



# Universidad Nacional Autónoma de México

---

---

**Facultad de Estudios Superiores Iztacala**

**Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del  
Instituto Politécnico Nacional**

“Caracterización de los bacteriófagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$   
pertenecientes a una colección de fagos que infectan  
cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*”.

**TESIS QUE PRESENTA:**

*Adrián Cazares López*

**PARA OBTENER EL GRADO DE:**

*Biólogo*

**CODIRECTORES DE LA TESIS:**

*Dr. Gabriel Guarneros Peña*

*M. en C. Omar Alejandro Sepúlveda Robles*

México, DF.

Agosto del 2010



Universidad Nacional  
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

**Biblioteca Central**



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

**“Nothing in Biology Makes Sense Except in the Light of Evolution”**

Theodosius Dobzhansky, 1973

*(The American Biology Teacher; 35:125-129)*

Este trabajo se realizó bajo la codirección del Dr. Gabriel Guarneros Peña y el M. en C. Omar Alejandro Sepúlveda Robles en el laboratorio 3 del Departamento de Genética y Biología Molecular del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional.

## **Agradecimientos**

### **A mi familia:**

A mi padre que vive en mi memoria y mi corazón, y cuyo recuerdo alimenta mis aspiraciones y deseos de seguir adelante.

A mi madre a quien le debo todo, porque con el ejemplo me ha enseñado a luchar en la vida y no rendirme ante cualquier adversidad por difícil que parezca.

A mi hermano, mi mejor amigo, quien comparte conmigo ilusiones y sueños y me enseña y demuestra a diario el espíritu de ser competitivo y las ganas de ganar en todos los aspectos.

Gracias por apoyarme siempre y por estar en mi mente en cada decisión que tomo en la vida, lo que hago es por ustedes.

### **A mis amigos:**

A mis amigos de la carrera y de la vida: Jatziry, Dilia, Sonia, Ilce, Alma, Sayra, Luis, Charly, Ángel y Erik. De todos ustedes he aprendido demasiado. En particular a Jacob, gracias hermano por ser cómplice en toda la carrera y porque todavía hay muchos proyectos sin terminar y otros por iniciar.

A mis amigos del cinvestav: Yuritza, Pako, Enith, Rubén, Azucena, Victor, Ruth, Serafin, Marco, Cesar, Manuel, Mine y Angeles. Gracias a todos por ayudarme y por hacer agradable la estancia en el CINVESTAV. En particular a Vania, gracias amiga por ofrecerme tu invaluable amistad y por los proyectos que vienen.

### **A la persona especial:**

Un agradecimiento especial a Stephany, porque igual de especial es en mi vida. Gracias princesa por entrar en mi vida y compartir tantos momentos conmigo que ya se han convertido en recuerdos imborrables. Gracias por que a pesar de las etapas difíciles aún quedan muchos días por compartir.

*Gracias a todos por compartir algo de su vida conmigo y formar parte de la mía, no hay forma de explicar cuanto los aprecio.*

## **A mis sinodales y asesores:**

Al Dr. Gabriel Guarneros Peña por permitirme el gran honor de trabajar en su laboratorio y bajo su dirección. Gracias por las observaciones críticas y por las aportaciones a este trabajo.

Al M en C. Omar Alejandro Sepúlveda Robles por ser el principal responsable de mi formación en el laboratorio y en el trabajo con bacteriófagos. Gracias por mostrarme el camino que dio forma a este trabajo.

A la M. en C. Eva Martínez Peñafiel por la atención brindada hacia mi persona y hacia este proyecto. Gracias por las enseñanzas y por los consejos que han contribuido de sobremanera a mi formación en la investigación.

Al Dr. Elias Piedra Ibarra por aceptar ser sinodal para esta tesis. Gracias por el tiempo dedicado a la revisión de este trabajo.

Al Dr. Rodolfo de la Torre Almaraz por mostrarme el increíble mundo de los virus. Gracias por lo enseñado en el curso de virología y que fue de gran ayuda en la realización de este trabajo.

A la M. en C. María Graciela Molina Gonzales por enseñarme lo impresionantes que son las bacterias. Hay poco espacio para agradecer todo lo enseñado, pero mil gracias por creer en mí y preocuparse por mi formación.

A la M. en C. Ma. De Jesus Laura Castañeda Partida por guiarme hacia el fascinante mundo de la ciencia. Gracias por que lo aprendido en clase fue determinante para elegir este camino de la investigación.

*Infinitas gracias por que los conocimientos son invaluable y ustedes han sido lo suficientemente bondadosos para compartirlos conmigo, y por que representan para mí un modelo a seguir.*

# Índice

Contenido	Página
<b>Índice</b>	<b>I</b>
<b>Índice de Figuras</b>	<b>II</b>
<b>Índice de Tablas</b>	<b>III</b>
<b>Resumen</b>	<b>IV</b>
<b>1. Introducción</b>	<b>1</b>
1.1. <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	1
1.2. Bacteriófagos	4
1.3. Clasificación de los bacteriófagos	7
<b>2. Antecedentes</b>	<b>10</b>
<b>3. Justificación</b>	<b>14</b>
<b>4. Objetivos</b>	<b>15</b>
4.1 Objetivo general	15
4.2 Objetivos particulares	15
<b>5. Esquema General de Trabajo</b>	<b>16</b>
<b>6. Materiales y métodos</b>	<b>17</b>
6.1. Bacterias y bacteriófagos	17
6.2. Tapices bacterianos	18
6.3. Propagación de bacteriófagos	19
6.4. Preparación de lisados fágicos en medio líquido	19
6.5. Preparación de lisados fágicos por placa confluyente	19
6.6. Titulación de lisados fágicos	20
6.7. Concentración de fagos con Polietilenglicol	20
6.8. Purificación de Fagos por gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio	20
6.9. Extracción del ADN	21
6.10. Ensayos de restricción	21
6.11. Microscopía electrónica de los fagos	21
6.12. Construcción de lisógenas	22
6.13. Rango de Hospedero	22
<b>7. Resultados</b>	<b>23</b>
7.1. Morfología de placa de los fagos	23
7.2. Construcción de Lisogénas	25
7.3. Rango de Hospedero	27
7.4. Microscopía electrónica	29
7.5. Patrones de Restricción	33
<b>8. Discusión</b>	<b>39</b>
<b>9. Conclusiones</b>	<b>48</b>
<b>10. Perspectivas</b>	<b>49</b>
<b>11. Referencias</b>	<b>50</b>
<b>12. Apéndice</b>	<b>57</b>

## Índice de Figuras

	Pagina
<b>Figura 1.</b> Ciclo Lítico y Lisógeno de los Bacteriófagos.	9
<b>Figura 2.</b> Morfotipos básicos de los bacteriófagos.	9
<b>Figura 3.</b> Placas líticas producidas por los fagos $\Phi 73$ y $\Phi 74$ .	24
<b>Figura 4.</b> Fotografías electrónicas del bacteriófago $\Phi 73$ .	31
<b>Figura 5.</b> Fotografías electrónicas del bacteriófago $\Phi 74$ .	32
<b>Figura 6.</b> Electroforesis del ADN de los fagos $\Phi 73$ y $\Phi 74$ cortado con las enzimas <i>HindIII</i> , <i>EcoRI</i> y <i>NdeI</i> .	37
<b>Figura 7.</b> Electroforesis del ADN del fago $\Phi 74$ cortado con las enzimas <i>DpnI</i> y <i>MboI</i> .	38
<b>Figura 7.</b> Comparación entre las morfologías de $\Phi 73$ y YuA.	44
<b>Figura 8.</b> Comparación entre las morfologías de $\Phi 74$ y LUZ1.	45
<b>Figura Suplementaria 1.</b> Morfotipos básicos de fagos de <i>P. aeruginosa</i> con cola.	57
<b>Figura Suplementaria 2.</b> Reporte del análisis hecho por el programa Quantity One para los ensayos de restricción de los fagos $\Phi 73$ y $\Phi 74$ .	58



## Índice de Tablas

	<b>Pagina</b>
<b>Tabla 1.</b> Clasificación actual de los bacteriófagos.	<b>8</b>
<b>Tabla 2.</b> Aislados clínicos de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> .	<b>17</b>
<b>Tabla 3.</b> Titulación de los lisados fágicos.	<b>23</b>
<b>Tabla 4.</b> Tabla de construcción de lisógenas para los fagos $\Phi 73$ y $\Phi 74$ .	<b>28</b>
<b>Tabla 5.</b> Rango de Hospedero de los fagos $\Phi 73$ y $\Phi 74$ .	<b>30</b>
<b>Tabla 6.</b> Datos morfométricos de los fagos $\Phi 73$ y $\Phi 74$ .	<b>33</b>
<b>Tabla 7.</b> Tamaño estimado del genoma de los fagos $\Phi 73$ y $\Phi 74$ .	<b>35</b>
<b>Tabla 8.</b> Grupos morfológicos básicos de bacteriófagos.	<b>43</b>
<b>Tabla 9.</b> Características generales de los fagos $\Phi 73$ , $\Phi 74$ , YuA, LAD2, LPB1 y LUZ1	<b>47</b>
<b>Tabla Suplementaria 1.</b> Clasificación y morfología general de fagos de <i>P. aeruginosa</i> con cola.	<b>59</b>
<b>Tabla Suplementaria 2.</b> Reporte del análisis hecho por el programa Quantity One para los ensayos de restricción mostrados en las figuras 6 y 7.	<b>59</b>

## RESUMEN

*Pseudomonas aeruginosa* es una bacteria patógena oportunista ampliamente distribuida en la naturaleza (Lyczak *et al.* 2000). Su habilidad de expresar una gran variedad de factores de virulencia y su capacidad intrínseca de resistencia a antibióticos la han convertido en un grave problema de salud en centros hospitalarios (Govan y Deretic, 1996). Esto ha llevado a explorar estrategias alternativas para combatir sus infecciones, y entre ellas, el uso de bacteriófagos con fines terapéuticos ha surgido con un potencial interesante (Sulakvelidze *et al.* 2001; Hagens *et al.* 2004).

Los bacteriófagos o fagos son virus exclusivos de bacterias. Desde su descubrimiento por Frederick Twort y Félix d'Hérelle en 1915 y 1917 respectivamente, han sido clave en el desarrollo de la biología molecular, han permitido el diseño de técnicas innovadoras en la terapéutica y el área de diagnóstico y se han convertido en un importante modelo de estudio en la biología (d'Hérelle, 1924; Abedon, 2008; Kutter, 2008).

En años recientes, el interés en el estudio de los fagos se ha incrementado debido a la reconsideración de su potencial terapéutico (Thiel, 2004). Esto ha conducido al aislamiento de fagos capaces de infectar bacterias de importancia médica como *Pseudomonas aeruginosa*, sin embargo, es necesario caracterizarlos para obtener información sobre su biología básica y establecer la base de estudios posteriores. Por esta razón, en este trabajo se dispuso caracterizar a los fagos de *P. aeruginosa*  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  de la colección reunida por Sepúlveda en 2007, en base a la morfología de sus placas líticas, el tipo de desarrollo, el rango de hospedero, el patrón de restricción de su ADN y la morfología de sus viriones.

Los resultados muestran que  $\Phi 73$  es un fago temperado que forma placas líticas turbias sobre su cepa huésped (ps-53), fue capaz de infectar a 9 de 50 cepas probadas y su ADN fue sensible al corte con las enzimas de restricción *HindIII*, *EcoRI* y *NdeI*. Por su parte,  $\Phi 74$  es un fago lítico que produce placas claras, infectó 7 cepas de 50 probadas y su ADN fue resistente al corte con las enzimas *HindIII*, *EcoRI*, *NdeI* y *DpnI*, y solo fue sensible al corte con *MboI*. Finalmente, la microscopía electrónica mostró que ambos fagos forman parte de la familia taxonómica *Siphoviridae* perteneciente al orden *Caudovirales*.

# 1) INTRODUCCIÓN

## 1.1. *Pseudomonas aeruginosa*

*Pseudomonas aeruginosa* es un bacilo gram negativo, aerobio y no esporulado capaz de producir pigmentos fluorescentes como la pioverdina y la piocianina, utilizados en su identificación bioquímica (Gilligan, 1995). Esta bacteria, ampliamente distribuida en la naturaleza, prospera en ambientes húmedos y tiene la habilidad de expresar una gran variedad de factores de virulencia. Esto le permite infectar a plantas, nemátodos, insectos y animales superiores. (Lyczak *et al.* 2000).

*P. aeruginosa* posee un genoma muy particular tanto en contenido como en estructura y en él residen todas las cualidades de esta bacteria. El tamaño aproximado del único cromosoma circular que compone el genoma de *P. aeruginosa* es de 6.3 millones de pares de bases ([www.pseudomonas.com](http://www.pseudomonas.com)). Este comprende un mosaico con bloques de genes altamente conservados en la especie (90%), interrumpidos por secuencias variables entre las cepas (10%) adquiridas por transferencia horizontal de genes (Wolfgang *et al.* 2003). A partir de esta composición, *P. aeruginosa* es capaz de adaptar su expresión genómica para sobrevivir en un amplio rango de reservorios ambientales (Mathee *et al.* 2008).

Otra característica de esta bacteria es su capacidad intrínseca de resistencia a antibióticos (Govan y Deretic, 1996). *P. aeruginosa* posee de forma natural estos genes de resistencia, a diferencia de otras bacterias que los adquieren por transferencia de islas de patogenicidad. De hecho, todas las cepas de *P. aeruginosa* son capaces de producir  $\beta$ -lactamasas de espectro extendido causantes de la resistencia hacia antibióticos de amplio espectro como la penicilina (Georgiev, 1998).

Todas las cepas de *P. aeruginosa* son potencialmente patógenas para el hombre, no obstante, la infección por esta bacteria es de carácter oportunista y se restringe a personas inmunocomprometidas, incluyendo pacientes con cáncer o que sufren de quemaduras o infecciones virales (Kielhofner *et al.* 1992). Los blancos de infección más frecuentes en el organismo son los tejidos blandos y el tracto respiratorio y urinario, lo cual origina problemas como endocarditis y una variedad de bacteriemias primarias (Lyczak *et al.* 2000; Bodey *et al.* 1983).

Es importante mencionar que individuos que padecen de fibrosis quística son especialmente vulnerables a la infección por este patógeno. *P. aeruginosa* coloniza eficientemente el tracto respiratorio de estos pacientes debido al ambiente característico que ofrecen sus pulmones, y a medida que progresa la infección se da la conversión a fenotipos mucoides que producen grandes cantidades de alginatos (Smith *et al.* 2006). Una vez que se establecen las cepas mucoides en los pulmones de estos pacientes, la infección se vuelve muy difícil de erradicar y la enfermedad llega a una etapa terminal. Esto se debe a que las cepas no pueden ser eliminadas por el sistema inmune y presentan un aumento en la capacidad de resistencia a antibióticos (Drenkard y Ausubel, 2002; Boles *et al.* 2004).

Por otra parte, en ambientes acuosos esta bacteria puede adherirse y comenzar a producir un agregado denominado biopelícula. La formación de este cúmulo de bacterias y material extracelular implica un problema en centros hospitalarios ya que contamina dispositivos que se implantan dentro del cuerpo (p. ej. dispositivos intrauterinos, catéteres, válvulas cardíacas, etc.). Además, puede provocar taponamiento y corrosión de conexiones y filtros, por lo que se considera también un problema en las industrias (Drenkard, 2003; Costerton *et al.* 1994).

En la actualidad *P. aeruginosa* representa un problema importante de salud y es considerada un microorganismo reemergente infeccioso debido a su amplia gama de factores de virulencia. Su infección se asocia con estancias prolongadas en los centros hospitalarios y presenta una mortalidad aproximada de 40-50% (Giamarellou, 2002; Weingarten *et al.* 2003). La generación constante de nuevas cepas de *P. aeruginosa* y la persistencia de aislados clínicos resistentes a antibióticos, han llevado a explorar estrategias alternativas para el manejo de infecciones por este patógeno. Entre ellas, el uso de bacteriófagos con fines terapéuticos presenta un potencial atractivo que ha sido poco estudiado (Sulakvelidze *et al.* 2001; Hagens *et al.* 2004).

## 1.2. Bacteriófagos

Los bacteriófagos o fagos fueron descubiertos por Frederick Twort y Félix d'Hérelle en 1915 y 1917, respectivamente. Las primeras investigaciones con fagos estuvieron enfocadas a definir su naturaleza bioquímica. Sin embargo, el creciente progreso en su análisis los convirtió en un importante modelo de estudio en la biología. Los fagos además, jugaron un papel fundamental en el desarrollo de la biología molecular (Abedon, 2008), permitiendo el diseño de técnicas innovadoras en la terapéutica y el área de diagnóstico (d'Hérelle, 1924; Kutter, 2008).

Los fagos son virus exclusivos de bacterias. Como todos los virus, están constituidos por una cubierta proteica o cápside que protege algún tipo de ácido nucleico, ya sea ADN o ARN de cadena sencilla o doble. En el caso del fago Ch1 de *Natronobacterium magadii*, su genoma puede contener DNA y RNA (Whitte *et. al.*, 1997).

La morfología de los fagos es altamente variable, mucho más que la de cualquier otro grupo viral. Su tamaño oscila entre 20 y 200 nm. La mayoría presentan cápsides con estructuras a manera de cabeza y cola que varían de forma y tamaño entre los grupos de fagos, no obstante, hay algunos que presentan cápsides con una apariencia filamentosa (Figura 2). Las cabezas pueden ser icosaédricas u octaédricas y pueden estar elongadas. Las colas son cilíndricas, pueden ser flexibles o contráctiles, tener apariencia estriada e incluso presentar estructuras terminales y subterminales como espinas, fibras, protuberancias, placas basales o estructuras cruciformes (Bradley, 1967; Morgan y Pitts, 2008).

Los fagos, durante su ciclo de infección, pasan a través de un estado extracelular en el cual son metabólicamente inertes (Abedon, 2009). Para

entrar e infectar una bacteria, estos se acoplan a receptores específicos de la superficie bacteriana (lipopolisacáridos, ácidos teicoicos, proteínas, pili o flagelos) en un proceso denominado adsorción. Ellos se propagan solo en ciertas bacterias según los receptores que estas presenten, es decir, el acoplamiento determina la especificidad de infección. Debido a que los fagos no tienen motilidad, dependen de encuentros al azar con los receptores adecuados para poder adsorberse y una vez que encuentran una bacteria susceptible (hospedero), utilizan distintos mecanismos para inyectar su material genético (Morgan y Pitts, 2008).

Según el tipo de desarrollo que siguen los fagos, se les puede clasificar en dos grandes grupos, líticos o virulentos y temperados (Duckworth, 1987). Los fagos virulentos siguen exclusivamente una vía lítica (Figura 1). En este tipo de desarrollo el virus se apodera del metabolismo de la célula hospedera para transcribir, traducir y replicar su genoma. La expresión de los genes del fago culmina con la formación de nuevas partículas virales capaces de iniciar un nuevo ciclo de infección y su liberación mediante la lisis de la bacteria (Campbell, 2003).

Por su parte, los fagos temperados pueden seguir tanto la vía lítica como la vía lisógena (Figura 1). Esta última se caracteriza por la represión de la expresión génica del fago, y en la mayoría de los casos, por la integración del ADN viral dentro del genoma de la bacteria (Hendrix *et al.* 1999). El ADN viral integrado o profago mantiene silenciados la mayoría de sus genes y puede ser replicado y heredado indefinidamente a futuros descendientes como parte del genoma bacteriano. Este estado de latencia es mantenido hasta que las condiciones del medio se vuelven desfavorables (p. ej. disminución de nutrientes o presencia de agentes mutagénicos), y en tales circunstancias el profago es desreprimido y sigue una vía de desarrollo lítico (Lavigne *et al.* 2008). Algunos fagos temperados como el colifago P1 no

integran su ADN dentro del cromosoma bacteriano y este persiste de forma episomal en la célula (Calendar 2006).

Bacterias que contienen un profago son conocidas como lisógenas. Cepas de este tipo presentan la propiedad de ser inmunes o resistentes a la infección por el mismo tipo de fago que albergan o por otros fagos emparentados con el fago temperado original (Lwoff, 1953).

Por otra parte, varias investigaciones sobre ecología de fagos establecen que pueden ser encontrados en la mayoría de los ambientes interactuando con la totalidad de las poblaciones bacterianas (Chibani-Chennoufi *et al.* 2004). De hecho, se estima que hay cerca de  $10^{31}$  bacteriófagos en la biosfera, por lo que son considerados los agentes biológicos más ubicuos y la fuente de diversidad génica más grande (Hendrix, 2005; Breitbart *et al.* 2002).

En años recientes, el interés en el estudio de los bacteriófagos se ha incrementado debido al reconocimiento de su importancia ecológica (Suttle, 2007), su participación constante en transferencia horizontal de genes y conversión lisogénica (McGrath *et al.* 2004), su papel esencial en el origen de la vida y la evolución (Forterre, 2006) y a la reconsideración de su potencial terapéutico (Thiel, 2004).



### 1.3. Clasificación de los Bacteriófagos

Clasificar a los fagos y relacionarlos entre sí siempre ha representado un problema debido a su gran diversidad. Desde su descubrimiento, la clasificación de bacteriófagos se ha ido modificando, no obstante, la morfología de la cápside (cabeza y cola) y las características del genoma se han mantenido como los principales criterios a considerar (Luria *et al.* 1943; Lwoff *et al.* 1962; Thomas y Abelson, 1966).

En 1967 se obtuvo un avance considerable en la clasificación cuando Bradley llegó al reconocimiento de seis morfotipos básicos de fagos (Figura 2): fagos con cola contráctil, con colas largas o cortas no contráctiles, cúbicos, cúbicos con cápsomeros grandes y filamentosos (Bradley, 1967). Pero fue hasta finales de los 90's que el Comité Internacional de Taxonomía de Virus (ICTV por sus siglas en inglés) publicó la clasificación oficial de virus bajo un sistema jerárquico. De esta forma, el ICTV definió una especie viral como una clase de virus que tienen un gran número de características en común aunque no son idénticos entre sí (grupo politético), y que constituyen un linaje de replicación y ocupan un hospedero particular (Pringle 1991).

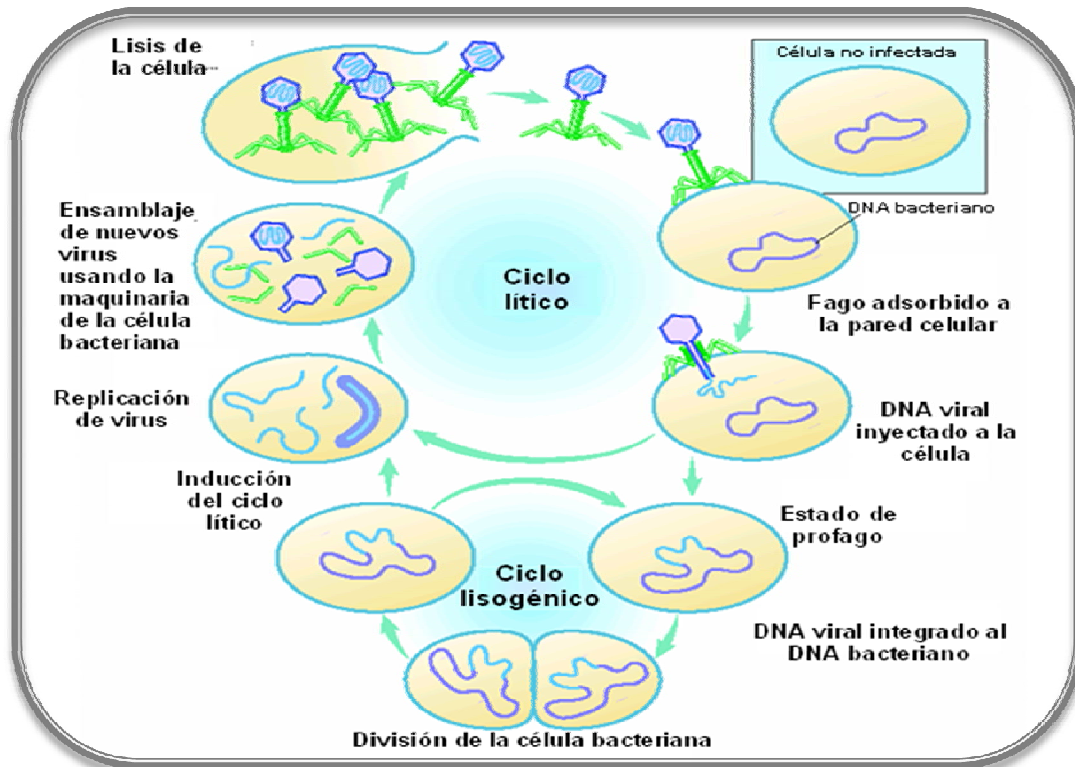
Actualmente, el esquema taxonómico de fagos elaborado por el ICTV reconoce 1 orden, 13 familias y 31 géneros de bacteriófagos (Tabla 1) (Calendar, 2006). Los fagos con cola, ADN de doble cadena (ADNdc) y genoma monopartita forman el grupo más grande y están clasificados en el orden *Caudovirales* al que pertenecen tres familias: *Myoviridae* (fagos con colas largas contráctiles como los fagos T4 y Mu), *Siphoviridae* (fagos con colas largas no contráctiles como los fagos T1 y  $\lambda$ ) y *Podoviridae* (fagos con cola corta no contráctil como los fagos P22 y T7) (Fauquet *et al.* 2005).

Simetría	Ac. Nucléico	Orden o Familia	Géneros	Miembros	Particularidades
Binaria	ADN, dc, L	<i>Caudovirales</i>	15	4950	Cola
		<i>Myoviridae</i>	6	1243	Cola contráctil
		<i>Siphoviridae</i>	6	3011	Cola larga no contráctil
		<i>Podoviridae</i>	3	696	Cola corta no contráctil
Cúbica	ADN, cs, C	<i>Microviridae</i>	4	40	Cápside isométrica consistente de 12 cápsomeros*
	dc, C, T	<i>Corticoviridae</i>	1	3	Cápside compleja, lípidos
	dc, L	<i>Tectiviridae</i>	1	18	Vesícula lipoproteica interna
	ARN, cs, L	<i>Leviridae</i>	2	39	Cápside redonda consistente de 32 cápsomeros*
	dc, L, S	<i>Cystoviridae</i>	1	1	Envoltura, lípidos
Helicoidal	ADN, cs, C	<i>Inoviridae</i>	2	57	Filamentoso o varilla
	dc, L	<i>Lipothrixviridae</i>	1	6	Envoltura, lípidos
	dc, L	<i>Rudoviridae</i>	1	2	Semejante a TMV (Virus del Mosaico del Tabaco)
Pleomórfica	ADN, dc, C, T	<i>Plasmaviridae</i>	1	6	Envoltura, lípidos, sin cápside
	dc, C, T	<i>Fusseloviridae</i>	1	8	Forma de uso, sin cápside

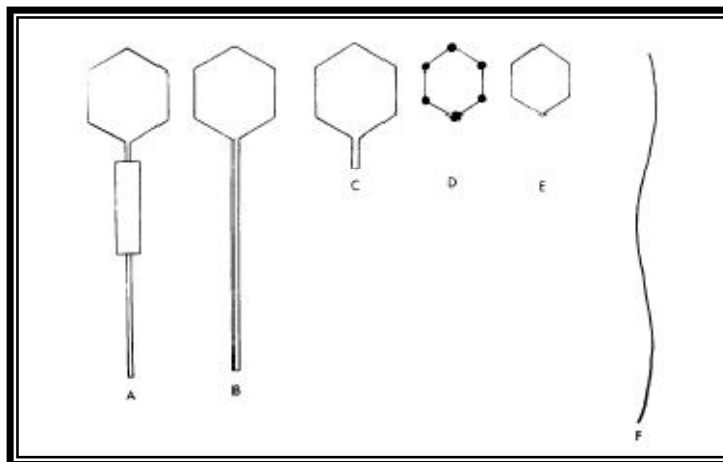
*\*Información actualizada de la web del ICTV, 2009.*

C: Circular  
L: Lineal  
S: Segmentado  
T: Superhelicoidal  
cs: Cadena Sencilla  
dc: Doble Cadena

**Tabla 1.** Clasificación actual de los bacteriófagos (Tabla modificada a partir de Calendar, 2006)



**Figura 1.** Ciclo Lítico y Lisogénico de los Bacteriófagos



**Figura 2.** Morfotipos básicos de los bacteriófagos. (Bradley, 1967) A: fago con cola contráctil, B: fago con cola larga no contráctil, C: fago con cola corta contráctil, D: fago cúbico con cápsomeros grandes ARN, E: fago cúbico con cápsomeros pequeños, F: fago filamentosos.

## 2) ANTECEDENTES

Desde su descubrimiento, los fagos han sido estudiados intensamente mediante diferentes técnicas, logrando un entendimiento considerable sobre la biología de los mismos. La primera característica observada en los fagos fue su capacidad de infectar específicamente a un tipo de hospedero bacteriano (Evans, 1934). Posteriormente, en la década de los 40's, el desarrollo de la microscopía electrónica reveló la gran variedad de formas y tamaños encontrados en este grupo viral (Luria *et al.* 1943). Pocos años después, con el establecimiento de la biología molecular, se desarrollaron técnicas innovadoras que permitieron definir el tipo y tamaño de los genomas fágicos (Thomas y Abelson, 1966). En la actualidad, la especificidad de infección, la morfología de la partícula fágica y la naturaleza del genoma son los criterios que conforman la base de la caracterización de bacteriófagos (Morse, 1994).

En la última década, se ha incrementado de manera importante el interés en el estudio de los fagos. Como consecuencia, muchos grupos de investigación han aislado y establecido grandes colecciones de fagos capaces de infectar bacterias de importancia médica o industrial (Carey-Smith *et al.* 2006; Jamalludeen *et al.* 2007; Sepúlveda, 2007; Stenholm *et al.* 2008). Debido al problema de salud que representa *Peudomonas aeruginosa*, ha resultado un blanco idóneo para la búsqueda y caracterización de fagos que sean capaces de infectarla.

A la fecha, varios fagos de *P. aeruginosa* han sido aislados y caracterizados, la mayoría pertenecientes al orden *Caudovirales*, incluidas las familias *Siphoviridae* (p. ej. D3112, DMS3, D3, YuA, M6, MP22, B3 y SD1), *Podoviridae* (p. ej.  $\Phi$ KMV, LKA1, LKD16 y F116), y *Myoviridae* (p. ej.  $\Phi$ KZ y  $\Phi$ CTX) (Darzins y Casadaban, 1989; Kutter, 2008). Entre los mejor caracterizados, se encuentran el miovirus lítico  $\Phi$ KZ y los siphovirus temperados D3112 y DMS3. Estos han sido sujetos a extensas investigaciones recientemente debido a su

potencial terapéutico y biotecnológico, respectivamente (Mesyanzhinov *et al.* 2002; Budzik *et al.* 2004; Miroshnikov *et al.* 2006; Briers *et al.* 2007; Fokine *et al.* 2007; Paradis-Bleau *et al.* 2007).

Varios investigadores han hecho estudios importantes con fagos de *P. aeruginosa*. Entre ellos, Bradley en 1967 realizó una revisión detallada de la ultraestructura de los bacteriófagos y entre ellos describió la morfología general de los fagos del género *Pseudomonas*. En este trabajo Bradley definió seis morfotipos básicos de fagos (Figura 2) y concluyó que para fagos de *Pseudomonas* solo está ausente el grupo D. Asimismo, menciona que los representantes del grupo B en este género usualmente presentan estructuras en la cola que los hacen distintivos de otros grupos de fagos. Finalmente, determinó que este grupo en particular presenta una gran diversidad morfológica (Bradley, 1967).

De forma similar, Ackermann y colaboradores en 1988 llevaron a cabo un estudio minucioso de fagos de *P. aeruginosa* mediante microscopía electrónica. En este trabajo se describió la morfología de 18 fagos pertenecientes al set de tipificación de Lindberg (Lindberg *et al.* 1964). Todos los fagos se clasificaron dentro del orden Caudovirales con representantes de las tres familias relacionadas a dicho orden. Además, en base a características como: dimensiones de la cabeza y cola, simetría y forma de la primera, y presencia de envoltura, estrías o estructuras terminales y subterminales en la segunda, se llegó a la asignación de 8 morfotipos básicos para fagos de *P. aeruginosa* (Ver apéndice, Figura suplementaria 1, Tabla suplementaria 1).

Otras investigaciones se han enfocado al aislamiento de los fagos a partir de distintas fuentes para su caracterización posterior. Ejemplo de ello es el trabajo de Yun-Jeong Heo y colaboradores en 2007, quienes aislaron al bacteriófago MP22 a partir de una cepa clínica de *P. aeruginosa* de Corea. Este fue

caracterizado como un siphovirus de morfología similar a la del fago lambda y con genoma de ADN de doble cadena (Yun-Jeong Heo *et al.* 2007). Un ejemplo más es el trabajo de Ceysens y colaboradores en 2008, en el cual se aisló al fago YuA de un estanque de Moscú, Rusia. El reporte de su caracterización identificó un genoma de ADN de cadena doble resistente a la restricción por varias enzimas y una morfología peculiar con una cabeza elongada y una cola flexible con fibras terminales y subterminales. (Ceysens *et al.* 2008).

Entre los trabajos mas recientes al respecto, Ceysens y colaboradores en 2009 aislaron 15 fagos de *P. aeruginosa* a partir de fuentes naturales y hospitalarias de 14 países. El objetivo principal de dicho estudio fue investigar la diversidad de este grupo viral y evaluar su potencial en fagoterapia. La caracterización de los fagos se hizo por perfiles de restricción del ADN, análisis de rango de hospedero y microscopía electrónica. Los resultados mostraron que los 15 fagos aislados eran líticos y en conjunto eran capaces de lisar al 87% de las cepas probadas en el rango de hospedero. Todos ellos presentaron perfiles de restricción únicos, pero sus características morfológicas los asociaron dentro de las tres familias del orden *Caudovirales* (Ceysens *et al.* 2009).

Finalmente, un trabajo similar se llevó a cabo en nuestro laboratorio (Sepúlveda, 2007). Una colección de 72 fagos específicos para *P. aeruginosa* fueron aislados de distintas muestras de agua y como hospederos se utilizaron diferentes aislados clínicos de la bacteria provenientes del Instituto Nacional de Pediatría. Los fagos fueron caracterizados por rango de hospedero, morfología de placa lítica y patrones de restricción con las enzimas *HindIII* y *EcoRI* para determinar su individualidad. De acuerdo a la morfología de placa, 46 fagos desarrollaron placas líticas claras y 26 fagos desarrollaron placas líticas turbias sobre su cepa huésped. El rango de hospedero fue obtenido para 15 fagos y fue distinto entre ellos. En cuanto a los patrones de restricción, fueron obtenidos para 40 fagos, de los cuales 38 fueron únicos, mientras que 16

fagos fueron resistentes a ambas enzimas y 3 sólo a la enzima *HindIII*. De los 72 fagos que fueron aislados, 13 aún no han sido caracterizados, entre ellos,  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$ .

*Pseudomonas aeruginosa* representa uno de los principales problemas en los centros hospitalarios debido a su capacidad intrínseca de resistencia a antibióticos, y su control se vuelve cada vez más difícil debido a la constante diversificación de sus cepas en la naturaleza. Los fagos, por su parte, ofrecen información valiosa y representan por sí mismos una alternativa atractiva para combatir las infecciones de este importante patógeno (Bull, 2008; Duffy y Turner, 2008; Kerr *et al.* 2008; Kutter, 2008). Esto exige el contar con el mayor número de fagos posibles y aumentar esfuerzos en la caracterización de los mismos. Debido a ello, en este trabajo se dispuso caracterizar 2 bacteriófagos capaces de infectar a *P. aeruginosa* a partir de criterios básicos que permitan su clasificación taxonómica y la obtención de información sobre su biología.

### 3) JUSTIFICACIÓN

La necesidad de alternativas para combatir al patógeno oportunista *P. aeruginosa*, ha conducido al aislamiento y caracterización de fagos capaces de infectarla. En este trabajo se dispuso caracterizar a los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  de la colección de Sepulveda 2007, para contribuir al conocimiento de la biología de los fagos y su aplicación en el control de infecciones de *P. aeruginosa*.



## 4) OBJETIVOS

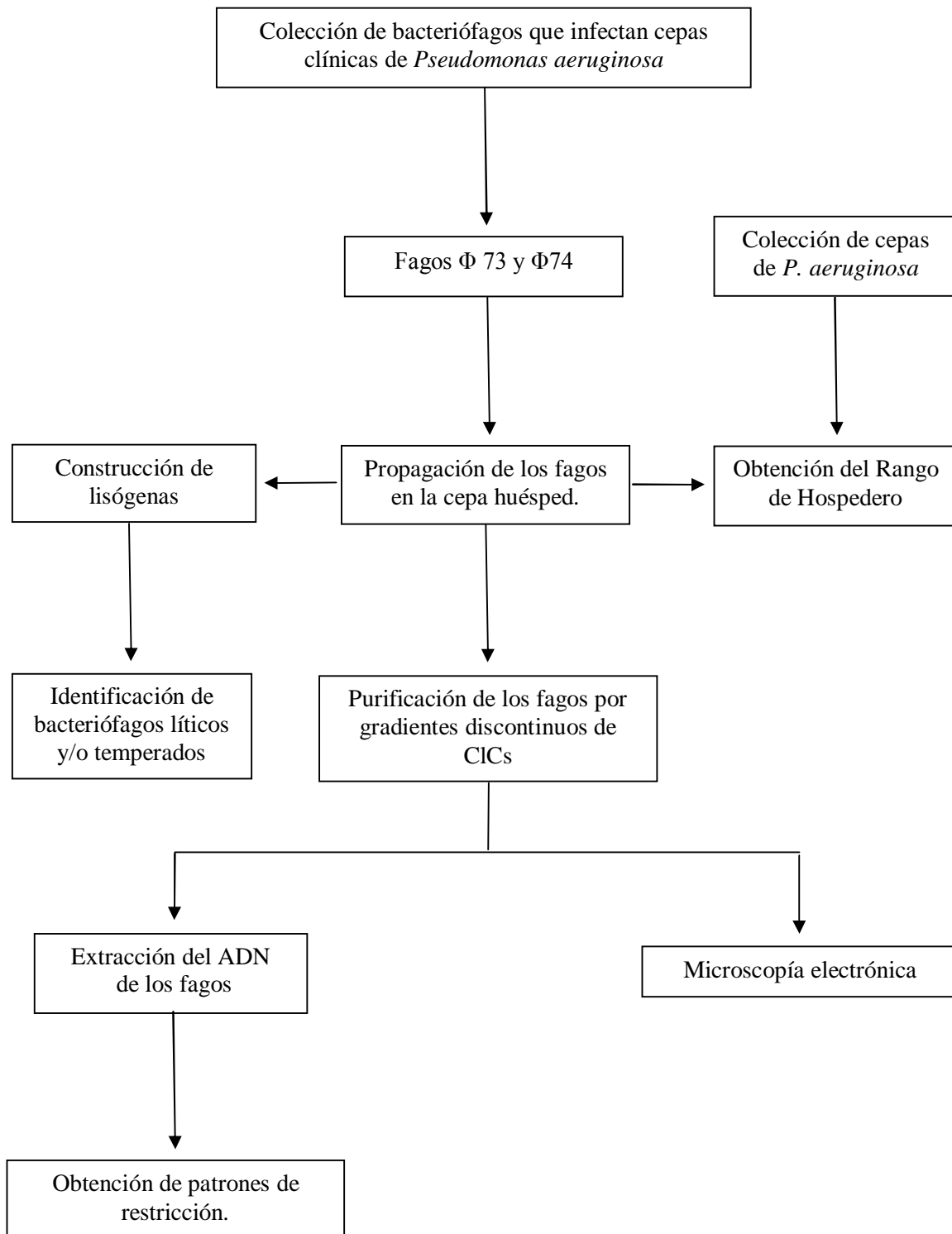
### 4.1 Objetivo General

Caracterizar a los bacteriófagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  pertenecientes a la colección de fagos que infectan cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*.

### 4.2 Objetivos particulares

1. Determinar la morfología de las placas líticas producidas por los fagos y obtener lisados fágicos con títulos mínimos de  $1 \times 10^{10}$  ufp utilizando a su cepa huésped.
2. Identificar el tipo de desarrollo de los bacteriófagos intentando construcción de lisógenas.
3. Determinar el rango de hospedero utilizando distintas cepas clínicas de *P. aeruginosa*.
4. Purificar a los bacteriófagos por gradientes discontinuos de cloruro de Cesio para la extracción de su ADN.
5. Obtener sus patrones de restricción con las enzimas *HindIII*, *EcoRI* y *NdeI*.
6. Identificar su morfología por microscopia electrónica.

## 5) ESQUEMA GENERAL DE TRABAJO



## 6) MATERIALES Y MÉTODOS

### 6.1 Bacterias y bacteriófagos.

Las bacterias utilizadas en este trabajo, así como su procedencia y el tipo de aislado clínico se enlistan en la Tabla 2. Para su propagación, las bacterias fueron sembradas en cajas petri con medio Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 37 °C. Los lisados bacterianos se realizaron en medio LB y el aislamiento de placas fágicas en cajas de medio TΦ. Los tapices bacterianos se hicieron utilizando medio TΦ semisólido.

Cepa	Procedencia	Tipo de Aislado
<b>Cepas Ps</b>		
<b>Ps-1</b>	Hospital 1 <sup>ro</sup> De Octubre	Expectoración
<b>Ps-8</b>	Hospital 1 <sup>ro</sup> De Octubre	Secreciones diversas
<b>Ps-9</b>	Cepas ATCC	-----
<b>Ps-10</b>	Cepas ATCC	-----
<b>Ps-11</b>	Hospital 1 <sup>ro</sup> De Octubre	Líquido de diálisis
<b>Ps-23</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-24</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-25</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-32</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-33</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-34</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-38</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-39</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-40</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-41</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-42</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-43</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-52</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-53</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-59</b>	INP	Hemocultivo
<b>Ps-61</b>	INP	Hemocultivo
<b>PAO1</b>	FES-Iztacala	-----

Cepas Fc		
Fc1	INP	Expectoración
Fc4	INP	Expectoración
Fc9	INP	Expectoración
Fc14	INP	Expectoración
Fc60	INP	Expectoración
Fc78	INP	Expectoración
Fc80	INP	Expectoración
Fc82	INP	Expectoración
Fc83	INP	Expectoración
Fc86	INP	Expectoración
Fc87	INP	Expectoración
Fc88	INP	Expectoración
Cepas HIM		
HIM9	HIM	Broncoaspirado
HIM10	HIM	-----
HIM11	HIM	Pus en zona de catéter
HIM12	HIM	-----
HIM13	HIM	-----
HIM14	HIM	-----
HIM15	HIM	Venopuncion
HIM19	HIM	Espujo
HIM20	HIM	Liquido cefalorraquídeo
HIM21	HIM	Liquido de válvula
HIM22	HIM	-----
HIM23	HIM	Liquido Pleural
HIM24	HIM	Higroma
HIM25	HIM	-----
HIM32	HIM	-----
HIM33	HIM	-----

**Tabla 2.** Aislados clínicos de *Pseudomonas aeruginosa*. Las cepas Ps y HIM provienen de casos nosocomiales diversos mientras que las cepas Fc provienen de casos de Fibrosis Quística. INP: Instituto Nacional de Pediatría; Fc: Fibrosis Quística; HIM: Hospital Infantil de México.

## 6.2 Tapices bacterianos.

Se inocularon 3ml de medio LB líquido con una colonia de la cepa bacteriana y se incubó en agitación continua (200 rpm) por toda la noche a 37 °C.

Posteriormente, en un tubo de ensayo estéril se adicionaron 300µl del cultivo bacteriano y 3 ml de medio TΦ suave previamente derretido. Se mezcló en vórtex y se vertió sobre una caja petri preparada con medio TΦ sólido para formar un tapiz bacteriano. Se dejó solidificar a temperatura ambiente y se incubo a 37 °C.

### **6.3 Propagación de bacteriófagos.**

Se gotearon 10 µl del stock de fagos en una caja con medio TΦ sólido, se dejó secar y se formó un tapiz bacteriano con la cepa huésped. Finalmente se incubo a 37 °C por toda la noche para permitir que el fago formara placas líticas aisladas.

### **6.4 Preparación de lisados fágicos en medio líquido.**

En un matraz estéril se agregaron 300 µl de un cultivo bacteriano de toda la noche, 2 placas líticas del fago y 20 µl de CaCl<sub>2</sub> 1M. Se dejó adsorber el fago durante 10 min y se adicionaron 30 ml de LB. El matraz se incubó a 37 °C en agitación continua (200 rpm) hasta la lisis de la bacteria (8-12 hrs). Posteriormente, se adicionaron 3 ml de cloroformo al lisado, se dejó reposar 15 min y se centrifugó a 10,509 g por 10 min para eliminar los restos celulares. Se tomó el sobrenadante, se pasó a un tubo Falcon estéril y se almacenó a 4 °C.

### **6.5 Preparación de lisados fágicos por placa confluyente.**

En un tubo Eppendorf se agrego 1 ml de medio SM y se colocaron 25 placas líticas del fago. El tubo se mantuvo en agitación continua a 4°C durante la noche. Posteriormente se adicionaron 100 µl de cloroformo y se agito por 10 min, se centrifugó a 10 509 g por 10 min y se recupero el sobrenadante que contiene a los fagos. Se tomaron 70 µl del sobrenadante y se mezclaron con 300 µl de un cultivo bacteriano de toda la noche para formar un tapiz bacteriano. Se incubo a 37°C por toda la noche y con un espátula se raspo el tapiz bacteriano y se coloco en un tubo falcón, se agregaron 25 ml de medio LB y se mantuvo en

agitación a 4°C por 2 hrs. Finalmente, se centrifugó a 10 509 g por 10 min, se recupero el sobrenadante y se almaceno a 4°C.

### **6.6 Titulación de lisados fágicos.**

Se hicieron 4 diluciones seriadas 1:100 del lisado a titular para formar las diluciones 10<sup>-2</sup>, 10<sup>-4</sup>, 10<sup>-6</sup> y 10<sup>-8</sup>. Se tomaron 5 µl de cada dilución y se gotearon en un tapiz bacteriano. Se dejo secar las gotas a temperatura ambiente y se incubo a 37 °C. Los títulos finales de los lisados se determinaron aplicando la siguiente fórmula matemática (Douglas, 1975):

$$\left( \frac{\text{No. de placas}}{\text{Vol. goteado en ml}} \right) \times [\text{Inverso de la ultima dilución con placas}] = \text{ufp/ml en el lisado}$$

*Donde: ufp = unidades formadoras de placas*

### **6.7 Concentración de fagos con Polietilenglicol.**

A 25 ml de lisado fagico con un título mínimo de 1x10<sup>10</sup> se le agregó DNAsa y RNAsa a una concentración final de 1µg/ml y se incubó a 37°C/30 min. Posteriormente se adicionó Polietilenglicol 8000 (PEG-8000) y Cloruro de Sodio (NaCl) a una concentración final del 16% y 1M respectivamente. Se incubo en hielo durante toda la noche y se centrifugó a 10,509 g por 30 min. Se decanto el sobrenadante y la pastilla de fago se resuspendió en 1ml de medio SM. Se agregó un volumen de cloroformo, se agito en vortex y se centrifugó a 8,944 g por 10 min para eliminar el PEG-8000. Se tomó la fase acuosa y se almacenó a 4°C.

### **6.8 Purificación de Fagos por gradientes discontinuos de Cloruro de Cesio.**

El gradiente discontinuo se realizó utilizando cuatro soluciones de cloruro de cesio con una densidad de 1.7, 1.5, 1.3 y 1.08. La muestra del fago que se precipito con PEG se diluyó con 1 volumen de la solución con densidad de 1.08 y se colocó en la parte superior del gradiente. Una vez preparado el gradiente se

centrifugó a 22,000 rpm durante 2:30hrs a 4°C utilizando tubos ultra-clear de Beckman de 12.5 ml y una ultracentrífuga Optima XL-100K de Beckman con el rotor SW40Ti. Posteriormente, se extrajo la banda del fago utilizando una jeringa con aguja de 25G. La banda del fago se dializó con solución de diálisis para eliminar el exceso de sales.

### **6.9 Extracción del ADN.**

A la muestra de fago dializada se le agregó un volumen equivalente de fenol-cloroformo, se mezcló con vórtex y se centrifugo a 5,724 g por 5 min. Se tomo la fase acuosa y se agregó un volumen de cloroformo, se mezcló con ayuda del vórtex y se centrifugó a 5,724 g por 5 min. Se tomó la fase acuosa y se adicionaron dos volúmenes de etanol absoluto para precipitar el ADN. Se centrifugó a 17,530 g por 30 min para empastillar el ADN.

Se lavó con etanol al 70% y se centrifugo a 8,944 g por 10 min. Se decanto el sobrenadante y se seco a baja temperatura. Finalmente se resuspendió en 20  $\mu$ l de agua inyectable estéril y se mantuvo a -20°C hasta su uso.

### **6.10. Ensayos de restricción.**

Las reacciones de restricción se realizaron utilizando 500 ng de ADN y 2 unidades de enzima en un volumen final de 20  $\mu$ l. Se incubaron a 37°C por 12 hrs y se analizaron en un gel de agarosa al 0.9%. Como marcador se utilizo a 1Kb plus leader de Invitrogen.

### **6.11. Microscopía electrónica de los fagos.**

Se tomaron 10  $\mu$ l de la muestra de fago purificado por cloruro de cesio y se colocaron sobre una rejilla de cobre recubierta con una película de formval al 0.3%, se dejo reposar por 3 minutos y se seco el exceso de muestra con papel filtro cuidando no tocar el centro de la rejilla. Se agregaron 10  $\mu$ l de acetato de uranilo al 2% e inmediatamente se retiro el exceso de líquido con papel filtro. Nuevamente se colocaron 10  $\mu$ l de acetato de uranilo al 2% por 30 segundos y

se eliminó el exceso de uranilo. Finalmente se colocaron 10  $\mu$ l de acetato de uranilo y se dejó reposar durante 2 minutos. Posteriormente se eliminó el exceso de uranilo. Las preparaciones se observaron en un microscopio electrónico de transmisión JOEL 2000EX a diferentes aumentos.

### **6.12. Construcción de lisógenas.**

A partir de spots hechos sobre tapices bacterianos se intentó la construcción de lisógenas de los fagos de la siguiente manera: Se picó con un asa de siembra el centro de los spots producidos por los fagos, se hizo un estriado en cajas con medio LB y se incubaron a 37°C durante toda la noche para permitir el crecimiento de colonias bacterianas. Posteriormente se tomaron diez colonias aisladas y se realizaron tres pases de sembrado para cada una. Las colonias aisladas en el tercer pase fueron sembradas en medio líquido LB durante 12 hrs. A partir de este cultivo se hicieron tapices bacterianos que fueron retados contra el fago para determinar resistencia a su infección. Para determinar la producción de fagos por las lisógenas, se tomó 1 ml del cultivo, se centrifugó a 10,000 g por 10 min y el sobrenadante se reto con tapices de la cepa silvestre.

### **6.13. Rango de Hospedero.**

El ensayo consistió en crear una matriz de infección de los fagos contra una colección de cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Para ello se formó un tapiz de las cepas a probar y se gotearon 5  $\mu$ l de un stock fágico con un título de  $1 \times 10^8$  ufp. Posteriormente se incubaron a 37°C durante 12 hrs y se registraron los resultados con respecto a la formación de placas.



## 7) RESULTADOS

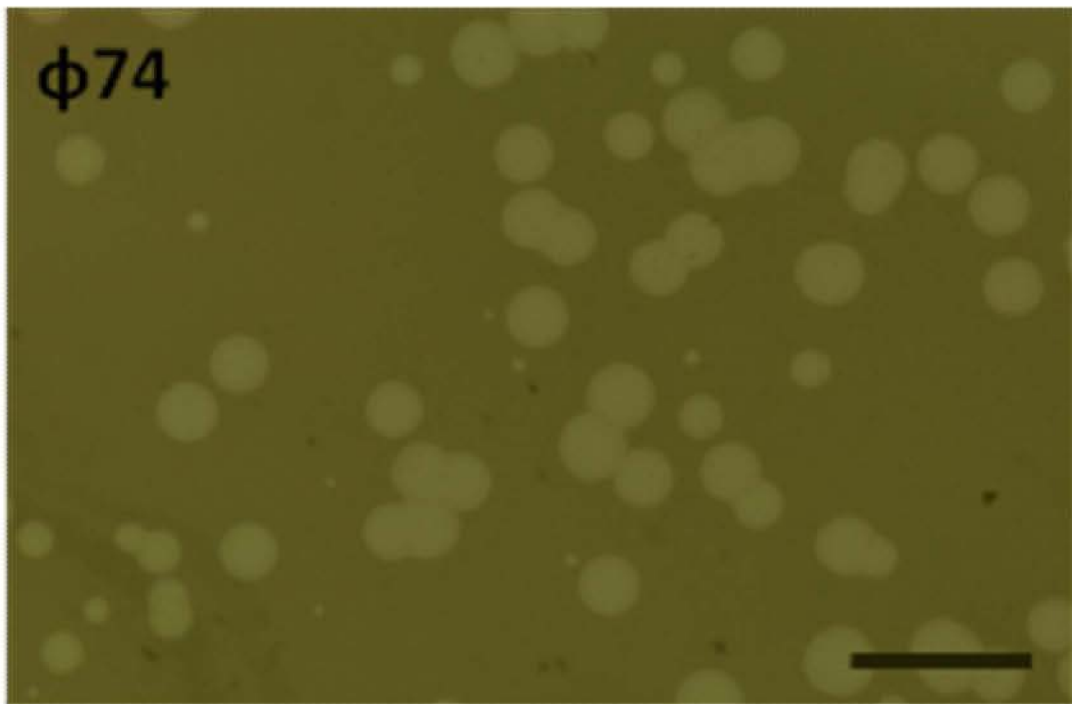
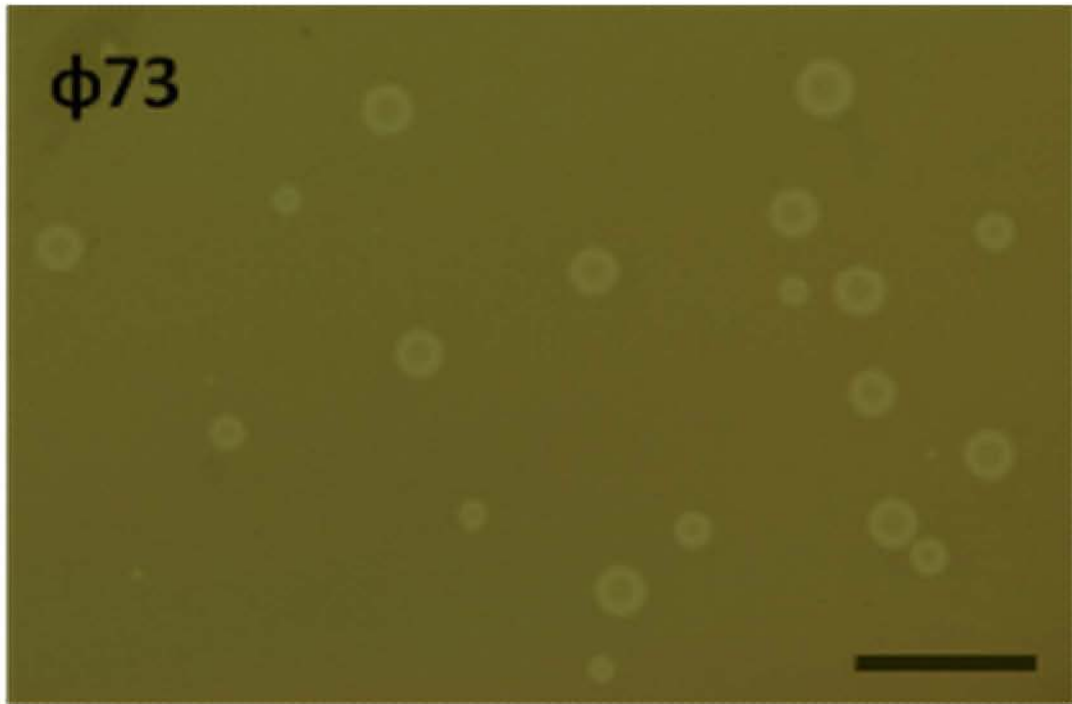
### 7.1 Morfología de placa de los fagos.

A partir de los lisados preparados en medio líquido con la cepa Ps-53, se registraron títulos de  $3 \times 10^8$  ufp para  $\Phi 73$  y  $2 \times 10^9$  para  $\Phi 74$ , los cuales estaban por debajo del título mínimo requerido ( $1 \times 10^{10}$  ufp) para la extracción de su ADN. Por tal motivo, se optó por utilizar la técnica de lisado por placa confluyente. Esta metodología permitió la obtención de lisados con títulos más altos:  $3 \times 10^{11}$  y  $5 \times 10^{11}$  ufp para el fago  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  respectivamente (Tabla 3).

Fago	Titulación de lisados fágicos	
	Lisado en Líquido	Placa confluyente
$\Phi 73$	$3 \times 10^8$ ufp	$3 \times 10^{10}$ ufp
$\Phi 74$	$2 \times 10^9$ ufp	$5 \times 10^{11}$ ufp

**Tabla 3.** Titulación de los lisados fágicos obtenidos en líquido y por placa confluyente. ufp: Unidades formadoras de placa.

La capacidad de los fagos para lisar a su bacteria huésped en un tapiz bacteriano se evidencia por la formación de placas líticas. Dependiendo del tipo de fago, estas se pueden clasificar o diferenciar bajo ciertas características como el tamaño y la turbidez. Esta última permite categorizar a los bacteriófagos en dos principales grupos: el de los fagos temperados que generalmente producen placas turbias y el de los fagos líticos que producen placas claras. Cuando el fago  $\Phi 73$  infecta a su cepa huésped (Ps-53) produce placas turbias con un centro de crecimiento bacteriano y un tamaño de 1.5 mm de diámetro, mientras que el fago  $\Phi 74$  produce placas claras de 2 mm de diámetro (Figura 3). La morfología de las placas líticas de estos fagos nos sugiere que el bacteriófago  $\Phi 73$  pertenece al grupo de los fagos temperados, mientras que el bacteriófago  $\Phi 74$  al de los fagos líticos.



**Figura 3.** Placas líticas producidas por los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  sobre la cepa ps-53. Se realizó un tapiz bacteriano con la cepa huésped (Ps-53) y se retó con los bacteriófagos. La barra equivale a 5 mm.

## 7.2 Construcción de Lisógenas

Los bacteriófagos temperados pueden mantener su ADN reprimido dentro de su cepa huésped y permanecer en está por generaciones como “profago”. Las bacterias que portan estos profagos se conocen como cepas lisógenas y se caracterizan por ser inmunes a la infección por el mismo tipo de fago o por otros emparentados con el fago original.

Una vez que se identificaron las características de las placas líticas producidas por los bacteriófagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$ , el siguiente paso fue corroborar su naturaleza temperada o lítica a través de la construcción de sus lisógenas (ver materiales y métodos). Debido a que no se contaba con bacteriófagos control capaces de infectar a la cepa Ps-53 de *P. aeruginosa*, se utilizó al fago temperado D3112 y al fago lítico  $\Phi KZ$  que infectan la cepa PA01 de *P. aeruginosa* como control positivo y negativo respectivamente.

Con un asa de siembra se picó el centro de un spot producido por el fago  $\Phi 73$  y se estrió en una caja con medio LB sólido para posteriormente seleccionar a 10 colonias como candidatas a lisógenas de este fago. Después de tres pases de resiembra se hizo un tapiz bacteriano de cada colonia y se reto contra el fago  $\Phi 73$  para identificar colonias inmunes a su infección. Se consideró una colonia como susceptible a la infección cuando el fago fue capaz de producir placas líticas sobre el tapiz bacteriano, mientras que una colonia inmune no permitía la formación de las mismas. El mismo procedimiento se siguió para los fagos  $\Phi 74$ , D3112 y  $\Phi KZ$ , obteniendo un total de 40 colonias candidatas a lisógenas para los cuatro fagos. Las 10 colonias candidatas del fago  $\Phi KZ$  fueron susceptibles a la infección por su respectivo fago, 9 colonias candidatas del fago  $\Phi 74$  fueron susceptibles y una fue inmune a la infección, 9 colonias candidatas de D3112 mostraron inmunidad a la infección y sólo una fue susceptible, y finalmente, 9 colonias del fago  $\Phi 73$  fueron inmunes y sólo una fue susceptible a la infección por su respectivo fago (Tabla 4). El

resultado anterior sugería que las colonias inmunes eran lisógenas de los fagos en cuestión ó eran resistentes debido a una mutación en algún gen necesario para el proceso de infección y/o replicación de los fagos.

Se sabe que en una población de bacterias lisógenas, existe un porcentaje de profagos capaces de escindirse de manera espontánea del cromosoma bacteriano e iniciar un ciclo lítico para generar nueva progenie (Bradley, 1967). Cuando esta población de bacterias se encuentra en un tubo de ensayo, la progenie de fagos se libera al medio y son capaces de infectar a otras bacterias no lisógenas para el fago. De esta manera, se hizo un cultivo de toda la noche de las colonias candidatas inmunes a la infección por su respectivo fago y se buscó la presencia de fagos en el sobrenadante para determinar cuales colonias eran lisógenas y cuales sólo eran resistentes. La cepa huésped original o silvestre de cada fago (la cepa ps-53 para los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  y la cepa PA01 para los fagos D3112 y  $\Phi KZ$ ) fue utilizada como cepa sensible o indicadora de la presencia de fagos en el sobrenadante. El sobrenadante de la única candidata inmune del fago  $\Phi 74$  no produjo placas líticas cuando se retó con la cepa silvestre, indicando la ausencia de fagos en el mismo. En contraste, los sobrenadantes de las 9 candidatas inmunes del fago  $\Phi 73$  y las 9 candidatas inmunes del fago D3112 produjeron placas líticas cuando se retaron con su respectiva cepa silvestre (Tabla 4). Estos resultados permitieron demostrar que la resistencia de estas colonias a ser infectadas por los fagos  $\Phi 73$  y D3112 es resultado de una inmunidad adquirida por la presencia de los profagos  $\Phi 73$  y D3112, a diferencia de la resistencia mostrada por la colonia de  $\Phi 74$ . En resumen,  $\Phi KZ$  fue incapaz de producir colonias lisógenas como es esperado para un fago virulento, D3112 produjo 9 colonias lisógenas como se espera para un fago temperado,  $\Phi 74$  también fue incapaz de producir colonias lisógenas lo que indica una naturaleza virulenta y  $\Phi 73$  produjo 9 colonias lisógenas que indican su naturaleza temperada.

### 7.3 Rango de Hospedero.

El rango de hospedero se entiende como la capacidad que tiene un fago para infectar a una o varias bacterias, lo cual genera una matriz de infección específica del fago contra bacterias. Este ensayo permitió determinar el patrón de infección de los fagos para 50 cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* (Tabla 2).

Con la finalidad de obtener resultados comparables entre los fagos, se utilizaron lisados fágicos de  $1 \times 10^8$  ufp de los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  y se gotearon 5  $\mu$ l del lisado sobre 50 tapices bacterianos de cepas clínicas de *P. aeruginosa*. Esto generó una matriz de infección que se observa en la tabla 5. De 50 cepas de *P. aeruginosa*, 9 (18%) fueron susceptibles a la infección por el fago  $\Phi 73$  y 7 (14%) por el fago  $\Phi 74$ . Ambos fagos fueron capaces de infectar a 14 cepas que representan el 28% del total de las cepas de *P. aeruginosa*. Sin embargo, existen 36 cepas (72%) que fueron resistentes a la infección por los fagos, incluyendo la cepa de *E. coli*. Por otra parte, el fago  $\lambda$  no infectó a ninguna cepa de *P. aeruginosa* pero sí a su cepa huésped *E. coli*.

El patrón de infección de los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  fue diferente entre ellos, solo pudieron infectar a la vez a la cepa Fc80 y Ps53, esta última, la cepa huésped utilizada para su propagación y obtención de lisados.

Fago	Colonias candidatas a Lisógenas	Identificación de colonias inmunes a la infección por el fago		Identificación de fagos en el sobrenadante de las colonias candidatas		Colonias Lisógenas	Colonias resistentes
		Colonias inmunes	Colonias susceptibles	Colonias con presencia de fagos	Colonias con ausencia de fagos		
$\Phi 73$	10	9	1	9	1	9	0
$\Phi 74$	10	1	9	0	10	0	1
D3112	10	9	1	9	1	9	0
$\Phi KZ$	10	0	10	0	10	0	0

**Tabla 4.** Tabla de construcción de lisógenas para los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$ . Se eligieron 10 colonias como candidatas a lisógenas para cada fago (columna 2). Se hizo un tapiz bacteriano de las colonias candidatas a lisógenas y se retó con su respectivo fago; cuando el fago produjo placas líticas sobre el tapiz se consideró a la colonia como susceptible y cuando el fago no produjo placas se consideró a la colonia como inmune a la infección (columnas 3 y 4). Finalmente se hizo un tapiz bacteriano de la cepa huésped original o silvestre y se reto contra el sobrenadante de las colonias candidatas a lisógenas; la presencia de fagos en los sobrenadantes se evidenció por la formación de placas líticas sobre la cepa silvestre (columnas 5 y 6). El fago temperado D3112 y el fago lítico  $\Phi KZ$  que infectan a la cepa PA01 de *P. aeruginosa*, fueron usados como control positivo y negativo respectivamente.

#### **7.4 Microscopía electrónica.**

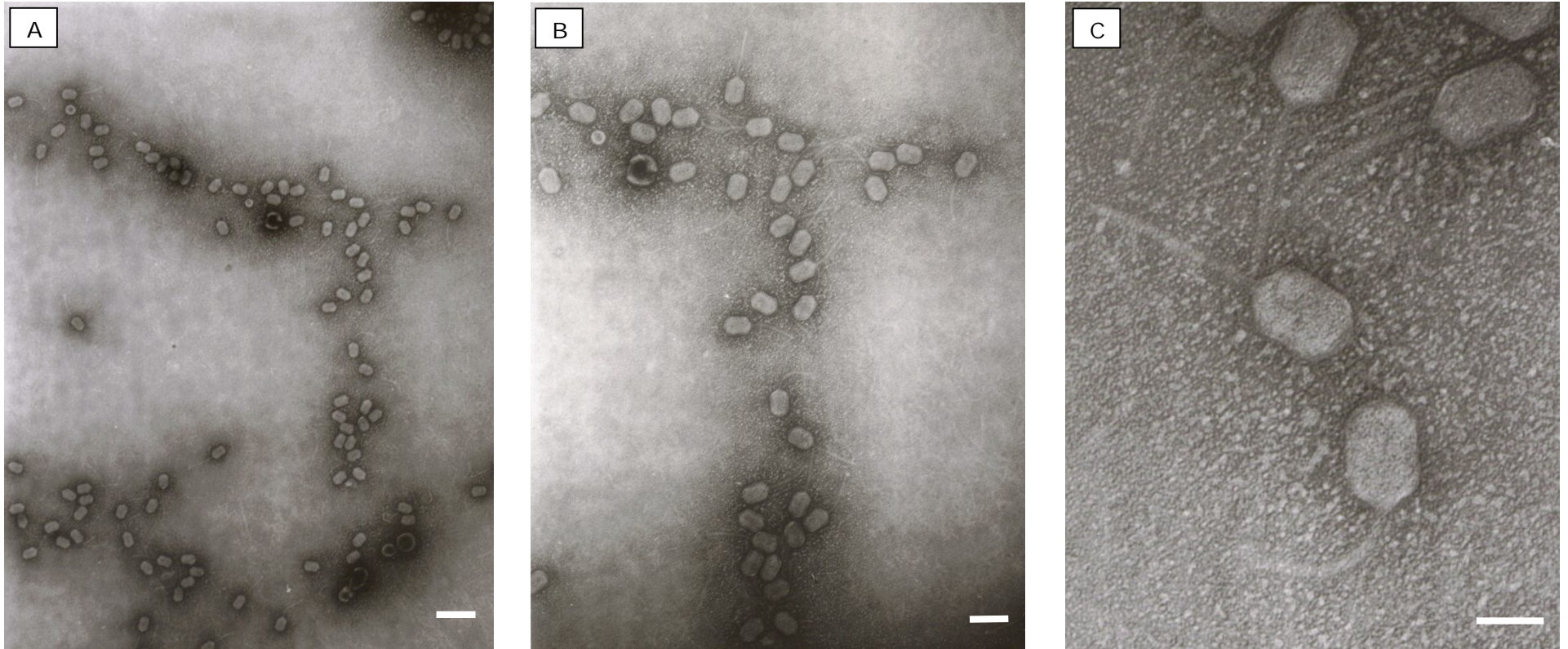
La microscopía electrónica de los fagos permitió identificar su morfología y por consiguiente clasificarlos taxonómicamente. Para esto fue necesario purificar las partículas fágicas por ultracentrifugación y prepararlas para su visualización al microscopio electrónico. Las fotografías electrónicas de los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  obtenidas a diferentes aumentos se observan en las figuras 4 y 5.

Las fotografías electrónicas de los fagos también permitieron obtener datos morfométricos de los mismos. Para ello se eligieron 20 partículas virales por fago y con el programa bioinformático Digimizer de MedCalc se midió la longitud total, de la cabeza y cola para obtener un promedio y desviación estándar de dichas medidas en los viriones (Tabla 6). El virión del fago  $\Phi 73$  tiene una longitud promedio de 186 nm. Presenta una cápside de perfil hexagonal elongado de 73 nm de largo y una cola flexible de 113 nm que presenta estructuras terminales (en algunos viriones se pueden apreciar estas estructuras a manera de fibras cortas o espinas) (Figura 4c). El virión del fago  $\Phi 74$  tiene una longitud promedio de 217 nm con una cápside icosaédrica isométrica de 54 nm de diámetro y una cola flexible de 163 nm que presenta estructuras terminales similares a las de  $\Phi 73$  (Figura 5c). La presencia de una cola larga flexible en ambos fagos permitió identificarlos como miembros de la familia *Siphoviridae* perteneciente al orden *Caudovirales*, en donde se ubican todos los fagos con cola.

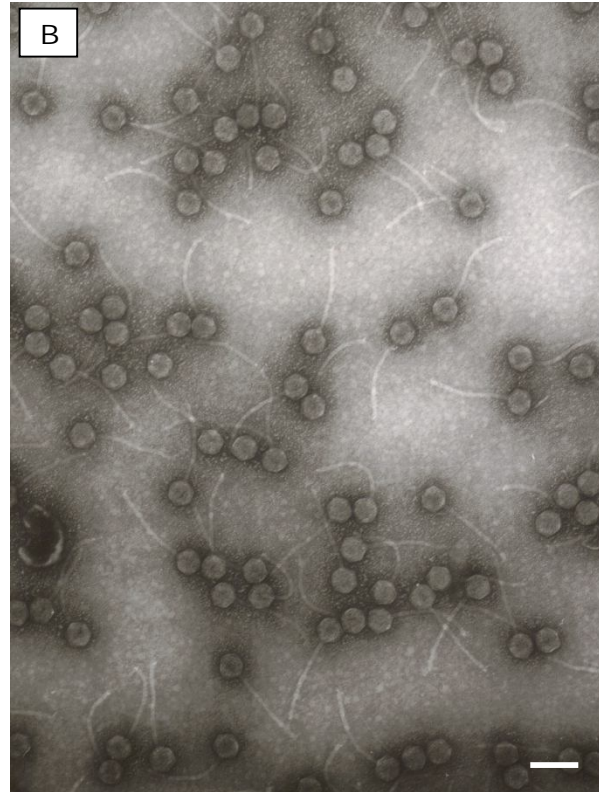
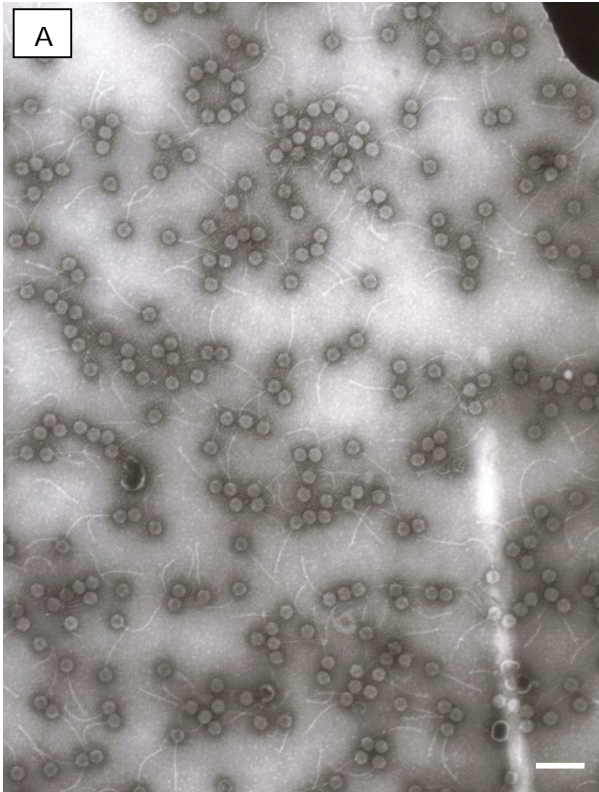
Cepas de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>		Bacteriófagos		
Colección de Cepas	Cepas clínicas	Φ73	Φ74	λ
Cepas Ps	Ps1	-	-	-
	Ps8	-	-	-
	Ps9	-	+	-
	Ps10	-	-	-
	Ps11	-	-	-
	Ps23	-	-	-
	Ps24	-	±	-
	Ps25	-	-	-
	Ps32	-	-	-
	Ps33	+	-	-
	Ps34	-	-	-
	Ps38	-	-	-
	Ps39	-	±	-
	Ps40	-	-	-
	Ps41	-	-	-
	Ps42	-	±	-
	Ps43	-	-	-
	Ps52	-	±	-
Ps53	+	+	-	
Ps59	-	-	-	
Ps61	-	-	-	
Cepas HIM	HIM9	+	-	-
	HIM10	-	-	-
	HIM11	-	-	-
	HIM12	-	-	-
	HIM13	+	-	-
	HIM14	-	-	-
	HIM15	-	-	-
	HIM19	-	-	-
	HIM20	-	-	-
	HIM21	+	-	-
	HIM22	-	-	-
	HIM23	+	-	-
	HIM24	-	-	-
	HIM25	-	-	-
HIM32	-	-	-	
HIM33	+	-	-	
Cepas Fc	Fc1	-	-	-
	Fc4	-	-	-
	Fc9	-	-	-
	Fc14	-	-	-
	Fc60	-	-	-
	Fc78	-	-	-
	Fc80	+	+	-
	Fc82	-	-	-
	Fc83	-	-	-
	Fc86	-	-	-
	Fc87	-	-	-
Fc88	-	-	-	
Cepas Control	PA01	+	-	-
	<i>E. coli</i>	-	-	+

**Tabla 5.** Rango de Hospedero de los fagos Φ73 y Φ74. Cada fago se reto contra cada cepa clínica y se hizo la lectura después de 24 horas de incubación. (+): Infección positiva, (±): Infección parcial, (-): Ausencia de infección. Ps: Cepas del Insituto Nacional de Pediatría. HIM: Cepas del Hospital Infantil de México. Fc: Cepas de pacientes con fibrosis quística. (λ): Fago lambda de *E. coli*.





**Figura 4.** Fotografías electrónicas del bacteriófago  $\Phi 73$ . Las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2%. Barra de tamaño equivalente a 200, 100 y 50 nm en A, B y C respectivamente.



**Figura 5.** Fotografías electrónicas del bacteriófago  $\Phi 74$ . Las muestras fueron contrastadas con acetato de uranilo al 2%. Barra de tamaño equivalente a 200, 100 y 50 nm en A, B y C respectivamente.

<b>Bacteriófago <math>\Phi</math>73</b>					
<b>Medición</b>	<b>No. de partículas virales medidas</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Valor Mínimo</b>	<b>Valor Máximo</b>
Longitud total	20	186 nm	2	182	189
Longitud de la cabeza	20	73 nm	1	72	77
Longitud de la cola	20	113 nm	2	110	119
<b>Bacteriófago <math>\Phi</math> 74</b>					
<b>Medición</b>	<b>No. de partículas virales medidas</b>	<b>Media</b>	<b>Desviación Estándar</b>	<b>Valor Mínimo</b>	<b>Valor Máximo</b>
Longitud total	20	217 nm	2	213	220
Longitud de la cabeza	20	54 nm	1	52	57
Longitud de la cola	20	163 nm	1	160	165

**Tabla 6.** Datos morfométricos de los fagos  $\Phi$ 73 y  $\Phi$ 74. Se eligieron 20 partículas virales por fago y se midió la longitud total, de la cabeza y la cola con el programa Digimizer Ver. 3.7 de MedCalc, el cual calculó la media, desviación estándar, valor mínimo y valor máximo para cada medición.

### **7.5 Patrones de Restricción.**

El stock de fagos purificado por ultracentrifugación se utilizó para la extracción del ADN de los fagos por el método de fenol-cloroformo. El ADN obtenido se usó para determinar el patrón de restricción de los fagos  $\Phi$ 73 y  $\Phi$ 74 que se observa en la figura 6. Para este ensayo el ADN del fago lambda fue elegido como control de restricción.

La restricción del ADN del fago  $\Phi 73$  con las enzimas *HindIII*, *EcoRI* y *NdeI* liberó 3, 6 y 3 bandas respectivamente. Al analizar estos patrones de restricción utilizando el programa bioinformático Quantity One de Bio-Rad se pudo determinar el tamaño de cada una de las bandas (Ver apéndice, Figura suplementaria 2, Tabla suplementaria 2). De esta manera, la sumatoria de las bandas obtenidas arrojó un tamaño estimado del genoma del fago  $\Phi 73$  de 42,702 pb con la enzima *HindIII*, de 46,467 pb con *EcoRI* y de 33,191 pb con la enzima *NdeI* (Tabla 7).

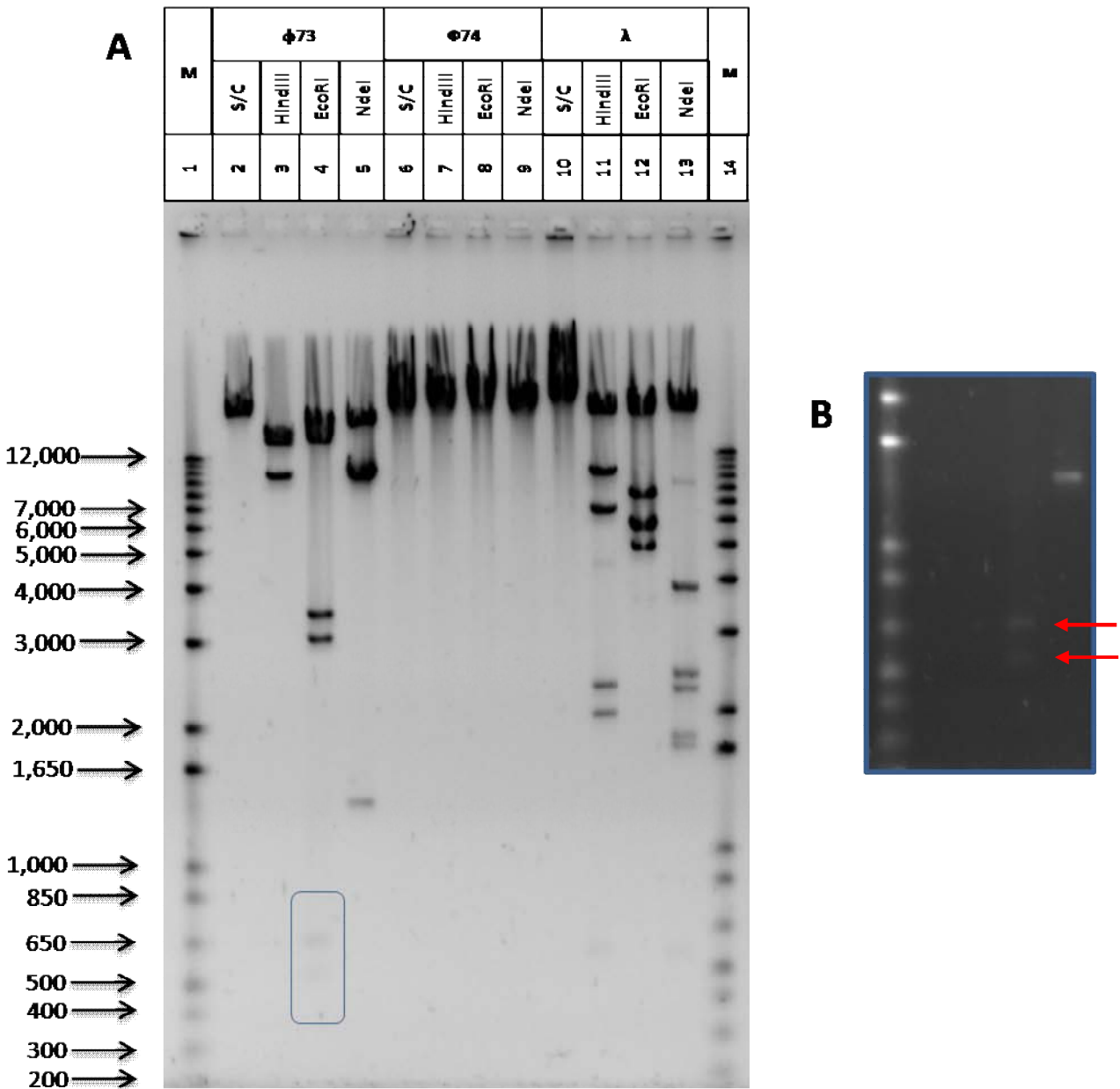
Mientras que el ADN del bacteriófago  $\Phi 73$  fue susceptible al corte con las enzimas *HindIII*, *EcoRI* y *NdeI*, el ADN del bacteriófago  $\Phi 74$  fue resistente al corte con dichas enzimas. Esto abría la posibilidad de que el ADN del fago careciera de los sitios de corte para estas enzimas o que presentara modificaciones que impidieran la acción de las mismas; algunas modificaciones podrían ser metilaciones del tipo *dam* (metilación de la adenina en la secuencia 5'..GATC..3'). Con la finalidad de identificar este tipo de modificaciones, el ADN del fago se cortó con las enzimas *DpnI* (corta sitios *dam* metilados) y *MboI* (corta sitios *dam* no metilados). Como control de sensibilidad a metilaciones por parte de estas enzimas se utilizó el plásmido pBR322 proveniente de una cepa mutante *E. coli dam-* y su contraparte proveniente de una cepa mutante *E. coli dam+*. En la figura 7 se puede observar que el ADN del fago es cortado con la enzima *MboI* y es resistente al corte con *DpnI*. Esto indica que el ADN de  $\Phi 74$  no presenta metilaciones del tipo *dam* y sugiere la ausencia de los sitios de corte para las enzimas *HindIII*, *EcoRI* y *NdeI* o la presencia de modificaciones alternativas en el ADN responsables de la resistencia a la restricción. El perfil de restricción obtenido para  $\Phi 74$  fue algo difuso, no obstante se identificaron varias bandas a partir de las cuales se estimó un tamaño de genoma de 13,423 pb utilizando el programa bioinformático Quantity One de Bio-Rad (Tabla 7). Como era esperado, el plásmido pBR322 proveniente de la cepa

*dam+* fue cortado con la enzima *DpnI* y no con la enzima *MboI*; por su parte el plásmido pBR322 proveniente del cepa *dam-* fue cortado con la enzima *MboI* y no con la enzima *DpnI* (Figura 7), corroborando así la sensibilidad de estas enzimas a las metilaciones tipo *dam*.

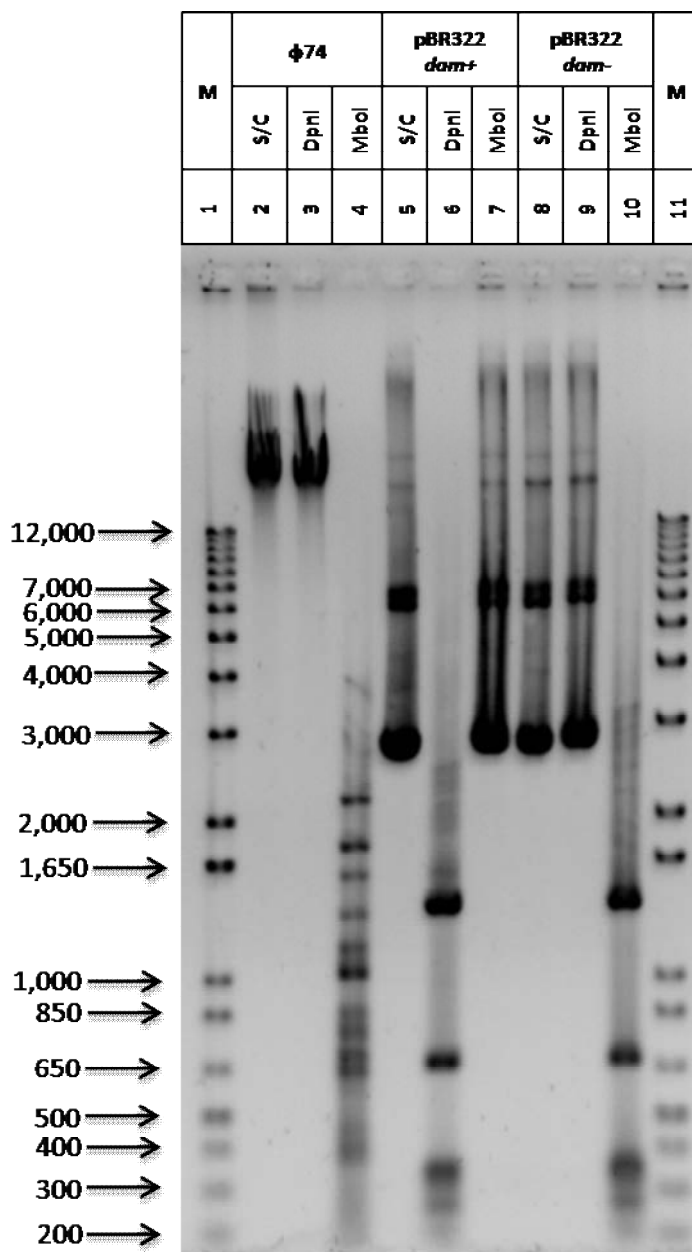
Muestra	Enzima	No. de Bandas	Pares de bases	Tamaño del genoma
<b>Φ73</b>	<i>HindIII</i>	1	17,368	42,702 pb
		2	15,678	
		3	9,656	
	<i>EcoRI</i>	1	21,783	46,467 pb
		2	17,014	
		3	3,461	
		4	3,036	
		5	648	
		6	525	
	<i>NdeI</i>	1	21,810	33,191 pb
		2	10,029	
		3	1,352	
<b>Φ74</b>	<i>MboI</i>	1	2,187	13,423 pb
		2	1,784	
		3	1,571	
		4	1,327	
		5	1,136	
		6	1,027	
		7	850	
		8	787	
		9	691	
		10	644	
		11	571	
		12	454	
		13	394	

$\lambda$	<i>HindIII</i>	1	26,077	51,941 pb
		2	9,767	
		3	6,649	
		4	4,523	
		5	2,329	
		6	2,017	
		7	579	
	<i>EcoRI</i>	1	26,706	45,240 pb
		2	7,658	
		3	5,856	
		4	5,020	
	<i>NdeI</i>	1	27,955	48,468 pb
		2	8,509	
		3	3,835	
		4	2,424	
		5	2,262	
		6	1,777	
		7	1,706	

**Tabla 7.** Tamaño estimado del genoma de  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$ . El análisis se hizo con el programa Quantity One Ver. 6.4 de Bio-Rad. Se cortaron 500 ng de ADN utilizando 2 unidades de enzima, la reacción se incubó por 12 hrs.



**Figura 6.** Electroforesis del ADN genómico de los fagos Φ73 y Φ74 cortado con las enzimas indicadas. Carriles en **A**: 1.- Marcador de peso molecular 1Kb Plus ADN ladder de Invitrogen. 2.- ADN del fago Φ73 sin cortar. 3, 4 y 5.- ADN del fago Φ73 cortado con las enzimas HindIII, EcoRI y NdeI respectivamente. 6.- ADN del fago Φ74 sin cortar. 7, 8 y 9.- ADN del fago Φ74 cortado con las enzimas HindIII, EcoRI y NdeI respectivamente. 10.- ADN del fago λ sin cortar. 11, 12 y 13.- ADN del fago λ cortado con las enzimas HindIII, EcoRI y NdeI respectivamente. 14.- Marcador de peso molecular 1Kb Plus ADN ladder de Invitrogen. **B**: Imagen ampliada del recuadro azul marcado en A, en donde se aprecian de forma más clara las bandas de 648 pb y 525 pb (indicadas con flechas) liberadas a partir de la restricción de Φ73 con EcoRI.



**Figura 7.** Electroforesis del ADN genómico del fago  $\Phi 74$  cortado con las enzimas indicadas. Carriles: 1.- Marcador de peso molecular 1Kb Plus ADN ladder de Invitrogen. 2.- ADN del fago  $\Phi 74$  sin cortar. 3 y 4.- ADN del fago  $\Phi 74$  cortado con las enzimas DpnI y MboI respectivamente. 5.- Plásmido pBR322 proveniente de una cepa *dam+* sin cortar. 6 y 7.- Plásmido pBR322 proveniente de una cepa *dam+* cortado con las enzimas DpnI Y MboI respectivamente. 8.- Plásmido pBR322 proveniente de una cepa *dam-* sin cortar. 9 y 10.- Plásmido pBR322 proveniente de una cepa *dam-* cortado con las enzimas DpnI y MboI respectivamente. 11.- Marcador de peso molecular 1Kb Plus ADN ladder de Invitrogen.



## 8) DISCUSIÓN

En este trabajo se caracterizaron los bacteriófagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  utilizando como criterios la morfología de sus placas líticas, el rango de hospedero, el patrón de restricción de su ADN y la morfología del virión visualizada por microscopía electrónica (Tabla 9).

La primera característica observada fue la morfología de las placas líticas que producen los fagos. Una placa lítica es una zona de aclaramiento en un tapiz bacteriano que evidencia el desarrollo de los bacteriófagos. Aunque algunas pueden parecer similares, cada fago forma una placa con una morfología característica que depende del tipo de fago, la bacteria huésped y las condiciones de crecimiento. No obstante, existen dos tipos principales de placas, las turbias y las claras. Las placas turbias son producidas por bacteriófagos temperados y se caracterizan por presentar una zona de crecimiento bacteriano en su centro, conformada por bacterias lisógenas. En contraparte, las placas claras son producidas por bacteriófagos líticos, no presentan una zona de crecimiento bacteriano en su centro y se puede observar a través de ellas (Maloy, 2006; Mayer, 2010). El fago  $\Phi 73$  presentó una placa turbia de 1.5 mm de diámetro similar a la que producen los fagos temperados, mientras que el fago  $\Phi 74$  produjo una placa clara de 2 mm que lo identificó como un fago lítico. La naturaleza temperada o lítica de ambos fagos se corroboró con el ensayo de construcción de lisógenas que confirmó la capacidad de los fagos para lisogenizar a su cepa huésped.

Posteriormente se determinó el rango de hospedero utilizando a 50 cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa* como cepas de prueba. El rango de hospedero es la capacidad de un fago para infectar una o más bacterias y producir progenie (Hyman y Abedon; 2010). Debido a la alta especificidad de infección que presentan los fagos, el rango de hospedero es diferente para

cada uno de ellos. En el ensayo de rango de hospedero reportado aquí, se obtuvieron tres tipos de resultados; infección total (zona de lisis clara), infección parcial (zona de lisis turbia) y no infección (ausencia de zona de lisis). El hecho de que un mismo fago produzca zonas de lisis con variaciones de aclaramiento en distintas cepas se debe a que la eficiencia de infección no es la misma para todas ellas (Hyman y Abedon; 2010). Tanto  $\Phi 73$  como  $\Phi 74$  mostraron rangos de hospedero diferentes.  $\Phi 73$  fue capaz de infectar a 9 cepas de las 50 probadas (18%), mientras que  $\Phi 74$  infectó a 7 (14%). Solo las cepas Fc80 y Ps53 fueron susceptibles a ambos fagos.

La siguiente característica a definir fue el perfil de restricción del ADN de los fagos. El ADN del fago  $\Phi 73$  fue sensible al corte de las enzimas *HindIII*, *EcoRI* y *NdeI*. Haciendo un análisis de los perfiles con el programa bioinformático Quantity One de Bio-Rad se estimó un tamaño aproximado de genoma de 42,702 pb con la enzima *HindIII*, 46,467 pb con *EcoRI*, y 33,191 pb con *NdeI*. La variación entre los tamaños estimados con las tres enzimas se puede deber a que en ocasiones algunos fragmentos de restricción se pierden en la electroforesis; otra posibilidad es la liberación de varios fragmentos que poseen tamaños muy similares y por ende migran muy cerca entre sí, y debido a la resolución del gel se aprecian como una sola banda. Por otra parte, el ADN de  $\Phi 74$  fue resistente al corte de las enzimas *HindIII*, *EcoRI*, *NdeI*. Este resultado condujo a la posibilidad de que no existieran los sitios de reconocimiento para estas enzimas o que el ADN de  $\Phi 74$  presentara metilaciones u otros mecanismos de multiresistencia a la restricción (ver pag. 42). Para determinar la posibilidad de metilaciones en el ADN de  $\Phi 74$  se decidió realizar un segundo ensayo de restricción utilizando las enzimas *DpnI* y *MboI*. Ambas enzimas comparten el sitio de reconocimiento (5'...GATC...3'), pero el corte con *DpnI* se ve favorecido por la metilación de la adenina en el sitio, mientras que *MboI* corta en sitios no metilados. En este segundo ensayo el ADN de  $\Phi 74$  fue resistente al corte con *DpnI* y

mostró sensibilidad al corte con *Mbol*; el perfil obtenido mostró bandas bien definidas en el rango de 1,500 a 3,000 pb pero se fue haciendo más difuso por debajo de este rango. El análisis con el programa Quantity One identificó 13 bandas y a partir de ellas estimó un tamaño de genoma de 13,423 pb, sin embargo, es improbable que este sea el tamaño real del genoma de  $\Phi 74$ . Debido a que la secuencia de reconocimiento para *Mbol* es de solo cuatro nucleótidos, es probable que se presente con alta frecuencia en el ADN de  $\Phi 74$  y que esto resulte en la liberación de varios fragmentos de tamaños similares representados en una sola banda. En cuanto a la sensibilidad del ADN de  $\Phi 74$  a la restricción con *Mbol* y no con *DpnI*, se pudo concluir que este no presenta metilaciones tipo *dam*, no obstante, existen otro tipo de modificaciones o factores que pueden influir en la resistencia a la restricción y que aún no han sido explorados.

Otros 16 fagos de la colección a la que pertenecen  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  también presentan la característica de resistencia a la restricción por varias enzimas. Hasta ahora se han probado las enzimas *HindIII*, *EcoRI*, *DpnI*, *Mbol*, *SacII*, *HaeIII* y *HpaII* y ninguna ha sido capaz de cortar el ADN de estos fagos (Sepúlveda, 2007). Por su parte, Ceysens y colaboradores informaron de un caso similar en 2008. En este trabajo se reportó que el ADN del fago YuA que infecta *Pseudomonas aeruginosa* fue resistente a 10 de 13 enzimas de restricción probadas, incluyendo enzimas como *HindIII*, *EcoRI*, *BglII* y la enzima dependiente de metilación *DpnI*. Entre las enzimas que fueron capaces de cortar el ADN de YuA se encontraban *Sau3A* y *SmaI* que tienen la característica de ser bloqueadas por sitios que presentan citocinas metiladas, por lo cual se concluyó que el ADN de este fago no presentaba metilaciones de este tipo. Análisis posteriores *In silico* de la secuencia de YuA revelaron la ausencia de 9 de los 10 sitios de reconocimiento para las enzimas que no cortaron, sin embargo, estuvieron presentes 4 sitios de restricción para *EcoRI* a pesar de la insensibilidad de YuA a dicha enzima.

Esto llevo a considerar otro tipo de modificaciones en el ADN o la actividad de una proteína codificada por el fago que mostró un alto grado de similitud con la proteína antirestricción ArdB (Ceysens et al, 2008).

Todos los ADNs de fagos son potencialmente susceptibles a la acción de endonucleasas de restricción, excepto aquellos que presentan adaptaciones que facilitan la evasión de dichas enzimas. Estas adaptaciones incluyen actividad de metiltransferasas (Hoskisson y Smith, 2007), perdida mutacional de secuencias de reconocimiento para las enzimas de restricción (Skiena, 2001), modificación química de las bases nitrogenadas (p. ej. sustitución de timina por hidroximetiluracilo ó de citosina por hidroximetilcitosina) (Krüger y Bickle, 1983), glicosilaciones del ADN (p. ej. adición de grupos glucosa o fosfoglucosa) (Murray, 2002) y la actividad de proteínas antirestricción codificadas por el fago. Sobre esta última adaptación, se sabe que proteínas de este tipo son muy ácidas, son codificadas por genes que se expresan en la etapa temprana de infección y generalmente inhiben mimetizando la estructura del ADN y uniéndose directamente a las enzimas de restricción (Belogurov *et al.*, 1993; Hyman y Abedon, 2010). Existen ya varios casos reportados sobre la actividad de estas proteínas, siendo la proteína 0.3 codificada por fago el T7 la mejor estudiada (Molineux, 2006). Entre otros fagos que codifican proteínas antirestricción se encuentran el fago T4 (Rifat *et al.*, 2008), el fago P1 (Lehnerr, 2006) y varios fagos del genero Bacillus (Makino et al., 1980).

La última característica que se determinó fue la morfología de los fagos mediante microscopía electrónica. Este es un aspecto clave en la caracterización debido a que los fagos exhiben una diversidad de formas mayor a la de cualquier otro grupo viral y determinar su morfología permite clasificarlos taxonómicamente. A pesar de la gran cantidad de formas, Bradley en 1967 llegó al reconocimiento de seis tipos morfológicos básicos y

determinó que cada morfotipo está relacionado con el tipo de ácido nucleico que posee el fago (Tabla 8) (Bradley, 1967). La abundancia de los morfotipos es variable, no obstante, el de colas largas no contráctiles (B) y el de colas largas contráctiles (A) son los más frecuentemente encontrados (Bradley, 1967). Tanto  $\Phi 73$  como  $\Phi 74$  presentan cola larga no contráctil y ADN de doble cadena (dc) lo cual los ubica dentro del grupo B de Bradley y dentro de la familia *Siphoviridae* perteneciente al orden *Caudovirales* según la clasificación taxonómica del ICTV (Comité Internacional de Taxonomía de Virus). Los reportes indican que los fagos de *Pseudomonas* de este tipo poseen una cola distintiva que a menudo presenta fibras, espinas, estructuras cruciformes o protuberancias en la zona terminal (Bradley, 1967). Estos reportes coinciden con las estructuras observadas en la zona terminal de las colas de  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$ .

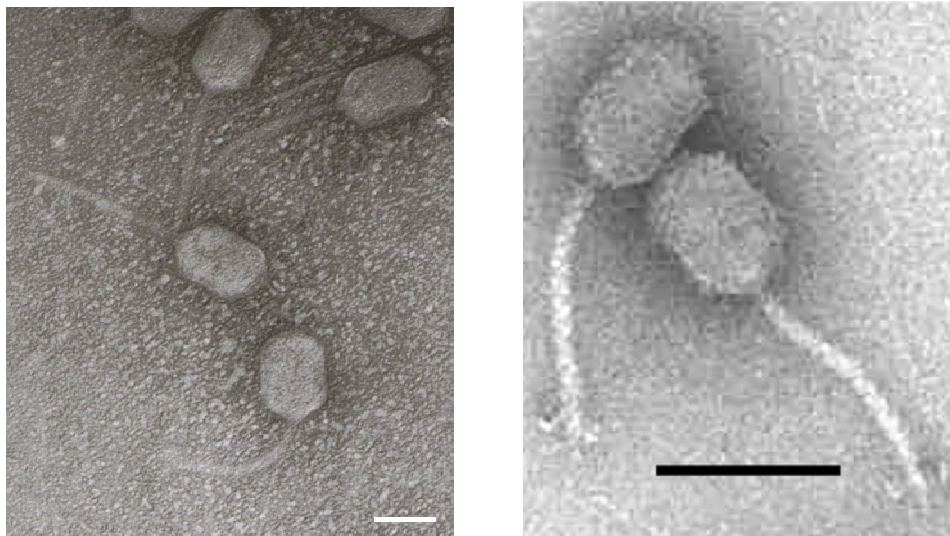
Grupo	Descripción	Tipo de ácido nucleico
A	Cola contráctil	ADN dc
B	Cola larga no contráctil	ADN dc
C	Cola corta no contráctil	ADN dc
D	Sin cola, cápsomeros grandes	ADN cs
E	Sin cola, cápsomeros pequeños	ARN cs
F	Sin cabeza, filamento flexible	ADN cs

**Tabla 8.** Grupos morfológicos básicos y tipos de ácidos nucleicos de los bacteriófagos (Bradley, 1967).

Por su parte, Ackermann y colaboradores en 1988 llegaron al reconocimiento de 8 morfotipos básicos de fagos que infectan *Pseudomonas aeruginosa*. Este set de morfotipos describe la forma de fagos del orden Caudovirales y tiene representantes de las tres familias que componen dicho orden. Considerando las características que determinan que un fago pertenezca a un cierto morfotipo (Ver apéndice, Figura suplementaria 1, Tabla suplementaria 1), se determinó que  $\Phi 73$  se relaciona con el morfotipo M6 característico por la

forma elongada de la cabeza y la presencia de espinas en la zona terminal de la cola (rasgo observado en algunos viriones de  $\Phi 73$ ); por su parte,  $\Phi 74$  se relaciona con el morfotipo SD1 característico por la forma icosaédrica isométrica de la cabeza y su cola larga y relativamente rígida que presenta una serie de espinas en la zona terminal y subterminal (característica observada en algunos viriones de  $\Phi 74$ ).

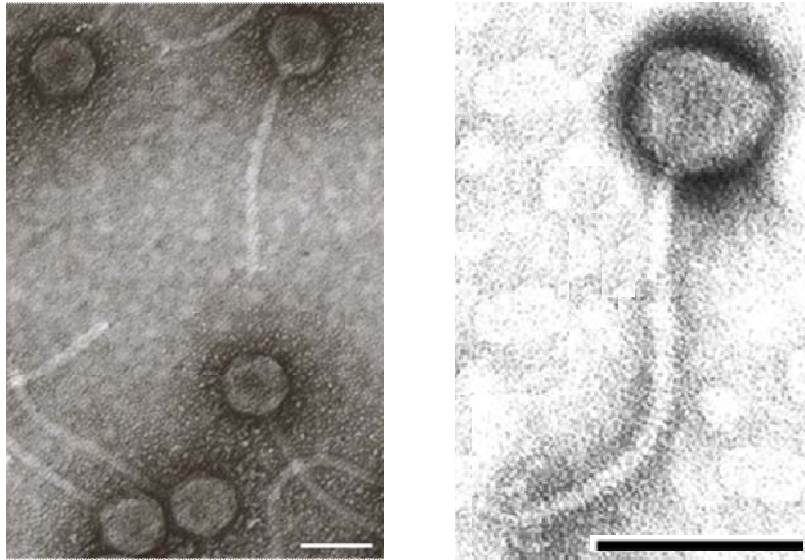
Con respecto a la estructura de la cápside,  $\Phi 73$  presenta una cabeza elongada de aproximadamente 73 nm de largo unida a una cola de 113 nm de longitud. Este tipo de cabeza poco común entre los fagos de *Pseudomonas aeruginosa* también ha sido reportada para los fagos YuA y M6. Estos también son fagos temperados pertenecientes a la familia *Siphoviridae* y ubicados dentro del morfotipo M6 (Ceyssens et al, 2008; Ackerman et al, 1988) (Figura 7).



**Figura 7.** Comparación entre las morfologías de  $\Phi 73$  (izquierda) y YuA (derecha). Las barras equivalen a 50 y 100 nm, respectivamente

Por otra parte,  $\Phi 74$  presenta una cabeza de forma icosaédrica de aproximadamente 54 nm de diámetro unida a una cola de 163 nm de longitud. Este tipo de cabeza similar a la del fago lambda es más común

entre los fagos de *P. aeruginosa* y ha sido reportada para los siphovirus temperados D3112, D3 y B3 (Wang *et al*, 2004) y para los siphovirus líticos, LUZ1, LPB1 y LAD2 (Ceysens *et al*, 2009). Todos estos últimos fagos también están ubicados dentro del morfotipo SD1 (Figura 8).



**Figura 8.** Comparación entre las morfologías de  $\Phi 74$  (izquierda) y LUZ1 (derecha). Las barras equivalen a 50 y 100 nm, respectivamente.

Como se mencionó anteriormente en este trabajo, el interés en el estudio de los fagos se ha incrementado de manera importante en años recientes buscando un mayor entendimiento de su rol ecológico y evolutivo y/o una aplicación biotecnológica o biomédica para ellos (Suttle, 2007; McGrath *et al*. 2004; Forterre, 2006; Thiel, 2004). Sin importar el enfoque de la investigación, todos los trabajos sobre fagos tienen su punto de partida en la caracterización, pues está permite adquirir conocimientos básicos sobre la biología de los mismos (Carey-Smith *et al*, 2006; Jamalludeen *et al*, 2007; Stenholm *et al*, 2008). El trabajo de caracterización de los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  reportado aquí, representa la base para futuros estudios que busquen aprovecharlos en distintas aplicaciones. Debido a la naturaleza temperada de  $\Phi 73$ , resulta un candidato lógico para estudiar su interacción génica con *P. aeruginosa* o para ser usado como agente de transducción o vector de

integración como ha sido reportado para los fagos MP22 y DMS3 (Yun-Jeong Heo *et al.*, 2007; Budzik *et al.*, 2004). Por su parte, la naturaleza lítica de  $\Phi 74$  lo hace un candidato potencial para su uso en terapia fágica y sumarse así a otros fagos como  $\Phi KZ$  (Briers *et al.*, 2007) con el objetivo de controlar infecciones por *P. aeruginosa*. Finalmente, sin importar su naturaleza, ambos fagos pueden ser aprovechados en fagoterapia bajo el enfoque de diseño de enzibioticos (enzimas líticas de los fagos utilizadas como agentes terapéuticos) o en la fagotipificación de cepas en el área de diagnóstico (Fischetti, 2005). Es importante mencionar que estas no son todas las aplicaciones posibles para estos fagos, pero las ya mencionadas y otras dependerán de estudios posteriores que lleven la caracterización a un nivel genómico.



Fago	Detalles de aislamiento			Placa (mm)	Genoma*	Rango de hospedero♦	Naturaleza	Familia	Morfortip†	Dimensiones (nm)	
	Fuente	País	Hospedero							Cabeza	Cola
<b>Φ73</b>	Aguas residuales	México	ps-53	Turbia (1.5)	33,191 – 46,467 pb	9/50 cepas	Temperado	<i>Siphoviridae</i>	B, M9	86	126
<b>Φ74</b>	Aguas residuales	México	ps-53	Clara (2)	13,423 pb	7/50 cepas	Lítico	<i>Siphoviridae</i>	B, SD1	57	171
<b>YuA</b>	Puente local	Rusia	PAO1	Turbia (1)	58 663 pb	13/73 cepas	Temperado	<i>Siphoviridae</i>	B, M6	72	145
<b>LAD2</b>	Puente local	Australia	PAO1	Clara (2)	65 000 pb	10/122 cepas	Lítico	<i>Siphoviridae</i>	B, SD1	63	210
<b>LPB1</b>	Desechos hospitalarios	Bélgica	PAO1	Clara (1-2)	45 000 pb	12/122 cepas	Lítico	<i>Siphoviridae</i>	B, SD1	68	210
<b>LUZ1</b>	Desechos hospitalarios	Bélgica	PAO1	Clara (2)	30 000 pb	11/122 cepas	Lítico	<i>Siphoviridae</i>	B, SD1	67	210

**Tabla 9.** Características generales de los fagos  $\Phi73$ ,  $\Phi74$  (caracterizados en este trabajo), YuA (Ceyssens et al, 2008) y LAD2, LPB1 y LUZ1 (Ceyssens et al, 2009).

♦ Las cepas utilizadas y el origen de las mismas son indicadas en los respectivos trabajos de caracterización de los fagos.

\* El tamaño de los genomas fue obtenido a partir de análisis de restricción, a excepción del de YuA que proviene de datos de secuenciación.

† Los morfotipos corresponden a la clasificación de Bradley, 1967 y la de Ackermann, 1988, respectivamente.

## 9) CONCLUSIONES

- El bacteriófago  $\Phi 73$  produce una placa lítica turbia sobre la cepa Ps53 mientras que el bacteriófago  $\Phi 74$  produce una placa clara, identificando tentativamente al primero como un fago temperado y al segundo como uno lítico.
- El bacteriófago  $\Phi 73$  fue capaz de lisogenizar a la cepa Ps-53 mientras que el bacteriófago  $\Phi 74$  no fue capaz de lisogenizarla, indicando así la naturaleza temperada del primero y lítica del segundo.
- Los bacteriófagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  pertenecen a la familia taxonómica *Siphoviridae* del orden *Caudovirales* al que pertenecen todos los fagos con cola.
- El patrón de infección observado en el rango de hospedero de los bacteriófagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  fue distinto entre ellos. De un total de 50 cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*, 9 (18%) fueron infectadas por el fago  $\Phi 73$  y 7 (14%) por el fago  $\Phi 74$ .
- El ADN del bacteriófago  $\Phi 73$  fue sensible al corte con las enzimas de restricción *HindIII*, *EcoRI* y *NdeI*, el DNA del bacteriófago  $\Phi 74$  no. El análisis del patrón de restricción del fago  $\Phi 73$  arrojó un tamaño de genoma de 42,702 pb con la enzima *HindIII*, 46,467 pb con *EcoRI*, y 33,191 pb con *NdeI*.
- La resistencia del ADN del bacteriófago  $\Phi 74$  al corte con la enzima *DpnI* y no con la enzima *Mbol* descartó la presencia de metilaciones tipo *dam* en el ADN de este fago. El análisis del patrón de restricción del fago  $\Phi 74$  arrojó un tamaño de genoma de 13,423 pb.

## 10) PERSPECTIVAS

Para completar este trabajo es necesario:

- Incrementar el número de cepas de *Pseudomonas aeruginosa* y de fagos utilizados en el rango de hospedero para llevar a cabo un estudio más extensivo
- Utilizar otras enzimas para la obtención de un patrón de restricción más claro del ADN del bacteriófago  $\Phi 74$  que permita su identificación.
- Obtener la secuencia nucleotídica del ADN de los bacteriófagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$  para su caracterización genómica por análisis *in silico*.

## 11) REFERENCIAS

1. Abedon S. T. (2008). Phages, ecology, evolution. In "Bacteriophage Ecology" (S. T. Abedon, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK. 1–28.
2. Abedon S. T. (2009). Phage Evolution and Ecology. *Advances in Applied Microbiology* 67:1-45.
3. Ackermann H. W., Cartier C., Slopek S. and Vieu J. F (1988). Morphology of *Pseudomonas aeruginosa* typing phages of the Lindberg set. *Ann. Inst. Pasteur/Virol.* 139: 389-404.
4. Belogurov A., Delver E. and Rodzevich O. (1993). Plasmid pKM101 encodes two nonhomologous antirestriction proteins (ArdA and ArdB) whose expression is controlled by homologous regulatory sequences. *J. Bacteriol.*175:4843–4850.
5. Bodey G. P., Bolivar R., Fainstein V. and Jadeja L. (1983). Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Rev Infect Dis.* 5: 279–313.
6. Boles B. R., Thoendel M. and Singh P. K. (2004). Self-generated diversity produces "insurance effects" in biofilm communities. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 101: 16630–16635.
7. Bradley D. E. (1967). Ultrastructure of bacteriophages and bacteriocins. *Bacteriological Rev.* 31: 230-314.
8. Breitbart M., Salamon P., Andresen B., Mahaffy J.M., Segall A.M., Mead D., Azam F., and Rohwer F. (2002). Genomic analysis of uncultured marine viral communities. *Proc Natl Acad Sci USA.* 99:14250–14255.
9. Briers Y., Volckaert G., Cornelissen A., Lagaert S., Michiels C. W., Hertveldt K. and Lavigne R. (2007). Muralytic activity and modular structure of the endolysins of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophages  $\phi$ KZ and EL. *Mol. Microbiol.* 65: 1334–1344.
10. Budzik J. M., Rosche W. A., Rietsch A. and O'Toole G. A. (2004). Isolation and characterization of a generalized transducing phage for *Pseudomonas aeruginosa* strains PAO1 and PA14. *J. Bacteriol.* 186:3270-3273.

11. Bull J. J. (2008). Patterns in experimental adaptation of phages. In *Bacteriophage Ecology* (S. T. Abedon, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK. 217–247.
12. Calendar R. (2006). Classification of bacteriophages. In “*The Bacteriophages*”. Oxford University Press, New York.
13. Campbell A. (2003). The future of bacteriophage biology. *Nat. Rev. Gen.* 4:471-477.
14. Carey-Smith G.V., Billington C., Cornelius A.J., Hudson J.A., and Heinemann J.A. (2006). Isolation and characterization of bacteriophages infecting *Salmonella* spp. *FEMS Microbiol Lett* 258: 182–186.
15. Ceysens P., Jean-Paul Noben, Hans-W. Ackermann, Jan Verhaegen, Daniel De Vos, Jean-Paul Pirnay, Maia Merabishvili, Mario Vaneechoutte, Andrew Chibeu, Guido Volckaert and Rob Lavigne (2009). Survey of *Pseudomonas aeruginosa* and its phages: *de novo* peptide sequencing as a novel tool to assess the diversity of worldwide collected viruses. *Environmental Microbiology*. 11: 1303–1313.
16. Ceysens P., Vadim Mesyanzhinov, Nina Sykilinda, Yves Briers, Bart Roucourt, Rob Lavigne, Johan Robben, Artem Domashin, Konstantin Miroshnikov, Guido Volckaert, and Kirsten Hertveldt (2008). The Genome and Structural Proteome of YuA, a New *Pseudomonas aeruginosa* Phage Resembling M6. *Journal of Bacteriology*. No. 4; 190: 1429–1435.
17. Chibani-Chennoufi S., Bruttin A., Dillmann M.L., Brussow H. (2004). Phage-host interaction: an ecological perspective. *J. Bacteriol.* 186:3677–3686.
18. Costerton J. W., Lewandowski Z., Debeer D., Caldwell D., Korber D., and James G. (1994) Biofilms, the customized microniche. *J. Bacteriol.* 176:2137-2142.
19. d’Hérelle F. (1924). “*Immunity in Natural Infectious Disease*” Williams & Wilkins Co., Baltimore.
20. d’Hérelle F. (1917). Sur un microbe invisible antagoniste des bacilles dysentériques. *C. R. Acad. Sci. Ser. D* 165, 373–375.
21. Darzins A. and Casadaban M. J. (1989). Mini-D3112 bacteriophage transposable elements for genetic analysis of *Pseudomonas aeruginosa*. *J Bacteriol.* 171: 3909–3916.

22. Drenkard E. (2003). Antimicrobial resistance of *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Micro. Infect.* 5:1213-1219.
23. Drenkard E. and Ausubel F. M. (2002). *Pseudomonas* biofilm formation and antibiotic resistance are linked to phenotypic variation. *Nature* 416, 740–743.
24. Duckworth D.H. (1987). History and basic properties of bacterial viruses. In: *Phage Ecology* (Goyal, S.M., Gerba, C.P. and Bitton, G., Eds.). John Wiley, New York. 1-43.
25. Duffy S. and Turner P. E. (2008). Introduction to phage evolutionary biology. In *Bacteriophage Ecology* (S. T. Abedon, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK. 147–176.
26. Evans A.C. (1934). *Streptococcus bacteriophage: a study of four serological types*. *Public. Health Rep.* 49:1386-1401.
27. Fauquet C. M., Mayo M. A., Maniloff J., Desselberger U. and Ball L.A. (2005). *Virus Taxonomy, VIIIth Report of the ICTV*. Elsevier/Academic Press, London.
28. Fischetti V. A. Bacteriophage lytic enzymes: novel anti-infectives. *TRENDS in Microbiology*. 13:491-496.
29. Forterre P. (2006). The origin of viruses and their possible roles in major evolutionary transitions. *Virus Res* 117: 5–16.
30. Georgiev St. (1998). *Infectious diseases in immunocompromised host. USA*, CRC Press. 501-503.
31. Giamarellou H. (2002) Prescribing guidelines for severe *Pseudomonas* infections. *J Antimicrob Chemother.* 49:229-33.
32. Gilligan P. H. (1995). *Pseudomonas and Burkholderia*. In: *Manual of clinical microbiology. Sixth Edition*. ASM PRESS. Washington, D.C.
33. Govan J. R. and Deretic V. (1996). Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: mucoid *Pseudomonas aeruginosa* and *Burkholderia cepacia*. *Microbiol Rev.* 60: 539–574.
34. Hagens S., Habel A., von Ahsen U., von Gabain A. and U. Blasi. (2004). Therapy of experimental *Pseudomonas* infections with a

- nonreplicating genetically modified phage. *Antimicrob. Agents Chemother.* 48:3817–3822.
35. Hendrix R.W. (2005). Bacteriophage HK97: Assembly of the Capsid and Evolutionary Connections. *Advances in Virus Research.* 1–14.
  36. Hendrix R. W., Smith M. C., Burns R. N., Ford M. E. and Hatfull G.F. (1999). Evolutionary relationships among diverse bacteriophages and prophages: all the world's a phage. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96: 2192–2197.
  37. Hoskisson P. A. and Smith M. C. (2007). Hypervariation and phase variation in the bacteriophage 'resistome'. *Curr. Opin. Microbiol.* 10: 396–400.
  38. Hyman P. and Abedon S. (2010). Bacteriophage Host Range and Bacterial Resistance. *Advances in Applied Microbiology.* 70: 217-248.
  39. Jamalludeen N., Johnson R. P., Friendship R., Kropinski A. M., Lingohr E. J., and Gyles C. L. (2007). Isolation and characterization of nine bacteriophages that lyse O149 enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Vet Microbiol.* 124: 47–57.
  40. Kerr B., West J., and Bohannan B. J. M. (2008). Bacteriophage: Models for exploring basic principles of ecology. In *Bacteriophage Ecology* (S. T. Abedon, ed.). Cambridge University Press, Cambridge, UK. 31–63.
  41. Kielhofner M., Atmar R. L., Hamill R. J. and Musher D. M. (1992). Life threatening *Pseudomonas aeruginosa* infections in patients with human immunodeficiency virus infection. *Clin Infect Dis.* 14: 403–411.
  42. Krüger D. H. and Bickle T. A. (1983). Bacteriophage survival: Multiple mechanisms for avoiding the deoxyribonucleic acid restriction systems of their hosts. *Microbiol. Rev.* 47, 345–360.
  43. Kutter E. (2008). Phage Therapy: Bacteriophages as naturally occurring antimicrobials. *Practical Handbook of Microbiology* (E. Goldman and L. H. Green, eds.). CRC Press, Boca Raton, FL. 713–730.
  44. Lavigne R., Seto D., Mahadevan P., Ackermann H.W., and Kropinski A.M. (2008). Unifying classical and molecular taxonomic classification: analysis of the Podoviridae using BLASTP-based tools. *Res Microbiol* 159: 406–414.

45. Lehnherr H. (2006). Bacteriophage P1. In "The Bacteriophages" (R. Calendar and S. T. Abedon, Eds.). Oxford University Press, Oxford, UK. 350–364.
46. Lindberg R. B., Latta R. L., Brame R. C., and Moncrief J.A. (1964). Definitive bacteriophage typing system for *Pseudomonas aeruginosa*. Bact. Proc. 81.
47. Luria S. E., Delbruck M. and Anderson T. F. (1943). Electron microscope studies of bacterial viruses. J. Bacteriol. 46:57-67.
48. Lwoff A. (1953). Lysogeny. Bacteriol. Rev. 17:269-337.
49. Lwoff A., Horne R.W., and Tournier P. (1962). A system of viruses. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 27:51-62.
50. Lyczak J. B., Cannon C. L., and Pier G. B. (2000). Establishment of *Pseudomonas aeruginosa* infection: lessons from a versatile opportunist. Microbes Infect 2: 1051–1060.
51. Makino O., Saito H., and Ando T. (1980). *Bacillus subtilis*-phage f1 overcomes host-controlled restriction by producing BamN<sub>x</sub> inhibitor protein. Mol. Gen. Genet. 179, 463–468.
52. Mathee K., Narasimhan G., Valdes C., Qiu X., Matewish J.M., Koehrsen M., et al. (2008) Dynamics of *Pseudomonas aeruginosa* genome evolution. Proc Natl Acad Sci, USA. 105: 3100–3105.
53. McGrath S., Fitzgerald G. F., Van Sinderen D. (2004). The impact of bacteriophage genomics. Curr. Opin. Biotechnol. 15: 94–99.
54. Mesyanzhinov V. V., Robben J., Grymonprez B., Kostyuchenko V. A., Bourkaltseva M. V., Sykilinda N. N., Krylov V. N. and Volckaert G. (2002). The genome of bacteriophage  $\phi$ KZ of *Pseudomonas aeruginosa*. J. Mol. Biol. 317: 1–19.
55. Miroshnikov K. A., Faizullina N. M., Sykilinda N. N. and Mesyanzhinov V. V., (2006). Properties of the endolytic transglycosylase encoded by gene 144 of *Pseudomonas aeruginosa* bacteriophage  $\phi$ iKZ. Biochemistry (Moscow). 71: 300–305.
56. Molineux I. J. (2006). The T7 Group. In "The Bacteriophages" (R. Calendar and S. T. Abedon, Eds.). Oxford University Press, Oxford, UK. 277–301.



57. Morgan G. J. and Pitts W. B. (2008). Evolution without Species: The Case of Mosaic Bacteriophages. British Society for the Philosophy of Science. Oxford University Press, Oxford, UK. 59: 745-765.
58. Morse S. S. (1994). Toward an evolutionary biology of viruses. In "The Evolutionary Biology of Viruses" (S. S. Morse, ed.). Raven Press, Ltd., New York. 1–28.
59. Murray, N. (2002). Immigration control of DNA in bacteria: Self versus non-self. 2001 Fred Griffith review lecture. Microbiology. 148: 3–20.
60. Paradis-Bleau C., Cloutier I., Lemieux L., Sanschagrín F., Laroche J., Auger M., Garnier A. and Levesque R. C., (2007). Peptidoglycan lytic activity of the *Pseudomonas aeruginosa* phage  $\phi$ KZ gp144 lytic transglycosylase. FEMS Microbiol. Lett. 266: 201–209.
61. Pringle C. R. (1991). 'The 20<sup>th</sup> Meeting of the Executive Committee of the International Committee on Virus Taxonomy', Archives of Virology. 119: 303–304.
62. Rifat D., Wright N. T., Varney K. M., Weber D. J. and Black L. W. (2008). Restriction Endonuclease inhibitor IPI\* of bacteriophage T4: A novel structure for a dedicated target. J. Mol. Biol. 375: 720–734.
63. Sepúlveda R. O. (2007). Aislamiento y Caracterización de fagos que infectan cepas clínicas de *Pseudomonas aeruginosa*. Tesis de Maestría especialidad Genética y Biología Molecular, CINVESTAV.
64. Skiena S. S. (2001). Designing better phages. Bioinformatics. 17: S253–S261.
65. Smith E. E., Buckley D. G., Wu Z., Saenphimmachak C., Hoffman L. R., D'Argenio D. A., et al. (2006). Genetic adaptation by *Pseudomonas aeruginosa* to the airways of cystic fibrosis patients. Proc Natl Acad Sci, USA. 103: 8487– 8492.
66. Stenholm A. R., Dalsgaard I. and Middelboe M. (2008). Isolation and characterization of bacteriophages infecting the fish pathogen *Flavobacterium psychrophilum*. Appl Environ Microbiol. 74: 4070–4078.
67. Sulakvelidze A., Alavidze Z. and Morris J. R. (2001). Bacteriophage Therapy. Antimicrob. Agents Chemother. 45:649-659.

68. Suttle C.A. (2007). Marine viruses-major players in the global ecosystem. *Nat Rev Microbiol.* 5: 801–812.
69. Thiel K. (2004). Old dogma, new tricks – 21st Century phage therapy. *Nat Biotechnol.* 22: 31–36.
70. Thomas C. A. and J. Abelson. (1966). The isolation and characterization of DNA from bacteriophages. *Prog. Nucleic Acid Res.* 1:553-561.
71. Twort F. W. (1915). An investigation on the nature of the ultra-microscopic viruses. *Lancet.* 11: 1241–1243.
72. Wang P. W., Chu L. and Guttman D. S. (2004). Complete sequence and evolutionary genomic analysis of the *Pseudomonas aeruginosa* transposable bacteriophage D3112. *J. Bacteriol.* 186: 400–410.
73. Weingarten J. A., Paterson D. L. and Yu V. L. (2003). Pneumonia caused by *Pseudomonas aeruginosa*. *Cur Treat Opt in Infec Dis.* 5: 159-169.
74. Witte A., Baranyi U., Klein R., Sulzner M., Luo C., Wanner G., Krüger D.H., and Lubitz W. (1997). Characterization of *Natronobacterium magadii* phage phiCh1, a unique archaeal phage containing DNA and RNA. *Mol. Microbiol.* 23:603-616.
75. Wolfgang M. C., Kulasekara B. R., Liang X., Boyd D., Wu K., Yang Q., et al. (2003). Conservation of genome content and virulence determinants among clinical and environmental isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. *Proc Natl Acad Sci, USA.* 100: 8484–8489.
76. Yun-Jeong Heo, In-Young Chung, Kelly B. Choi, Gee W. L. and You-Hee Cho (2007). Genome sequence comparison and superinfection between two related *Pseudomonas aeruginosa* phages, D3112 and MP22. *J. Microbiology.* 153: 2885–2895.

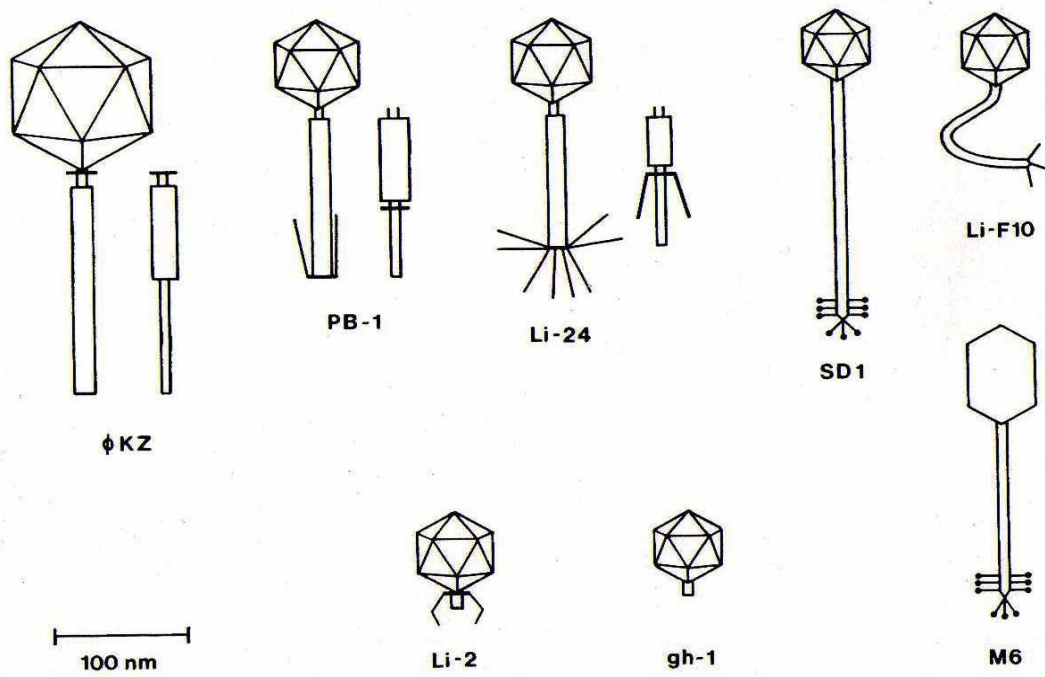
### **Referencias electrónicas**

1. Maloy S. (2006). Phage. Maloy Online Textbook of Microbial Genetics. University of San Diego. Department of Biology. <http://www.sci.sdsu.edu/~smaloy/MicrobialGenetics/topics/phage/plaques.html>

2. Mayer G. (2010). Bacteriophage. Online Textbook of Microbiology and Immunology. University of South Carolina. Department of Biomedical Sciences. <http://pathmicro.med.sc.edu/mayer/phage.html>

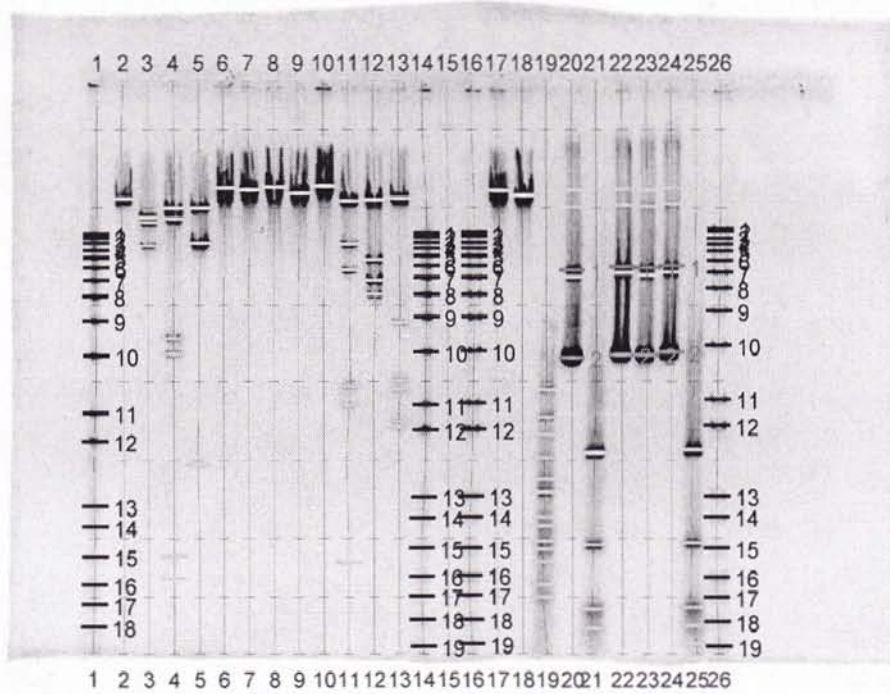
## 12) APÉNDICE

### FIGURAS SUPLEMENTARIAS



**Figura 1.** Morfotipos básicos de fagos de *P. aeruginosa* con cola (Ackermann et al. 1988).

Image Report For: Restricción del DNA de los Fagos con Varias Enzimas (Raw 1-D Image)



Description	N/A		
Directory	C:\Documents and Settings\GUARNER CHILDREN\Escritorio\Restricción		
Filename	Restricción del DNA de los Fagos con Varias Enzimas.1sc		
Image Date	09-Jul-2010 16:18		
Imager	Gel Doc XR	Pixel size(um)	X: 80.4, Y: 80.4
Image Area(mm)	X: 109.4, Y: 82.4	Data Range	4095.00 Int
Image Pixels	X: 1360, Y: 1024	Memory Size	2.78 Mb
Acquisition Parameters			
	Exposure Time	1.341 seconds	
	Light Mode:	UV transmissive	
Gel Background			
	Method	None	

**Figura 2.** Reporte del análisis hecho por el programa Quantity One para los ensayos de restricción de los fagos  $\Phi 73$  y  $\Phi 74$ .

## TABLAS SUPLEMENTARIAS

Familia	Morfotipos	Cabeza	Cola	Particularidades
<i>Mioviridae</i>	ΦKZ	I	C	Red fibrosa que rodea la cola, collar cosnspicuo en la parte superior de la misma.
	PB-1	I	C	Cápsomeros en forma de copa, 4 fibras terminales en la cola.
	Li-24	I	C	8 fibras terminales en la cola.
<i>Siphoviridae</i>	SD1	I	L	Espinas terminales en la cola.
	LiF-10	I	L	Cola muy flexible.
	M6	E	L	Forma de la cabeza, espinas terminales en la cola.
<i>Podoviridae</i>	Li-2	I	S	Collar y fibras terminales torcidas en la cola.
	gh-1	I	S	Similar al fago T7.

**Tabla 1.** Clasificación y morfología general de fagos de *P. aeruginosa* con cola (Ackermann et al. 1988). I: icosaedrica, E: elongada, C: contráctil, L: larga no contráctil, S: corta.

Carril	Muestra	# de banda	Migración relativa de la banda	Tamaño de la banda (pb)
1	1 Kb Plus DNA Leader	1	0.27	12000
		2	0.276	11000
		3	0.285	10000
		4	0.298	9000
		5	0.311	8000
		6	0.328	7000
		7	0.35	6000
		8	0.379	5000
		9	0.421	4000
		10	0.483	3000
		11	0.582	2000
		12	0.631	1650
		13	0.743	1000

		14	0.779	850
		15	0.831	650
		16	0.88	500
		17	0.915	400
		18	0.954	300
2	$\Phi 73$ sin cortar	1	0.208	26639.73
3	$\Phi 73$ con <i>HindIII</i>	1	0.241	17368.639
		2	0.249	15678.232
		3	0.29	9656.978
4	$\Phi 73$ con <i>EcoRI</i>	1	0.224	21783.512
		2	0.243	17014.727
		3	0.45	3461.857
		4	0.479	3036.198
		5	0.828	648.767
		6	0.868	525.264
5	$\Phi 73$ con <i>NdeI</i>	1	0.224	21810.467
		2	0.285	10029.711
		3	0.669	1352.029
6	$\Phi 74$ sin cortar	1	0.189	34516.863
7	$\Phi 74$ con <i>HindIII</i>	1	0.192	33227.773
8	$\Phi 74$ con <i>EcoRI</i>	1	0.187	35520.387
9	$\Phi 74$ con <i>NdeI</i>	1	0.198	30749.547
10	$\lambda$ sin cortar	1	0.186	36571.543
11	$\lambda$ con <i>HindIII</i>	1	0.211	26077.971
		2	0.287	9767.804
		3	0.332	6649.412
		4	0.394	4523.508
		5	0.535	2329.882
		6	0.569	2017.715
		7	0.841	579.063
12	$\lambda$ con <i>EcoRI</i>	1	0.209	26706.449
		2	0.313	7658.666
		3	0.35	5856.827
		4	0.375	5020.368
13	$\lambda$ con <i>NdeI</i>	1	0.206	27955.879

		2	0.301	8509.513
		3	0.424	3835.81
		4	0.524	2424.97
		5	0.54	2262.287
		6	0.595	1777.659
		7	0.605	1706.283
14	1 Kb Plus DNA Leader	1	0.268	12000
		2	0.274	11000
		3	0.283	10000
		4	0.294	9000
		5	0.307	8000
		6	0.324	7000
		7	0.345	6000
		8	0.375	5000
		9	0.414	4000
		10	0.476	3000
		11	0.567	2000
		12	0.611	1650
		13	0.726	1000
		14	0.762	850
		15	0.816	650
		16	0.865	500
		17	0.899	400
		18	0.94	300
		19	0.987	200
16	1 Kb Plus DNA Leader	1	0.266	12000
		2	0.272	11000
		3	0.283	10000
		4	0.294	9000
		5	0.307	8000
		6	0.324	7000
		7	0.345	6000
		8	0.375	5000
		9	0.414	4000
		10	0.474	3000



		11	0.564	2000
		12	0.609	1650
		13	0.724	1000
		14	0.761	850
		15	0.816	650
		16	0.863	500
		17	0.898	400
		18	0.94	300
		19	0.983	200
17	$\Phi$ 74 sin cortar	1	0.194	33204.359
18	$\Phi$ 74 con <i>DpnI</i>	1	0.202	30148.029
19	$\Phi$ 74 con <i>MboI</i>	1	0.542	2187.285
		2	0.589	1784.166
		3	0.619	1571.595
		4	0.658	1327.636
		5	0.694	1136.786
		6	0.718	1027.358
		7	0.761	850
		8	0.776	787.284
		9	0.803	691.104
		10	0.817	644.452
		11	0.839	571.574
		12	0.879	454.565
		13	0.901	394.109
20	pBR322 <i>dam+</i> sin cortar	1	0.192	35999.281
		2	0.222	22725.482
		3	0.332	6409.144
		4	0.343	5916.058
		5	0.485	2801.234
21	pBR322 <i>dam+</i> con <i>DpnI</i>	1	0.65	1369.073
		2	0.809	670.237
		3	0.923	340.781
		4	0.956	262.55
		5	0.983	204.306
22	pBR322 <i>dam+</i> con <i>MboI</i>	1	0.191	38617.305

		2	0.219	24337.793
		3	0.326	6624.867
		4	0.337	6097.177
		5	0.48	2834.108
23	pBR322 <i>dam</i> - sin cortar	1	0.192	38582.273
		2	0.22	23968.891
		3	0.328	6499.258
		4	0.34	5925.147
		5	0.48	2821.047
24	pBR322 <i>dam</i> - con <i>DpnI</i>	1	0.189	41794.07
		2	0.216	26290.834
		3	0.324	6608.533
		4	0.335	6082.146
		5	0.476	2866.687
25	pBR322 <i>dam</i> - con <i>Mbol</i>	1	0.646	1386.364
		2	0.806	680.59
		3	0.92	351.326
		4	0.951	278.264
		5	0.983	208.103
26	1 Kb Plus DNA Leader	1	0.26	12000
		2	0.265	11000
		3	0.276	10000
		4	0.287	9000
		5	0.299	8000
		6	0.315	7000
		7	0.335	6000
		8	0.364	5000
		9	0.403	4000
		10	0.463	3000
		11	0.557	2000
		12	0.603	1650
		13	0.724	1000
		14	0.761	850
		15	0.816	650
		16	0.866	500

		17	0.901	400
		18	0.943	300
		19	0.987	200

**Tabla 2.** Reporte del análisis hecho por el programa Quantity One para los ensayos de restricción mostrados en las figuras 6 y 7. La migración relativa de la banda expresa la distancia relativa que migró la banda con respecto a la longitud total del carril; los valores proporcionan medidas genéricas de las posiciones de las bandas en el carril. Los valores del tamaño de la banda están expresados en pares de bases.

## PREPARACIÓN DE MEDIOS DE CULTIVO

### Medio LB (Medio Luria-Bertani)

#### Por litro:

Bacto-triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	5 g

#### Para cajas:

Agar	15 g
------	------

#### Top agar:

Agar	7 g
------	-----

Disolver los ingredientes y calentar para que la disolución sea completa. Se ajusta el pH a 7 con una solución de NaOH 5N. Esterilizar por autoclave durante 20 min a 120 °C (15 lb/in<sup>2</sup>).

### Medio TB (Caldo triptona o medio para fagos TΦ)

#### Por litro:

Bacto-triptona	10 g
NaCl	5 g

#### Para cajas:

Bacto-agar	11 g
------------	------

**Top agar:**

Bacto-agar 7 g

Disolver los ingredientes y calentar para que la disolución sea completa. Se ajusta el pH a 7 con una solución de NaOH 5N. Adicionar 5 ml de una solución 2M de MgCl<sub>2</sub> (19 g de MgCl<sub>2</sub> en 90 ml de agua), ajustar el volumen a 10 ml y adicionar a la solución. Esterilizar por autoclave durante 20 min. a 120 °C (15 lb/in<sup>2</sup>).

**Medio SM****Por litro:**

NaCl	5.8 g
MgSO <sub>4</sub> •7H <sub>2</sub> O	2 g
Tris•HCL 2M pH=8	2.5 ml
Gelatina 2%	5 ml

Disolver los ingredientes y calentar para que la disolución sea completa. Esterilizar por autoclave durante 20 min a 120 °C (15 lb/in<sup>2</sup>).

**PREPARACIÓN DE SOLUCIONES****EDTA 0.5M (pH=8.0)****Por litro:**

Se mezclan 186.1 g de la sal disodio etilendiaminotetraacético•2H<sub>2</sub>O en 800 ml de agua destilada. Se agita vigorosamente hasta disolver la sal y se ajusta el pH a 8.0 con NaOH (~20g). Aforar a un litro y esterilizar en autoclave.

*Nota: La sal disódica de EDTA no debe agregarse a la solución hasta que el pH de esta se ajuste a 8.0.*

## **Tris 1M**

### **Por litro:**

Se disuelven 121.1 g de Tris base en 800 ml de agua. Se ajusta el pH a 8.0. Se afora a un litro y se esteriliza en autoclave.

*Nota: Si la solución 1M tiene un color amarillento, desechar y utilizar Tris de mejor calidad. El pH de las soluciones de Tris es temperatura dependiente y decrece aproximadamente 0.03 unidades por cada 1°C.*

## **Reguladores para electroforesis**

### **Buffer 6X**

Azul de bromofenol al 1%	250 µl
Glicerol estéril	400 µl
TAE 1X	350 µl

Mezclar y guardar a temperatura ambiente. Para el corrimiento de muestras, el buffer debe de estar a una concentración 1X.

### **TAE 50X**

Trisma-base	245 g
Ácido Acético Glacial	57.1 ml
EDTA 400 mM, pH=8.0	125 ml

Aforar a un litro con agua destilada. Para corrimientos electroforéticos se disuelven 20 ml en 980 ml de agua destilada.

## **Preparación del gel de Agarosa al 1%**

Disolver la solución 50X de TAE a una concentración final de 1X. Disolver por calentamiento 1 g de agarosa (Sigma) en 100 ml de TAE 1X. Vaciar en el molde y una vez gelificado, retirar el peine y los sellos. Para el corrimiento procurar cubrir el gel con suficiente solución de TAE 1X.

## **Soluciones de Microscopía electrónica**

### **Formval al 0.3%**

Formval	0.3 g
Cloroformo	100 ml

Disolver el formval en el cloroformo y mantener en un recipiente tapado. Se prepara en el momento de utilizarse.

### **Acetato de Uranilo al 2%**

Acetato de Uranilo	2 g
Agua destilada estéril y desionizada	100 ml

Disolver el acetato de uranilo en el agua destilada estéril y desionizada. Sonicar durante 5 min. Para una mejor disolución. Filtrar con membrana de 0.22  $\mu\text{m}$ . Mantenerse en un recipiente cubierto con plomo y de preferencia en la campana ya que se trata de material radioactivo. Se prepara al momento de utilizarse.

## Soluciones de cloruro de cesio con densidades de 1.7, 1.5, 1.3 y 1.08

Datos de Concentración, Índice refractivo y Densidad del Cloruro de Cesio a 25°C.

Density (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	Refractive Index, $n_D$	% by Weight	mg/ml of Solution <sup>aa</sup>	Molarity	Density (g/cm <sup>3</sup> ) <sup>a</sup>	Refractive Index, $n_D$	% by Weight	mg/ml of Solution <sup>aa</sup>	Molarity
1.0047	1.3333	1	10.0	0.056	1.336	1.3657	34	454.2	2.698
1.0125	1.3340	2	20.2	0.119	1.3496	1.3670	35	472.4	2.806
1.0204	1.3348	3	30.6	0.182	1.363	1.3683	36	490.7	2.914
1.0284	1.3356	4	41.1	0.244	1.377	1.3696	37	509.5	3.026
1.0365	1.3364	5	51.8	0.308	1.391	1.3709	38	528.6	3.140
1.0447	1.3372	6	62.8	0.373	1.406	1.3722	39	548.3	3.257
1.0531	1.3380	7	73.7	0.438	1.4196	1.3735	40	567.8	3.372
1.0615	1.3388	8	84.9	0.504	1.435	1.3750	41	588.4	3.495
1.0700	1.3397	9	96.3	0.572	1.450	1.3764	42	609.0	3.617
1.0788	1.3405	10	107.9	0.641	1.465	1.3778	43	630.0	3.742
1.0877	1.3414	11	119.6	0.710	1.481	1.3792	44	651.6	3.870
1.0967	1.3423	12	131.6	0.782	1.4969	1.3807	45	673.6	4.001
1.1059	1.3432	13	143.8	0.854	1.513	1.3822	46	696.0	4.134
1.1151	1.3441	14	156.1	0.927	1.529	1.3837	47	718.6	4.268
1.1245	1.3450	15	168.7	1.002	1.546	1.3852	48	742.1	4.408
1.1340	1.3459	16	181.4	1.077	1.564	1.3868	49	766.4	4.552
1.1437	1.3468	17	194.4	1.155	1.5825	1.3885	50	791.3	4.700
1.1536	1.3478	18	207.6	1.233	1.601	1.3903	51	816.5	4.849
1.1637	1.3488	19	221.1	1.313	1.619	1.3920	52	841.9	5.000
1.1739	1.3498	20	234.8	1.395	1.638	1.3937	53	868.1	5.156
1.1843	1.3508	21	248.7	1.477	1.658	1.3955	54	895.3	5.317
1.1948	1.3518	22	262.9	1.561	1.6778	1.3973	55	922.8	5.481
1.2055	1.3529	23	277.3	1.647	1.699	1.3992	56	951.4	5.651
1.2164	1.3539	24	291.9	1.734	1.720	1.4012	57	980.4	5.823
1.2275	1.3550	25	306.9	1.823	1.741	1.4032	58	1009.8	5.998
1.2387	1.3561	26	322.1	1.913	1.763	1.4052	59	1040.2	6.178
1.2502	1.3572	27	337.6	2.005	1.7846	1.4072	60	1070.8	6.360
1.2619	1.3584	28	353.3	2.098	1.808	1.4093	61	1102.9	6.550
1.2738	1.3596	29	369.4	2.194	1.831	1.4115	62	1135.8	6.746
1.2858	1.3607	30	385.7	2.291	1.856	1.4137	63	1167.3	6.945
1.298	1.3619	31	402.4	2.390	1.880	1.4160	64	1203.2	7.146
1.311	1.3631	32	419.5	2.492	1.9052	1.4183	65	1238.4	7.355
1.324	1.3644	33	436.9	2.595					

\*La tabla fue obtenida del catalogo para ultracentrífuga de Beckman (BR-8101P-E)