



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

ESCUELA NACIONAL DE ESTUDIOS PROFESIONALES
IZTACALA

EFFECTO IONICO EN LA ADHESION DE
Pseudomonas aeruginosa
A CELULAS BUCOEPITELIALES HUMANAS

T E S I S

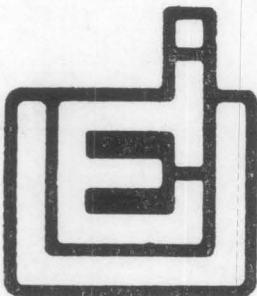
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE

B I O L O G O

P R E S E N T A

FROYLAN ARGUELLO ROMERO

1989





Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

A mis padres:

J. Rosario y Esther

Por la oportunidad de darme la vida, su ternura, comprensión y ejemplo, que permitió mi formación; a ellos ,como respuesta a sus esfuerzos deseando que esta meta lograda la tomen como suya, porque sin su ayuda y ejemplo no la hubiera alcanzado; a ellos pues, por haberme enseñado que los logros se obtienen con perseverancia, esfuerzo y constancia y por haber estado siempre pendientes de mi superación profesional.

A mis hermanos:

Esther, Rogelio, Rosario, Milagros, Elia, Veronica y Radl

Por el apoyo y ayuda que siempre me han brindado, por cada momento que compartimos juntos y por el amigo que encuentro en cada uno de ellos.

A mis amigos y compañeros:

Muchas personas han caminado conmigo en algún momento de mi vida, no escribo los nombres porque tal vez fallaría, solo les digo que éste es el testimonio de un trabajo con muchos devenires que al fin concluyó. Gracias a todos aquellos que de una manera u otra han influido para que esta inquietud pudiera realizarse.

Al personal que labora en el laboratorio de Genética de la
Unidad de Morfología y Función de la E.N.E.P. Iztacala:

Sergio, Diego, Lupita, Ramón, Andrés, Joceline, Lourdes, Fabiola,
Elías, Jaime

*por el ambiente de compañerismo y amistad que
siempre reinó, las horas de trabajo se hicieron más gratas y
el tiempo se fue sin sentir. a todos ustedes: ¡ Gracias por ser
amigos !*

Mi más sincero agradecimiento al M en C Sergio Vaca Pacheco Jefe del laboratorio de Genética de la E.N.E.P. Iztacala por la dirección y apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

A los biólogos Diego Arenas y Ramón V. Moreno por sus atinadas sugerencias y puntos de vista en cuanto al diseño e interpretación de algunos experimentos

" No siempre el más inteligente es el que nunca se equivoca o raras veces lo hace, sino aquel que piensa que sus errores son treguas que el cielo le concede para que reconsidere la razón de su equivocación"

Froylán Argüello

Este trabajo fue realizado en el laboratorio de Genética de la Unidad de Morfología y Función de la Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala bajo la dirección del M en C Sergio Vaca Pacheco.

INDICE

Resumen	1
Introducción	3
Antecedentes	11
Objetivos	14
Material y Métodos	15
Resultados	18
Efecto del sodio sobre la adhesión de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a células bucepiteliales humanas	20
Efecto del fosfato sobre la adhesión de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a células bucepiteliales humanas	21
Efecto del potasio sobre la adhesión de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> a células bucepiteliales humanas	22
El potasio no estimula la adhesión de <i>Pseudomonas aeruginosa</i> cuando ésta ha sido muerta por irradiación con U.V.	23
Efecto inhibitorio del C.C.C.P sobre la estimulación producida por el potasio en la adhesión de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	24
Efecto inhibitorio del C.C.C.P sobre la estimulación producida por el fosfato en la adhesión de <i>Pseudomonas aeruginosa</i>	25
Efecto del pH sobre la adhesión de <i>P.</i> <i>aeruginosa</i> a células bucepiteliales humanas	26
Discusión	27
Bibliografía	30

RESUMEN

Pseudomonas aeruginosa es una bacteria patógena oportunista para humanos. Su virulencia es compleja debido a que se trata de un microorganismo invasivo y toxigénico. La adhesión es un importante factor de virulencia ya que permite a la bacteria colonizar al hospedero para después causarle enfermedad. Se ha reportado que la adhesión de *P. aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas está mediada por los pili (*fimbriae*) bacterianos y ocurre mediante un proceso independiente de energía (52).

En trabajos anteriores (1,50) hemos reportado que el bacteriófago FIZ 15, aislado de una cepa clínica de *P. aeruginosa*, le confiere a su lisógena un incremento significativo en la adhesión a células bucoepiteliales humanas mediante un mecanismo que requiere energía. En el presente trabajo reportamos los resultados que hemos obtenido al probar el efecto del sodio, fosfato y potasio (a 0,1, 10.0 y 50.0 mM en la adhesión de *P. aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas. El sodio prácticamente no tuvo efecto sobre la adhesión en tanto que el fosfato la incrementó ligeramente (alrededor del 20% a 10.0 y 50.0 mM. El potasio incrementó grandemente la adhesión (180% a 10.0 mM y 200% a 50.0 mM. Para que el potasio ejerza su efecto estimulador requiere que las bacterias se encuentren activas metabólicamente ya que al medir la adhesión de bacterias muertas

por irradiación con luz ultravioleta, el número de bacterias adheridas por célula bucoepitelial humana en presencia de KCl 50.0 mM, es muy similar al que se obtiene con bacterias vivas, o irradiadas, en ausencia de potasio.

Estos resultados nos permiten concluir que el potasio estimula la adhesión de *P aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas y que para ello requiere que las bacterias se encuentren metabólicamente activas, probablemente para que el ión sea transportado activamente. Queda por aclarar cuál es el mecanismo de acción del potasio.

INTRODUCCION

Pseudomonas aeruginosa es un bacilo Gram-negativo, no esporulado que mide 1-4 micras de longitud por 0.5-1 micras de diámetro, es aerobio y su temperatura óptima es 37°C, aunque puede crecer tanto a 5 como a 42°C, es patógeno oportunista, móvil por la presencia de un flagelo polar (35); es responsable de entre el 10 al 20% de las infecciones nosocomiales (6).

Pseudomonas aeruginosa crece en forma de microcolonias cubiertas por un moco de naturaleza polisacárida (alginato), esto hace posible que la bacteria se adhiera a superficies del suelo o bien se mantenga en las superficies de aguas dulces o marinas (12).

Pseudomonas aeruginosa presenta gran capacidad de crecer casi en cualquier medio ambiente húmedo; sus hábitats fundamentales son el suelo y el agua; el éxito de este microorganismo para crecer en diversos ambientes se debe a sus mínimos requerimientos nutricionales; tiene la habilidad de metabolizar más de 76 compuestos orgánicos diferentes (35, 38).

En *Pseudomonas aeruginosa* la fuente de infección es el ser humano enfermo o portador (intestinal o cutáneo), puede transmitirse de persona a persona o de tejido a tejido; se le ha encontrado en soluciones fenólicas diluídas, soluciones oftálmicas, jabones de hexaclorofeno, aparatos de succión,

jeringas, catéteres, sondas, respiradores, termómetros, es capaz de reproducirse aún en agua destilada (33, 35).

Entre las enfermedades causadas por *Pseudomonas aeruginosa*, podemos citar, entre otras, a las infecciones pulmonares en pacientes con fibrosis quística, septicemia en pacientes granulocitopénicos, endocarditis en los adictos a la heroína, queratitis en personas que utilizan lentes de contacto, sepsis en pacientes con quemaduras, etc. (33).

Casi todas las cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas de pacientes hospitalizados presentan resistencia a uno o a varios antibióticos que son usualmente activos contra la mayoría de las bacterias patógenas; dicha resistencia está conferida por la presencia de elementos extracromosómicos llamados plásmidos (37); también es frecuente que las cepas resistentes a antibióticos posean resistencia a metales (mercurio, telurito, arsenato, cromato, cadmio (9, 34, 46).

* Es importante mencionar también que la frecuencia de cepas lisógenas (portadoras de profagos) en cepas clínicas, es cercana al 100%; en otras bacterias la frecuencia de lisógenas es baja; *Escherichia coli*, por ejemplo, tiene una frecuencia aproximada de 10%, y se ha demostrado también, que la presencia de profagos (puede ser uno o más) en las cepas puede modificar algunas propiedades de virulencia mediante conversión lisogénica (23, 47). La conversión lisogénica se produce cuando uno o más genes del profago introducido confieren nuevas propiedades al hospedero.

Para *Pseudomonas aeruginosa* se ha reportado un ejemplo de conversión lisogénica, producida por el fago D3 que causa cambios en el antígeno "O"; este fago impide que las cepas lisogenizadas sean capaces de adsorber a fagos homólogos, disminuyendo la fagocitosis y muerte de las lisógenas por macrófagos de ratón *in vitro* (22).

La virulencia bacteriana generalmente se define como la capacidad que tienen las bacterias para multiplicarse en un hospedero y producirle enfermedad (o incluso la muerte) (37).

Algunos factores de virulencia bacteriana son toxinas extracelulares producidas por organismos no invasivos, tales como *Vibrio cholerae* y *Corynebacterium diphtheriae*, la virulencia de estas bacterias, depende de los mecanismos y sitios de acción de sus respectivas toxinas (37).

La virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* es muy compleja, ya que se trata de un microorganismo invasivo y toxigénico, capaz de causar cuadros clínicos muy variados, predominando las infecciones urinarias, óticas, oculares, de heridas quirúrgicas y de quemaduras (49).

Pseudomonas aeruginosa produce varias sustancias extracelulares que han sido relacionadas con su virulencia, entre ellas cabe mencionar a la EXOTOXINA A letal para ratones, la cual es un solo polipéptido con un PM de 66 Kd. que inhibe la síntesis de proteínas por ADP-Ribosilación del factor de alargamiento 2 (EF-2) requerido para el paso de translocación durante la

síntesis proteica (36, 7, 31).

Relacionadas también se encuentran a la PROTEASA ALCALINA y una ELASTASA que han sido implicadas en la producción de hemorragias en órganos internos, especialmente en los pulmones (28) y probablemente son las responsables de la destrucción del tejido corneal en infecciones oculares producidas por este microorganismo (27) Aproximadamente el 85% de las cepas clínicas de *P aeruginosa* producen elastasa (53) la cual es una proteasa neutra que contiene zinc y es sensible a quelantes de metales (54) la elastasa es producida como una proenzima inactiva asociada a la pared celular y es activada por proteólisis limitada por otras proteasas de *P aeruginosa* o por la propia elastasa (24) La elastasa purificada inactiva a los factores C1, C3, C5, C8 y C9 del complemento *in vitro*, por lo que quizá inhibe el movimiento de los leucocitos polimorfonucleares al sitio de inflamación y disminuye su actividad fagocítica (43).

Cicmanec y Holder (10) han demostrado *in vitro* que la producción de proteasas extracelulares por *P aeruginosa* correlaciona inversamente con el tiempo de generación del microorganismo en extracto de piel quemada de ratón; es decir, a mayor producción de proteasas, menor tiempo de generación y viceversa. Estos investigadores han sugerido que los nutrimentos que obtendría *P aeruginosa* por proteólisis de piel quemada *in vivo* facilitarían el crecimiento de la bacteria hasta el número crítico de 10^5 células por gramo de tejido que se ha reportado como necesario para

invasión sistémica (40).

P aeruginosa produce también dos hemolisinas: un GLICOLIPIDO termoestable y una FOSFOLIPASA termolábil, esta última también llamada FOSFOLIPASA C, es una proteína de 78 Kd (11) que cataliza la hidrólisis de la Fosfatidilcolina (el componente principal del surfactante pulmonar) en Fosforilcolina y Diacilglicerol. Se ha sugerido que la combinación del Glicolípido hemolítico y la Fosfolipasa C puede producir efectos citopáticos considerables en los pulmones de los pacientes con infecciones de estos órganos (32).

El Glicolípido parece favorecer la actividad de la Fosfolipasa actuando como detergente para solubilizar a los fosfolípidos (29).

Ambas hemolisinas son producidas durante la fase estacionaria en medios de cultivo con bajas concentraciones de fosfato pero son reprimidas en medios con alto contenido de fosfato (20,26).

Se ha demostrado también que la Fosfolipasa C es muy activa sobre los fosfolípidos presentes en células eucarióticas (fosfatidilcolina, lisofosfatidilcolina y esfingomielina) y casi no tiene actividad sobre los fosfolípidos que forman parte de las membranas de las células procarióticas (fosfatidiletanolamina, fosfatidilserina y fosfatidilglicerol) (5).

Por último el ALGINATO y la LEUCOCIDINA han sido mencionadas como sustancias coadyuvantes a la virulencia de *P aeruginosa*; el ALGINATO es la sustancia mucoide que elaboran algunas cepas de origen clínico, particularmente las aisladas de pacientes con

fibrosis quística (55). El Alginato es un exopolisacárido constituido principalmente por ácido manurónico y ácido gulurónico (8) que hace a la cepas presentar una morfología colonial muy mucóide; y según algunos investigadores (45), el Alginato inhibe las actividades fagocíticas de los leucocitos.

La LEUCOCIDINA es una proteína de 27.5 Kd, termolábil y activable por tripsina; tiene acción destructiva sobre los leucocitos pero no sobre los glóbulos rojos (41,42).

Uno de los factores primarios de virulencia bacteriana, es la adhesión y colonización de bacterias a un sitio del hospedero, comúnmente a células epiteliales. Mediante la adhesión los organismos pueden establecerse, mantenerse y reproducirse en los tejidos, teniendo de este modo la posibilidad de invadirlos y de resistir las defensas normales del hospedero (32).

La adhesión bacteriana es el resultado de la asociación entre moléculas específicas de las superficies bacterianas (adhesinas) y receptores superficiales en las células del hospedero, que sirven como estructuras adhesivas complementarias (4).

Las adhesinas son pili (*fimbriae*) de la superficie de las bacterias Gram-negativas y son fimbrillas de la superficie de las bacterias Gram-positivas. Los pili son polímeros de proteínas, compuestos de subunidades idénticas, unidas por puentes de hidrógeno o por interacciones hidrofóbicas. Las subunidades tienen un PM de 8000 a 26000, están formadas en un 50% por aminoácidos no polares y su punto isoeléctrico oscila entre 3.7 y

5.6 (4). En cuanto a los receptores celulares para las bacterias patógenas, éstos contienen carbohidratos en su mayoría, a veces es un solo residuo el responsable de la adhesión y otras veces son cadenas de oligosacáridos.

Actualmente se conocen tanto las adhesinas como los receptores de algunas bacterias; *E coli*, por ejemplo, tiene una adhesina identificada como *fimbriae* tipo I, mientras que el receptor implicado es el carbohidrato D-Manosa (4); para *P aeruginosa* se sabe que tiene una adhesina del tipo *fimbriae*, mientras que se desconoce la naturaleza del receptor.

Las condiciones de cultivo de los microorganismos modifican considerablemente la producción de adhesinas; algunos pueden sintetizar más de una adhesina que puede tener una función específica en algún momento de su ciclo de vida (aunque no necesariamente en el hospedero) (15,16).

Existe una gran variedad de modelos experimentales (16) para el estudio de la adhesión de organismos patógenos; entre ellos podemos mencionar a los siguientes:

- a) Adhesión de microorganismos en suspensión a una gran variedad de tipos celulares.
- b) Adhesión a monocapas de células epiteliales hechas a partir de explantes.
- c) Adhesión a bordes de cepillo de intestino.
- d) Adhesión a membranas celulares.
- e) Utilización de mutantes no adhesivos bien caracterizadas.

- f) Adhesión a superficies inertes (vidrio y acero).
- g) Hematoaglutinación.
- h) Microscopia óptica y electrónica.
- i) Adhesión utilizando inhibidores específicos de la adhesión, como carbohidratos, lectinas y anticuerpos específicos.

Los criterios considerados para la utilización de uno u otro modelo varían; pero podemos afirmar que la adhesión puede ser cuantificada y el sistema puede manipularse para así, identificar los mecanismos fisicoquímicos y aislar las moléculas involucradas.

En el presente trabajo, se utilizó el modelo de adhesión usado por Woods y col. (52); aunque con algunas modificaciones (por ejemplo, el cambio del Buffer utilizado de PBS pH 7.2 a Tris pH 7.2).

Existen evidencias que demuestran la preferencia de las bacterias para adherirse específicamente a ciertos tipos de tejidos y no a otros; se cree que este tropismo está determinado en gran medida por la distribución de las adhesinas de la superficie bacteriana y los receptores en los diferentes tejidos (18,25); también se dice que hay especificidad de especies; es decir, que ciertas cepas bacterianas solo pueden colonizar determinadas especies, por ejemplo, podemos citar entre otras a : las infecciones gonococales que están limitadas a humanos; las infecciones diarreicas por *E coli* (K 88) exclusivas de cerdos; y las infecciones por estreptococos del grupo A que solo se presentan en humanos (39,44).

ANTECEDENTES

Recientemente se ha reconocido que la adhesión es un importante determinante ecológico en la colonización de sitios específicos en plantas y animales, y, en particular, un importante primer evento en la patogénesis de infecciones bacterianas en animales y humanos (18).

Uno de los primeros en considerar a la adhesión bacteriana experimentalmente, fue Guyot en 1908 (19); reportó estudios sobre adhesión bacteriana a eritrocitos humanos.

En 1960 Duguid y col. (13), demostraron que la adhesión de varios géneros y especies de bacterias Gram-negativas a eritrocitos y a células epiteliales intestinales, es sensible a Manosa.

Sin embargo, el estudio de los mecanismos de adhesión bacteriana, no comenzó hasta hace 12 años, cuando Gibbons y col.(17), empezaron a reportar una serie de estudios, que mostraron la naturaleza selectiva por varios nichos en la adhesión bacteriana a cavidades orales y superficies dentales.

En 1980 Woods y col. (52), reportaron que los pili o *fimbrias* de *P aeruginosa* son fundamentales para la adhesión de ésta a células bucoepiteliales humanas; realizaron una serie de experimentos, en los cuales demostraron que las bacterias que habían perdido los pili (tratadas con calor a 100 °C por 2 h), decrecieron significativamente en su capacidad de adhesión; contrastando con el hecho de que las bacterias que conservaron sus

pili (muertas por irradiación con luz UV), seguían conservando intacta su capacidad de adhesión; pero más importante es aún el hecho de que con sus experimentos, establecieron que el proceso de adhesión mediado por los pili en *P aeruginosa* no requiere energía; ya que las bacterias muertas por irradiación con UV, continuaron adhiriéndose (lo anterior era de esperarse, ya que el tratamiento con UV no afectó a los pili).

En 1987, Arce, G. y col. (1), encontraron que el fago FIZ 15, aislado de una cepa clínica de *P aeruginosa*, provocó un aumento significativo en la adhesión de la cepa PIZ 15 (lisógena para el fago FIZ 15) a células bucoepiteliales humanas (esto con respecto a la cepa control PA01, libre de fagos); demostrando además, que el bacteriofago FIZ 15 aumenta la adhesión de la lisógena a células bucoepiteliales humanas mediante un mecanismo, adicional al ya descrito (mediado por los pili), que requiere energía (50-51).

Es probable que existan dos componentes superficiales, además de los pili, que contribuyen a aumentar la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas: uno dependiente de energía y otro independiente. Alteraciones en cualquiera de ellos afectan al receptor para FIZ 15, la energía requerida para incrementar la adhesión quizá puede ser utilizada para el transporte activo de cationes, que pudieran favorecer la adhesión (50).

Partiendo del hecho anteriormente citado, nos propusimos

investigar la participación de los iones sodio, fosfato y potasio en la adhesión de *P aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas con el propósito de profundizar en las interpretaciones sobre la adhesión aumentada que se presenta en la lisógena PIZ 15.

OBJETIVOS PARTICULARES

Investigar si los iones Sodio, Potasio y Fosfato tienen efecto en la adhesión de *P aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas.

Determinar el pH óptimo de adhesión de *P aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas.

MATERIAL Y METODOS

I. - Material Biológicos:

Se utilizaron las siguientes cepas de *Pseudomonas aeruginosa*:

* PA01; Caracterizada Genética y Bioquímicamente y de uso internacional, (libre de fagos). Donada por el Dr. B.W. Holloway, Monash, University. Australia.

* PIZ 15; Lisógena de la cepa PA01 (contiene el profago FIZ 15), construida en el laboratorio de Genética de la U.M.F. de la E.N.E.P. Iztacala.

* PA01/15; Cepa PA01 resistente a la infección por el fago FIZ 15, también obtenida en el laboratorio de Genética de la E.N.E.P. Iztacala.

II. - Soluciones y Medios de Cultivo:

* Solución Buffer Tris (hidroximetilaminometano, Merck); 100 mM, con pH que va desde 7.2 hasta 9.8.

* Solución de Tripsina 2.5 ug/ml. en Tris pH 7.2.

* Solución de Eritrosina B al 0.4% en Tris pH 7.2.

* Azul de Metileno al 0.4% en Tris pH 7.2.

* C.C.C.P. (Carbonilcianuro-metaclorofenilhidrazona) 50 µg/ml, 75 µg/ml en Etanol absoluto.

* KCl 1.0mM, 10.0mM, 50.0mM en H₂O bidestilada estéril

* NaCl " " " "

* Na₂HPO₄ " " " "

* TSA (Agar de Soya y Tripticasa) 30 gr de caldo de soya y tripticasa y 15 gr de agar bacteriológico (Bioxón) en 1 lt. de H₂O destilada.

* AN (Agar nutritivo) 8 gr de caldo nutritivo y 15 gr de agar bacteriológico (Bioxón) en 1 lt. de H₂O destilada.

Todas las soluciones y medios de cultivo fueron esterilizadas en autoclave a 15 lbs/pulg² y 121 °C durante 15 min.

III.- Ensayo de adhesión:

a) Obtención de Bacterias.

Bacterias frescas (crecidas durante 18 hrs. en caja en TSA), se lavaron 3 veces por centrifugación (15000 rpm, centrifuga Eppendorf) en Buffer Tris durante 3 min. Posteriormente se ajustaron a una Densidad Optica de 0.2-0.3 a 590 nm. (aproximadamente 2.0×10^8 bacterias/ml.)

b) Obtención de las Células Bucoepiteliales Humanas.

La obtención fué por donación voluntaria de personas sanas por medio de raspado vigoroso, con hisopos estériles, del carrillo bucal, sin tocar superficies dentales. Las células se lavaron 3 veces por centrifugación (150 x g en centrífuga clínica), para eliminar las bacterias indígenas, en solución Buffer de Tris durante 10 min., ajustadas a 2.5×10^4 células/ml. Después de contarlas en una cámara de Newbauer.

c) Adhesión *in vitro*.

2.0×10^6 bacterias/ml. y 2.5×10^4 células/ml. se mezclaron en

1 ml de Buffer Tris y se incubaron a 37 °C durante 2 hrs, en una incubadora con agitación a una velocidad de 30 rpm; después de la incubación se realizaron 3 lavados más para eliminar las bacterias no adheridas; en el segundo lavado se les agregó una gota de Eritrosina B al 0.4% (con objeto de teñir a las bacterias). Al término de los lavados, se obtuvieron frotis y se agregaron 5 gotas de Azul de Metileno al 0.4% incubandose 5 min. (con la finalidad de teñir a las células), se eliminó el exceso de colorante con H₂O bidestilada y se observaron al microscopio óptico Carl Zeiss. a 400 X y 1000 X para contar las bacterias adheridas a 50 células tomadas al azar.

Los iones (NaCl, Na₂HPO₄, KCl) se adicionaron a la mezcla bacterias-células bucoepiteliales a concentraciones de 1.0, 10.0 y 50.0 mM. El desacoplante C.C.C.P. se adicionó a 50 µg/ml o a 75 µg/ml.

d) Irradiación de las Bacterias con luz ultravioleta.

Los cultivos bacterianos, crecidos hasta saturación a 37 °C en TSA, fueron lavados y resuspendidos en Tris 0.1 M pH 7.2 e irradiados, en una caja de petri de vidrio, con una lámpara germicida General Electric 50 W a una distancia de 40 centímetros durante 20 min. La muerte bacteriana se confirmó por la ausencia de crecimiento en TSA.

"No se mide la integridad de un hombre por su éxito vocacional. solo esta en nuestra mano hacer lo mejor que se puede, empleando lo mejor que se tiene, a nadie se le puede pedir más. en esto consiste la naturaleza de la integridad; lo genuino del propio esfuerzo".

David Ireland

RESULTADOS

Los valores reportados en las gráficas son el promedio de al menos 3 experimentos independientes. La desviación estándar de la media fué, en general menor de 10% del promedio.

Como puede verse en la gráfica 1, el sodio prácticamente no tuvo efecto sobre la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas (CBHD, en tanto que el fosfato la incrementó ligeramente (alrededor de 20% a 10 y 50 mM (gráfica 2).

El potasio incrementó grandemente la adhesión de las tres cepas probadas (180% a 10 mM y 200% a 50 mM (gráfica 3).

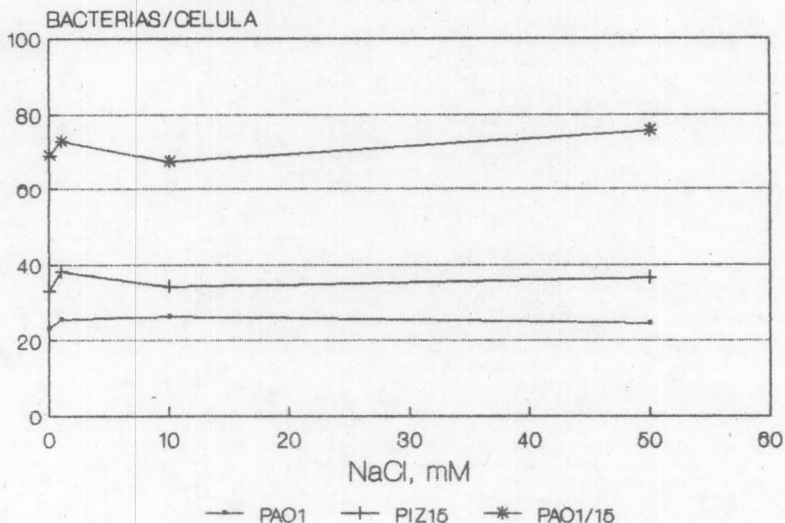
Para que el potasio ejerza su efecto estimulador sobre la adhesión, requiere que las bacterias se encuentren activas metabólicamente, ya que al medir la adhesión de bacterias muertas por irradiación con luz ultravioleta, el número de bacterias adheridas por célula bucoepitelial en presencia de KCl 50mM, es muy similar al que se obtiene con bacterias vivas, o muertas por irradiación, en ausencia de potasio (gráfica 4) El potasio tampoco estimula la adhesión cuando se incluye en el ensayo C.C.C.P., un desacoplante de la fosforilación oxidativa que impide la síntesis de ATP. (gráfica 5).

El desacoplante de la fosforilación oxidativa anula el efecto estimulador del fosfato sobre la adhesión de *Pseudomonas*

aeruginosa a células bucoepiteliales humanas (gráfica 6).

Por último, la adhesión disminuye a medida que se aumenta el pH en el intervalo de 7.2 a 9.8 (gráfica 7).

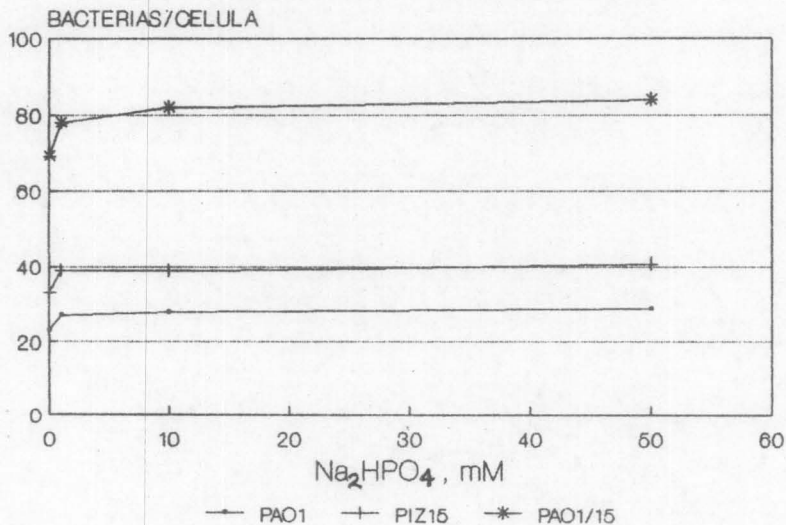
GRAFICA 1
EFFECTO DEL SODIO SOBRE LA ADHESION DE
Pseudomonas aeruginosa A CBH



2×10^6 bacterias se mezclaron con 2.5×10^4 células bucoepiteliales humanas (CBH) y se incubaron a 37°C durante 2 h en un baño de temperatura regulable con agitación. La mezcla se lavó 3 veces con Tris 0.1 M pH 7.2 para eliminar las bacterias no adheridas, se tiñó con eritrosina B y se hizo un frotis. La preparación se contratiñó con azul de metileno y se examinó al microscopio óptico para contar el número de bacterias por célula en 50 CBH elegidas al azar. Los resultados representan el promedio de al menos tres experimentos independientes.

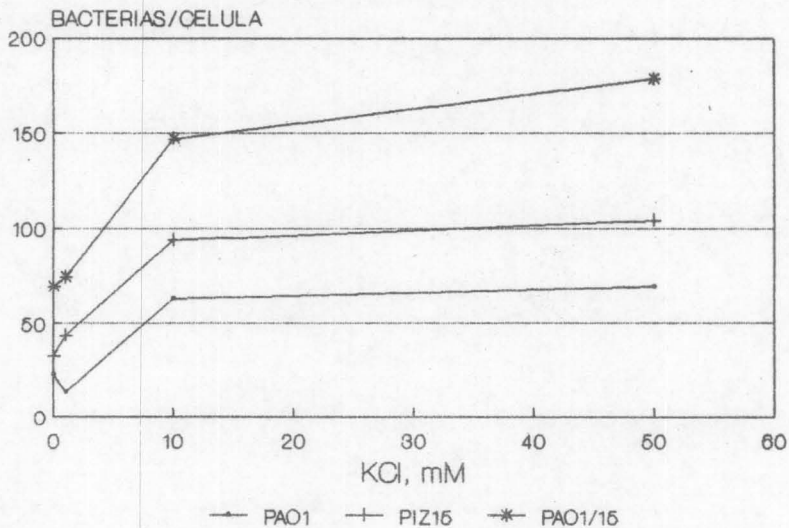
El NaCl se adicionó al principio de los ensayos a 1, 10 y 50 mM.

GRAFICA 2
EFFECTO DEL FOSFATO SOBRE LA ADHESION DE
Pseudomonas aeruginosa A CBH



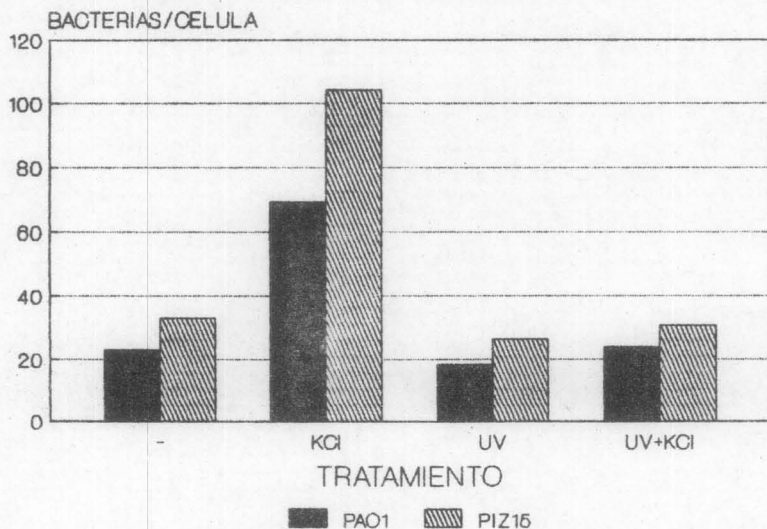
Las condiciones experimentales son las descritas para la gráfica 1, excepto porque la sal adicionada fué Na_2HPO_4 a las cocentraciones indicadas.

GRAFICA 3
EFFECTO DEL POTASIO SOBRE LA ADHESION DE
***Pseudomonas aeruginosa* A CBH**



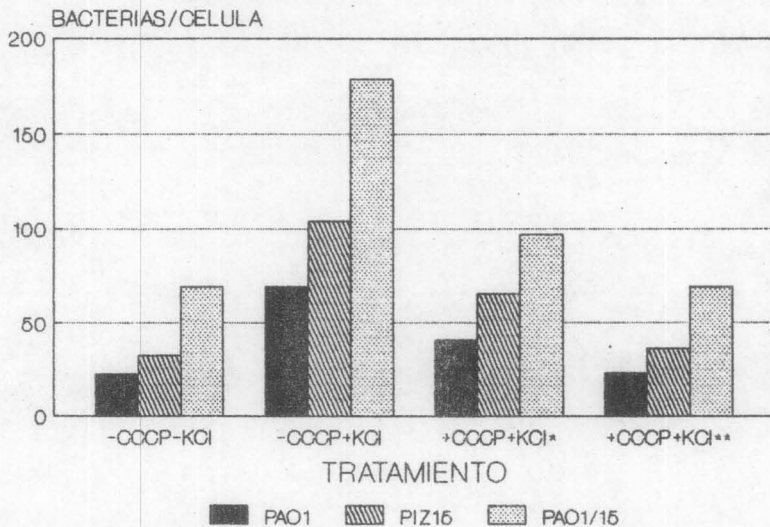
Las condiciones experimentales son las descritas para la gráfica 1, excepto porque se adicionó KCl a las concentraciones indicadas.

GRAFICA 4
EL POTASIO NO ESTIMULA LA ADHESION DE
***P. aeruginosa* CUANDO ESTA HA**
SIDO MUERTA POR IRRADIACION CON U.V.



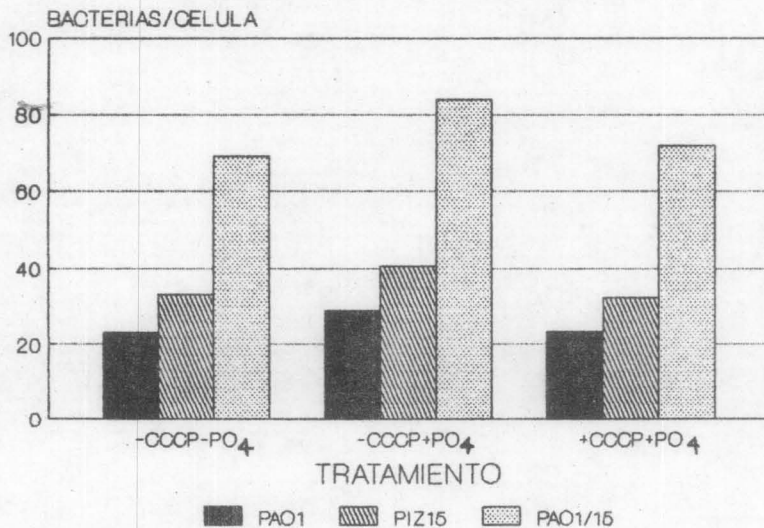
Las condiciones experimentales son las descritas para la gráfica 1; excepto por la muerte bacteriana, antes del ensayo de adhesión, por irradiación con luz ultravioleta y porque se adicionó KCl (50 $\mu\text{g}/\text{ml}$) en los casos indicados.

GRAFICA 5
EFFECTO INHIBITORIO DEL CCCP SOBRE LA
ESTIMULACION PRODUCIDA POR EL POTASIO
EN LA ADHESION DE *P. aeruginosa*



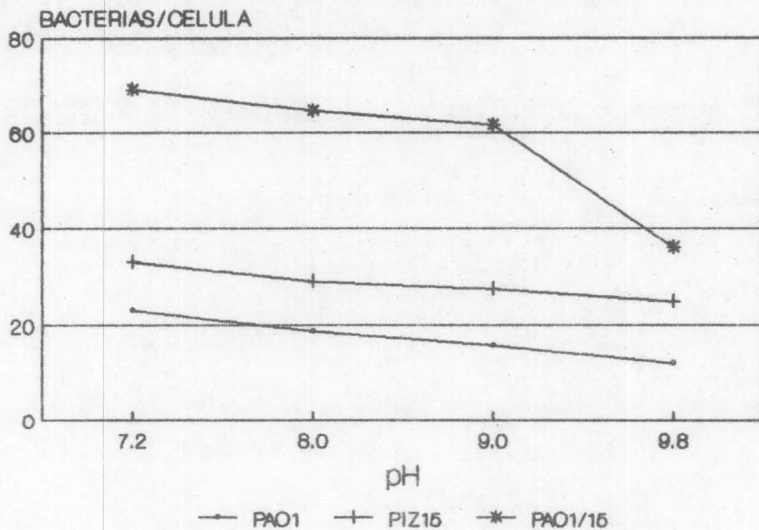
Las condiciones experimentales son las descritas para la gráfica 1, excepto por la adición del desacoplante CCCP (* 50 µg/ml; ** 75 µg/ml), durante las dos horas de incubación; así como por la incorporación de KCl (50 µg/ml) al inicio del ensayo de adhesión.

GRAFICA 6
EFEECTO INHIBITORIO DEL CCCP SOBRE LA
ESTIMULACION PRODUCIDA POR EL FOSFATO
EN LA ADHESION DE P. aeruginosa



Las condiciones experimentales son las descritas para la gráfica 1, excepto por la adición del desacoplante CCCP (50 µg/ml) durante las dos horas de incubación, así como por la incorporación, al inicio del ensayo de adhesión, de Na₂HPO₄ (50 µg/ml).

GRAFICA 7
EFFECTO DEL pH SOBRE LA ADHESION DE
***Pseudomonas aeruginosa* a CBH**



Las condiciones experimentales son las descritas para la gráfica 1, excepto porque se usó Tris 0.1 M a los pHs indicados y porque no se adicionó NaCl.

DISCUSION

En el presente trabajo hemos presentado evidencias que confirman que el bacteriófago FIZ 15, al lisogenizar, aumenta la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas. Igualmente hemos confirmado que para que ocurra el incremento en la adhesión no es necesaria la presencia del profago; basta con que la cepa PA01 haya sufrido un cambio superficial a nivel del receptor para el fago (antígeno "O", ver Vaca y cols. 1988) (48), ya que la cepa PA01/15 se adhiere a células bucoepiteliales humanas en número mucho mayor que la cepa silvestre PA01 o la lisogena PIZ 15 (gráfica 1).

También hemos confirmado nuestro hallazgo previo de que el incremento en la adhesión conferido por el profago FIZ 15 a su lisógena ocurre mediante un mecanismo, adicional al descrito mediado por *fimbriae* (Woods y col., 1980) (52), que requiere energía, ya que la irradiación con luz UV disminuye la adhesión de la cepa PIZ 15 en tanto que no afecta a la de PA01, en concordancia con lo reportado para esta última por Woods y col. (52) (gráfica 4).

A objeto de averiguar el papel de los iones en la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas, decidimos sustituir el PBS, Buffer comúnmente usado en este tipo de ensayos, por Tris 0.1 M pH 7.2 e incorporar a la mezcla bacterias con células bucoepiteliales humanas, NaCl, KCl o Na_2HPO_4 a distintas concentraciones.

El NaCl no tuvo efecto apreciable sobre la adhesión a células bucoepiteliales humanas en ninguna de la cepas probadas (gráfica 1); a diferencia del fosfato que la incrementó ligeramente (gráfica 2) y del potasio, el cual la favoreció grandemente (gráfica 3).

El incremento causado por el potasio fue nulificado cuando las cepas bacterianas no estaban metabólicamente activas (gráfica 4) o cuando se les desacopló la fosforilación oxidativa con C.C.C.P (gráfica 5), el cual es un compuesto que rompe el gradiente electroquímico de la membrana por introducción de protones y con ello impide la síntesis de ATP. El requerimiento de síntesis de ATP para la adhesión incrementada es más pronunciado en las cepas PIZ 15 y PA01/15 que en PA01, como puede inferirse al observar el mayor efecto estimulador del fosfato (sustrato para la síntesis de ATP) en las primeras que en la última (gráfica 2). Así, cuando las bacterias están impedidas para sintetizar ATP (desacopladas) por fosforilación oxidativa, el fosfato no estimula su adhesión a células bucoepiteliales humanas (gráfica 6).

Tomados en su conjunto, estos resultados nos permiten hipotetizar que el estado energético de *Pseudomonas aeruginosa* influencia grandemente su adhesión a células bucoepiteliales humanas; particularmente la de la cepas PIZ 15 y PA01/15, ya que PA01 se adhiere en números comparables tanto viva como muerta o desacoplada (2, 3).

El hecho de que disminuya la adhesión de PIZ 15 cuando está

muerta o desacoplada nos indica que existen dos mecanismos de adhesión en esta cepa: uno mediado por los *fimbrias* y otro, dependiente de energía, en el que participa la superficie externa de la membrana (el LPS ?). En este segundo mecanismo que proponemos, el grado de exposición de los sitios de unión a células bucoepiteliales humanas en la superficie bacteriana dependerá de la energización de la membrana, de modo que los factores que alteren el gradiente electroquímico, tales como el C.C.C.P. que introduce protones o el potasio que provoca la salida de éstos, disminuyen y activan, respectivamente la adhesión, mediante la menor-mayor exposición de los sitios de unión.

Finalmente, creemos que las uniones adherentes de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas probablemente incluyen un componente de tipo electrostático, toda vez que la adhesión disminuye a medida que se incrementa el pH en el intervalo 7.2-9.8; podemos suponer también que estas uniones no son puentes iónicos ya que al aumentar la fuerza iónica con NaCl, la adhesión prácticamente no aumenta.

BIBLIOGRAFIA

- 1.- Arce, G.J.; Arenas, A.D.; Argüello, R.F.; Vaca, P.S. (1987) "El bacteriofago FIZ 15 aumenta la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas mediante un mecanismo que requiere energía". Resúmenes del VII coloquio interno de investigación E.N.E.P. Iztacala U.N.A.M. pp 42.
- 2.- Argüello, R. F. Vaca, P. S. (1989) "El potasio estimula la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas" Resúmenes del VIII coloquio de investigación E.N.E.P. Iztacala U.N.A.M. pp (C) 40.
- 3.- Argüello, R.F.; Arenas, A.D.; Moreno, T.R.V.; Martínez, H.G.; Vaca, P.S. (1989) "Efecto de los iones en la adhesión de *Pseudomonas aeruginosa* a células bucoepiteliales humanas" Resúmenes del XX Congreso Nacional de Microbiología. Morelia Michoacan Mexico. Del 26 al 29 de Abril pp 36.
- 4.- Beachey, H.E. (1981) Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. Rev. Infect. Dis. 143 : 325-343.
- 5.- Berka, R.M. and M. L. Vasil, (1982) Phospholipase C

(heat-labile hemolysin) of *Pseudomonas aeruginosa*; purification and preliminary characterization. *J. Bacteriol.* 152 : 239-245.

6.- Bodey, G.B. (1983) Infections caused by *Pseudomonas aeruginosa* *Rev. Infect. Dis.* 5 : 270-313.

7.- Callahan, L.T. III (1974) Purification and characterization of *Pseudomonas aeruginosa* Exotoxin. *Infect. Immun.* 9 : 113-118.

8.- Carlson, D.M. and L.W. Mathews, (1966) Polyuronic acids produced by *Pseudomonas aeruginosa*. *Biochemistry* 5 : 2817-2822

9.- Cervantes-Vega, C.; J. Chavez; N.A. Cordova; P. Mora and J.A. Velasco, (1986) Resistance to metals by *Pseudomonas aeruginosa* Clinical isolates. *Microbios* 48 : 159-163.

10.- Cicmanec, J. F. and I.A. Holder, (1979) Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in normal and burned skin extract : Role of extracellular proteases. *Infect. Immun.* 25 : 477-483.

11.- Coleman, K.; G. Dougan and J.P. Arbuthnott (1983) Cloning and expression in *Escherichia coli* K12 of the chromosomal hemolysin (phospholipase C) determinant of *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Bacteriol.* 153 : 909-915.

- 12.- Costerton, J.W. (1979) *Pseudomonas aeruginosa* in nature and disease. In : *Pseudomonas aeruginosa* the organism, diseases it causes and their treatment, Sabath, L.D. (eds.) Hans Huber Publisher. Bern. Stuttgar. Viena. pp 15-25.
- 13.- Duguid, J. P.; Old, D.C. (1980) Adhesive properties of Enterobacteriaceae. En E.H. Beachey (ed) Bacterial adherence. Chapman and Hall, London; Methuen, New York, pp 184-217.
- 14.- Escobar, H. J.; Urzúa, M. M.; Martínez, H. G.; Arenas, A.D.; Oliver, A. G.; Vaca, P.S.; Cervantes, C. (1985) Conversión lisogénica en *Pseudomonas aeruginosa*. Resúmenes del V Coloquio Interno de Investigación E.N.E.P. Iztacala pp 110.
- 15.- Fein, J. E. (1981) Screening of uropathogenic *Escherichia coli*. for expression of mannose-sensitive adhesins: Importance of culture conditions. J. of J. Clinical Microbiology. 11 : 1088-1095.
- 16.- Freter, R., and G. W. Jones. (1983) Models for studying the role of bacterial attachment in virulence and pathogenesis. Rev. Infect. Dis. 5 : 647-658.
- 17.- Gibbons, R.J. (1977) Adherence of bacteria to host tissue. En D. Schlessinger (ed) Microbiology. American Society for

Microbiology, Washington, D.C. pp 395-406.

18.- Gibbons, R.J.; Van Houte, J. (1980) Bacterial adherence and the formation of dental plaques. En E.H. Beachey (ed) Bacterial adherence. Chapman and Hall. London; Methuen New York, pp 60-104.

19.- Guyot, G. (1908) Uber die bakterielle hamaglutination Zentralbl. Bakteriologie. (I. abt.) 47 : 640-653.

20.- Gray, G.L. ; R. M. Berka and M.L. Vasil, (1981) A *Pseudomonas aeruginosa* mutant nonderepressible for orthophosphate-regulated proteins. J. Bacteriol. 147 : 675-678.

21.- Holder, I.A.; R.C. Wheeler and T.C. Montie, (1982) Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa* : Animal protection studies. Infect. Immun. 35 : 220-228.

22.- Holloway, B. W. and G. N. Cooper. (1962) Lysogenic conversion in *Pseudomonas aeruginosa* J. Bacteriol. 84 : 1321-1324.

23.- Holloway, B. W. and V. Krishnapillai (1975) Bacteriophages and Bactericins. En P. H. Clarke and M. H. Richmond (ed) Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas*. John, W. and S. pp 99-132.

24.- Jensen, S. E.; I. T. Fecycz; G. W. Stenke and J. N. Campbell,

(1980) Demonstration of a cell-associated, inactive precursor of an exocellular protease produced by *Pseudomonas aeruginosa* cultures. Can. J. Microbiol. 26 : 87-93.

25.- Johanson, V. G. Jr. and D. E. Woods. (1979) Association of respiratory tract colonization with adherence of Gram-negative bacilli to epithelial cells. J. Infect. Dis. 139 : 667-673.

26.- Johnson, M. K. and D. Boese-Marrazo, (1980) Production and properties of heat-stable extracellular hemolysin from *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 28 : 1028-1033.

27.- Kawaharajo, K.; C. Abe; J. Y. Homma; M. Kawane; T. Gotoh; N. Tanaka and Morihara, (1974) Corneal ulcers caused by protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn. J. Exp. Med. 44 : 435-442.

28.- Kawaharajo, K.; Y. Homma; Y. Aoyama; E. Okada and K. Morihara, (1975) *In vivo* studies on protease and elastase from *Pseudomonas aeruginosa*. Jpn. J. Exp. Med. 45 : 89-100.

29.- Kurioka, S. and P. V. Liu, (1977) Effect of the hemolysin of *Pseudomonas aeruginosa* on phosphatides and on phospholipase activity. J. Bacteriol. 93 : 670-674.

- 30.- Kuzio, J. and A. M. Kropinski. (1981) "O"-antigen conversion in *Pseudomonas aeruginosa*. PA01 by bacteriophage D3 J. Bacteriol. 155 : 203-212.
- 31.- Leppla, S. H., (1976) Large-scale purification and characterization of the exotoxin of *Pseudomonas aeruginosa*. Infect. Immun. 14 : 1077-1086.
- 32.- Liu, P. V., (1979) Toxins of *Pseudomonas aeruginosa*. En *Pseudomonas aeruginosa* Dogget, R. G. (ed) Academic Press. pp 63-88.
- 33.- Lowbury, E. J. L. (1975) Ecological importance of *Pseudomonas aeruginosa*: Medical aspects. En P. H. Clarke and M. H. Richmond (ed) Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas* John W. Sons. pp 37-67.
- 34.- Nakahara, H.; T. Ishikawa; Sarai; I. Kondo; H. Kozokue and S. Silver, (1977) Linkage of Mercury, Cadmium and Arsenate and drug resistance in clinical isolates of *Pseudomonas aeruginosa*. Appl. Environ. Microbiol. 33 : 975-976.
- 35.- Palleroni, M. J. (1975). General properties and Taxonomy of the genus *Pseudomonas*. En P. H. Clarke and M. H. Richmond (ed)

Genetics and Biochemistry of *Pseudomonas* John Willey and Sons pp.
I-37

36.- Pavloskis, O. R. and A. H. Shakelford (1974). *Pseudomonas aeruginosa* exotoxin in mice: localization and effect on protein synthesis *Infect. Immun* 9:540-546.

37.- Pollack, M. (1984). The virulence of *Pseudomonas aeruginosa* *Rev. Infect. Dis.* 6 (3): 617-625.

38.- Rhame, F. S. (1979). The ecology and epidemiology of *Pseudomonas aeruginosa* En L.D. Sabath (ed) *Pseudomonas aeruginosa* The organism, diseases it causes and their treatment. Hans Huber Publishers, Bern Stuttgart, Vienna pp 35-55.

39.- Sensakovic, J. W. and P. F. Bartell. (1974). The slime of *Pseudomonas aeruginosa*: Biological characterization and possible role in experimental infection. *J. Infect. Dis.* 129: 101-109.

40.- Sokath, J. R., (1969). Citado en Cicmanec, J. F. and I. A. Holder. (1979), Growth of *Pseudomonas aeruginosa* in normal and burned skin extract: role of extracellular proteases. *Infect. Immun.* 25: 477-483.

41.- Scharman, W., (1976) Formation and isolation of leucocidin from *Pseudomonas aeruginosa*. *J. Gen. Microbiol.* 93: 283-291.

- 42.- Scharman, W., F. Jacob and J. Postendorfer. (1976). The cytotoxic action of leucodidin from *Pseudomonas aeruginosa* on human polymorphonuclear leukocytes. *J. Gen. Clinical Microbiology* 11: 1088-1095.
- 43.- Schultz, D. R. and K. D. Miller, (1974) Elastase of *Pseudomonas aeruginosa*: inactivation of complement and complement-derived chemotactic and phagocytic factors. *Infect. Immun.* 10: 128-135.
- 44.- Sparling, P.F. (1983). Bacterial virulence and pathogenesis and over view. *Rev. Infect. Dis.* 5: 637-646.
- 45.- Schwarzmann, S.C. and J. R. Boring III, (1971) Antiphagocytic effect of slime from a mucoid strain of *Pseudomonas aeruginosa* *Infect. Immun* 3: 762-767.
- 46.- Summers, A. O. and G. A. Jacoby. (1978). Plasmid determined resistance to boron and chromium compounds in *Pseudomonas aeruginosa*. *Antimicrob. Agents Chemother.* 13: 637-640.
- 47.- Vaca, P. S.; Oliver, A. G.; Escobar, H. J.; Martínez, H. G.; Arenas, A. D. (1986) Modificación de propiedades de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa* inducida por el fago FIZ 15. *Resúmenes del*

- 48.- Vaca, P. S.; G. Martínez; A. Cruz and J. Escobar. (1988). Decreased Sensitivity to phagocytosis and serum bactericidal Effect induced by FIZ 15 bacteriophage in *Pseudomonas aeruginosa* Rev. Lat-amer. Microbiol. 30 (3) : 277-281.
- 49.- Vaca, P.S.; Cervantes-Vega, C. (1988). Factores de virulencia de *Pseudomonas aeruginosa*. Rev. Lat-amer. Microbiol. 30: 87-90.
- 50.- Vaca, P.S.; Arce, G.J.; Argüello, R.F.; Arenas, A.D.; and Oliver, A.G.(1989) FIZ 15 bacteriophage increases the adhesion of *Pseudomonas aeruginosa* to human buccal epithelial cells. Rev. Lat-amer. Microbiol 31 : I-5
- 51.- Vaca, P.S.; Argüello, R.F.; Arenas, A.D.; Moreno, T.R.V.; and Martínez, H.G. (1989) Potassium ions stimulate the adhesion to human buccal epithelial cells. Rev. Lat-amer. Microbiol (enviado).
- 52.- Woods, D. E.; D. C. Straus; W. G. Johanson; V. K., Berry and J. A. Bass. (1980). Role of pili in adherence of *Pseudomonas aeruginosa* to mammalian buccal eithelial cells. Infect. Immun. 29: 1146-1151.
- 53.- Wretlind, B. L. Heden; L. Sjoberg and T. Wadstrom, (1973).

Production of enzymes and toxins by hospital strains of *Pseudomonas aeruginosa* in relation to serotype and phage typing patterns. J. Med. Microbiol. 6: 91-100.

54.- Wretling, B. and T. Wadstrom. (1977). Purification and properties of a protease with elastase activity from *Pseudomonas aeruginosa*. J. Gen. Microbiol. 103:319-327.

55.- Zierdt, C. H. and R. J. Williams, (1975). Serotyping of *Pseudomonas aeruginosa* isolated from patients with cystic fibrosis of the pancreas. J. Clin. Microbiol. 1: 521-526.