



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**



FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES IZTACALA

DISTRIBUCIÓN DE SECUENCIAS HOMOLOGAS AL GEN *bor*

DEL BACTERIÓFAGO λ EN MIEMBROS DE LA FAMILIA

Pasteurellaceae: Haemophilus, Actinobacillus y Pasteurella.

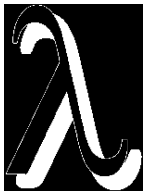
T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

MARÍA DOLORES ALCÁNTARA MONTOYA



DIRECTOR DE TESIS: DR. SERGIO VACA PACHECO



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.



DEDICATORIA

A

Mi madre: Cheli

Por ofrecerme siempre lo mejor, sin recibir nada a cambio; por ser una mujer que siempre se mantuvo de pie sin importarle que tan duro fuera el cierzo. Mami: Gran parte de lo que soy ahora y seré en un futuro será por ti.

Mil gracias.

Mis hermanos: Jesús, Gaby, Mire y July

Por todo el apoyo que me brindaron, especialmente en los momentos más difíciles de mi carrera; Demostrándome que siempre estarán ahí a pesar de todo.

Gracias.

A Gerardo, Santiago e Israel

Por todas las ocasiones que estuvieron conmigo y por que no importa que tan difícil sea el camino, nunca se rinden. Esto también es por ustedes.

Gracias.

Mis sobrinos: Gerardito, Aixa, Ilse, Aylin, Lupita y Miguel

Niños saben que los quiero mucho.



Agradecimientos

Dr. Sergio Vaca Pacheco por hacer de la genética un deporte que se debe practicar; Gracias por ser además de asesor, amigo.

A los Dr. Erasmo Negrete Abascal y Diego J. Arenas Aranda por sus atinados comentarios, enriqueciendo enormemente este trabajo.

A la Profa. Gloria L. Paniagua y Prof. Erick Monroy por que siempre estaban cuando los necesite.

A Octavio P. García González por ser un "profesor maligno" muy a todo dar, además de sus ilustres enseñanzas en Biología Molecular.

A Ricardo por ofrecerme siempre lo mejor de ti. Gracias por todo lo que pasamos juntos durante la carrera.

A mis amigos de la carrera: Paty, Diego, Efraín y Monse por esos momentos de enorme trabajo, prácticas, quemas, etc. Saben que los primeros siempre serán los primeros.

A mis compañeros del laboratorio: Faby, Marce, Ángel, Paulo, Augusto, Gaby, Eli y Angélica: gracias su apoyo y amistad, haciendo más amena la estancia en Genética. Manta Agus por tus striptease.



A los Biólogos Iztacalos en el CCH Azcapotzalco:

- ⇒ Pedro por creer en mí, permitiéndome estar en ésta nueva aventura donde aprenderé muchísimo.
- ⇒ Muy especialmente a Virgilio y José por depositarme su confianza, apoyo, amistad y profesionalismo desde un principio, no me permito defraudarlos.

A Biól. Paul y Armando por el enorme apoyo que me brindan.

A los Profesores de Iztacala: Ángel Duran, Margarita Canales, Carmen Álvarez, Teresa Ramírez, Rodolfo Cadenas, Rafael Quintanar, Josefina Vázquez y Rodolfo de la Torre por ser excelentes profesores.

A todos los Biólogos con los que he convivido durante la carrera, en el CCH y amigos, por demostrar siempre su pasión por la **BIOLOGÍA** y no es para menos.



“El mundo vivo puede dividirse en dos grandes categorías: los organismos celulares y los virus”

Wolfram Zillig

*La Biología no se rige por leyes sino todo lo contrario,
por lo que es difícil suponer que existan verdades
absolutas...*

AMMD



INDICE

RESUMEN.....	1
INTRODUCCIÓN.....	3
<i>Escherichia coli</i>	3
Bacteriófagos.....	3
Ciclo de multiplicación vírica.....	5
Conversión lisogénica.....	8
El bacteriófago λ	10
Ciclo de replicación del fago λ	11
Genes accesorios de λ	15
El gen bor	16
La resistencia al suero.....	18
Familia <i>Pasteurellaceae</i>	22
OBJETIVOS.....	30
MATERIALES Y METODOS.....	31
MATERIALES.....	31
METODOS.....	33
Extracción de DNA cromosómico en miembros de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	33
Amplificación por PCR de secuencias homologas al gen bor de λ en miembros de la familia <i>Pasteurellaceae</i>	34
Clonación de los bor-like a pCR2.1-TOPO.....	37
Transformación en <i>E.coli</i> W3110.....	38



Análisis de clonas β -galactosidasas positivas

Extracción de DNA plasmídico.....40

Análisis por restricción.....42

Purificación de los ***bor-like***.....44

Secuenciación de los ***bor-like***.....45

Análisis *in silico* de los ***bor-like***.....46

RESULTADOS.....47

Extracción de DNA cromosómico en miembros de la familia *Pasteurellaceae*.....47

Estandarización del PCR en DNA de λ48

Amplificación por PCR de secuencias homologas al gen ***bor*** de λ en miembros de la familia *Pasteurellaceae*.....49

Clonación de los ***bor-like*** en pCR2.1-TOPO.....50

Análisis de clonas β -galactosidasa positivas

Extracción de DNA plasmídico.....50

Análisis por restricción.....51

Análisis *in silico* de los ***bor-like***.....53

Alineamiento por computadora de los ***bor-like***.....54

Árbol filogenético de los ***bor-like*** en miembros de la familia *Pasteurellaceae*.....55

DISCUSIÓN.....56

PERSPECTIVAS.....59

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....60



R E S U M E N

El bacteriófago λ es un virus que infecta a *Escherichia coli*, es parásito intracelular que requiere de la maquinaria de replicación, transcripción y traducción bacteriana para multiplicarse. Presenta dos ciclos de vida: la vía lítica y la lisogénica; En ésta última el DNA del fago se incorpora de manera estable en el cromosoma bacteriano reprimiéndose la expresión de los genes estructurales y de lisis. En esta condición se le denomina **profago** y a la bacteria que lo porta **lisógena**. Los **profagos** pueden modificar a la bacteria proporcionando características de virulencia mediante: transducción y conversión lisogénica, como puede ser la producción de toxinas, resistencia a algunos antibióticos o nuevas rutas metabólicas.

Uno de los genes descritos que confieren propiedades de virulencia es el gen **bor** del fago λ que le proporciona a su lisógena resistencia al efecto bactericida del suero. Éste gen posee cierta homología a nivel secuencia con el locus *iss* del plásmido ColVI-K94 de *E. coli*.

Debido a la importancia médica, genética y evolutiva que significa la presencia del gen **bor** en la supervivencia de la bacteria ante el sistema inmune del hospedero, el objetivo de este trabajo fue localizar mediante PCR la presencia de secuencias homólogas al gen **bor** en diferentes cromosomas bacterianos de algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*, donde se encuentran especies bacterianas que infectan mayoritariamente a animales de importancia económica.



A partir de DNA cromosómico se amplificó por PCR utilizando oligos complementarios a ***bor*** de λ . El resultado fue la obtención de un fragmento de aproximadamente 300pb (tamaño ya reportado para ***bor*** de λ) en *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotipos 1 y 3; *Haemophilus paragallinarum* serogrupo A, a₅ y a₆; con excepción del serogrupo C. *Pasteurella multocida* (cerdo) y *P. haemolytica* (bovino y ave). Algunos fragmentos fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO, empleando para transformar *E.coli* W3110, para su secuenciación y posterior análisis fenotípico.

Las secuencias fueron alineadas en el programa Clustal X proporcionando valores de similitud bastante altos, además de un árbol filogenético el cual aporta la posible diseminación de las secuencias relacionadas con ***bor*** en los miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Cabe mencionar que la presencia de estas secuencias en el cromosoma de las bacterias de tipo silvestre significaría una ventaja selectiva y por lo tanto un éxito evolutivo.

Palabras clave: fago λ , gen *bor*, familia *Pasteurellaceae*.



INTRODUCCIÓN.

Escherichia coli.

La bacteria *Escherichia coli* generalmente es un comensal inocuo que forma parte de la flora intestinal de aves y mamíferos (Selander *et al.*, 1987). Algunas cepas de *E.coli* pueden causar varias enfermedades en humanos y animales, entre las que destacan: diarrea, colitis hemorrágica, disentería, síndrome urémico hemolítico, septicemia, infecciones de riñón y vejiga, neumonía, meningitis neonatal, pielonefritis y bacteriemia en niños y adultos con SIDA (Maslow *at al.*, 1995). *E. coli* es infectada por un vasto número de bacteriófagos, entre los que destacan el fago lambda (λ) y los fagos de la serie T, (T1 a T7) (Fig. 1).

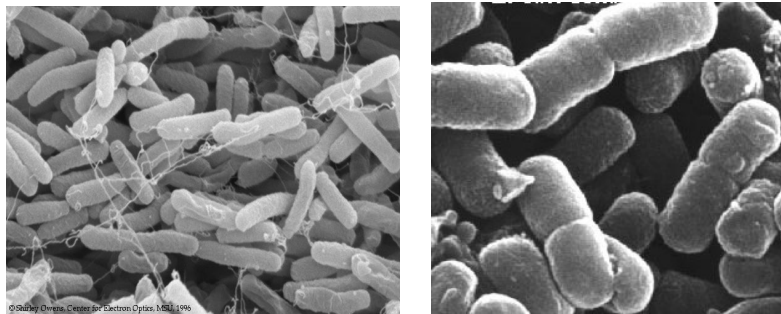


Fig. 1 Micrografía electrónica de *E.coli*.
Tomado de Internet¹¹

BACTERIÓFAGOS.

Los bacteriófagos, o fagos, son virus parásitos intracelulares obligados que infectan a bacterias. Su parasitismo es a nivel genético ya que para multiplicarse intracelularmente requieren de la maquinaria biosintética bacteriana para llevar a cabo sus procesos de replicación, transcripción y traducción.



Fueron descubiertos independientemente por Twort en 1915 y por F. D'Herelle en 1917, siendo éste último quien les designó con el nombre de bacteriófagos que significa: "devorador de bacterias". Además diseñó el método de titulación que es utilizado actualmente. Éste permite contar el número de unidades formadoras de placa (UFP) presentes en una suspensión, es decir, el número de fagos capaces de infectar productivamente a bacterias sensibles causando la aparición de una placa de lisis sobre un cultivo bacteriano inmovilizado en agar. Generalmente el número de UFP es menor que el número de partículas fágicas en suspensión, debido a que una fracción de éstas últimas es incapaz de infectar productivamente como resultado de algún defecto estructural como la ruptura de la cápside o de la cola viral.

Desde el inicio de la Biología Molecular, los bacteriófagos han jugado un papel preponderante en el desarrollo de esta disciplina. Por ejemplo, en 1952 Hersey y Chase gracias a sus experimentos con el fago T2 demostraron que el DNA es el material genético. Años más tarde se utilizarían como modelos de estudio para distintos problemas de biología molecular. Los fagos con material genético de tipo RNA de cadena sencilla se usaron como RNAm para el estudio de la traducción *in vitro* en sistemas libres de células. Mientras que los virus bacterianos con DNA de cadena sencilla fueron un modelo excelente para estudiar la replicación de esta macromolécula. El estudio de los bacteriófagos con DNA de doble cadena permitió ampliar los conocimientos acerca de los mecanismos de control de la expresión genética como: represión, antiterminación de la transcripción, expresión genética secuencial, etc.



EL CICLO DE MULTIPLICACIÓN VIRAL

Conforme a sus ciclos de vida, los bacteriófagos se clasifican en líticos y temperados. El ciclo de vida ciclo lítico, está formado por las siguientes etapas: adsorción, inyección, expresión genética secuencial, morfogénesis (o maduración) y lisis. Los bacteriófagos temperados pueden seguir el ciclo lítico o el ciclo lisogénico. Este último da lugar a un estado de latencia o inactividad del virus al cual se le denomina ***lisogenia***.

El fago T4 es un claro ejemplo para el *ciclo lítico*, ya que éste se adsorbe mediante su cola a su receptor específico. Cada fago se adsorbe a una molécula específica de la superficie celular puede ser un lipopolisacárido o un componente proteico de las bacterias gram negativas; un ácido teicoico en las bacterias gram positivas, incluso una proteína del flagelo o del pili. En el caso de T4 su receptor es la región central de la molécula de lipopolisacárido de la membrana externa de su hospedador: *E. coli*. Posterior a la adsorción sigue la inyección del DNA, en la cual la vaina de la cola se contrae forzando al DNA a entrar a la célula, probablemente a través de las uniones Bayer. El componente proteico del bacteriófago, que carece de papel en la replicación, permanece unido a la superficie de la célula. Por lo tanto, el desnudamiento del T4 ocurre fuera de la célula hospedera.

Durante el período de latencia que sigue a la inyección, el DNA del fago dirige a la célula hospedera para que sintetice los componentes víricos: DNA y componentes proteicos. Al final del período de latencia, los componentes víricos se ensamblan y dan origen a los nuevos viriones (maduración o morfogénesis). Una lisozima codificada por el bacteriófago actúa sobre la pared celular del hospedero



produciendo su lisis y permitiendo que alrededor de cien bacteriófagos puedan salir al exterior por cada célula infectada.

En el ciclo lisogénico, la infección es análoga a como sucede en la vía lítica en lo que se refiere a la adsorción e inyección. Sin embargo la expresión de los genes estructurales y de lisis es reprimida merced a la acción de una proteína represora codificada por el genoma viral, la cual se une a sitios específicos (operadores) del cromosoma fágico impidiendo el acceso de la RNA polimerasa a los promotores. El genoma viral reprimido se llama **profago**, la bacteria que lo porta se denomina **lisógena** y el proceso que conduce a la formación de ésta se designa como **lisogenización**. Algunos profagos se integran al cromosoma bacteriano en un sitio específico, por ejemplo λ , cuyo sitio de integración *attB* está flanqueado por los operones *gal* y *bio*. El profago λ se replica pasivamente como parte del cromosoma bacteriano heredándose a las células hijas. Otros profagos, como P1 de *E. coli*, permanecen como plásmidos replicándose de manera autónoma.

Una **lisógena** puede ser destruida y dar origen a progenie fágica cuando ocurre el proceso de inducción, en el cual el profago es conducido al crecimiento lítico por agentes físicos (e.g. irradiación con luz U.V.) o químicos (e. g. mitomicina C) que dañan al DNA o interfieren con su replicación. La inducción del **profago** forma parte de una compleja serie de respuestas, conocida como sistema SOS, que presentan las bacterias ante situaciones que comprometen su sobrevivencia y en la cual una actividad proteolítica inducible (RecA) degrada al represor del genoma viral (Little y Mount, 1982).



En un cultivo de **lisógenas** la desrepresión ocurre espontáneamente a baja frecuencia (10^{-6}), ocasionando que haya fagos libres. Es posible también que ocurra desrepresión transitoria; es decir, que falle la represión por un breve lapso y se restablezca enseguida, dando lugar a bacterias “curadas” que han perdido el **profago**, ya que, si éste se encontraba integrado al cromosoma, se escinde pero es incapaz de iniciar la vía lítica al restablecerse la represión, de modo que ya no se replica como parte del cromosoma bacteriano ni en forma autónoma y se pierde por dilución a medida que el cultivo crece.

En una bacteria **lisógena** para λ el **profago** se mantiene como tal debido a que codifica al represor, del cual siempre hay un exceso (6%) en el citoplasma bacteriano. Por esta razón, la **lisógena** es inmune a la superinfección por fagos homólogos al **profago**: si un fago homólogo al **profago** (de la misma inmunidad, con los mismos operadores) inyecta su ácido nucléico, éste es reprimido por el represor citoplásmico y no puede seguir ni la vía lítica ni la lisogénica. Así pues, la lisogenia se caracteriza por 4 propiedades: *Heredabilidad*, *Inducibilidad*, *Inmunidad* y *Curabilidad* (Fig. 2).

Los bacteriófagos pueden ser benéficos para la bacteria que infectan mediante los procesos de transducción (especializada o generalizada) y de conversión lisogénica, cuyo resultado es la adquisición de nuevas características fenotípicas por la bacteria, que podrían serle benéficas o indispensables en determinados nichos ecológicos.

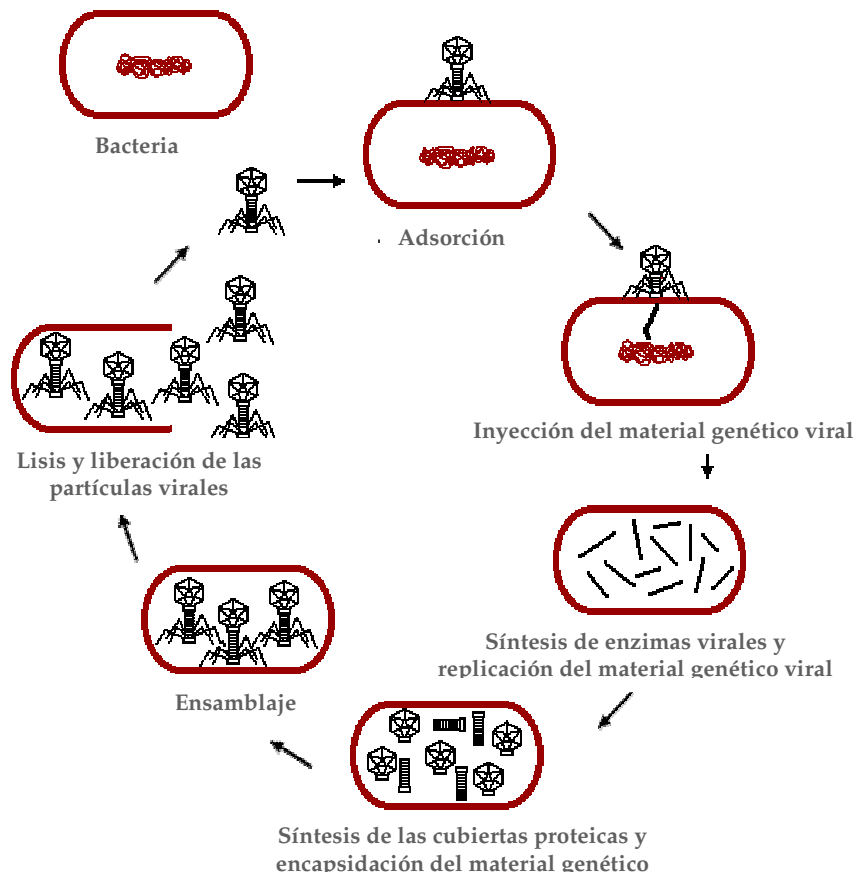


Fig. 2 Ciclo de multiplicación del fago lítico T4.
Tomado de Internet⁴

CONVERSIÓN LISOGÉNICA.

La conversión lisogénica se define como la adquisición bacteriana de nuevas características fenotípicas mediada por un profago (Barksdale y Arden, 1974). Existen numerosos ejemplos de toxinas bacterianas codificadas por bacteriófagos (Bishai y Murphy, 1988); entre éstas se encuentran: la toxina diftérica producida por *Corynebacterium diphtheriae* (Freeman, 1951; Holmes y Barksdale, 1969), las toxinas eritrogénicas de *Streptococcus pyogenes* (Nida y Ferretti, 1982); la estafilocinasa y la enterotoxina A de *Staphylococcus aureus* (Coleman, *et al.*, 1989), la toxina Shiga-like y la enterohemolisina Ehly2 producidas por *E. coli* (Newland *et al.*, 1985; Beutin



et al., 1993), la neurotoxina producida por *Clostridium botulinum* (Barksdale y Arden, 1974) y la citotoxina codificada por el ϕ CTX de *Pseudomonas aeruginosa* (Hayashi *et al.*, 1993). Además de los genes que codifican para toxinas, se han descrito otros genes de virulencia en bacteriófagos, entre los que se encuentran el gen *oac*, que codifica para una acetilasa del antígeno O de *Shigella flexneri* (Clark *et al.*, 1991), genes para producción de cápsula en *S. pneumoniae* (Russel, 1991) y el gen **bor** del bacteriófago λ , que le confiere a *E. coli* resistencia al efecto bactericida del suero (Barondess y Beckwith, 1990).

La fuerza directriz mayoritaria de la emergencia y evolución de las islas de patogenicidad es dicha transferencia horizontal y la adquisición de factores de virulencia. Algunos de los elementos genéticos móviles además de las islas de patogenicidad es la inserción de secuencias como los plásmidos con genes fágicos, siendo estos últimos los más importantes. Se ha sugerido que la persistencia de estos genes en los genomas virales les confiere ventaja evolutiva a los bacteriófagos, siendo favorecidos por el incremento de la replicación de las bacterias que posean estos determinantes de virulencia (Cheetham y Katz, 1995).

La interacción entre bacteria y bacteriófago no es simplemente una interacción entre parásito-hospedero, si no un fascinante caso de **co-evolución** entre las células procariontas y los virus. Un claro ejemplo de ello son los **profagos** que acrecientan el éxito ecológico de muchas bacterias, independientemente de su estilo de vida (Boyd y Brüsow, 2002).



BACTERIÓFAGO λ .

El fago λ que infecta a *E. coli* está compuesto por aproximadamente 50% de proteínas y 50% de DNA de cadena doble (Fig. 3). El tamaño de su genoma es de 48,502pb que corresponde a una masa de 32×10^6 Da. La molécula de DNA está contenida en una cápside icosaédrica de 0.055μ de diámetro que se encuentra unida a una cola tubular de 0.15μ de longitud (Fig. 4).

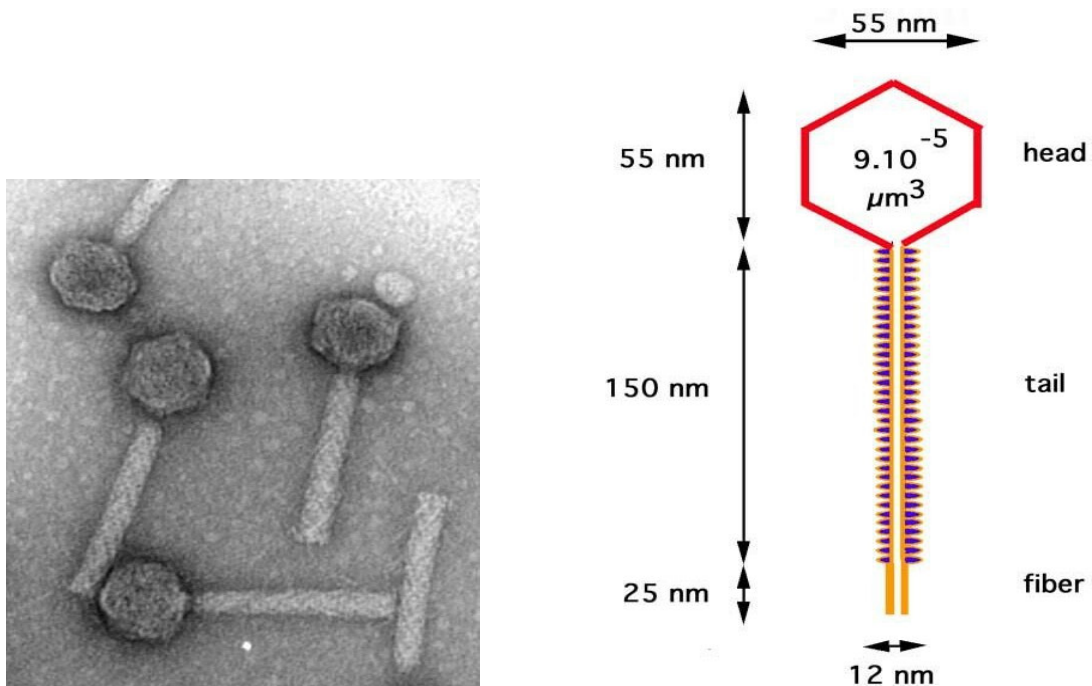


Fig. 3 Izquierda micrografía electrónica del fago λ donde se muestra la estructura de las partículas virales. Derecha esquema del bacteriófago λ . Tomado de Internet³

Su DNA posee extremos cohesivos de cadena sencilla (12 b) en ambos extremos 5' que le permiten circularizarse después de la inyección a la célula (Hershey *et al.* 1963; Young y Sinsheimer, 1964). El genoma de λ expresa aproximadamente 50 proteínas (Szybalski y Szybalski, 1979).



Los genes de λ están agrupados como unidades funcionales cuya localización en el genoma refleja su orden de expresión temporal (Fig. 4).



Fig. 4 Disposición de los genes en λ de acuerdo a su expresión temporal.

CICLO DE REPLICACIÓN DEL FAGO λ .

El fago temperado λ puede seguir cualquiera de las dos vías mutuamente excluyentes: lítica o lisogénica (Echols, H., 1972) (Fig. 5).

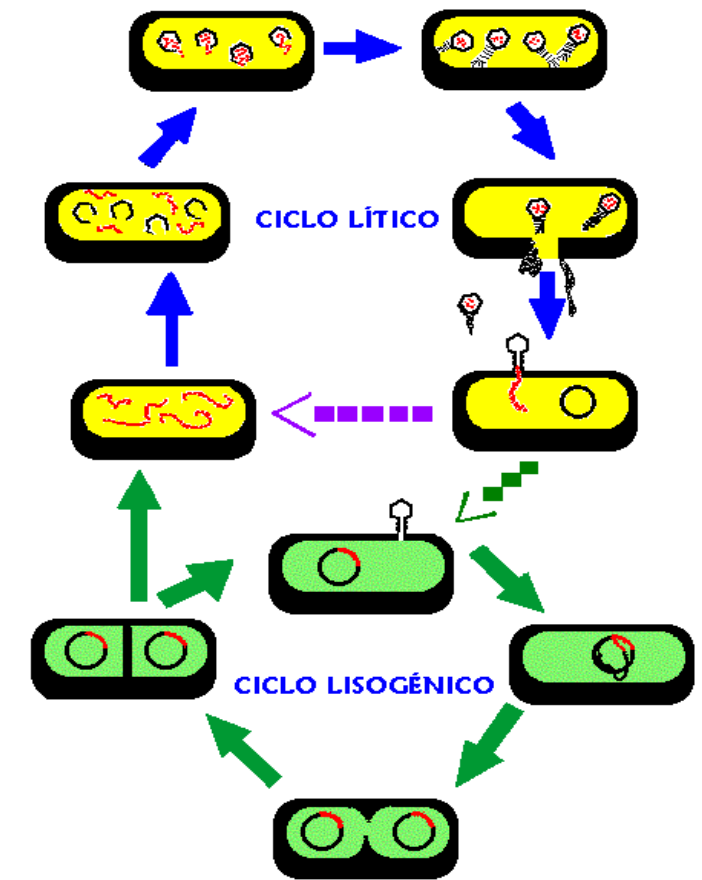


Fig. 5 Ciclo de replicación del fago temperado λ .
Tomado de Internet¹



Para el ciclo lítico se requiere la expresión de los genes *O* y *P* (para el inicio de la replicación del DNA viral) y de los genes *A-J* (alrededor de 20 genes para cabeza y cola) y de los genes de lisis *S* y *R* (lisis de la membrana y de la pared celular, respectivamente). Para el ciclo de vida lisogénico se necesita la expresión de los genes *int* (cuyo producto promueve la integración del cromosoma viral al bacteriano) y *ci* (el cual codifica al represor, que reprime la expresión de los genes estructurales y de lisis). La infección comienza por la adsorción de la partícula viral, vía la proteína J de la fibra de la cola a su receptor específico: la proteína LamB, cuya función es transportar maltosa.

Después de la inyección, el DNA de λ se circulariza, por apareamiento de los extremos cohesivos, y es transcrito por la RNA polimerasa bacteriana a partir de dos promotores: P_R y P_L . La transcripción a partir de P_L se extiende hasta el terminador t_{L1} originando un transcrito de unos 1000 nucleótidos (Roberts, 1969), cuya traducción produce la proteína N (12.2 kDa) (Franklin y Bennet, 1979). El transcrito iniciado en P_R termina en t_{R1} y su traducción da origen a la proteína Cro (Roberts, 1969).

En presencia de la proteína N la RNA polimerasa es capaz de trascender las señales de terminación (t_{L1} , t_{R1} y t_{R2}) y la transcripción iniciada en P_L se extiende hasta la región *cIII-b*, en tanto que la transcripción de P_R se extiende hasta la región *cII-O-P-Q* (Gottesman *et al.*, 1980). La antiterminación mediada por la proteína N requiere la presencia de sitios *nut* en el genoma viral (N utilization: *nutL*, situado entre



P_L y N ; y $nutR$, localizado entre cro y t_{R1}) (Salstrom y Szybalski, 1978; Rosenberg. *et al*, 1978), y varias proteínas bacterianas, denominadas nus (N utilization substances) (Friedman y Baron, 1974); (Friedman *et al.*, 1981)(Fig. 6).

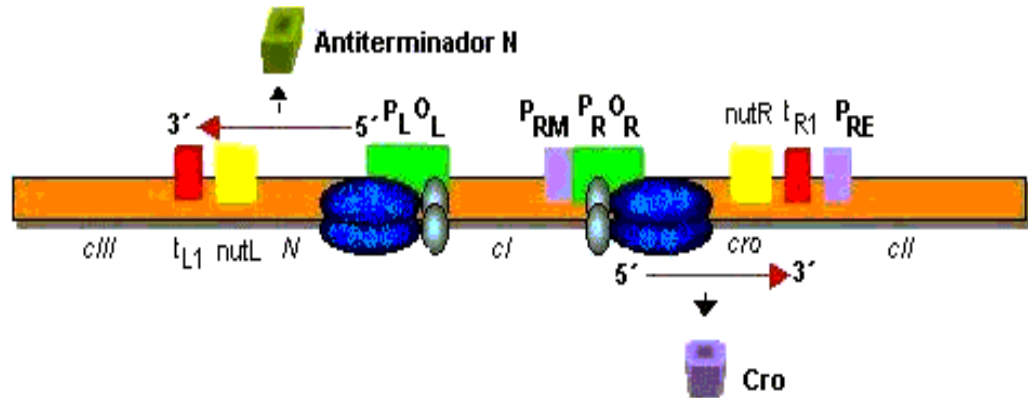


Fig. 6 Genes de λ que regulan la expresión del ciclo de replicación viral.
Tomado de internet³

Hasta este punto, las células infectadas contienen proteínas necesarias tanto para el crecimiento lisogénico (cII y $cIII$, que se requieren para la transcripción de cl e int) como para el crecimiento lítico (O y P , que participan en la replicación del DNA viral), y Q que estimula la transcripción de los genes tardíos (estructurales y de lisis). La decisión lisis-lisogenia depende de una compleja interacción (influenciada por las condiciones del medio) entre proteínas virales y bacterianas (Herskowitz y Hagen, 1980).

Para que λ lisogénice a *E. coli* se necesita que cl reprima la expresión de los genes estructurales y de lisis, además de que el DNA viral se integre al cromosoma bacteriano. Esta integración ocurre por recombinación sitio-específica, mediada por la proteína viral Int y el factor de integración del huésped (IHF) codificado por los genes bacterianos: $himA$ y $himD$ (Miller y Nash, 1981).



La característica peculiar de la estructura genómica de los fagos lambdoides es comparable genéticamente con los virus de tallo, evidentemente por la recombinación no homóloga entre secuencias ancestrales. Otro ejemplo son los fagos de bacterias presentes en la leche. Ambos con grupos de hospederos definidos. Un importante avance en la comprensión del intercambio horizontal es el reconocimiento de eventos recombinación no homóloga que van en aumento y son esencialmente al azar, ambos en una posición relativa a las regiones codificantes ((Hendrix, 2003).

El aumento en los genomas no solo es por la recombinación no homóloga, existen muchos más caminos específicos, por ejemplo, la adquisición de **morones** (unidades de más DNA). Usualmente codifican regiones flanqueadas por un promotor y un terminador. Los **morones** algunas veces tienen un contenido diferente de G+C en su secuencia. En otros casos los **genes moron** son genes de conversión *lisogénica* expresados a partir del **profago** reprimido, confiriéndole a la **lisógena** una ventaja selectiva. La toxina shiga aparentemente es codificada por **genes moron**.

En la población de estos fagos se asume que existe un traspaso de genes el cual es de tipo local; es decir, sólo entre algunos tipos de fagos, por ejemplo, los lambdoides. Este cambio de genes ocurre de manera frecuente con otros miembros de éste grupo de fagos lambdoides, pero nunca con fagos de otros grupos.

Los fagos líticos presentan una trayectoria evolutiva distinta, por que en un principio nunca llegan a ser **profagos** o si lo son es con un bajo índice y por que en muchos casos ellos hidrolizan el DNA de su hospedero. Debido a estas



características el intercambio horizontal vía recombinación entre fago lítico y **profago** puede ser significativamente menor que en fagos temperados. Este es una evidencia que demuestra que los fagos virulentos forman grupos biológicos coherentes con un limitado grupo para el cambio de secuencias. (Hendrix, 2003).

GENES ACCESORIOS DE λ .

Los genes de λ que no se requieren para la lisis ni para la lisogenia se denominan **genes accesorios**. Estos genes se encuentran distribuidos en diferentes partes del genoma, donde el segmento mayor de DNA dispensable corresponde a 33% del genoma, localizado entre el gen *J* y el gen *N*. Este segmento incluye a los genes de la región **b**: a la izquierda de **att** y los genes del operon P_L a la derecha de **att**. El gen **rex**, situado inmediatamente a la izquierda de **cl** no se requiere tampoco para la formación de placas líticas. Otra región dispensables del genoma de λ se encuentran a la derecha de los genes **O** y **P**.

Un segmento de 2.8 kb puede ser deletado (delección nin5) sin tener efecto alguno sobre el desarrollo del fago. Por lo que corresponde a las últimas 2 kb del extremo derecho del genoma de λ , exactamente a la derecha del gen *R*, donde no se habían localizado genes (Hernández *et al.*, 1985). En 1990 se describió al gen **bor** que se encuentra a la derecha de este gen *R* (Barondess y Beckwith, 1990) (Fig. 7).



Fig. 7 Ubicación del gen **bor** en el cromosoma de λ ; el cual se encuentra a un costado del gen *R*.



EL GEN *bor* DEL FAGO λ .

En 1966 se reportó que el *profago* λ disminuía la sensibilidad de su lisógena al efecto bactericida del suero de cobayo (Muschel, L.H. & K. Schmoker, 1966). Este hallazgo fue confirmado con suero humano normal (SHN) y se mostró que la vía alterna del complemento era responsable de la muerte bacteriana (Vaca, S. *et al.*, 1993). El gen responsable de este fenotipo de la *lisógena* fue identificado por mutagénesis insercional con *TnphoA*; se localizaba en el extremo derecho del DNA de λ , distal al gen *R_Z* y orientado hacia la izquierda, en una región que hasta ese momento se creía no codificaba para ninguna función (Barondess, J.J. & J. Beckwith, 1990). El gen fue denominado *bor* (por *blue open reading frame*, porque las *lisógenas* son azules en un medio con XP). El gen *bor* se expresa en la *lisógena* y codifica para una lipoproteína localizada en la membrana externa de *E. coli*. La secuencia de *bor* es altamente homóloga con la del locus *iss* del plásmido conjugativo ColV, I-K94 (Barondess, J.J. & J. Beckwith, 1995). Asimismo se demostró la presencia del plásmido ColV, I-K94 en aislamientos de *E. coli* a partir de aves (Nolan, *et al.*, 2003); Dicho gen aumenta la resistencia al suero de *E. coli* y por lo tanto su virulencia, medido como DL₅₀, en un modelo de infección de pollitos (Binns, M.M., *et al.*, 1979).

Mediante PCR se ha detectado la presencia de putativas secuencias *bor-like* en colifagos temperados de tipo silvestre: mEp 123, mEp 038, mEp 460, 933W y Stx1 (García G.O. datos no publicados). El análisis *in silico* demostró que *bor*_{933W-like} y *bor*_{Stx1-like} presentaban un alto grado de similitud y de conservación, por lo que posiblemente sean las más cercanas al *bor* de λ . Con base a ello es posible que



estos **bor-like** codifiquen para una proteína similar para la que codifica **bor**, confiriéndoles a sus respectivas lisógenas el fenotipo de resistencia al suero incrementando, de esta manera su virulencia.

En cuanto a la regulación de la expresión de **bor** del fago λ se sabe que se transcribe de derecha a izquierda. En el 2004 se logro determinar una región intergénica de 289 nucleótidos contando a partir del nucleótido inmediato siguiente al de término del gen putativo, hasta al inmediato anterior al codón de inicio de **bor**. En dicha región intergénica se identificaron regiones consenso similares a las reportadas para las secuencias Shine-Dalgarno, TATA y región -35; Conjuntamente una secuencia de RNA leader de 82 pb. Por estas características la región intergénica pudiera ser la secuencia de un promotor σ^{70} a partir del cual se transcribe **bor**. Mientras que para la región intergénica ubicada justo al término de **bor**, fue localizada una secuencia similar a la de un terminador de transcripción, que pudiera ser para dicho gen. Por lo que probablemente **bor** se transcriba en la misma dirección que el gen putativo para la proteína de la cápside de λ (Guadarrama, 2004).

RESISTENCIA AL SUERO

La actividad bactericida que tiene el suero es un importante mecanismo de defensa contra las infecciones bacterianas. El suero de humano (SHN) o de animales contiene al complemento y lisozimas, cuyo efecto combinado tiene una acción lítica sobre la superficie bacteriana y es letal para muchas cepas bacterianas gam-negativas previniendo la invasión de la sangre (Taylor, 1983).



El sistema del complemento.

El complemento es un sistema de proteínas conectadas a nivel funcional que interactúan entre sí de forma muy controlada para proporcionar muchas de las funciones efectoras de la inmunidad humoral y de la inflamación. Sus principales funciones biológicas son: 1) Ciertos componentes del complemento activado median la *citólisis* polimerizándose sobre las superficies celulares y formando poros o roturas en la integridad de la doble capa de fosfolípidos de la membrana de estas células. 2) La *opsonización* de microorganismos extraños o partículas que se produce por la unión de las proteínas del complemento a sus superficies. Estas proteínas del complemento se denominan *opsoninas*. Los leucocitos fagocíticos expresan receptores específicos para estas opsoninas; de esta forma las *opsoninas* facilitan la fagocitosis de partículas o microorganismos. 3) La *activación de la inflamación*, la cual se produce en respuesta a la generación de ciertos fragmentos proteolíticos de proteínas del complemento. Estos péptidos derivados del complemento actúan sobre varias células. Activan a los mastocitos produciendo reacciones que producen las de hipersensibilidad inmediata. Además otros fragmentos de las proteínas del complemento pueden aumentar las respuestas del linfocito B frente al antígeno. 4) Los *complejos inmunitarios*, que pueden dañar a los tejidos, se vuelven inocuos al unirse a las proteínas del complemento, lo que da lugar a la solubilidad de los mismos (Abbas, A. *et al.*, 1995).

El sistema del complemento tiene varias propiedades importantes que lo capacitan para actuar de forma eficaz contra invasores extraños sin lesionar los tejidos normales: a) Los componentes solubles del complemento comprenden múltiples enzimas proteolíticas, que se activan de forma secuencial cuando ellas



mismas sufren proteólisis por la acción de otra enzima previamente activada. Las proteínas que adquieren actividad proteolítica por la acción de otras proteasas se llaman *zimógenos* (una cascada enzimática es también característica de los sistemas de coagulación y de las cinasas). b) La activación del sistema del complemento se produce normalmente en ciertos puntos localizados: las moléculas de inmunoglobulina (Ig) que tienen unidas a sus antígenos específicos pueden activar al complemento y por esa razón éste actúa como un mecanismo efector importante de la inmunidad humoral específica. La secuencia de activación del complemento iniciada por los complejos antígeno-anticuerpo se le llama **vía clásica**. Algunos componentes del complejo se activan directamente al unirse a las superficies de microorganismos infecciosos, participando el complemento en la inmunidad natural.

La cascada del complemento.

El componente central del sistema del complemento es una proteína llamada C3 que es crítica para las funciones efectoras de este sistema. La vía clásica y alternativa difieren en sus compuestos proteicos, por lo tanto su activación es distinta para generar las enzimas llamadas **convertasas** que escinden el C3 para producir C3a y C3b (productos proteolíticos de cada proteína del complemento) En los primeros pasos de la vía clásica los anticuerpos unidos a sus antígenos específicos se unen y activan de manera secuencial la proteólisis de tres proteínas del complemento llamadas C1, C4 y C2. Lo que conduce a la formación del complejo C4b2a (con actividad enzimática) que actúa como una convertasa del C3 de la vía clásica. En la vía alternativa el C3b generado de forma espontánea a niveles bajos o por la vía clásica se une a un fragmento proteico llamado Bb que aparece por la escisión proteolítica de una proteína llamada B. El complejo C3bBb es la convertasa



del C3 de la vía alternativa que actúa como la convertasa C3 de la vía clásica para romper C3 y generar más C3b. El siguiente paso de ambas vías es la unión del C3b a las enzimas convertasas del C3 y cambiándolas a convertasas del C5, que catalizan la escisión proteolítica de la proteína C. aunque las convertasas del C5 de las dos vías don moléculas diferentes catalizan reacciones idénticas y actúan sobre idénticos sustratos.

Estos acontecimientos finales no implican la proteólisis, sino la unión secuencial de varias proteínas solubles del complemento llamadas: C6, C7, C8 y C9 a la superficie activadora. Esto conduce a la formación de una estructura de poros liposolubles llamada **complejo de ataque de membrana** (CAM) que produce la lisis osmótica de las células (Fig. 8).

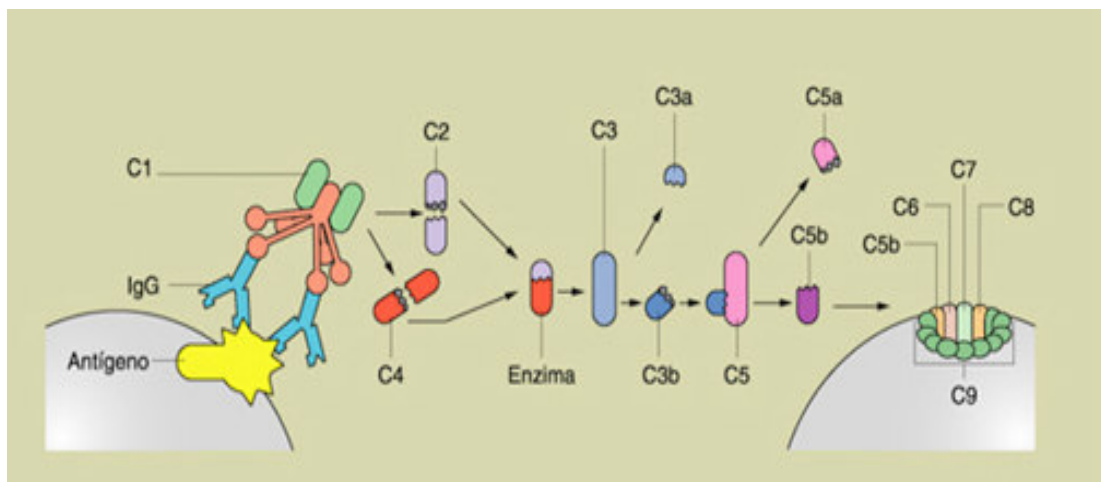


Fig. 8. Esquema de la cascada del complemento que es activada cuando se reconoce un anticuerpo unido a un antígeno. Tomado de Internet⁷



Familias de genes del complemento

Las proteínas del sistema del complemento pueden clasificarse como miembros de varias familias de genes en función de su homología a nivel secuencia. Esta homología entre los genes que codifican varias proteínas del complemento sugiere que los miembros de cada familia de genes podían haber surgido de la duplicación de un gen ancestral, seguido de la diversificación estructural, que imparten las funciones especializadas de las proteínas individuales (Abbas, A. *et al.*, 1995).

La actividad bactericida del suero puede ser inhibida por los LPS (Sansano, M, *et. al.*, 1985) como en *Francisella tularensis* (Sorokin, *et. al.*, 1996); *H. ducreyi* en suero humano (Odumeru, *et. al.*, 1985); Por la cápsula, como es el caso del gen *traT* que codifica para una proteína de membrana externa que muestra cierta resistencia al suero en *E.coli*, *Salmonella*, *Shigella* y *Klebsiella* (Montenegro, M.A, *et. al.*, 1985); Además de la cápsula podría ser el antígeno O en *K. pneumoniae* (Tomás, J.M, *et.al.*, 1986). Todas estas características pueden ser determinantes para la virulencia de las diferentes cepas bacterianas, pero en la mayoría de los casos la resistencia al suero está determinada por información cromosomal, sin embargo se han reportado plásmidos que portan genes que incrementan dicha resistencia (Cisneros & Gómez, 1987). Jonson, T.J, y cols en el 2002 localizaron al gen *iss* en un plásmido conjugativo R en aislamientos de *E.coli* en aves, observándose un incremento en la resistencia al complemento cuando por conjugación se transfirió a una cepa no virulenta.



LA FAMILIA *Pasteurellaceae*.

Los miembros que pertenecen a la familia *Pasteurellaceae* son pequeños bacilos gram-negativos o cocobacilos que pueden colonizar las superficies mucoides del tracto respiratorio y genital. Se consideraban solamente tres géneros: *Haemophilus*, *Actinobacillus* y *Pasteurella*; pero recientemente se agregó el género *Mannheimia* a la lista de la familia *Pasteurellaceae*, que anteriormente era *P. haemolytica*. Los estudios genéticos y taxonómicos indican un alto grado de diversidad de este grupo de microorganismos. En esta familia están incluidos algunos patógenos de importancia humana como: *H. influenzae*, *H. ducreyi* y *A. actinomycetemcomitans*, así como de animales (Tabla 1).

Género	Especies	Tipo de hospedero
<i>Actinobacillus</i>	<i>equuli</i>	Equinos
	<i>pleuropneumoniae</i>	Cerdos
	<i>suis</i>	Cerdos
<i>Haemophilus</i>	<i>paragallinarum</i>	Aves
	<i>parasuis</i>	Cerdos
	<i>somnus</i>	Bovinos y ovinos
<i>Mannheimia</i>	<i>haemolytica</i>	Bovinos y ovinos
<i>Pasteurella</i>	<i>multocida</i>	Aves, bovinos, ovinos, cerdos y conejos
<i>Gallibacterium</i>	<i>anatis</i> *	Aves

Tabla 1. Ejemplos de patógenos de animales que se encuentran clasificados en la familia *Pasteurellaceae*.

* (Christensen *et al.*, 2003).



Muchos miembros de esta familia están cubiertos por varias capas de polisacáridos capsulares (CPS). Esta cápsula juega un importante papel en la virulencia por mostrar propiedades antifagocíticas, que protegen a la bacteria de las defensas del hospedero, o porque participa en la adhesión bacteriana a las células del hospedero. Otro mecanismo adicional que utiliza el organismo para adherirse a las células mucoides del hospedero es la fimbria (estructura filamentosa). Otros factores de virulencia que las bacterias de la familia *Pasteurellaceae* secretan al medio son las toxinas y proteasas que degradan inmunoglobulinas (Jacques and Leonie, 2002).

Haemophilus paragallinarum. Es un cocobacilo gam-negativo que tiene tendencia a formar filamentos, todas las cepas virulentas presentan cápsula. Este organismo puede ser dependiente o independiente de Nicotinamin Adenin Dinucleotido (NAD o factor V). La independencia de NAD se demostró inicialmente en algunas cepas aisladas de pollos en Sudáfrica y en el 2003 en México. Tiene la habilidad de reducir nitrato a nitrito y fermentar la glucosa con desprendimiento de gas.

La denominada coriza infecciosa (CI) es una enfermedad respiratoria aguda en pollos, mejor conocida en algunas ocasiones como catarro infeccioso o contagioso, que es provocada por *H. paragallinarum*, el cual infecta primordialmente los conductos nasales. La CI causa pérdidas económicas ya que reduce el crecimiento de las aves de corral y la producción de huevos (Blackall, P. *et al.*, 1997). Los síntomas clínicos más comunes son la secreción e inflamación nasales, lagrimeo,



anorexia, diarrea, disminución del apetito y bajo consumo de agua (Blackall, P, 1999). Esta enfermedad no tiene importancia en salud pública. La enfermedad está limitada a este hospedero y se inactiva rápidamente si se encuentra fuera de él. Su distribución es mundial (Blackall, P. *et al.*, 1997).

La CI es caracterizada por su baja mortalidad ya que produce un agudo catarro y la inflamación de las membranas mucoides de los conductos nasales. Esto provoca conjuntivitis y edemas subcutáneos en la cara y en las carnosidades. Para contrarrestar la enfermedad se emplean antibióticos, pero muchas cepas de *H. paragallinarum* son resistentes a varios antibióticos probablemente, por la presencia de plásmidos que son transmitidos por conjugación.

Produce antígenos *HA*, los cuales juegan un papel importante en la colonización de *H. paragallinarum*. La cápsula también está asociada con la colonización y se sugiere que es un factor determinante en las lesiones asociadas a la CI. Esta cápsula protege al organismo de la actividad bactericida del suero de pollo normal, puesto que contiene antígenos protectores. El polisacárido extraído de *H. paragallinarum* es tóxico para pollos y puede ser responsable de los signos tóxicos que siguen después de la administración de la bacteria en organismos saludables.

Todas las edades son susceptibles del contagio de *H. paragallinarum* pero la enfermedad es menos severa en aves jóvenes, por lo que en aves maduras la enfermedad es mucho más grave y prolongada. La duración de la enfermedad varía de acuerdo a la virulencia del organismo. El periodo de incubación es corto, se



manifiesta de 24 a 48 h después de la exposición a *H. paragallinarum* (Blackall, 1999).

Actinobacillus pleuropneumoniae. Es considerado un parásito obligado del tracto respiratorio de porcinos. El organismo puede ser aislado de las cavidades nasales, amígdalas, de la cavidad media del oído y de los pulmones de cerdos infectados. No se conocen otros hospederos naturales y el organismo no sobrevive mucho tiempo en el ambiente externo, ya que un limitante nutricional es el hierro y puede afectar la habilidad de *A. pleuropneumoniae* para sobrevivir y causar la enfermedad. Su transmisión es mediante el contacto directo con cerdos infectados o aerosoles. Existen dos tipos diferentes de *A. pleuropneumoniae* en base a sus requerimientos de NAD. Las cepas del biotipo 1 requieren de NAD, mientras que las cepas del biotipo 2 pueden sintetizar NAD en la presencia de un precursor específico de nucleótidos de piridina. Todos los serotipos son capaces de producir hemolisinas y por lo tanto producen hemólisis; asimismo todos son ureasa positivos. Existen variaciones en el grado de la enfermedad y pueden ser atribuidas en gran parte por la producción de diferentes combinaciones de toxinas *Apx*. Otro factor es la cantidad de polisacáridos de la superficie que puede contribuir en las diferencias en la virulencia entre las cepas y los serotipos (fig. 9).

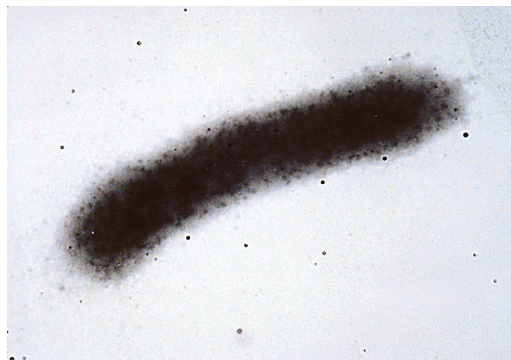


Fig. 9 Micrografía electrónica de *A. pleuropneumoniae*.
Tomado de Internet⁵



La pleuroneumonía que provoca *A. pleuropneumoniae* puede suceder en cerdos de todas las edades pero el incremento en la incidencia de la enfermedad está relacionado con el estrés. Durante la enfermedad los cerdos pueden exhibir algunos de los siguientes síntomas: fiebre elevada, incremento del índice respiratorio, anorexia, vómito, diarrea y una severa aflicción respiratoria. Las lesiones pulmonares asociadas con una enfermedad aguda se caracterizan por la inflamación, hemorragia y necrosis. Existe degeneración de las células epiteliales pulmonares, leucocitos, eritrocitos y las plaquetas son encontrados dentro de capilares dilatados en el pulmón. Por lo que *A. pleuropneumoniae* puede ser encontrada en fluido alveolar.

En la colonización, la habilidad del patógeno para adherirse a las células hospederas o a las superficies, además de la multiplicación dentro de su hospedero son prerequisites para la producción de la enfermedad. La adherencia es en los cilios de la parte terminal del bronquio y las células epiteliales del alveolo, por ello se puede aislar fácilmente de las amígdalas y las cavidades nasales del cerdo. Esto puede depender de la naturaleza de la infección encontrada en el animal (estornudos o secreciones mucoides). Las partículas producidas por estornudos son suficientemente pequeñas para poder penetrar dentro del tracto respiratorio inferior, obviamente después de la colonización del tracto respiratorio superior.

La expresión de fimbrias en *A. pleuropneumoniae* está regulada de igual forma que en muchos otros patógenos. Esta expresión es importante en todos los sitios que colonice, ya sea en pulmón, cavidades nasales o amígdalas. Los LPS intervienen en la adherencia de *A. pleuropneumoniae* en el tracto respiratorio de porcinos. En 1999



se identificó que los glicoesfingolípidos presentes en las células del epitelio respiratorio son los receptores de los LPS en *A. pleuropneumoniae*.

En ocasiones la bacteria no puede ser eliminada por la acción de las células fagocíticas puesto que produce una proteasa contra la inmunoglobulina (Ig) que puede interferir con la opsonofagocitosis. Un ejemplo de este tipo de enzima porcina con actividad proteolítica es contra IgA codificada por un putativo gen IgA proteasa-like. Otro mecanismo de defensa contra el sistema inmunológico del hospedero es la liberación de las toxinas Apx que provocan la lisis de los macrófagos, después de haber estado expuesta a ellos por más de 90 min. A ésta habilidad de sobrevivir a los macrófagos se incluyen los LPS y la cápsula. Confiriéndole a *A. pleuropneumoniae* la resistencia al efecto bactericida del suero. Ésta participación de los LPS y la cápsula se observó en algunas cepas de *A. pleuropneumoniae* serotipo 5 con baja expresión de CPS y LPS (Bossé, J.T *et al.*, 2002).

Pasteurella multocida. Es un patógeno oportunista con una distribución mundial que infecta a humanos y otros animales. Causa cólera en aves, septicemia hemorrágica en bovinos y búfalos, además de rinitis porcina (Lo, R. & Shewen P., 1992). Es uno de los patógenos más importantes puesto que la enfermedad se presenta en un extenso rango de animales. Como por ejemplo la septicemia hemorrágica en el ganado vacuno y búfalos. La septicemia hemorrágica no es muy común. Ambas provocan serias pérdidas económicas (Frost & Adler, 2000). Un mecanismo de virulencia es la resistencia de cepas de *P. multocida* aisladas de aves al efecto bactericida del suero. Esta resistencia está mediada por el efecto protector



de su cápsula; Diallo y cols en el 2000 comprobaron en papel que juega la cápsula en dicha resistencia, mediante el tratamiento de algunas cepas con hialuronidasa. El efecto de la descapsulación por la hialuronidasa se manifestó ya que dichas cepas exhibieron sensibilidad contra el suero. Pero sin embargo el origen de la resistencia puede ser multifactorial (Diallo, I.S & Frost, A.J., 2000).

Mannheimia haemolytica. También conocida como *P. haemolytica* es el principal organismo asociado con la pasteurellosis neumónica bovina (Yates, W., 1982). También puede ser aislada del tracto respiratorio de pollos normales. Forma parte de la microbiota del tracto respiratorio de aves con excepción del pavo (Mushin, R. *et al.*, 1980). *M. haemolytica* es considerada un significativo co-patógeno ó invasor secundario en la mortalidad de las gallinas ponedoras y reproductoras, esto se demostró en los reportes clínicos y aislamientos de laboratorio. En los enfermos la tráquea se inflama; además se identificó el virus de laringotraqueítis infecciosa. Trayendo como consecuencia la mortalidad y anormalidad de los huevos de las aves ponedoras (Shaw, D.P *et al.*, 1990). Se conocen dos biotipos de *M. haemolytica*: A y T que se pueden distinguir por su acción sobre carbohidratos, por la presencia de cápsula y por sus antígenos de superficie. El biotipo A es más común en aves de corral (Addo, P.B & Mohan, K., 1985). Actualmente se ha reclasificado a *P. haemolytica* aislada de ave reubicándose en un nuevo género: *Gallibacterium* y su especie distintiva *G. anatis*. Éste tipo de clasificación se basa en el análisis geonómico (Christensen *et al.*, 2003).



La relevancia que ha adquirido a través de la evolución la adquisición bacteriana de nuevas características fenotípicas mediante el traspaso de genes de manera horizontal mediada por fagos, puede ya no ser de tipo local, es decir, el traspaso de genes mediada por fagos a bacterias que no sean precisamente de la familia de *E.coli* a la cual infecta λ . Por lo tanto, es de importancia médica, genética y evolutiva la presencia del gen ***bor*** del fago λ en ***lisógenas*** de la familia *Pasteurellaceae*, que pudiera conferirles la sobrevivencia al mecanismo de defensa como es el sistema inmune de sus hospederos que a los que colonizan.



OBJETIVOS.

OBJETIVO GENERAL:

- ⇒ Determinar la posible presencia de secuencias homólogas al gen ***bor*** del fago λ en el cromosoma bacteriano de algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

OBJETIVOS PARTICULARES:

- ⇒ Obtener DNA cromosómico de algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*.
- ⇒ Determinar por PCR la presencia de putativas secuencias al gen ***bor*** del fago λ en el cromosoma de algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*.
- ⇒ Clonar los productos de PCR al plásmido pCR2.1-TOPO para su secuenciación.
- ⇒ Análisis *in silico* de las secuencias "***bor-like***".



MATERIALES Y MÉTODOS.

Cepas de la Familia *Pasteurellaceae*.

Las cepas bacterianas que se utilizaron en el presente trabajo fueron: cepas aisladas de campo *H. paragallinarum* a₅ y a₆ del serogrupo A que fueron proporcionadas por el laboratorio BIOVETSA, Tehuacán, Puebla. *M. haemolytica* fue donada por el Dr. Francisco Morales, INIFAP, México. El resto de las cepas son estándares: *H. paragallinarum* A y C; *A. pleuropneumoniae* serotipo 1, 3 y 5b, las cuales fueron proporcionadas por el Dr. Erasmo Negrete Abascal del laboratorio de Genética, Unidad de Morfología y Función, FES Iztacala-UNAM. Éstas últimas forman parte del cepario del laboratorio de Genética.

Medios de cultivo.

Caldo Nutritivo (CN), Agar Nutritivo (AN), Caldo Luria (LB), Caldo de Infusión Cerebro Corazón (BHI, por su siglas en inglés) y Caldo de soya tripticaseína (TSB, por su siglas en inglés).

NAD (nicotinamin-adenin-di nucleótido) utilizado para el crecimiento de las cepas de *Haemophilus* y *Actinobacillus*.

Cajas de AN con Ampicilina (amp)_X-gal_ IPTG: La ampicilina a una concentración de 100 µg/ml. X-gal disuelto en Dimetilformamida (DMFM) a una concentración de 40mg/ml. IPTG a una concentración de 100mM.



Reactivos y Soluciones.

Agarosa para ácidos nucleicos libre de DNA'sas y de bajo punto de fusión (Sigma).

Saturación del Fenol: fue disuelto 300ml de fenol al 100% a 68°C y se le agregó 200ml de agua destilada estéril. La saturación fue con 2ml de β- mercaptoetanol puro, 4ml de Tris-HCl 1M (pH 8.0), 292.5ml de NaOH 10 M y 0.5g de β-hidroxiquinoleína. Se mezcló dejándose en refrigeración toda la noche.

Fenol: Cloroformo: se mezclaron cantidades iguales de fenol y cloroformo, equilibrándose la mezcla con varias extracciones de Tris-HCl 0.1mM (pH 7.6). La solución resultante se almacenó con un volumen de Tris-HCl 10 mM (pH 7.6) a 4°C en frascos ámbar.

Fenol: Cloroformo: Alcohol isoamilico (25:24:1): se tomaron 25ml de fenol, 24 de cloroformo y 1ml de alcohol isoamilico para un volumen total de 50ml.

NaCl 5M: 8.68 de cloruro de sodio en 30ml de agua destilada (estéril).

Soluciones para la extracción de DNA plasmídico:

Solución I: glucosa 50 mM, Tris-HCl 25 mM (pH 8.0), EDTA 10 mM (pH 8.0) (fría).

Solución II: NaOH 0.2 M y SDS 1%. (Preparada al momento)



Solución III: 60ml de Acetato de Potasio 5M, 11.5ml de Ácido acético y 28.5ml de H₂O. La glucosa se esterilizó a 15 lb por 10min, mientras que el resto de las soluciones se esterilizaron a 15 lb durante 15min. Se prepararon lotes de 50ml.

Buffers.

Buffer TBE 5x: 54g de Tris-base 44 mM, 27.5g ácido bórico 44 mM, 20ml EDTA 500 mM (pH8). Se afora a 1 litro.

Buffer de Lisis para extracción de DNA cromosómico: Tris-base 40mM (pH 7.8), Na Ac. 20 mM, EDTA 1mM, SDS 1% y RNA'sa 10µg/ml (Promega).

MÉTODOS.

Extracción de DNA cromosómico

Las cepas bacterianas se sembraron en BHI o TSB más 3µl de NAD para el caso de *Haemophilus* y *Actinobacillus*. Los dos tipos de *Pasteurellas* se sembraron en BHI. Dejándose los cultivos en agitación a 37°C durante toda la noche.

Los cultivos se centrifugaron a 14,000rpm por 5min. Después de la centrifugación se les retiró el sobrenadante, resuspendiéndose las pastillas por pipeteo vigoroso en 200µl de regulador de lisis. Las mezclas se incubaron a 37°C por 15min. Transcurrido el periodo de incubación se les agregó 66 µl de NaCl 5M (para eliminar la mayoría de los detritos celulares) centrifugándose a 14,000 rpm a 4°C por 10min. El



sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo estéril, al cual se le adicionó 1 volumen de cloroformo-álcool isoamílico (25: 24:1). Mezclándose por inversión.

Se centrifugó a 14,000 rpm por 5min a 4°C. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo estéril. La precipitación fue con el doble volumen de etanol al 100% (grado molecular). Se mezcló por inversión, centrifugándose a las mismas revoluciones por 15 min. a 4°C. Fue retirado el sobrenadante para resuspender la pastilla en 500 µl de etanol al 70% (grado molecular), la centrifugación fue a 14,000 rpm durante 10 min. Este lavado se realizó por duplicado. La pastilla obtenida fue secada a 65°C por 1 min en digit-block y resuspendida en 50 µl de H₂O desionizada estéril. Los DNA's se corrieron en un gel de agarosa al 1% utilizando como buffer TBE al 0.5x y con las condiciones: 120v, 94mA por 30min.

Amplificación mediante PCR de secuencias homólogas al gen *bor* de λ .

La amplificación del gen *bor* del fago λ y los genes putativos en el DNA cromosómico de algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae* fue mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR). La enzima que se utilizó fue Taq DNA Polimerasa termoestable de alta fidelidad. Extraída de una cepa de *E. coli* que lleva el gen de la Taq DNA Polimerasa de *Thermus aquaticus* YTI.

La mezcla de reacción para 50µl contenía:



Reactivo	Volumen (μ l)	Concentración (para 50 μ l)
Buffer 10x	5 μ l	1x
MgCl ₂ 50mM	3 μ l	3mM
Dntp's 10mM	1 μ l	2mM
<i>bor</i> upper	1 μ l	25pMoles
<i>bor</i> lower	1 μ l	25pMoles
DNA cromosómico	5 μ l	200ng
H ₂ O desionizada estéril	33.7 μ l	-----
Taq DNA polimerasa	0.3 μ l	1.5 ud
Aceite mineral.	30 μ l	-----

Tabla 2. Reacción de PCR para la amplificación de secuencias homologas a *bor* de λ

Las condiciones de amplificación son las que se muestran en la figura 10. Los *oligonucleótidos* o *primers* que se utilizaron fueron diseñados a partir de la secuencia original del gen ***bor*** del fago λ en dirección 5' a 3' (Fig. 11). La secuencia fue tomada del GeneBank del NCBI (gi 288763). El gen a amplificar tiene una longitud promedio de 297 a 300pb. Siendo éste el tamaño aproximado del gen ***bor*** en el fago λ .

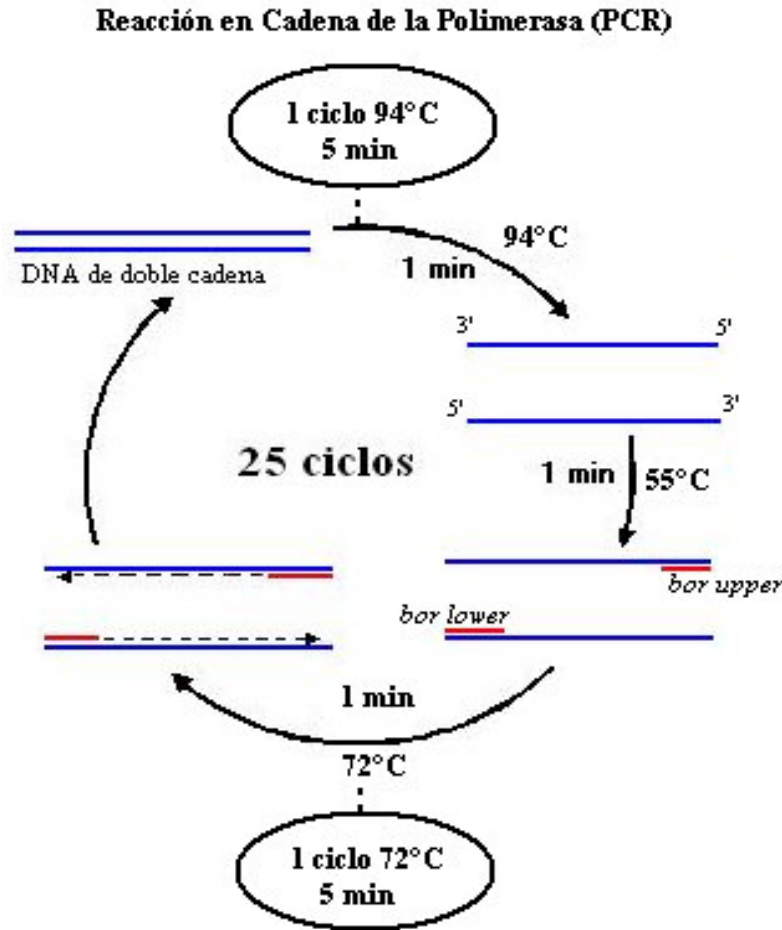


Fig. 10 Esquema de las condiciones del PCR para la amplificación de genes *bor*-like.

Los iniciadores tienen la siguiente secuencia:

borupper ACC ATG AAA AAA ATG CTA CTC GCT ACT GC $T_m=74.8^\circ\text{C}$

borlower TT ATTG TGAGCAATAC ACACGCGCTT CCA $T_m=79.4^\circ\text{C}$

La temperatura de alineación es de 56.3°C con una diferencia de T_m entre *primers* de 4.7°C . Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% con TBE al 0.5x con las condiciones de corrida: 120v, 94mA por 30min.



```

1 5' AGGGGGGCCC CCC TTATTG TGAGCAATAC ACACGCGCTT CCAGCGGAGT ATAAATGCCT
3' T CCCCCCGGG GGGAAATAAC AC TCGT TATG TGTGCGCGAA GGTC GCCTCA TATTTACGGA

61 AAAGTAATAA AAC CGAGCAA TCCATTTACG AATGT T TGCT GGGTTTCTGT TTTAACAACA
T T TCATTATT TT GGC TCGTT AGGTAATGC TTACAAACGA CCCAAAGACA AAATT GTTGT

121 T TTTC TCGC CCGCCACAAA T T TTGGCTGC ATCGACAGTT TTCT TCT GCC CAATTCCAGA
AAAAGACGC GCGGTGTT T AAAACCGACG TAGCTGTCAA AAGAAGACGG GTTAAGGTCT

181 AACGAAGAAA TGATGGGTG ATGGTTTCCT TT GGTGCTAC TGCTGCCGGT T TGTT TTGAA
T TGCTTCT T T ACTACCCAC TACCAAAGGA AACCACGATG ACGACGGCCA AACAAAACT T

241 CAGTAAACGT C TGTTGAGCA CATCCTGTAA TAAGCAGGGC CAGCGCAGTA GCGAGTAGCA
GTCATTTGCA GACAACTCGT GTAGGACATT ATTC GTCCCG GTCGCGTCAT CGCTCATCGT

301 T T TTT TTCAT GATCAGATCT GATC 3'
AAAAAAAGTA CTAGTCTAGA CTAG 5'

```

Fig. 11 Secuencia completa del gen *bor* del fago λ . En azul los *ologonucleótidos* o *primers* que fueron sintetizados para amplificar por PCR las putativas secuencias.

Clonación de los *bor*-like a pCR2.1-TOPO

Los amplificadores de *H. paragallinarum* (A, a_5 y a_6) y *A. pleuropneumoniae* (1 y 3) fueron clonados al vector pCR2.1-TOPO (Fig. 12). Utilizando el TOPO pCR2.1 TA cloning Kit (Invitrogen). La mezcla de reacción que se utilizó para dicho fin, es la que se muestra en la siguiente tabla.

Reactivo	Volumen (μ l)
Producto de PCR	1 μ l
Solución salina	2 μ l
Vector pCR2.1-TOPO	2 μ l
H ₂ O	1 μ l

Tabla 3 Mezcla de reacción para la clonación de los productos de amplificación por PCR al vector TOPO-pCR2.1



La mezcla se incubó a temperatura ambiente por 15min, transcurrido el tiempo se incubó en hielo para transformar a *E. coli* (Top 10 ó W3110). Los amplificadores resultantes fueron clonados por las colas de AAA's que se generan durante la reacción.

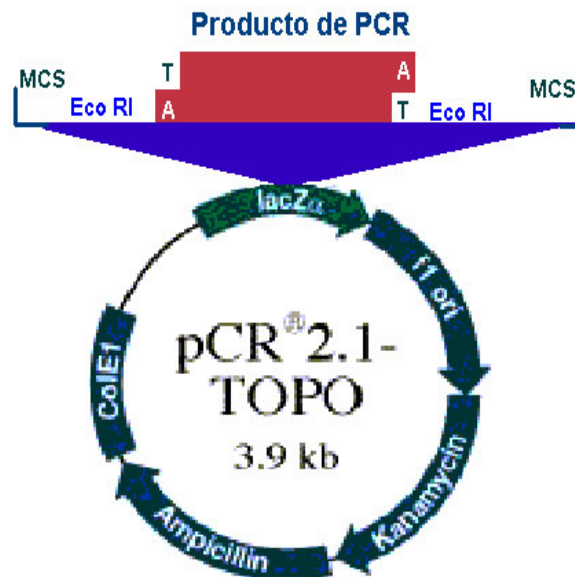


Fig. 12 Mapa del vector de clonación pCR2.1-TOPO exclusivamente para clonación de productos de PCR.

Transformación en células competentes *E.coli* W3110

Preparación de células competentes en CaCl₂

En 5 ml de medio LB se sembraron las cepas XL1BLUE y W3110 dejándose en agitación a 37°C de 12-16 h. Se tomaron dos volúmenes de 100 ml de LB, y se colocaron en matraces de 250ml por separado. En éstos se inocularon 2ml de cultivo respectivamente.

Las cepas fueron cultivadas en agitación a 37°C hasta que alcanzaron una densidad óptica de 0.4 a 0.6 utilizando una longitud de onda de 600nm. Es necesario



que se alcance este intervalo de densidad óptica, ya que éste indica la fase exponencial del cultivo. Ya alcanzada la fase exponencial, los cultivos se enfriaron en hielo durante 15 min. Transcurrido el tiempo de incubación en hielo, se dividen los cultivos en tubos corex o falcon. Los cuales fueron centrifugados a 7,000 rpm durante 10 min a 4°C. Se descartó el sobrenadante rápidamente y las células fueron resuspendidas en 15 ml de CaCl₂ 0.1M (estéril frío).

Las células se incubaron en hielo por un periodo de 2 a 4 h como máximo. Posteriormente fueron centrifugadas nuevamente a 7,000 rpm durante 10min a 4°C. Se les extrajo el sobrenadante rápidamente para resuspender en 2ml de CaCl₂ 0.1M estéril frío el paquete celular. Además a las células se les agregó 340 µl de glicerol estéril al 100% también frío. Por último, se hicieron alícuotas de 120 µl para ambos tipos de cepas en tubos eppendorf y se congelaron en hielo seco. Dejándose en refrigeración a -70°C.

Método *express* para la preparación de células competentes por el método de CaCl₂.

Se sembró la cepa en agar nutritivo o caldo nutritivo, incubándose 3µl de caldo nutritivo en agitación a 37°C durante 1 hora 30min. Se colocó el cultivo en dos tubos eppendorf de 1.5ml con volúmenes aproximadamente iguales. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 35 s, eliminando el sobrenadante. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 300 µl de CaCl₂ agitándose con vortex durante 5 s. Los tubos fueron centrifugados a 12,000 rpm durante 25 s desechándose el sobrenadante. La pastilla resultante fue resuspendida en 33 µl de CaCl₂. La mezcla de células en CaCl₂ fue incubada en hielo para su posterior uso en la transformación.



Transformación en *E.coli* W3110

A 5 tubos de las células competentes se les agregó todo el producto de ligación respectivamente, dejándose 20 min en hielo. Dándoles un shock térmico de exactamente 1 min 30 s a 42°C en digiblock. Posteriormente se incubaron en hielo por 20 min. Se les agregó 250 μ l de caldo nutritivo, dejándose en agitación a 37°C por 1h. Transcurrido el tiempo de incubación, el producto se plaqueó en cajas petri con AN y Ampicilina_ X-gal_ IPTG como medio selectivo. Las cajas se dejaron en incubación a 37°C por 24 h.

Fueron seleccionadas las colonias β -galactosidasa negativas (colonias blancas); mientras que las β -galactosidasa positivas (colonias azules) fueron descartadas. De esta manera se seleccionaron las posibles colonias portadoras del inserto. Las colonias blancas fueron sembradas en cajas petri con AN y amp (100 μ g/ μ l). Dejándose en incubación a 37°C por 24 h. Para realizar el escrutinio de las colonias transformantes fue necesario la extracción de DNA plasmídico

Análisis de Colonias β -galactosidasa negativas.

Extracción de DNA plasmídico.

Las clonas fueron sembradas en 3 ml de AN con amp y se mantuvieron en agitación por 24 h a 37°C. Los 3 ml de cultivos bacterianos se centrifugaron por 3 min removiendo por aspersion el sobrenadante, dejándose las pastillas celulares totalmente secas sin residuos de caldo nutritivo. Éstas fueron resuspendidas en 100 μ l de la Solución I, mezclándose vigorosamente con vortex.



Se les añadió 200 μ l de la Solución II, los cuales fueron mezclados por inversión durante 5 s dejándose en hielo por 1min. Posteriormente se les agregó 300 μ l de la Solución III fría; se mezclaron por vortexeo vigoroso durante 10 s para lisar a las bacterias rápidamente. Los tubos se dejaron en reposo por 5 min en hielo. Se centrifugó a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C en microcentrífuga. Al finalizar la centrifugación, los sobrenadantes se transfirieron a tubos eppendorf nuevos estériles.

A las mezclas se les añadió un volumen de fenol-cloroformo mezclándose con vortex. Fueron centrifugadas a 12,000 rpm durante 2 min a 4°C, transfiriéndose los sobrenadantes a tubos nuevos estériles. La precipitación del DNA se realizó con dos volúmenes de etanol al 100% dejándose la muestra 2 min a temperatura ambiente. La centrifugación fue a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C.

Los sobrenadantes fueron removidos, obteniéndose una pastilla en el fondo de tubo eppendorf. Estas pastillas fueron resuspendidas en 1 ml de etanol al 70%, centrifugándose a 12,000 rpm durante 5 min a 4°C. El sobrenadante se removió y el DNA plasmídico fue resuspendió en 50 μ l de agua desionizada estéril.

Método para degradar RNA.

A las muestras de DNA plasmídico se les añadió 3 μ l de RNA'sa, incubándose por 20 min a 37°C. Concluido el tiempo de incubación se les agregó un volumen de fenol-cloroformo, se mezclaron por vortexeo vigoroso y se centrifugaron en microcentrífuga por 5 min a 12,000 rpm. La fase superior ó fase acuosa se pasó a tubos eppendorf nuevos estériles.



Se les agregó 1 volumen de cloroformo, mezclándose con vortex y centrifugándose durante 2 min a 12,000 rpm. La fase superior ó fase acuosa se pasó a otros tubos eppendorf nuevos estériles, procurando no tomar algo de la fase inferior. Los DNA's plasmídicos se corrieron en un gel de agarosa al 1% con buffer TBE al 0.5x y las condiciones de corrida: 120v 94mA por 30min.

Análisis por restricción.

Para comprobar la presencia del inserto en el vector se digirió con la enzima *EcoRI* (Biolabs). La mezcla de reacción fue como se muestra en la siguiente tabla.

Reactivo	Volumen (μl)
DNA plasmídico	15
Enzima: <i>EcoRI</i>	0.3
Buffer H	1.7

Tabla 4. Mezcla de reacción para un volumen total de 17 μ l.

Las mezclas de reacción se incubaron a 37°C por 2 h. Al término del periodo los productos de la digestión se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% con TBE 0.5x y las condiciones de corrida: 120v 94mA por 30min.

Sistema de Purificación de DNA plasmídico Wizard® (Kit MiniPrep).

Las clonas que liberaron el inserto de aproximadamente 300 pb se sembraron en 5ml de CN con amp incubándose a 37°C en agitación constante por 24 h. A éstas clonas se les extrajo DNA plasmídico para su secuenciación mediante la siguiente técnica.

**Producción de lisados claros.**

Los cultivos bacterianos se centrifugaron durante 5 min a 14,000 rpm. Las pastillas fueron totalmente resuspendidas en 250 μ l de Solución de Resuspensión de Células. A cada mezcla se le añadió 250 μ l de Solución de Lisis Celular; las mezclas se agitaron por inversión durante 5 s. Posteriormente se les agregó 10 μ l de Solución de Proteasa Alcalina, agitándose también por inversión durante 5 s, incubándose a temperatura ambiente por 5 min. Se les añadió 350 μ l de Solución Neutralizadora, mezclando por inversión durante 5 s. Fueron centrifugadas a 14,000 rpm durante 10 min a temperatura ambiente.

Concentración del DNA plasmídico.

Las columnas con filtro se insertaron en las de colección. La fase clara que se obtuvo en el paso anterior se colocó dentro la columna con filtro y el resto fue desechado. Fueron centrifugados los tubos a 14,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente, descartándose el sobrenadante y fue reinsertada la columna con filtro dentro del tubo de colección.

Lavado de la columna.

A las columnas se les añadió 750 μ l de Solución de Lavado, centrifugándose a 14,000 rpm durante 1 min descartándose el sobrenadante y reinsertando la columna de filtro dentro del tubo de colección. Se repitió el lavado de la columna con el filtro con 250 μ l de la Solución de Lavado. En este paso se centrifugó a 14,000 rpm durante 2 min a temperatura ambiente.

Elución.

Fueron transferidas las columnas con filtro a tubos eppendorf estériles de 1.5 ml y se les añadió 100 μ l de agua Libre de Nucleasa a la columna de filtro centrifugándose a 14,000 rpm durante 1 min a temperatura ambiente. Obteniendo



así el DNA plasmídico en el tubo de microcentrífuga y se descartó la columna. Los DNA's plasmídicos se almacenaron a -20°C .

Purificación de los *bor-like*.

Los amplificadores de *P. multocida* (ave) y *P. haemolytica* (bovino y pollo) fueron purificados para eliminar factores que pudieran afectar la secuenciación como: la enzima, algunas sales del buffer, restos de *primers*, entre otros.

Procesamiento de las reacciones.

A las reacciones se les añadió 1 volumen de la Solución de Concentración en la Membrana.

Concentración del DNA.

Se insertaron las mini columnas dentro de los tubos de colección. Transfiriéndose los productos claros en las mini columnas ensambladas. Las mezclas se incubaron a temperatura ambiente por 1 min. Centrifugándose a 12,000 rpm por 1min. Descartándose posteriormente el contenido del tubo de colección reinsertando la mini columna.

Lavado.

A cada mezcla se le agregó 700 μl de la Solución de Lavado de Membrana. La centrifugación fue a 12,000 rpm por 1min. Transcurrido el tiempo se descartó nuevamente el contenido del tubo de colección reinsertando la mini columna en éste.

El paso anterior se repitió pero con 400 μl de Solución de Lavado de Membrana, la centrifugación fue a 12,000 rpm por 5 min.



Elución.

Las mini columnas fueron transferidas a tubos eppendorf nuevos estériles. A estas mini columnas se les añadió 50 µl de agua libre de nucleasa. Incubándose a temperatura ambiente por 1min y fueron centrifugados a 12,000 rpm por 1min. Fueron descartadas las mini columnas y las muestras obtenidas en los tubos de microcentrífuga se almacenaron a 4°C.

Secuenciación de los *bor-like*.

La secuenciación de los ***bor-like*** en pCR2.1 TOPO de *H. paragallinarum* (A, a₅ y a₆) y *A. pleuropneumoniae* (1 y 3) y los productos de PCR de *P. multocida* (cerdo) y *P. haemolytica* (bovino y pollo) fue realizado en un secuenciador automático modelo 3100, Genetic analyzer, del laboratorio de Análisis y Química de ADN en la Unidad de Biotecnología y Prototipos de la FES Iztacala UNAM; por el Biól. Alejandro Monsalvo Reyes.

Para la secuenciación de los productos clonados en el vector TOPO pCR2.1 dentro del MCS cerca de los sitios de restricción para la enzima EcoR1 (fig. 12) fueron necesarios los *primers* universales (forward y reverse); Mientras que en la secuenciación directa de los productos de PCR purificados se utilizó el *primer borlower*, a una concentración de 25 pm. Cabe mencionar que todos los productos fueron secuenciados de 5' a 3' y de 3' a 5' con la finalidad de obtener una buena integridad en las secuencias putativas de los ***bor-like***. Para el análisis de las secuencias se utilizó el programas *Chromas* versión 1.45 (primera versión) bajado de Internet, mediante el cual se obtuvieron los *electroferogramas* para su análisis.



Análisis *in silico* de los *bor-like*.

Para el análisis *in silico* se utilizó el programa Windows Clustal X⁹ en su versión para windows. Es un programa para el alineamiento múltiple de secuencias el cual es guiado por un árbol filogenético, visto por el programa Tree view, el cual es calculado a partir de las distancias entre las secuencias a alinear.



RESULTADOS.

Extracción de DNA cromosómico de miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

Las muestras de DNA cromosómico se corrieron en un gel de Agarosa al 1% con las siguientes condiciones: TBE 0.5x, 120v 94mA por 30min para observar la integridad del DNA y su concentración (Fig. 13). Cabe mencionar que se corrieron alícuotas de 5 μ l para cada una de las muestras. Para saber la concentración del DNA fue necesario cargar las muestras junto a un marcador de peso molecular de una concentración conocida (λ cortado con *Hind* III invitrogen), con la finalidad de deducir la concentración de las muestras extraídas mediante la comparación de la intensidad de las bandas.

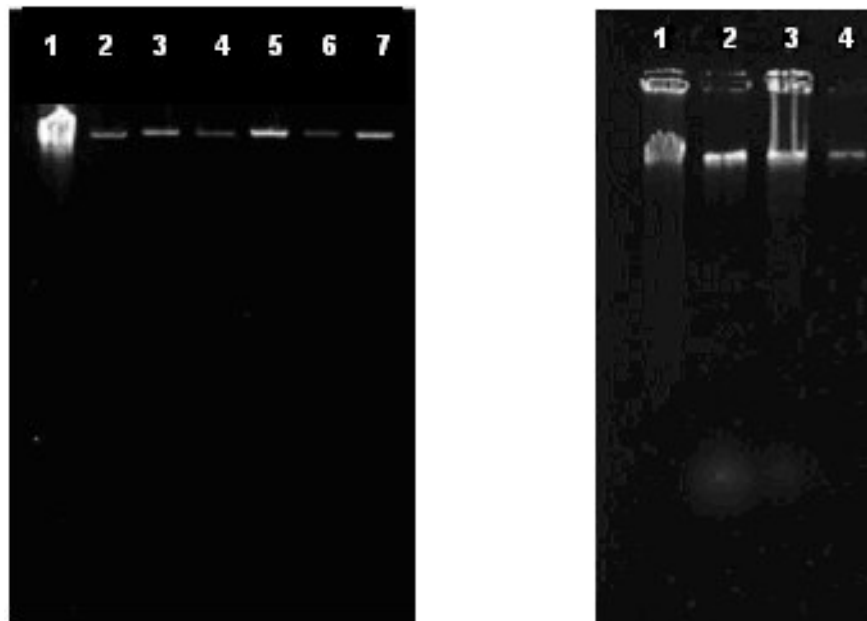


Fig. 13 Electroforesis del DNA cromosómico extraído.

Izquierda: 1.- MWM DNA FIZ15; 2.- *H. paragallinarum* A; 3.- *H. paragallinarum* C; 4.- *H. paragallinarum* a₅; 5.- *H. paragallinarum* a₆; 6.- *A. pleuropneumoniae* 1; 7.- *A. pleuropneumoniae* 3. **Derecha:** 1.- MWM DNA FIZ 15; 2.- *P. multocida* (cerdo); 3.- *P. haemolytica* (bovino); 4.- *P. haemolytica* (pollo).



Estandarización del PCR en DNA de λ .

Con el DNA de λ se establecieron las condiciones adecuadas del PCR: temperatura de alineamiento, la concentración de los *oligonucleótidos* ó *primers* y del $MgCl_2$, etc. Los *primers* son complementarios a los extremos 5' a 3' del gen *bor* del fago λ . Se obtuvo un amplificado de aproximadamente 300 pares de bases (pb) comparándolo con el peso molecular de 100 pb. Se corrió en un gel de agarosa al 2% (condiciones de corrida: TBE 0.5x, 120v, 94mA por 30min); El tamaño del amplificado coincide con el del gen *bor* de λ ya reportado por Barondes, *et.al*, en 1995 (Fig. 14).

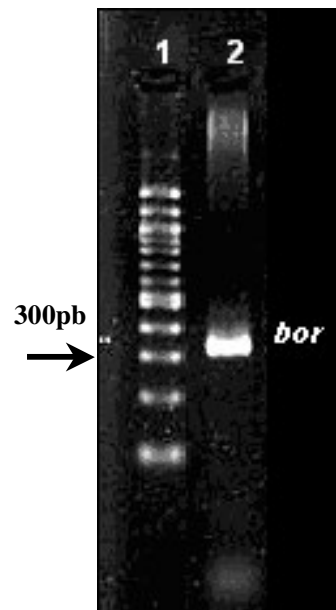


Fig. 14 Electroforesis del PCR de λ donde se observa el amplificado de 300 pb.

Carril: 1.- MWM DNA ladder 100 pb; 2.- amplificación por PCR del *bor* de λ .



Amplificación mediante PCR de secuencias homologas al gen *bor* de λ en miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

Debido a que el gen *bor* les confiere a sus *lisógenas* resistencia al efecto bactericida del SHN proporcionándoles una ventaja selectiva, es posible que este gen se encuentre diseminado en distintas bacterias patógenas y no patogénicas. Por lo que se realizó el PCR con las condiciones ya estandarizadas con DNA de λ , utilizando como molde el DNA cromosómico de los miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Los productos de PCR se corrieron en un gel de agarosa al 2% (TBE 0.5x, 120v, 94mA por 30min) y como control se utilizó el marcador de peso molecular de 100 pb, para observar el tamaño aproximado en pb del producto amplificado (Fig.15). En la mayoría de las bacterias se obtuvo un amplificado, con excepción de *H. paragallinarum* C y *A. pleuropneumoniae* 5b.

Como se muestra en la figura 15 los productos de amplificación que se obtuvieron presentaron un tamaño aproximado de 300 pb, comparándolos con el marcador de peso molecular (carril 1: MWM 100 pb); exactamente en la banda que corresponde a 300pb migrando en el gel a la misma distancia. En este gel se demuestra la presencia de putativas secuencias o *bor-like* en el cromosoma de dichas bacterias.

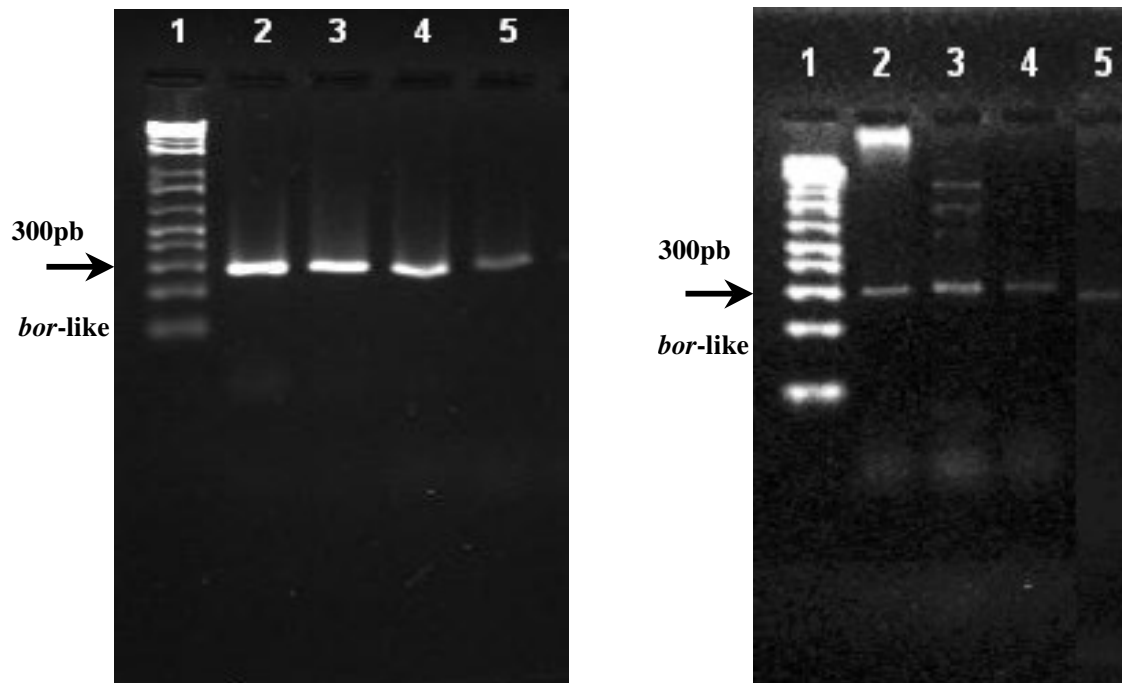


Fig. 15 Productos de amplificación *bor-like* en el cromosoma de algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

Izquierda: 1.- MWM DNA ladder 100pb; 2.- *H. paragallinarum* A; 3.- *H. paragallinarum* a₅; 4.- *H. paragallinarum* a₆; 5.- *A. pleuropneumoniae* 1. **Derecha:** 1.- MWM DNA ladder 100 pb; 2.- *A. pleuropneumoniae* 3; 3.- *P. multocida* (cerdo); 4.- *P. haemolytica* (bovino); 5.- *P. haemolytica* (pollo).

CLONACIÓN DE LOS DE LOS *bor-like* EN pCR2.1-TOPO.

Con el fin de aislar y analizar estas putativas secuencias relacionadas al gen *bor*, los productos de amplificación fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO (Fig.12).

ANÁLISIS DE CLONAS B-GALACTOSIDASA NEGATIVAS

Extracción de dna plasmídico de las clonas

Después de la transformación fueron seleccionadas solamente las colonias blancas poseedoras de inserto en el gen *lacZ*, a las cuales se les extrajo DNA plasmídico. Las muestras se corrieron en un gel de agarosa al 1% (TBE 0.5x, 120v,



94mA, por 35min). El RNA suele correr en la electroforesis más rápido que el DNA plasmídico porque su peso molecular es menor, por lo que se sitúa en la parte inferior del gel de agarosa. Los plásmidos extraídos que se observan en la figura 16 se trataron con RNA'sa para eliminar los restos de RNA que pudiera afectar la digestión con la enzima de restricción *EcoRI*.

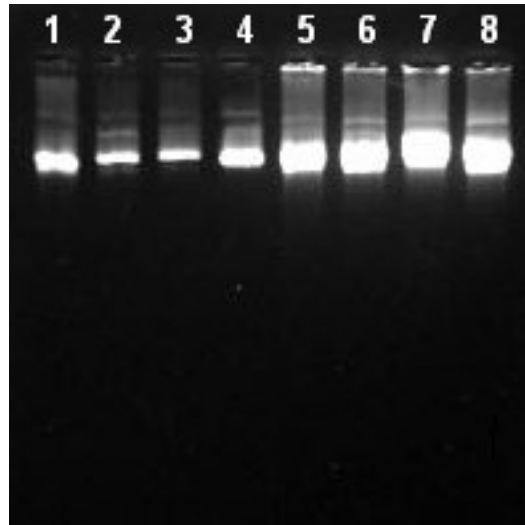


Fig. 16 DNA plasmídico de las clonas (©).

1.- *H. paragallinarum* A; 2.- *H. paragallinarum* a₅; 3.- *H. paragallinarum* a₆; 4.- *A. pleuropneumoniae* 1; 5.- *A. pleuropneumoniae* 3; 6.- *P. multocida* (cerdo); 7.- *P. haemolytica* (bovino); 8.- *P. haemolytica* (pollo).

Análisis por restricción.

El vector utilizado posee dos sitios de restricción para la enzima *EcoRI*:

(5'...G|AATTC...3' CTTAA|G...5') que al cortar deja extremos cohesivos. Estos sitios se encuentran dentro del MCS y por lo tanto cerca del sitio de la clonación del producto de PCR (Fig. 17). Se analizaron aquellas clonas (©) que resultaron β-galactosidasa negativas.



Fig. 17 Esquema de la región de clonación del vector pCR2.1-TOPO y la localización de los sitios de restricción para *EcoRI* que permiten la liberación del producto de PCR o inserto que se haya clonado.

Por lo que se comprobó por restricción con la enzima *EcoRI* la presencia del putativo gen *bor* en el vector pCR2.1, con un tiempo de incubación de 2 h a 37°C (Tabla 5). El producto digerido se corrió en un gel de agarosa al 1% (TBE 0.5x, 120v, 94mA por 30min) observándose un fragmento de aproximadamente 300 pb que se liberó (Fig. 18)

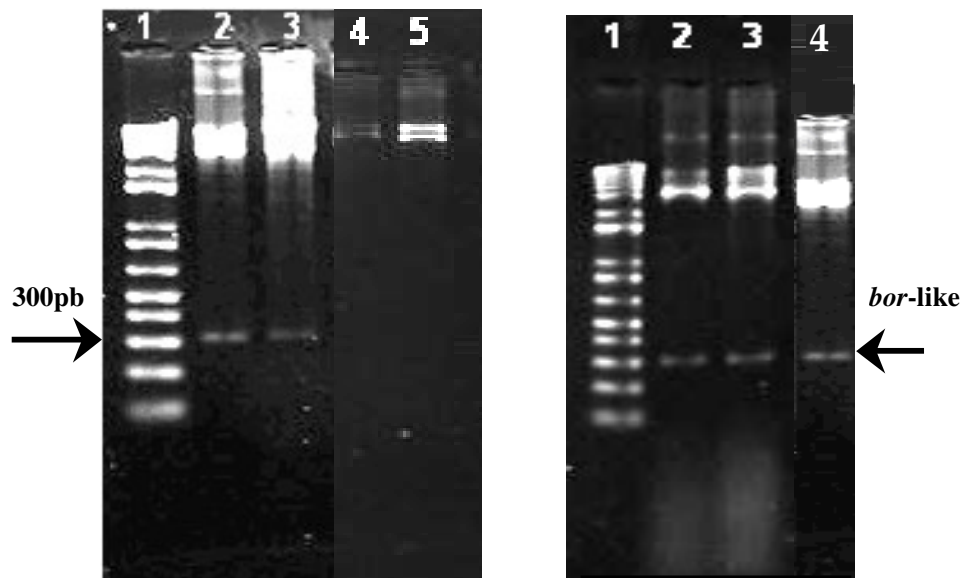


Fig. 18 Análisis por restricción de las clonas (©) β -galactosidasa negativas.

Izquierda: 1.- MWM DNA ladder 100 pb; 2.- ©⁴ *H. paragallinarum* A; 3.- ©⁴ *H. paragallinarum* a₆; 4.- ©⁴ *H. paragallinarum* A (sin cortar); 5.- ©⁴ *H. paragallinarum* a₆ (sin cortar).

Derecha: 1.- MWM DNA ladder 100 pb; 2.- ©³ *A. pleuropneumoniae* 1; 3.- ©⁴ *A. pleuropneumoniae* 3. 4.- ©⁴ *H. paragallinarum* a₅.



Secuenciación de los *bor-like*.

Para la secuenciación de los *bor-like* se realizó minipreps a las clonas que portaban el fragmento, la extracción se realizó con Kit (Promega). Se corrieron las muestras en un gel de agarosa al 1% (TBE 0.5x, 120v, 94mA por 30min) para observar la concentración del DNA y su integridad (Fig.19).

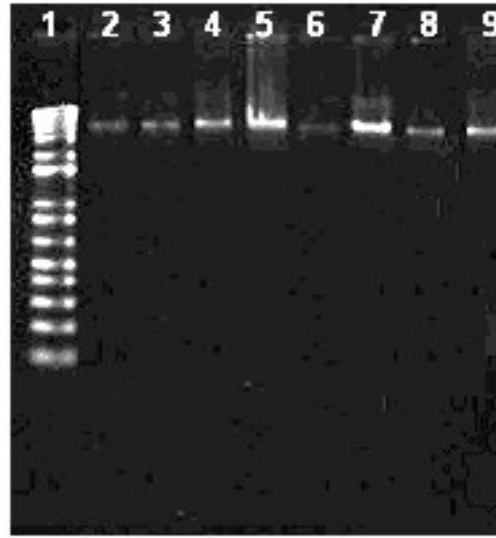


Fig. 19 DNA plasmídico de las clonas para su secuenciación.

1.- MWM DNA ladder 1Kb; 2.- *H. paragallinarum* A; 3.- *H. paragallinarum* a₅;
4.- *H. paragallinarum* a₆; 5.- *A. pleuropneumoniae* 1; 6.- *A. pleuropneumoniae* 3;
7.- *P. multocida* (cerdo); 8.- *P. haemolytica* (bovino); 9.- *P. haemolytica* (pollo).

Después del análisis de las secuencias en los electroferogramas¹¹ fueron alineadas dichas secuencias, por el programa Clustal X para el alineamiento múltiple de secuencias como se observa en la figura 20. Y el árbol filogenético que muestra a nivel secuencia, las relaciones evolutivas entre los distintos *bor-like* (Fig. 21) presentes en algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae*.



ÁRBOL FILOGENÉTICO DE LOS DISTINTOS *bor*-like EN LA FAMILIA *Pasteurellaceae*.

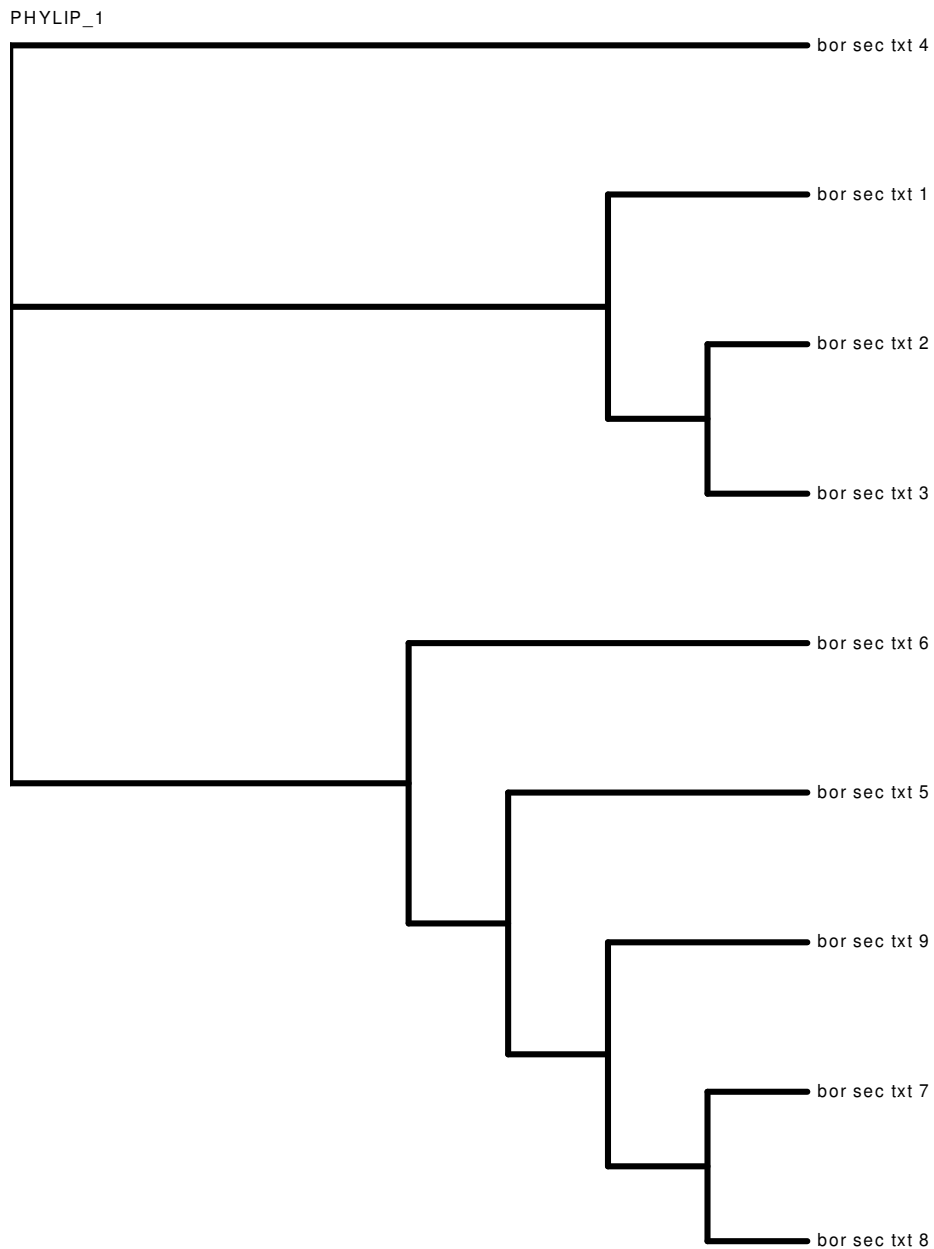


Fig. 21 Árbol filogenético de los genes *bor*-like presentes en la familia *Pasteurellaceae*.

Las secuencias *bor*-like están distribuidas de la siguiente manera: 1.- *bor* λ ; 2.- *HpaA**bor*-like; 3.- *Hpa*₅*bor*-like; 4.- *Hpa*₆*bor*-like; 5.- *Ap1**bor*-like; 6.- *Ap3**bor*-like; 7.- *Pm*(cerdo)*bor*-like; 8.- *Pm*(bovino)*bor*-like; 9.- *Ph*(pollo)*bor*-like.



DISCUSIÓN.

El gen **bor** del bacteriófago λ causa conversión lisogénica en *E. coli*. El fenotipo que le confiere es resistencia al efecto bactericida del suero (Barondess y Beckwith, 1995). Este gen se expresa en la lisógena y codifica para una proteína que se localiza en la membrana externa. El número de copias de la proteína **bor** por célula es de alrededor de 2000. Aunque no se conoce el mecanismo mediante el cual **bor** protege a *E. coli* contra la muerte por suero, su bajo número de copias en la membrana externa permite suponer que su papel no es estructural, sino catalítico.

Dada la indudable ventaja selectiva que **bor** confiere a las bacterias que lo poseen, no es improbable anticipar que este gen pudiera estar presente en el genoma de otras bacterias. Como es el caso del plásmido *iss* en aislamientos de *E. coli* en ave, por ejemplo, que le proporciona una resistencia al complemento del suero (Nolan, *et al.*, 2003). Partiendo de esta premisa, en este trabajo decidimos detectar mediante PCR la presencia de secuencias similares a **bor** en miembros de la familia *Pasteurellaceae*.

En base a la estandarización de las condiciones de amplificación por PCR en el DNA de λ , como se muestra en la figura 14, se obtuvo un amplificado de 300 pb que es el tamaño aproximado del gen **bor** de lambda ya reportado por Barondess y Beckwith en 1990. En los DNA's cromosómicos de la familia *Pasteurellaceae* se obtuvieron amplificados de aproximadamente 300 pb en 8 de las 10 cepas analizadas: *H. paragallinarum* A, a₅ y a₆ con excepción de *H. paragallinarum* C; *A. pleuropneumoniae* 1 y 3, con excepción de *A. pleuropneumoniae* 5b. También dio



amplificado en *P. haemolytica* aislada de bovino y pollo; *P. multocida* aislada de cerdo (figura 15). Estos resultados demuestran la amplia distribución de secuencias relacionadas con **bor** en los genomas bacterianos y sugieren que efectivamente este gen se ha conservado por conferir ventaja selectiva a las cepas portadoras.

Para la amplificación de estas secuencias se utilizaron oligos complementarios a los extremos 5' y 3' de **bor** de λ y DNA cromosómico de las distintas cepas. Nuestros resultados no permiten distinguir si el gen es efectivamente cromosómico o bien forma parte de un **profago**. Dichos amplificados fueron clonados en el vector pCR2.1-TOPO a excepción de los amplificados obtenidos de *P. haemolytica* y *P. multocida*. El análisis de restricción que se llevó a cabo en las clonas resultantes nos permitió confirmar que los plásmidos vectores (Fig. 18) contenían el fragmento amplificado de 300 pb que corresponde a los putativos **bor-like**.

La secuenciación de los **bor-like** se realizó en dirección 5' a 3' y de 3' y 5'. La similitud entre las secuencias nucleotídicas de estos **bor-like** y el gen **bor** de λ confirma nuevamente que se trata de un gen altamente diseminado entre las cepas bacterianas. Es decir, no solamente los tamaños son similares sino también las secuencias.

La adquisición de secuencias homólogas a **bor** por algunos miembros de la familia *Pasteurellaceae* o la dispersión de estas secuencias en este tipo de bacterias que no son infectadas por el fago λ por carecer, al menos, de los receptores específicos para este fago, podría deberse a transferencia genética horizontal,



mediada por bacteriófagos que las infecten o por plásmidos conjugativos. Como se muestra en el árbol filogenético existe mayor similitud entre las secuencias de *H. paragallinarum* que *A. pleuropneumoniae* y *P. multocida* posiblemente por el camino evolutivo que han recorrido.

Probablemente las características fenotípicas conferidas por λ sean de importancia relevante ya que podría ser una ventaja evolutiva mediante selección natural de las lisógenas en los hospederos animales. El resultado de ello sería la enorme distribución del gen ***bor***, tanto en los fagos temperados (Guadarrama, P.R, 2004) como en el cromosoma de distintas bacterias y que no precisamente pertenecen a la misma familia. La presencia de ***bor-like*** podría proporcionarles una cierta resistencia al suero ya que codificaría para una proteína de membrana externa, con la finalidad de evadir el sistema inmune de pollos, codorniz, bovinos, cerdos y poder atacar el tracto respiratorio superior. Cabe señalar que en el proceso evolutivo sólo se conservan aquellas estructuras o incluso genes que juegan un papel importante en la sobrevivencia del organismo.

Actualmente en el laboratorio se sigue estudiando al gen ***bor*** en cuanto a su distribución por que podría estar disperso entre algunas familias bacterianas alejadas de *E. coli*, como es el caso de la familia *Pasteurellaceae*.



PERSPECTIVAS.

Se sugiere seguir con las investigaciones acerca del gen **bor** del bacteriófago λ y la posible presencia de **bor-like** en los plásmidos de los miembros de la familia *Pasteurellaceae*. El diseño y construcción de una mutante (Palmeros, et al., 2000) sitio dirigida **bor-** para los ensayos de resistencia al suero con los **bor-like** resultantes en este trabajo, por supuesto fuera del contexto metabólico de los miembros de la familia *Pasteurellaceae*. Es necesario también analizar las características fenotípicas que confieren a la familia *Pasteurellaceae* los genes **bor-like**, como pueden ser los niveles de resistencia al suero. Sería conveniente también obtener la secuencia de aminoácidos de las proteínas resultantes y determinar si los genes **bor-like** son cromosómicos o forman parte de un *profago*.



REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. **Abbas, A.K; Lichtman, A.H y Pober, J.S.** 1995. Inmunología celular y molecular. Mc Graw-Hill Interamericana. 2ed. 338-354.
2. **Addo, P.B and Mohan, K.** 1985. A typical *Pasteurella haemolytica* type A from poultry. *Avian Dis.* 29(1): 214-217.
3. **Barksdale, L. & Arden S.B.** 1974. Persisting bacteriophage infections, lysogeny and phage conversions. *Ann. Rev. Microbiol.* 28: 265-299.
4. **Barondess, J.J and Beckwith, J.** 1990. A bacterial virulence determinant encoded by lysogenic coliphage. *Nature.* 346: 871-874.
5. **Barondess, J.J. and Beckwith, J.** 1995. *bor* gene of phage λ , involved in serum resistance, encodes a widely conserved outer membrane lipoprotein. *J. Bacteriol.* 177(5): 1247-1253.
6. **Beutin, L., U.H. Stroehrer & P.A. Manning.** 1993. Isolation of enterohemolysin (Ehly2) associated sequences encoded on temperate phages of *Escherichia coli*. *Gene.* 132: 95-99.
7. **Binns, M.M., D.L. Davies K.G. Hardy.** 1979. Cloned fragments of the plasmid ColV, I- K94 specifying virulence and serum resistance. *Nature* 279: 778-781.
8. **Bishai, W.R. & J.R. Murphy.** 1988. Bacteriophage gene products that cause human disease. En: *The Bacteriophages*, Vol. 2. Calendar, R. (ed). Plenum Press, New York. 683-725.
9. **Blackall, P. J.** 1999. Infectious Coryza: Overview of the disease and new diagnostic options. *Clin. Microbiol. Rev.* 12(4): 627-632.
10. **Blackall, P.J; Matsumoto, M & Yamamoto, R.** 1997. Infectious Coryza. *Poultry Diseases* 10^{ma} ed. Ames (Io): Iowa State University Press. 179-190.



11. **Bossé, J.T; Janson, H; Sheehan, B.J; Beddek A.J; Rycroft, A.N; Kroll, J.L and Langford, P.R** 2002. *Actinobacillus pleuropneumoniae*: pathobiology and pathogenesis of infection. *Microbes Infect.* 4: 225-235.
12. **Boyd, E.F and Brüssow, H.** 2002. Common themes among bacteriophage-encoded virulence factors and diversity among the bacteriophages involved. *TRENDS Microbiol.* 10(11): 521-530.
13. **BS 23.** 1998. Multiple Sequence Alignment with Clustal X. *Computer Corner.*
14. **Cheetham, B.F. and M.E. Katz.**1995.A role for bacteriophages in the evolution and transfer of bacterial virulence determinants. *Mol. Microbiol.* 18: 201-208.
15. **Christensen H., M. Bisgaard, A. M. Bojesen, R. Mutters, and J. E. Olsen.** 2003. Genetic relationships among avian isolates classified as *Pasteurella haemolytica*, “*Actinobacillus salpingitidis*” or *Pasteurella anatis* with proposal of *Gallibacterium anatis* gen. nov., comb. nov. and description of additional genomospecies within *Gallibacterium* gen. nov. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 53: 275-287.
16. **Cisneros, B.M.E and Gómez, E.M.C.** 1987. Transferencia y resistencia al suero en cepas gram-negativas multirresistentes a las drogas antimicrobianas. *Rev. Lat-amer. Microbiol.* 29: 27-33.
17. **Clark, C.A., J. Beltrame and P.A. Manning.**1991. The *oac* gene encoding a lipopolysaccharide O-antigen acetylase maps adjacent to the integrase-encoding gene on the genome of *Shigella flexneri* bacteriophage Sf6. *Gene* 107: 43-52.
18. **Coleman, D., D.J. Sullivan, R.J. Russell, J.P. Arbuthnott, B.F. Carey and H.M. Pomeroy,** 1989. *Staphylococcus aureus* bacteriophages mediating the simultaneous lysogenic conversion of beta-lysin, staphylokinase and



- enterotoxin A: molecular mechanism of triple conversion. *J. Gen Microbiol.* 135: 1679-1697.
19. **Diallo, I.S & Frost, A.J.** 2000. Survival of avian *Pasteurella multocida* in chicken serum. *Vet. Microbiol.* 72: 153-161.
20. **Freeman, V.J.** 1951. Studies on the virulence of bacteriophage-infected strains of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Bacteriol.* 61: 675-688.
21. **Franklin, N.C. & Bennet G.N.** 1979. The N protein of bacteriophage lambda, defined by its DNA sequence, is highly basic. *Gene* 8: 107-119.
22. **Friedman, D.I. & Baron L.S.** 1974. Genetic characterization of a bacterial locus involved in the activity of the N function of phage λ . *Virology* 58: 141-146.
23. **Friedman, D.I. ,M. Baumann & L.S. Baron.** 1976. Cooperative effects of bacterial mutations affecting λN gene expression I. Isolation and characterization of a *nusB* mutant. *Virology* 73: 119-127.
24. **Friedman, D.I., Schauer A.T., Baumann M.R., Baron L.S. & Adhya S.** 1981. Evidence that ribosomal protein S10 participates in the control of transcription termination. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 78: 1115-1122.
25. **Frost, A.J and Adler, B.** 2000. *Pasteurella multocida*: the elusive determinants of virulence and immunity. *Vet. Microbiol.* 72: 1-2.
26. **Guadarrama, P.R.** 2004. Búsqueda por PCR de secuencias homologas al gen *bor* del bacteriófago lambda en colifagos silvestres. Tesis-licenciatura, Biología. FESI-UNAM. 47.
27. **Hayashi, T., H. Matsumoto, M. Ohnishi and Y. Terawaki.** 1993. Molecular analysis of a cytotoxin-converting phage, phi CTX, of *Pseudomonas*



- aeruginosa*: structure of the *attP-cos-ctx* region and integration into the serine tRNA gene. *Mol. Microbiol.* 7: 657-667.
28. **Hendrix, R.W.** 2003. Bacteriophage genomics. *Curr. Opin Microbiol.* 6: 506-511.
29. **Hernández, V.J., Edlin T.D., Young R.F. & Ihler G.M.** 1985. The DNA between *Rz* and *cosR* in bacteriophage lambda is nonessential. *Gene* 33: 363-365.
30. **Hersey, A.D, Burgi, E & Ingraham.**1963. Cohesion of DNA molecules isolated of phage lambda. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA.* 49: 748-755.
31. **Herskowitz, I. & Hagen D.** 1980. The lysis-lysogeny decision of phage λ : Explicit programming and responsiveness. *Ann. Rev. Genet.* 14: 399-445.
32. **Holmes, R.K. and W.L. Barksdale.**1969.Genetic analysis of *tox⁺* and *tox⁻* bacteriophages of *Corynebacterium diphtheriae*. *J. Virol.* 3: 586-598.
33. **Jacques, M and Leronie, G.M.** 2002. Virulence factors of *Pasteurellaceae*, formidable animal pathogens. *ASM News.* 68(4): 174-179.
34. **Johnson, T.J.; Giddings, C.W.; Horne, S.M.; Gibas, P.S.; Skyberg, J.; Olah, P.; Kercher, R.; Sherwood, J.S.; Foley, S.L. and Notan, L.K.** 2002. Location of increased serum survival gene and selected virulence traits on a conjugative R plasmid in avian *E.coli* isolate. *Avian Dis.* 46(2): 343-352.
35. **Little, J.W & Mount, D.W.** 1982. The SOS regulatory system of *Escherichia coli*. *Cell.* 29: 11-22
36. **Lo, R.Y.C. and P.E. Sewen.**1992. The genus *Pasteurella*. P 3331-3338. In A. Balows, H.G. Truper, M,Dworkin, W. Harder, and K.-H. Schleifer (ed), The prokaryotes. A handbook on the biology of bacteria: ecophysiology, isolation, identification, applications, 2nd ed.,volIV. Springer-Verlag, New York, N.Y.



37. **Martínez, R.A. and Isibasi, A.** 2001. Estudio de los antígenos superficiales de dos cepas de *Klebsiella pneumoniae*. II. El lipopolisacàrido. *Enf. Infec y Micro.* 21(3): 97-101.
38. **Maslow, J.N; Whittam, T.S; Gilks, Ch.S; Wilson, R.A; Mulligan, M.E; Adams, K and Arbeit, R.D.** 1995. Clonal relationships among bloodstream isolotes of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 63: 2409-2417.
39. **Miller, H.I. & Nash H. A.** 1981. Direct role of the *himA* gene product in phage λ integration. *Nature* 290: 523-526.
40. **Montenegro, M.A.; Bitter-Suermann, D.; Timmis, J.K.; Agüero, M.E.; Cabello, F.C.; Sanyal, S.C and Timmis, K.N.** 1985. *traT* Gene Sequences, Serum Resistance and Pathogenicity-related Factors in Clinical Isolates of *Escherichia coli* and Gram-negative Bacteria. *J. Gen. Microbiol.* 131: 1511-1521.
41. **Muschel, L.H. & K. Schmoker.** 1966. Activity of mitomycin C, other antibiotics, and serum against lysogenic bacteria. *J. Bacteriol.* 92: 967-971.
42. **Mushin, R; Weisman, Y and Singer, N.** 1980. *Pasteurella haemolytica* found in the respiratory tract of fowl. *Avian Dis.* 24: 162- 168.
43. **Newland, J.K., N.A. Strockbine, S.F. Miller, A.D. O'Brien and R.K. Holmes.** 1985. Cloning of shiga-like toxin structural genes from a toxin converting phage of *Escherichia coli*. *Science* 230: 258-264.
44. **Nida, S.K. and Ferretti J.J.** 1982. Phage influence on the synthesis of extracellular toxins in group A Streptococci. *Infect. Immun.* 36: 745-750.



45. **Nolan, L.K, Horne, S.M, Giddings, C.W, Foley, S.L, Johnson, T.J, Lynne, A.M and Skyberg, J.** 2003. Resistance to serum complement, iss, and virulence of avian *Escherichia coli*. *Vet. Res. Comm.* 27: 101-110.
46. **Odumeru, J.A.; Wiseman, G.M. and Ronald. A. R.** 1985. Role of Lipopolysaccharide and Complement in Susceptibility of *Haemophilus ducreyi* to Human Serum. *Infect. Immun.* 50(2): 495-499.
47. **Palmeros, B; Wild, J.; Szybalski W; Le Borgne, S.; Hernández, G; Gosset, G; Valle, F; Bolivar, F.** 2000. A family of removable cassettes designed to obtain antibiotic-resistance-free genomic modifications of *Escherichia coli* and other bacteria. *Gene.* 247: 255 264.
48. **Ramu Chenna; Hideaki; Sugawara; Tadashi; Rodrigo; Toby; Gibson; Desmond; Higgins and Thompson.** 2003. Multiple sequence alignment with the Clustal series of programs. *Nuc. Acids Res.* 31(13): 3497-3500.
49. **Roberts, J.W.** 1969 Termination factor for RNA synthesis. *Nature* 224:1168-1174.
50. **Rosenberg, M., Court D., Shimatake H., Brady C. & Wulff D.L.** 1978. The relationship between function and DNA sequence in an intercistronic regulatory region in phage λ . *Nature* 272: 414-423.
51. **Russel, M.** 1991. Filamentous phage assembly. *Mol. Microbiol* 5: 1607-1613.
52. **Sanson, M. ; Reynard, A and Cunningham, R.** 1985. Inhibition of Serum Bactericidal Reaction by Lipopolysaccharide. *Infec. Immun.* 48(3): 759-762.
53. **Salstrom, J.S. & Szybalski W.,** 1978. Coliphage λ_{nutL} : A unique class of mutants defective in the site of N product utilization for antitermination of leftward transcription. *J. Mol. Biol.* 124: 195-222.



54. **Selander, R.K; Caugant, D.A and Whittam, T.S.** 1987. Genetic structure and variation in natural populations of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. Cellular and Molecular Biology, vol 2, F.C. Neidhart, J.L. Ingraham, K.B. Low, B. Magazanik, M. Schaechter and H.E. unbarge (eds). American Society of Microbiology, Washington, D.C
55. **Shaw, D.P; Bouley, C.D; Maheswaran, S.K; Linderman, C.J and Halvorson, D.A.** 1990. *Pasteurella haemolytica* as a co-pathogen in pullets and laying hens (case report). *Avian Dis.* 34: 1005-1008.
56. **Sorokin, V.M.; Pavlovich, N.V. and Prozorova, L.A.** 1996. *Francisella tularensis* resistance to bactericidal action of normal human serum. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* 13: 249-252.
57. **Szybalski, E. & Szybalski W.** 1979. A comprehensive molecular map of bacteriophage lambda. *Gene* 7: 217.
58. **Taylor, P.W.** 1983. Bactericidal and bacteriolytic activity of serum against gram-negative bacteria. *Microbiol. Rev.* 47: 46-83.
59. **Tomàs, J.M.; Benedi, V.J.; Ciurana, B. and Cofre, J.** 1986. Role of Capsule and Antigen in Resistance of *Klebsiella pneumoniae* to Serum Bactericidal Activity. *Infec. Immun.* 54(1): 85-89.
60. **Vaca, P.S; Piedra, I.E; Arenas, A.D y Paniagua, C.G.L.** 1993. λ Prophage Decreases *Escherichia coli* Sensitivity to Human Serum Bactericidal Effect. *Rev. Lat. -Amer. Microbiol.* 35: 71-75.
61. **Yates, W.D.G.** 1982. A review of infections bovine rhinotracheitis, shipping fever pneumonia and viral-bacterial synergism in respiratory disease of cattle. *Can. J. Comp. Med.* 46: 225-263.



62. **Young, E.T. & Sinsheimer R.L.** 1964 Novel intra-cellular form of lambda DNA.

J. Mol. Biol. 10: 562-564.

SITIOS WEB.

- I. <http://www.biología.edu.ar/viruslocal/phagerep.htm>
- II. <http://www.biologíaanaweb.com/Livro1/c2/precoce.html>
- III. http://www.copernico.bo.it/.../k8_fago%20lambda.html
- IV. <http://ins.cnice.mecd.es/.../contenidos7.htm>
- V. <http://micro-gen.ovhsc.edu/a-pleuro/a-pleuro-home.htm>
- VI. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/viewer>.
- VII. <http://press2.nci.nih.gov/.../immunesp/immunesp19.htm>
- VIII. <http://www.technelysium.com.au/chromas.html>
- IX. <ftp://ftp.ebi.ac.uk/pub/software/>
- X. <http://www.psc.edu/biomed/genedoc/>
- XI. zebu.uoregon.edu/.../talks/mars/evidence.html