Aunque se conoce que en el proceso de emsamblamiento del pili F están involucradas 14 proteinas, solo se conoce la función de dos de ellas, los productos de tra A y tra Q. El gene tra A es el ge ne estructural de la pilina F y codifica para un polipéptido de -13,000 daltones el cual en su extremo amino terminal lleva una se cuencia de aminoacidos conocida como "peptido señal", esta por--ción es excindida durante su tránsito a través de la membrana generando un polipéptido de 7,000 daltones. Este evento conocido co mo procesamiento es catalizado por una proteasa específica que es el producto del gene tra Q.

El análisis genético ha revelado un alto grado de homologia en la región del operón tra entre los plasmidos que pertenecen a los grupos de incompatibilidad IncF.

Los genes del operón tra del F y plasmidos relacionados de acuerdo a sus funciones pueden ser divididos en cinco grupos principaoberined lesio, y obsrileool, and wolle

1.- tra A L E K B V W C U F Q H G : responsables de la bio--unim le ne obssilansintesis del pilus.

2.- tra N G : estabilización de las parejas conjugantes.

- ne scharoulova3.- tra S T : exclusión de superficie.

4.- oriT, tra M Y D I Z : metabolismo conjugacional deL DNA.

isquallog my 5.- fin 0 P, tra J y el promotor pyz: involucrados en la regulación del operón. malmente se han localizado los genes pilet, pil F,

La regulación del operón tra es complejo, el producto del gene -tra J es un regulador positivo del operón completo, el cual solo se transcribe en su presencia; pero tres genes adicionales determi nan la síntesis del producto de tra J, estos son los genes tra 0,fin O y fin P. Cuando están presentes los productos génicos de fin 0 y fin P estos se asocian con el gene tra 0 conduciendo a unbloqueo en la transcripción del gene tra J, de esta manera los pro ductos génicos de fin 0 y fin P actúan como reguladores negativoscooperativos, ya que en estas circunstancias el operon tra no se transcribe reprimiendose así la síntesis del pilus, el mecanismo descrito anteriormante se ilustra en la Figura 5.

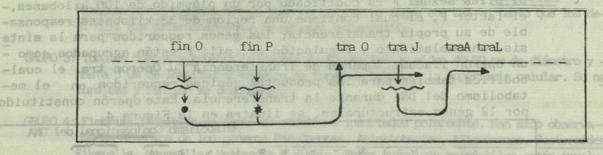


Fig. 5. Regulación del operón tra.

Fig.4. El operón tra presente en el Factor F o plásmidos tipo F.

Exclusion de Superflote

VARIACION DE FASE: Los primeros estudios sobre las fimbrias demostraron quelas células fimbriadas de una misma cepa podían existir tambiénen un estado no fimbriado. Esta alternancia fenotípica se denomi nó variación de fase. Cada fase pyede cambiar espontaneamente a la otra a una tasa promedio de 10 bacteria/generación, pero -varía según la cepa y condiciones ambientales. La fase fimbriada es seleccionada por cultivos estáticos en caldo, en tanto que el estado no fimbriado se obtiene por subcultivos seriados en me dio sólido.

Este carácter metaestable de la expresión del fenotipo fimbriado ha sido analizado a nivel genético habiendose determinado que es tá regulado a nivel de transcripción. El mecanismo molecular in volucra la existencia de un segmento pequeño de DNA de 300 pares de bases colocado en la vecindad de la región promotora del genepil A. Este elemento es de índole invertible, y su inversión es el interruptor que controla la transcripción del gene pil A. En la fase fimbriada (ON), el promotor está orientado en la misma dirección que procede la transcripción del gene pil A, tal co mo se muestra en la Figura 6. Al invertirse, el promotor se --orienta en dirección opuesta a la de la transcripción bloqueando este proceso y en consecuencia la síntesis de pili tipo 1 por lo que las células se encuentran en el estado no fimbriado (OFF).

al ser secretados generando las subunidades fimbriales de 17.000

ufre un proce

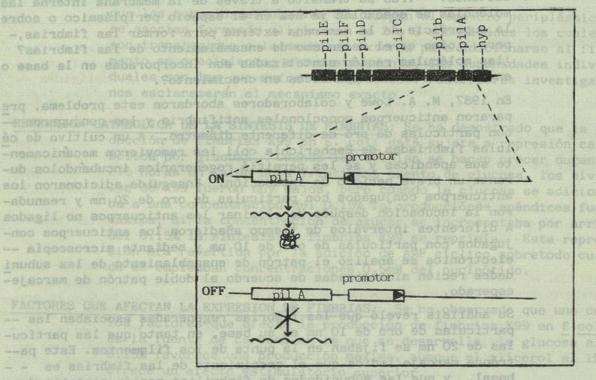


Fig. 6. Mecanismo molecular de la variación de fase fimbrial. En la figura superior se muestra la región pil y en los esquemasinferiores se ilustra agrandado la región invertible dentro del promotor de pil A en sus dos orientaciones que originan el estado ON (fimbriado) y el estado OFF (no fimbriado) en-

FUNCIONES DE LAS FIMBRIAS: Las fimbrias tienen funciones adherentes y pa-

Este fenómeno incrementa la virulencia de las bacterias patóge-nas fimbriadas ya que les permite evadir los mecanismos de defen sa del hospedero. Cuando estos organismos se encuentran sobre la superficie de las mucuosas presentan fimbrias para adherirsefijamente, pero al invadir tejidos más profundos se desprenden de sus apéndices adhesivos para evitar su asociación con células fagocíticas del sistma de vigilancia inmunológico.

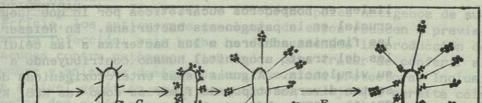
MORFOGENESIS DE LAS FIMBRIAS: Las proteinas extracelulares localizadas en el espacio periplásmico o en la membrana externa deben ser transferidas desde el sitio de síntesis hasta su destino final a través de la membrana plasmática, por ello son sintetizadas como precur sores que llevan un "peptido señal" en su extremo amino terminal el cual permite su secrección, sin embargo, tras las etapas de traducción y excrección simultáneas, el precursor sufre un proce so de maduración consistente en la eliminación del peptido señal generandose una molécula polipéptidica de menor peso molecular.

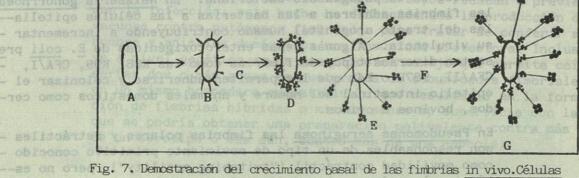
gene pil A.

Los protómeros que constituyen las fimbrias son proteinas de exportación sujetas a este procesamiento, son sintetizadas como -polipéptidos precursores de 19,000 daltones los cuales maduran al ser secretados generando las subunidades fimbriales de 17,000 daltones. Tras su tránsito a través de la membrana interna las moléculas se ensamblan ya sea en el espacio periplásmico o sobre la superficie de la membrana externa para formar las fimbrias,pero, ¿cómo es el mecanismo de ensamblamiento de las fimbrias? ¿las moléculas recién sintetizadas son incorporadas en la base o en la punta de los apéndices en crecimiento?.

> En 1987, M. A. Lowe y colaboradores abordaron este problema, pre pararon anticuerpos monoclonales antifimbria y los conjugaron -con partículas de oro de diferente diámetro. A un cultivo de cé lulas fimbriadas de Escherichia coli les removieron mecanicamente sus apéndices y se les permitió regenerarlos incubandolos durante un breve período de incubación. Enseguida adicionaron los anticuerpos conjugados con partículas de oro de 20 nm y reanudaron la incubación después de eliminar los anticuerpos no ligados A diferentes interválos de tiempo añadieron los anticuerpos conjugados con partículas de oro de 10 nm y mediante microscopía -electrónica se analizó el patrón de ensamblamiento de las subuni dades recién sintetizadas de acuerdo al doble patrón de marcajeesperado.

Su análisis reveló que las fimbrias regeneradas asociaban las -partículas de oro de 10 nm en su base, en tanto que las partículas de 20 nm se fijaban en la punta de los filamentos. Este pa-trónde marcaje indica que el crecimiento de las fimbrias es -basal, y que las subunidades de fimbrilina recién sintetizadasse ensamblan en la base de la fimbria en crecimiento. En la Figu ra 7 se esquematiza el experimento mencionado. No obstante queda por precisar el mecanismo exacto del ensamblamiento. Los auto res de este artículo proponen dos hipótesis respecto a la polime rización del apéndice fimbrial. Una posibilidad propone que las





defimbriadas de E. coli (A) se les dejó regenerar parcialmente sus fimbrias (B), se adicionaron anticuerpos conjugados con partículas de oro de 20 nm (C) y los filamentos fimbriales fueron marcados conel anticuerpo específico (D), se incubó durante cierto tiempo para permitir que las fimbrias siguieran creciendo (E) y luego se adicioeda congregación naron anticuerpos conjugados con particulas de oro de 10 nm (F) y se examinó al microscopio el patrón de marcaje (G).

que las subunidades una vez que llegan al espacio periplásmico se asocian formando oligómeros de 2 o 3 subunidades los cuales son transferidos a la membrana externa para adicionarse al filamento en crecimiento; alternativamente, las subunidades indivi--- and duales son las que sufren este proceso. Posteriores investigacio nos esclarecerán el mecanismo exacto.

REPRESION CATABOLICA DE LA SINTESIS DE FIMBRIAS: Se ha demostrado que la pro ducción de fimbrias K99 en E. coli está sujeta a represión catabólica por glucosa. Cuando las células se hacen crecer durante-2.5 horas en Caldo Soya Tripticasa exento de glucosa, los nive-les de K99 fueron muy bajos, pero cuando la glucosa se adicionaba a una concentración del 0.15% la producciónde apéndices fué máxima; si la concentración de azúcar se incrementaba por arriba del 0.15% la síntesis de fimbrias K99 se reprimía. Esta repre-sión era revertida por la adición de AMP cíclico sobretodo cuando se empleaban concentraciones 0.5mM del nucleótido.

FACTORES QUE AFECTAN LA EXPRESION DE FIMBRIAS: Se ha observado que uno de los factores que afecta la producción de fimbrias K99 en E.colies la fuente de carbono en la que se desarrolla, la glucosa al -0.15% favorece una producción máxima, aunque el glicerol al 1% ofrece un efecto estimulatorio superior. La expresión de estos apéndices es dependiente también de la tem peratura de incubación, siendo favorecida a 37°C pero no a 18°Cpara el caso de las fimbrias K99. Adicionalmente, el pasaje de una célula fimbriada a traves de medios líquidos agitados estimula la producción de fimbrias K99. FUNCIONES DE LAS FIMBRIAS: Las fimbrias tienen funciones adherentes y parecen ser un mecanismo para la colonización de tejidos epiteliales en hospederos eucarióticos por lo que juegan un papel crucial en la patogénesis bacteriana. En Neisseria gonorrhoeae las fimbrias adhieren a las bacterias a las células epiteliales del tracto urogenital humano contribuyendo a incrementar su virulencia. Algunas cepas enterotoxigénicas de E. coli pre sentan diversos tipos de fimbrias como las K88, K99, CFA/I, CFA/II, 987P o F41 que les permiten adherirse y colonizar el epitelio intestinal del hombre y animales domésticos como cerdos, bovinos u ovinos.

En <u>Pseudomonas aeruginosa</u> las fimbrias polares y retráctiles - son responsables de un tipo de movimiento primitivo conocido - como movilidad contráctil ("twitching motility"), pero no es-tán involucradas en la conjugación bacteriana como puentes detransferencia de material genético.

Las fibrillas observadas en organismos grampositivos partici—
pan también en la adherencia bacteriana, su presencia se ha co
rrelacionado con propiedades adhesivas como son la congregación
con otras bacterias, la agregación salival, hemaglutinación yadhesión a partículas de hidroxiapatita recubiertas con saliva.

Además de las propiedades adherentes, las fimbrias muestran - otro tipo de cualidades como son:

PROPIEDADES HEMAGLUTINANTES: La aglutinación de eritrocitos ocasionada por las fimbrias se debe a que éstos sobre su superficie — presentan receptores específicos, generalmente glicolípidos — que contienen manosa. Dado que la interacción entre las fimbrias bacterianas y sus receptores es altamente específica, el conocimiento de la naturaleza química del receptor permitirá — fabricar compuestos químicamente análogos que se puedan emplear como fármacos para combatir infecciones causadas por organis— mos fimbriados. Como hicimos notar en las clasificaciones deapéndices filamentosos dadas anteriormente, la hemaglutinación puede ser sensible o resistente a manosa.

Algunas bacterias como Corynebacterium renale presentan fim—brias incapaces de aglutinar eritrocitos.

Respecto a lo anterior, recientemente se ha observado que mutantes de <u>E. coli</u> completamente fimbriadas fallan para aglutinar — eritrocitos de cobayo; este hecho ha hecho evidente que la presencias de fimbrias tipo 1 no es suficiente para fijarse a un receptor, sino que es necesario otro componente adicional al filamento polimerizado; este componente se ha identificado como el producto del **gene pil E.** Se desconoce como participa esta molécu la en la hemaglutinación, se ha sugerido que esta proteina sea el verdadero componente adhesivo pero que requiere de la fimbria para presentarse en una forma apropiada, pero también se ha supuesto que actue indirectamente, confiriendo al monómero de pili na tipo 1 la capacidad de unirse al receptor.

PROPIEDADES ANTIGENICAS: Las fimbrias son los principales antígenos de superficie, los anticuerpos en contra de ellos reducen o previenen la infección; este hecho ha desencadenado la producción de vacunas contra patógenos fimbriados para tratar de conferir al hombre y animales domésticos una inmunidad protectora. Inclusi ve a nivel genético se ha discutido el manejo que permita coin sertar dos o más genes estructurales de subunidades fimbriales en un mismo hospedero compatible lo que resultaria en la forma ción de fimbrias híbridas o mixtas sobre su superficie con las que se podría obtener una preparación polivalente contra más de un serotipo o más aún, contra más de una especie.

ELACELOS BALLAROS

AGREGACION Y FORMACION DE PELICULAS: La adhesividad conferida por las fimbrias permite la asociación entre las mismas células cuando éstas crecen en medios de cultivo líquido bajo condiciones estáticas, al agotarse el oxígeno disponible las células se adhierenentre sí formando películas sobre la superficie del caldo de cultivo. Esta capacidad ha sido observada en organismos fimbriados como Escherichia coli, Salmonella typhimurium, Shigella flexneri, Enterobacter sp. Ya se mencionó anteriormente que al gunas bacterias del suelo como Pseudomonas aeruginosa, Pseudomonas rhodos, Agrobacterium luteus y Rhizobium lupini forman películas en forma de estrella.

ADSORCION DE FAGOS: Los pili sexuales F e I están involucrados especificamente en la transferencia de material genético durante la conju gación y no están involucrados en propiedades adhesivas, pero adicionalmente actúan como receptores de fagos, los cuales porsu característica de unirse a estos apéndices se les ha denominado andrófagos o fagos específicos de macho.

Los pili F sirven como receptores para fagos esféricos que contienen RNA como material genético, como son los fagos QB , f2 , MS2, y para fagos filamentoso que contienen DNA como son los fagos M13 y F1.

Los pili sexuales I contienen receptores para fagos de DNA como son los fagos IF1 e IF2. Estos dos tipos de apéndices pueden - ocurrir sobre la misma célula.

-such a seriomization p.E. y S. Yellow. 1985. Nocleopide searches of place dradened

L.B. Smille. 1985. Comparative studies of the eminaced and macleotide sequences of pilin derived from Pseudomorae seruginosa DAV v. RAO I Recorded to the CO. Security of the Property of the Co.

## BIBLIOGRAFIA

- 1.—Bull, A.T. y P.M. Meadow. 1978. Companion to Microbiology. Selected Topics for further study. Longman—London.
- 2.-Clegg, S. y G.F. Gerlach. 1987. Enterobacterial Fimbriae. J. Bact. 169 (3) :934-938.
- 3.-de Graaf, F.K., P. Klemm y W. Gaasia. 1986. Purification, characterization and partial covalent structure of Escherichia coli adhesive antigen K99. Infect. Immun. 33 (3): 877-883.
- 4.-Duguid, J.P., E.S. Anderson., I. Cambell. 1966. Fimbriae and adhesive properties in Salmonellae. J. Pathol. Bacteriol. 92: 107-138.
- 5.—Finlay, B.B., L. Frost., W. Paranchych., J.M.R. Parker y R.S.H. Hodges. 1985. Major Antigenic Determinants of F and Col B pili. J. Bacteriol. 163 (1): 331—335.
- 6.—Finlay, B.B., L.S. Frost., W. Paranchych. 1986.Origin of transfer of IncFPlasmids and nucleotide sequences of the Type II oriT, traM and
  traY alleles from Col B4, K98 and the Type IV traY Allele from—
  R100-1. J. Bacteriol. 168 (1): 132-139.
  - 7.-Issacson, R.E. 1977. K99 Surface Antigen of Escherichia coli: Purification and Partial Characterization. Infect. Immun. 15(1):272-279.
  - 8.-Issacson, R.E. 1980. Factors affecting expression of the Escherichia coli pilus K99. Infect. Immun. 28 (1): 190-194.
  - 9.-Korhonen, T.K., K. Louthnatmaa., H. Ranta y N. Kuusi. 1980. Characterization of Type 1 pili of Salmonella typhimurium LT2. J. Bacteriol. 144(2): 800-805.
  - 10.-Korhonen, T.K., V.V. Rhen., A. Pere., J. Parkkinen y J. Finne. 1984. —

    Escherichia coli Fimbriae recognizing sialyl glactosides. J. 
    Bacteriol. 159 (2): 762-766.
- 11.-Mattick, J.S., M.M. Bills., B.J. Anderson., B. Dalrymple., M.R. Mott y J.R. Egerton. 1987. Morphogenetic Expression of Bacteroides nodosus Fimbriae in Pseudomonas aeruginosa. J. Bacteriol. 169. (1): 33-41.
  - 12.-Maurer, L. y P. E. Orndorff. 1985. A New Locus: pil E, required for binding of type 1 piliated Escherichia coli to erythrocytes. FEMS. Microbiol. Lett. 30: 59-66.
  - 13.-Maurer, L. y P.E. Orndorff. 1987. Identification and characterization ofgenes determining receptor binding and pilus length of Escherichia coli type 1 pili. J. Bacteriol. 169 (2): 640-645.
  - 14.-Morris, E.J., N. Ganeshkumar., M. Song y B.C. McBride. 1987. Identification and preliminary characterization of a Streptococcus sanguis fibrillar glycoprotein. J. Bacteriol. 169(1):164-171.
  - 15.-Old, D.C. 1972. Inhibition of the Interaction between friae haemaglutinin and erythrocytes by D-Mannose and other carbohydrates. J. Gen. Microbiol. 71: 149-157.
  - 16.-Orndorff, P.E. y S. Falkow. 1985. Nucleotide sequence of pil A, the Gene-encoding the structural component of type 1 pilin in Escherichia coli. J. Bacteriol. 162(1): 454-457.
  - 17.-Ørskov, I., F. Ørskov y A.B. Andersen. 1980. Comparison of E. coli fimbrial antigen F7 with type 1 fimbriae. Infect. Immun. 27 (2): 657-666.
  - 18.—Sastry, P.A., B. Finlay., B.L. Pasloske., W. Paranchych., J.P. Pearlstone;
    L.B. Smille. 1985. Comparative studies of the aminaocid and nucleotide sequences of pilin derived from <u>Pseudomonas aeruginosa</u>
    PAK y PAO. J. Bacteriol. 164 (2):571—579.

## FLAGELOS BACTERIANOS

DEFINICION: Son apéndices filamentosos que se originan en la membrana plasmática, su composición es enteramente proteica, son antigénicos y están involucrados en la motilidad celular. Todos los flagelos estudiados a la fecha poseen tres regiones morfológica y antigénicamente diferentes conectadas en serie: el filamento, el gancho y el cuerpo basal — (fig.1).

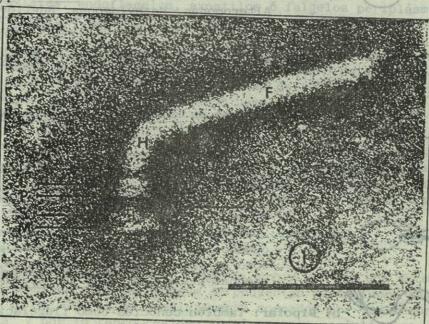


Fig.1. Micrografía que muestra el flagelo intacto de Aquaspirillum serpens, el cual — consta de gancho (H), filamento (F) y cuerpo basal. El complejo basal está compuesto — de cuatro discos (L, P, S y M) colocados sobre un eje central (R) que conecta el par — de discos externos con el par interno. El eje emerge del complejo basal para unirse al gancho. La barra mide 100 nm.

CLASIFICACION: Ya desde hace tiempo las células bacterianas han sido objeto de diversas clasificaciones de acuerdo al número y disposición de sus — flagelos. Aunque los sitios de inserción de los mismos sobre la super ficie de la célula se consideran una característica de especie o grupo, debe señalarse que esto, al igual que el número de los flagelos, puede variar aún dentro de la misma especie. Seelinger y Welshimer establecieron que la flagelación variable ocurre cuando flagelos morfológicamente distintos están presentes en en el mismo organismo, aunque no necesariamente en la misma célula. En cambio el término flagelación mixta se refiere al caso en el que flagelos distintos aparecen sobre un mismo individuo, como en el caso de ciertas especies de Pseudomonas, Aeromonas, Vibrio y Azospirillum que producen flagelos laterales en adición al único flagelo polar cuando cercen sobre un medio sólido.