

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



TOLERANCIA DE Vibrio cholerae AL CHOQUE ACIDO

UANL

T E S I S

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA.

Q.F.B. MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. DICIEMBRE DE 1997





1080087089



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

**UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO**



TOLERANCIA DE *Vibrio cholerae* AL CHOQUE ACIDO

UANL

TESIS

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

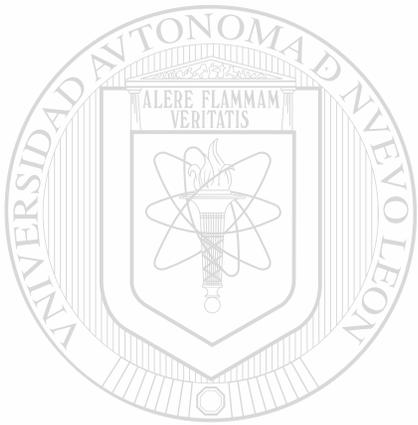
**PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA.**

Q.F.B. MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA.

Monterrey, Nuevo León

Diciembre de 1997

TM
QR 201
.c5
A4



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

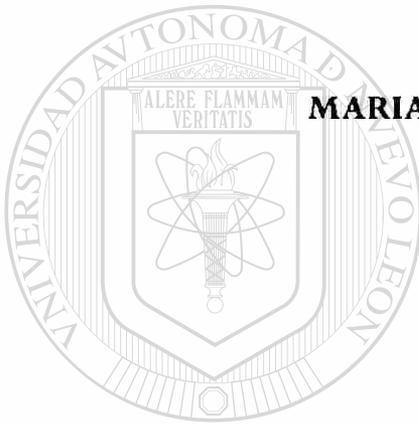
TOLERANCIA DE *Vibrio cholerae* AL CHOQUE ACIDO

TESIS
PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN
MICROBIOLOGIA

POR

MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA

APROBADA
COMISION DE TESIS



A handwritten signature in black ink, appearing to read "J. Santos García Alvarado".

Dr. J. Santos García Alvarado

Presidente

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Norma L. Heredia Rojas".

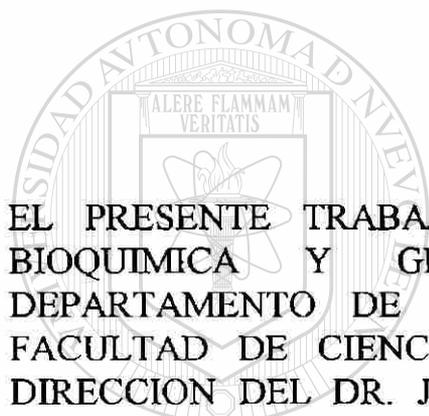
Dra. Norma L. Heredia Rojas

Secretaria

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Licet Villarreal Treviño".

M.C. Licet Villarreal Treviño

Vocal



EL PRESENTE TRABAJO SE REALIZO EN EL LABORATORIO DE BIOQUIMICA Y GENETICA DE MICROORGANISMOS DEL DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGIA E INMUNOLOGIA DE LA FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA U.A.N.L. BAJO LA DIRECCION DEL DR. JOSE SANTOS GARCIA ALVARADO Y LA CO-DIRECCION DE LA DRA. NORMA L. HEREDIA ROJAS.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

DEDICATORIA

A MIS PADRES, Ignacio Alvarez R. (+) y Leonor Ojeda, por su gran amor y confianza que me han dado y sobre todo por enseñarme que con fe se puede lograr todo en la vida.

A MIS HERMANOS, Raúl, Delia, Patricia, Felipe, Ignacio, Ramona, Juan José, Olga Lidia y Blanca Liliana, con mucho amor y cariño por ser amigos y compañeros, en todo momento de mi vida.

A MIS SOBRINOS, Tania, Mayra, Abraham, Jessica, Nallely, Diana y Rosita, por ser el fruto de amor y la esperanza del mañana en mi familia.

A MIS AMIGOS, por proporcionarme el estímulo necesario para lograr mi meta. Especialmente a: Luis R. Romo, Gerardo García y Cesar Sánchez.



NADA

NO HAY NADA DEMASIADO BUENO PARA QUE NO LO POSEAS.

NINGUNA ALTURA QUE NO CONVIERTAS EN REALIDAD.

TU PODER ES MAYOR QUE TU PENSAMIENTO.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
ES ALGO QUE DEBES SENTIR DENTRO DE TI.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS
NO DEBES TEMER NADA. TU PROPIO SER SABE QUE TU ERES TU PROPIO SER

INFINITO: POR TANTO FIJA TU MENTE EN LA META MAS ALTA.

NO EXISTE NADA QUE NO PUEDAS HACER.

ELLA WHEELER WILCOX.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por brindarme el apoyo económico ya que sin el no hubiera sido posible la realización de esta investigación.

Mi más sincero agradecimiento a mis asesores, Dr. José Santos García Alvarado y a la Dra. Norma Laura Heredia Rojas por permitirme trabajar en este proyecto y por darme la oportunidad de formar parte de su equipo de investigación.

Agradezco a la M. C. Licet Villarreal Tréviño, por todo su apoyo, consejos y sugerencias que me ayudaron en esta investigación.

Al Dr. Ronaldo Labbé por darme la oportunidad de trabajar una parte de la tesis en su laboratorio.

Al Dr. Rafael Castro Aguayo por la asesoría brindada en el análisis estadístico.

A mis compañeros del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos: Angeles, Licet, Cesar, Fabiola, Gerardo, Mely, Susana, Enriqueta, Elva, Mima, Rubén, Eduardo, Fernando, por su compañerismo y ayuda que han hecho grata y memorable mi estancia en este laboratorio.

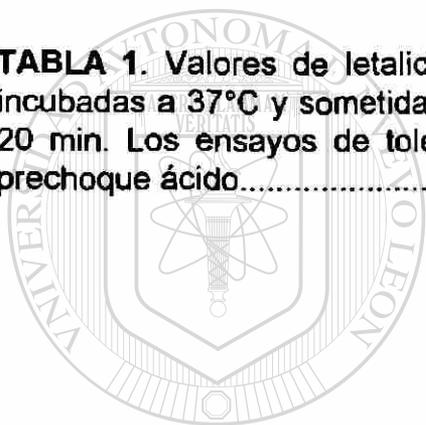
A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por abrirme sus puertas.

INDICE DE CONTENIDO

DEDICATORIA	III
AGRADECIMIENTOS	V
INDICE DE CONTENIDO.....	VI
INDICE DE TABLAS.....	VII
INDICE DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
RESUMEN.....	1
INTRODUCCION.....	3
ANTECEDENTES.....	5
<hr/>	
HIPOTESIS.....	19
OBJETIVO GENERAL.....	20
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	20
MATERIAL Y METODOS.....	21
RESULTADOS.....	24
DISCUSION.....	38
CONCLUSIONES.....	40
LITERATURA CITADA	41

INDICE DE TABLAS

TABLA 1. Valores de letalidad a pH 4.5 ($D_{4.5}$) de células de *V. cholerae* C 7677 incubadas a 37°C y sometidas previamente a un choque ácido subletal de pH 5.5 por 20 min. Los ensayos de tolerancia se realizaron a diferentes tiempos después del prechoque ácido..... 37



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



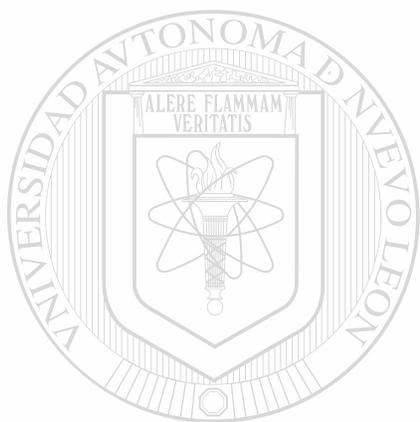
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INDICE DE FIGURAS

- FIG. 1.** Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a un choque ácido de pH 3.0 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque..... 26
- FIG. 2.** Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a choque ácido a pH de 3.5 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido..... 27
- FIG. 3.** Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a choque ácido a pH de 4.0 durante 20 min. la flecha indica el momento de aplicación del choque ácido. 28
- FIG. 4.** Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a pH de 4.0 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido. 29
- FIG. 5.** Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a pH de 4.5 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido..... 30
- FIG. 6.** Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a un choque ácido de pH 4.5 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque..... 31
- FIG. 7.** Curva de crecimiento de *V. cholerae* C. 7677 cultivada en medio ICC a 37°C y sometida a un choque ácido de pH 5.5 y 5.0 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido..... 32
- FIG. 8.** Curva de muerte de *V. cholerae* C 7677 a pH de 4.5 después de que fue sometida a un prechoque ácido de pH 5.5 por 20 min. El ensayo de tolerancia ácida se realizó inmediatamente después del prechoque ácido..... 33
- FIG. 9.** Curva de muerte de *V. cholerae* C 7677 a pH de 4.5 después de que fueron sometidas a un choque ácido de pH 5.5 por 20 min. Los ensayos de tolerancia se realizaron inmediatamente después del prechoque..... 34

FIG. 10. Curva de muerte de *V. cholerae* C 7677 a pH de 4.5 cultivada a 37°C y sometida a un prechoque ácido de pH 5.5 por 20 min. Los ensayos de tolerancia se realizaron 30 min después del prechoque..... 35

FIG. 11. Curva de muerte de *V. cholerae* C 7677 a pH de 4.5 cultivada a 37°C. Los ensayos de tolerancia se realizaron 1 h después del prechoque a pH de 5.5 por 20 min..... 36



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LISTA DE ABREVIATURAS

Absorbancia a 600 nm.	A ₆₀₀
Acido clorhídrico	Hcl
Desviación estándar	D. Stand.
Grados celsius	°C
Hora	h
Infusión cerebro corazón	ICC
Kilodaltones	Kda
Menor que	<
Microgramo por mililitro	ug/ ml
Mililitro	ml
Minutos	min
Molaridad	M
Por ciento	%
Probabilidad	P
Proteínas de choque ácido	PCHA
Proteínas del estrés	PE
Proteínas de choque térmico	PCHT
Respuesta a la tolerancia ácida	RTA
Revoluciones por minuto	rpm
Unidades formadoras de colonia	UFC
Valor de letalidad	D

RESUMEN

Vibrio cholerae es el microorganismo que origina el cólera, la cual es una enfermedad con alta mortalidad. Para causarla éste tiene que afrontar barreras naturales del hospedero, tales como cambios en temperatura, pH extremo, y disponibilidad de nutrientes. Existen trabajos en donde se estudió la inducción de respuesta al choque térmico en *V. cholerae*, pero no se conoce a la fecha la respuesta a la tolerancia ácida. Siendo el pH bajo una de las principales barreras naturales del humano para la entrada de organismos enteropatógenos, así como uno de los métodos de conservación de alimentos, resultaba necesario conocer si esta bacteria era capaz de adquirir tolerancia al ácido y saber los mecanismos involucrados. En base a esto nos planteamos la hipótesis de que un choque ácido subletal en *V. cholerae* inducía tolerancia al ácido. Para demostrar esta hipótesis se usó *V. cholerae* tipo 01 C 7677, y se determinó la mejor condición de choque ácido cultivando las células en medio Infusión Cerebro Corazón hasta que alcanzaron la mitad de la fase logarítmica, y posteriormente fueron expuestas a diferentes pH ácidos durante 20 min. Después se transfirieron a un medio nuevo con el pH original. Cada hora se determinó la viabilidad celular mediante cuenta en placa.

Para determinar la tolerancia al ácido, se repitió el procedimiento anterior, solo que esta vez las células fueron expuestas a un segundo choque de pH más bajo por un período de 40 min. Durante este último tratamiento se determinó la viabilidad de las

células cada 10 min. Se determinó el tiempo requerido para que la población disminuyera en un logaritmo. Se estableció que los choques ácidos a pH de 4.5, 5.0 y 5.5 durante 20 min provocarían una disminución de crecimiento moderado, pero si las células eran retornadas a su pH original, estas eran capaces de recuperarse y alcanzar niveles semejantes a las del control. Además, que como resultado de un choque ácido previo a pH de 5.5, la bacteria resultó ser dos veces más tolerante a un pH de 4.5 que el control. Esta tolerancia permanecía al menos una hora después del choque inicial.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

INTRODUCCION

La enfermedad del cólera es causada por la ingesta de alimentos o agua contaminados con *Vibrio cholerae*, la cual es una bacteria que se encuentra ampliamente distribuida en la naturaleza, o bien interactuando con diversas asociaciones marinas (Kaper, B., et al., 1995; Jyot, J. y A. Ghosh., 1995).

La forma de transmisión de esta bacteria se lleva a cabo por la ingesta de agua o de alimentos contaminados con vibrios provenientes del vómito o de las heces de los enfermos. Los pescados y los mariscos que se consumen crudos, especialmente los camarones y los crustáceos procedentes de litorales poco profundos pueden estar también contaminados (Cabra, L. D., et al., 1994).

Se ha establecido que algunos factores determinan el desarrollo de la enfermedad, tales como el nivel socioeconómico, la disponibilidad y el acceso a medidas sanitarias básicas, el estado nutricional, el embarazo, la inmunidad natural y la acidez gástrica (Giannella, S., et al., 1972). Esta última representa una barrera de defensa frente al ingreso de microorganismos por vía oral, de tal manera que cuando dicha protección se encuentra disminuida, las bacterias sobrevivían más fácilmente. Así, la ingestión simultánea de alimentos capaces de neutralizar el jugo gástrico, permite que la infección se produzca con dosis mucho menores (Gonzalez, S. N y P. S. Saltigeral, 1992).

Cuando esta bacteria entra al organismo humano antes de poder llegar a invadir el epitelio intestinal y proliferar allí se enfrenta a una gran variedad de estímulos estresantes, tales como la elevada temperatura, pH extremo y disponibilidad de diferentes nutrientes (Nistrón, T., et al., 1992). Se ha sugerido que si los microorganismos se han adaptado previamente a condiciones de estrés, estos podrían sobrevivir a esas barreras naturales (Bearson, S., et al., 1996; Foster, W. J., 1991).

Debido a lo anterior, la respuesta a cambios no deseables en el medio ambiente es crucial para la sobrevivencia de los microorganismos tanto los patógenos como los obicuos.

En algunos organismos se ha demostrado la adquisición de tolerancia a pH ácido. Se ha visto que esta resistencia va acompañada por la síntesis de un grupo de proteínas conservadas evolutivamente conocidas como proteínas del choque ácido (Foster, J. W., 1995; Baik, S. H., et al., 1996; Wilmes, R. M., et al., 1996).

Siendo el pH ácido una condición de estrés a la que se tiene que enfrentar *V. cholerae*, así como uno de los métodos de conservación de alimentos, resulta interesante conocer los mecanismos que pudieran ayuda a sobrevivir a esta bacteria a esa condición, a fin de comprender y entender la resistencia y finalmente poder idear estrategias que nos permitan controlar la enfermedad del cólera.

ANTECEDENTES

EPIDEMIOLOGIA

El cólera es una de las enfermedades más antiguas de la humanidad, se pueden encontrar descripciones de cuadros clínicos semejantes a los de este microorganismo en los escritos de Hipócrates. Thomas Sydenham, en el siglo XVII, acuñó el término *Cholerae morbus* para distinguirlo de cólera, sinónimo de ira o enojo (Díaz, O. C., 1993; Rubio, M. C., y C. L. Tzuc, 1995).

Desde el siglo XVII hasta el XIX el *Cólera morbus* fue una enfermedad común entre los habitantes del Continente Asiático. En el año de 1817 salió de Asia y recorrió el mundo entero (Tapia, R., et al., 1992).

Entre 1830 y 1831 las tropas rusas llevaron la enfermedad a Polonia y de allí se introdujo a Europa. En 1832, atravesó el Atlántico y se presentó en Canadá; después se propagó a los Estados Unidos, específicamente a Nueva Orleans, y al año siguiente apareció en nuestro país (Gonzalez, S. y P. S. Saltigera., 1992).

John Snow, considerado como el padre de la metodología epidemiológica, publicó en 1849 su obra sobre el modo de transmisión del cólera en Londres. El definió las características epidemiológicas y precisó las bases para su prevención y control (Brock, T. D., et al., 1987).

En 1883 ocurrió una epidemia de grandes proporciones en Alejandría, en donde se realizaron investigaciones por Emilio Roux, Thuiller, Roberto Koch y por Kaffly.

Estos últimos pudieron aislar a la bacteria en la materia fecal de personas enfermas (Tapia, C. R., *et al.*, 1982).

Esta enfermedad había desaparecido de nuestro país por más de un siglo, aun y que durante mucho tiempo se registraron casos en el Continente Americano. Desgraciadamente, hace algunos años reapareció en el área andina de Sudamérica y desde allí se ha extendido lentamente a otros países de América, incluyendo el nuestro (Loo, D., *et al.*, 1997; Kaper, B. K., *et al.*, 1995; Nair, B., *et al.*, 1996).

En el mes de julio de 1991 se detectó la presencia de un pequeño brote en una localidad de la sierra sur del Estado de México, con 19 casos confirmados de cólera. La localización inmediata del caso permitió el control sanitario en forma oportuna, con lo que se logró el control total del brote (Kaper, J. B., *et al.*, 1995; Nair, B. G., *et al.*, 1996).

Actualmente, los movimientos migratorios son intensos y amplios, y las condiciones sanitarias deficientes, lo que coloca prácticamente a cualquier lugar del país como un área de riesgo para la enfermedad (Tapia, C. R., *et al.*, 1992).

GENERALIDADES DE *V. cholerae*

V. cholerae es un bacilo aerobio, gram negativo, curvo, de extremos redondeados, en uno de los cuales tiene un flagelo que lo hace sumamente móvil. Además, es un microorganismo marino que tiene preferencia por las aguas salobres

contaminadas con materia orgánica y se le encuentra con frecuencia en estuarios (Kaper, J. B., *et al.*, 1995; Brock, T. D., 1987).

Este microorganismo pertenece a la familia Vibrionacea, filogenéticamente cercano a las enterobacterias. Tiene más de 90 serogrupos, de los cuales dos de ellos, pueden ocasionar el cólera, el O1 y el O139. Existen dos biotipos: el clásico y el Tor, serológicamente indistinguibles. Dentro de cada biotipo hay tres serogrupos, Inoba, Ogawa e Hykojima. El biotipo clásico produce manifestaciones clínicas graves y el Tor es el que se ha relacionado más directamente con las últimas epidemias, excepto en Bangladesh, donde reapareció el biotipo clásico (Balakrish, N. G., *et al.*, 1996; Kaper, J. B., 1995). El único *V. cholerae* asociado con las epidemias es el del grupo O1 y el O139, los demás se han agrupado con *V. cholerae* no O1 (Kaper, J. B., *et al.*, 1995; Balakrish, N. G., *et al.*, 1996; Tapia, C. R., *et al.*, 1992).

EL COLERA

Tanto el biotipo clásico como el Tor elaboran una misma enterotoxina, el colerágeno, la cual es la responsable del cuadro clínico, el cual se caracteriza por falta de apetito, malestar abdominal y diarrea líquida, inicialmente de color café pero que rápidamente adquiere un color pálido como de "agua de arroz". Las heces son isotónicas, las cuales no tienen gran cantidad de proteínas, aunque son ricas en bicarbonato y potasio, motivo por el cual se pierde agua, y rápidamente se produce la deshidratación. Por lo general no se presenta fiebre, tampoco hay sangre ni moco en las heces. Poco tiempo después aparecen los vómitos. En ocasiones es frecuente la

presencia de calambres abdominales y musculares (Díaz O. C., 1993; Rubio, C. M. y C. L. Tzuc., 1995).

La mayor parte de las infecciones por *V. cholerae* (hasta un 75%) son asintomáticas, en especial en los niños. De los pacientes con manifestaciones clínicas, una parte presenta cuadros diarréicos leves, sin complicaciones, que no pueden distinguirse de las diarreas causadas por otras etiologías (Rubio, C. M., 1995). Solo una proporción pequeña de las personas infectadas presentan cuadros graves, que dependen principalmente de la liberación de la toxina (Gonzalez, S. y S. P. Saltigeral, 1992).

Pasado el tiempo de incubación del bacilo, se produce la enterotoxina, la cual es una proteína compuesta de dos subunidades (A y B). La subunidad B de la toxina se fija en los receptores del monoacilgangliósido (GM1) y transloca la subunidad A a través de la membrana, donde se activa la adenilatociclasa que produce un aumento del AMPc. Esto trae como consecuencia pérdida de líquido al inhibir la captación de cloruro de sodio y estimular la secreción activa de cloro por las células epiteliales del intestino (Cabral, D. L., et al., 1994; Ludwig, S. D., et al., 1985; Lanne, B., et al., 1994).

Se ha determinado que los anticuerpos IgA sintetizados contra el lipolisacárido y la toxina de *V. cholerae* proveen cierta protección contra el cólera, los primeros por inhibir la adherencia bacteriana a la pared intestinal y los segundos por el bloqueo a la fijación de la toxina a su receptor. Sin embargo, hasta la fecha no ha sido posible una vacuna efectiva utilizando esta estrategia (Gonzalez, S. N. y S. P. Saltigeral, 1992).

El control de esta infección plantea algunos problemas específicos. Este vibrión sobrevive por periodos de hasta 7 días fuera del organismo, específicamente en ambientes húmedos y templados. En el agua puede sobrevivir desde unas cuantas h hasta semanas, si ésta se encuentra contaminada con materia orgánica, y tiene un pH entre 6 y 9. Sin embargo, el microorganismo es susceptible a la desecación, a la ebullición, al cloro, a otros desinfectantes y a algunos antibióticos. (Tapia, R. C., *et al.*, 1992; Kaper, J. B., *et al.*, 1995).

Se ha observado que la forma de transmisión de esta bacteria se lleva a cabo por la ingesta de agua o de alimentos contaminados con *vibrones* provenientes del vómito o de las heces de enfermos. Los pescados y mariscos que se consumen crudos, especialmente los camarones y crustáceos procedentes de litorales poco profundos pueden estar también contaminados. (Makukutu, C. A. y R. K. Guthrie, 1986; Dalsgaard, A., *et al.*, 1996; Koch, W. H., *et al.*, 1993; Bej, A. K., *et al.*, 1996). Este patógeno tiene la capacidad de colonizar el intestino delgado, debido a que puede penetrar en las células epiteliales de la mucosa intestinal y reproducirse dentro de éstas (Miller, F. J., *et al.*, 1989; Kaper, J. B., *et al.*, 1995). Para que el patógeno se multiplique, primero debe encontrar en el huésped los nutrientes y las condiciones ambientales apropiadas. La temperatura, el pH y el potencial de óxido reducción son factores ambientales que afectan el desarrollo del microorganismo. Sin embargo, de mayor importancia es la disponibilidad de los nutrientes microbianos en los tejidos del huésped (Holmquist, L., *et al.*, 1993). Así como también influye el nivel socioeconómico de la población, la disponibilidad y el acceso a medidas sanitarias básicas, y en forma particular el estado nutricional, el embarazo, la inmunidad natural y la acidez gástrica.

La ingestión simultánea de alimentos capaces de neutralizar el jugo gástrico permite la infección con dosis mucho menores de sólo 10 000 gérmenes; esto se ha demostrado en voluntarios jóvenes y sanos; lo mismo sucede cuando existe aclorhidria (Gonzalez, S. N. y S. P. Saltigeral, 1992; Kaper, J., *et al.*, 1995).

PROTEINAS DEL ESTRES

Se ha establecido que los organismos son capaces de adaptarse a una serie de condiciones ambientales tanto físicas, químicas y biológicas. Además, esta exposición estimula la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas del estrés (PE) (Gautan, K., *et al.*, 1994; Visick, E y S. Clarke. 1995). Se cree que la función de estas proteínas es proteger a las células de cambios adversos, los cuales pueden ser letales (Morimoto, R. J., *et al.*, 1990). Estas proteínas se producen como respuesta a diferentes condiciones de estrés tales como la temperatura, etanol, cambios en el pH, iones de metales pesados, carencia de nutrientes, anaerobiosis, e infecciones virales (Morimoto, I. R., 1990; Couto, J. A., *et al.*, 1997; Holmquist, L., *et al.*, 1993; Foster, W. J. y P. M. Spector, 1995; Flahaut, S., *et al.*, 1996).

Se ha determinado que las PE son producidas en pequeñas cantidades en condiciones no tensionantes, y están involucradas en funciones esenciales para la célula, tales como la translocación, la construcción y el ensamblaje de proteínas. Algunas de estas proteínas han sido llamadas chaperonas moleculares (Schlesinger, J. M., 1988). Dentro de este grupo destaca la GroEI, que ayuda a otras proteínas a protegerse de la desnaturalización así como en el ensamblaje de estructuras. Por otro lado, también se ha caracterizado a la proteína DnaK, la cual se encontró que disocia

algunas proteínas agregadas, mantiene polipéptidos desdoblados, facilita el transporte de éstos a través de la membrana y además es responsable de unir polipéptidos específicos (Schlesinger, J. M., 1988; Morimoto, I. R., *et al.*, 1990).

Araki en 1991, trabajando con una bacteria psicrófila (*Vibrio sp*) encontró que existían cambios en la síntesis de proteínas cuando las bacterias crecían a 13°C, en comparación a cuando era cultivada a 0°C. El sugirió que se trataba de una respuesta adaptativa para poder crecer eficientemente a la temperatura a la cual era sometida.

Nystrom, *et al*, en 1991 estudiaron la respuesta de la cepa S14 de *Vibrio sp* sometida a inanición de carbón, nitrógeno o fósforo. Ellos encontraron que este estrés provocaba la estimulación de la síntesis de 20 proteínas nuevas además de las ya existentes.

En 1996 un grupo de investigadores estudiaron las proteínas de choque térmico (PCHT) en *V. parahaemolyticus*. Ellos encontraron una PCHT cuando se incrementaba la temperatura de 30 a 42°C. Se encontró que esta era homóloga a la GroEl y que tenía un peso molecular de 58 kDa (Koga, T., *et al.*, 1996).

Gautam, K. *et al*, (1994) estudiaron la respuesta de *V. cholerae* al choque térmico. Ellos encontraron que existían 16 proteínas identificadas en respuesta a la exposición de altas temperaturas. Además se encontró que 5 proteínas de pm= (69, 66, 46, 23 y 16 kDa) localizadas en la membrana externa de las células eran inmunogénicas. Siguiendo con esto mismo en 1993, Holmsquist, *et al*, estudiaron la inducción de las proteínas del estrés en especies marinas de *Vibrios* durante un período de deficiencia de carbono y un cambio de temperatura. Ellos demostraron que

estas condiciones inducían la síntesis de proteínas del estrés tales como la DnaK y GroEl. Sin embargo, después de un largo período de carencia de carbono solo se indujo la DnaK.

En el mismo año se estudió el efecto de la variación de la temperatura sobre la tolerancia al ácido y al calor en *S. enteritidis*. Se demostró que cuando las células se transferían a temperaturas de 20, 37 y 46°C, se producía un incremento en la tolerancia tanto al ácido como al calor (Humphrey, J. T., *et al.*, 1993). A este fenómeno se le ha denominado protección cruzada.

La protección cruzada fue estudiada en *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 al ser expuesta a sales biliares, a pH ácido y a un choque térmico. Las células sometidas a altas temperaturas y a sales biliares, indujeron resistencia a condiciones extremas tanto del mismo ó diferente estrés, mientras que las sometidas a bajos pH no mostraron protección contra la exposición a sales biliares. Este análisis, reveló que cada tratamiento era capaz de inducir la síntesis de un conjunto de proteínas particulares, entre ellas estaba la DnaK y GroEl (Flahaut, S., *et al* 1996).

En otra investigación realizada por Humprey, *et al.* (1991), se reportó que *S. enteritidis* PT4 mostró adquisición de termotolerancia después de una exposición previa a condiciones alcalinas. Se determinó de esta manera, que la adquisición de termotolerancia fue debida a un estrés diferente del choque térmico.

En investigaciones realizadas por Völker, U., *et al* (1992) con *Bacillus subtilis*, ellos demostraron que las células podían adquirir termotolerancia al ser expuestas a un choque térmico subletal. Además cuando estas células se sometieron a

concentraciones bajas de sal, se observó un aumento en la tolerancia a concentraciones letales de NaCl.

Jones, G. P., *et al*, en 1987, estudiaron la inducción de las proteínas en respuesta a bajas temperaturas en *E. coli*, y observaron que cuando se sometían a cambios bruscos de temperatura (de 37°C a 10°C) se detenía el crecimiento por varias h y las células entraban a una fase de adaptación o lag, en la cual se sintetizaban aproximadamente 24 proteínas, de las cuales 13 se incrementaban de 3 a 300 veces en comparación con su síntesis a 37°C.

Otro grupo de investigadores encontraron que cuando el cultivo de células de *E. coli* era incubado a 37°C y transferido a 10° ó 15°C, se producía una proteína de choque frío. Ellos demostraron que la proteína era citoplasmática y que tenía un peso molecular de 7.4 kDa (Goldstein, *et al*, 1990).

La respuesta al estrés oxidativo ha sido muy estudiada en bacterias como *E. coli* y *S. typhimurium*. Las estrategias de defensa de estas bacterias son muy similares a los mecanismos empleados por levaduras y células de ratón y humanas para defenderse de agentes oxidantes. Las bacterias se enfrentaban con este estrés, intentando destruir al agente oxidante, y reparando las macromoléculas que habían sido dañadas (Ahern, H., 1991; Farr, S. B. y T. Kogoma, 1991).

Leyer, *et al*, (1993) demostraron que un choque ácido desarrollaba una importante protección cruzada al calor, al estrés oxidativo, y al estrés osmótico en *S typhimurium*. Sin embargo, ni el choque térmico, ni el osmótico indujeron tolerancia al ácido.

PROTEINAS DE CHOQUE ACIDO

Una importante condición de estrés que tiene que ser afrontada por muchos microorganismos enteropatógenos, es el pH bajo. Por ejemplo, en algunos microhábitats del cuerpo humano, los patógenos microbianos son expuestos al pH ácido del estómago, a condiciones de acidez en tracto urinario y en los fagolisosomas. La adaptación y sobrevivencia a bajos pH puede favorecer la producción de enfermedades por muchos patógenos gastrointestinales (Karem, et al., 1994).

S. typhimurium, así como otras bacterias entéricas, experimentan cambios significativos durante el crecimiento en diversos nichos ecológicos. Se ha demostrado que la acidez del estómago origina que las células mueran rápidamente al pasar por este órgano. Sin embargo, recientemente se ha demostrado que *S. typhimurium* tiene la capacidad de sobrevivir a bajos pH (pH 3.0 a 4.0), si primero se adapta a un pH moderadamente ácido (5.5 a 6.0). Este fenómeno es conocido como respuesta a la tolerancia ácida (RTA). La exposición a cambios ácidos moderados es conocida como pre-choque (choque subletal), y las proteínas que se sintetizan como respuesta son conocidas como proteínas de choque ácido (Foster, 1991, 1993 y 1995).

Gorden y Small en 1993, estudiaron la resistencia ácida en bacterias entéricas, demostrando que algunas especies de *Shigella*, *E. coli* y *Salmonella* tienen la capacidad de sobrevivir a pH 2.5 durante 2 h.

Ahamad y Marth (1990), observaron que en ciertos alimentos con pH ácido se provocaba una inhibición en el crecimiento microbiano no deseado y también provocaba letalidad en estos organismos. Por otro lado, otros autores también

demonstraron que la exposición, de grandes números de *L. monocytogenes* en alimentos ácidos podría provocar un daño en la bacteria pero no la muerte.

Se ha visto que ciertos ácidos orgánicos tales como el propiónico y ácido butírico son constituyentes comunes en diversos nichos ecológicos, por ejemplo el contenido intestinal de humanos que puede tener niveles de ácidos grasos volátiles, producidos como resultado de la fermentación por la flora natural. Sin embargo, estos ácidos orgánicos pueden tener también un efecto contra el crecimiento y la viabilidad de las bacterias. En la actualidad, los ácidos anteriores son comúnmente usados para la conservación de alimentos (Guifoyle, D. E. y I. N. Hirshfield., 1995).

Los ácidos grasos de cadena corta (ácido acético y propiónico) son usados ampliamente en la conservación de alimentos. La producción de estos dos ácidos más el ácido butírico en el colon por anaerobios sirven como un mecanismo para controlar el número de enterobacterias que pueden ser patógenas en este órgano. Se ha demostrado que la tolerancia a pH ácidos (3.5) de células inicialmente crecidas a pH cercano al neutro (pH 6.5) se incrementa por la exposición de ácido propiónico[®] o butírico al 0.1 %. Ellos observaron que la inducción de la arginina y la lisina descarboxilasas son importantes para la sobrevivencia de *E. coli* que fue expuesta a combinaciones de ácidos ligeros (pH 5.5) y a butirato al 0.5 %. Este estudio sugirió que la presencia de ácidos orgánicos de cadena corta podían disparar una respuesta de adaptación que pudiera ser importante en la sobrevivencia de patógenos causantes de brotes por el consumo de alimentos contaminados.

Baik, S. *et al.*, (1996), estudiaron la tolerancia al ácido en *S. typhimurium* y observaron que la RTA inducida era importante en la sobrevivencia, si previamente había una exposición de ácidos débiles (pH 3.0). También observaron que un factor regulador (sigma) tenía un papel importante en la protección contra los efectos letales de los ácidos. Además se vio que este factor estaba involucrado en la RTA (Foster, W. J., 1993; Lee, S. I., *et al.* 1994).

Heyde, M. y R. Portalier, (1990) estudiaron la síntesis de proteínas de *E. coli* después de someter los cultivos de un pH de 6.9 a 4.3, durante 30 a 45 min. Ellos encontraron siete proteínas cuya síntesis fue inducida después de agregar el ácido. La inducción de una de estas proteínas fue dependiente del factor sigma (RpoH), mientras que las otras fueron independientes de este factor.

En un trabajo realizado en *Shigella flexneri* en fase estacionaria, se observó que la bacteria tenía la capacidad de sobrevivir a un pH de 2.5. Se determinó que esta resistencia ácida podía contribuir a que se presentara la enfermedad. Y que dependía de proteínas protectoras y del factor sigma (Waterman, S. y P. L. C. Small, 1996).

Realizando un estudio con la cepa PT4 de *S. enteritidis* que se expuso a diferentes pH (3.0 hasta 6.0) Humphrey, *et al.* (1993), encontraron que cuando las células se transfirieron a un pH entre 2.5 a 2.9 se presentó un marcado incremento en la resistencia al ácido. Se determinó que tal adaptación involucraba dos sistemas protectores en donde uno de ellos era independiente de la síntesis de proteínas.

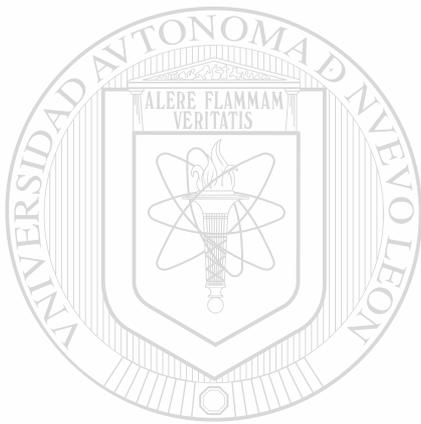
La RTA inducida en *L. monocytogenes* Scott A fue estudiada por Okereke, *et al* (1996), cuando cultivaron las células a un pH de 5.4, y posteriormente se transfirieron

a un pH de 3.3 y 4.3. Ellos encontraron que las células tratadas con el pre choque ácido de 3.3 fueron 150 a 7500 veces más resistentes. Sin embargo, a un pH de 4.3 no hubo diferencia con los controles. En otro experimento, se expusieron las células a diferentes concentraciones de nisina (0.03, 0.6, 1.2 y 1.5 µg /ml), el cual es un antimicrobiano que se usa en la industria de alimentos como conservador. Se encontró que las células que presentaron resistencia a pH ácido fueron ligeramente más resistentes a la nisina que los controles. Esto indicó que la RTA confería una limitada protección cruzada contra otro estrés, como lo fue la exposición a esta sustancia.

Karem, et al, (1994) diseñaron un estudio para examinar la respuesta de *Aeromonas hydrophila* al estrés ácido. Ellos demostraron que la bacteria exhibía una importante RTA, ya que era capaz de proteger a la célula a pH de 3.5. Dicha tolerancia al ácido era inducida por la exposición previa a un pH de 5.0 por 20 min. La adición de cloranfenicol al medio durante la primera exposición al ácido impidió el desarrollo de la tolerancia, indicando el importante papel que desempeñaban las proteínas en el proceso.

Por otro lado se estudió también la RTA en *Lactococcus lactis* subespecie *lactis*. Aquí las bacterias se sometieron un pre-choque y posteriormente a un pH de 3.9. Se demostró la inducción de 33 polipéptidos. Cuando se adicionó cloranfenicol al medio durante el pre-choque, la RTA no varió, sugiriendo que la síntesis de proteínas no era necesaria para la sobrevivencia en condiciones ácidas extremas (Harthe, A., et al., 1996).

O'Brien, *et al*, (1995) estudiaron la respuesta de *Mycobacterium smegmatis* al estrés ácido. Ellos observaron que la exposición previa a condiciones subletales confería protección contra exposiciones extremas de acidez. Además, se determinó que tal adaptación dependía de la inducción de proteínas.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



HIPOTESIS

Un choque ácido subletal en *V. cholerae* induce tolerancia al ácido.

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

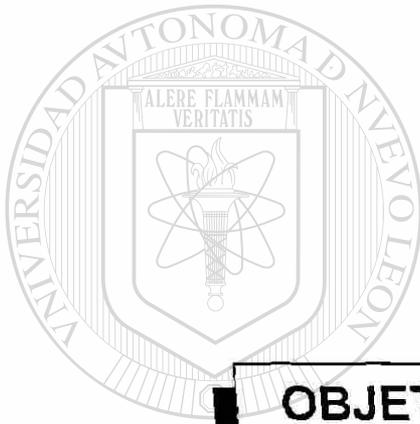
®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVO GENERAL

Demostrar la adquisición de tolerancia a condiciones letales de acidez de *V.*

cholerae como respuesta a una exposición previa subletal de acidez.



OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1). Establecer el efecto de un choque ácido subletal sobre la adquisición de tolerancia de *V. cholerae* a bajos pH.
- 2). Determinar la duración de la tolerancia adquirida en las células de *V. cholerae*.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS UTILIZADAS

Se utilizó la cepa de *Vibrio cholerae* C7677 - 01 Ogawa, proporcionada por la Dra. Elisa I. Elliot de la División de Microbiología del Centro para la Seguridad de Alimentos y Nutrición Aplicada de la Food and Drugs Administration. Washington D.C. EUA. Esta se mantuvo en agar infusión cerebro corazón (ICC, Difco) a temperatura ambiente, y se realizaron resiembras cada 3 meses.

ACTIVACION DE LA CEPA

Para la activación de las cepa se utilizaron tubos con 5 ml de caldo ICC, en los cuales se inoculó una asada del cultivo de reserva y se incubó a 37 °C por 20 a 24 h.

EFFECTO DE UN PRE- CHOQUE ACIDO SOBRE EL CRECIMIENTO

Este experimento tuvo como fin conocer las condiciones de acidez que son subletales a *V. cholerae*. La cepa ya activada se inoculó (1%) en tubos con 5 ml de caldo ICC y se incubaron a 37°C. Cuando estos alcanzaron la parte media de la fase logarítmica (A_{600} de 0.30 a 0.35, en un espectrofotómetro Sequiola Turner modelo 340) se sometieron a diferentes pH ácidos. Para esto se agregó HCl 2 M, durante diferentes

intervalos de tiempo. Posteriormente se centrifugaron las células y se transfirieron a un medio de cultivo nuevo.

Durante todo este procedimiento se midió el crecimiento de los cultivos cada h mediante lecturas espectrofotométricas y cuenta viable en placa. Para esto se tomaron alícuotas y se realizaron diluciones decimales, las cuales se inocularon en cajas de petrí y posteriormente se agregó agar ICC. Una vez que solidificaron las placas fueron incubadas a 37°C por 24 a 48 h.

ENSAYOS DE TOLERANCIA.

Se activó la cepa C 7677 de la manera ya descrita, y se incubó a 37°C. Al alcanzar una (A_{600} 0.3-0.5) los cultivos se sometieron a pre-choque ácido (pH 5.5) y, posteriormente las células se centrifugaron a 5000 r.p.m. por 5 min. Después se transfirió el paquete celular en un medio de cultivo nuevo y se sometió a un choque ácido letal, agregando HCl 2M, hasta alcanzar un pH de 4.5.

Se determinó la viabilidad a este pH a diferentes intervalos tomando alícuotas y sembrándolas en cajas de petrí como se especificó en el punto anterior.

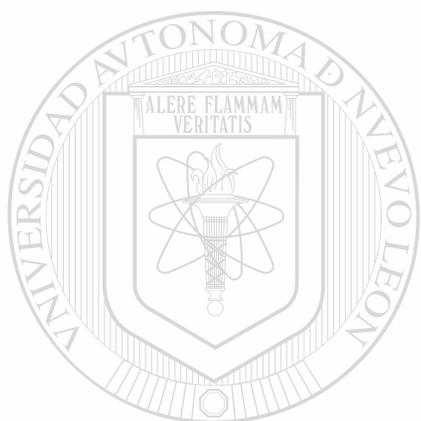
DURACION DE LA TOLERANCIA ACIDA ADQUIRIDA

Las cepas se activaron y fueron cultivadas de la manera anteriormente descrita. Cuando llegaron a la parte media de la fase log se sometieron al choque ácido previamente especificado. Una vez terminado éste, los cultivos fueron centrifugados a 5000 r.p.m. por 5 min, y el paquete celular se transfirió a medio nuevo, y se incubaron

a 37°C. Después de 30, 60 y 90 min se sometieron a ensayos de tolerancia a un pH de 4.5 tal como están especificados en el punto anterior.

Se determinó el tiempo requerido para que la población celular disminuyera un logaritmo (valor D). Cada experimento se realizó por duplicado con dos repeticiones.

Los resultados se sometieron a un análisis de comparación de pendientes a fin de determinar si existían diferencias significativas entre tratamientos y controles.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

RESULTADOS

Efecto de un choque ácido sobre el crecimiento de *V. cholerae*

Se probaron diferentes condiciones de choque ácido a fin de establecer aquel pH capaz de provocar un daño subletal en la célula, de tal manera que permitiera una recuperación posterior. Cuando el choque ácido se aplicó a pH de 3.0, 3.5 y 4.0 se afectaron las células al grado de no permitir una recuperación posterior (Fig. 1,2 y 3), lo que nos indicó que el choque ácido aplicado resultó ser demasiado severo.

Cuando probamos el choque ácido de pH de 4 y 4.5 se pudo observar que después del choque los cultivos no mostraron disminución de absorbancia, sino incluso aumentaba su turbidez (Fig 4 y 5). Sin embargo cuando realizamos la curva de crecimiento mediante una cuenta viable en placa se observó una marcada disminución en la viabilidad de las células (Fig. 6).

Cuando se probó un choque ácido a pH de 5.0 y 5.5 por 20 min se observó que se producía una pequeña disminución del crecimiento después de aplicado el choque ácido, sin embargo, tiempo después las células mostraron un aumento en su número, llegando alcanzar números semejantes a los del control (Fig. 7). Por lo anterior, encontramos que un choque ácido a pH se 5.5 por 20 min la condición adecuada a la cual las células fueron capaz de recuperarse.

Ensayos de tolerancia producido por un choque ácido.

En relación con los ensayos de adquisición de tolerancia ácida como resultado de un choque ácido previo a pH de 5.5 por 20 min se pudo observar en las gráficas de muerte a pH de 4.5 la sobrevivencia de las células tratadas. A partir de estas curvas de muerte, se determinaron los valores de letalidad ($D_{4.5}$). Observamos que dicho valor fue 13.2 min para las células tratadas con prechoque y de 6.1 min para las control. Por lo se pudo observar que las células de *V. cholerae* que recibieron un prechoque ácido resultaron ser 2 veces mas resistente que el control (Fig. 8).

Los valores obtenidos fueron sometidos a un análisis estadístico de t pareada para pequeñas muestras y obtuvimos una diferencia significativa entre tratamientos y controles.

Duración de la tolerancia al ácido.

En relación con los ensayos de duración de tolerancia ácida se pudo observar que cuando las células se centrifugaron y se cambiaron a medio de cultivo nuevo pH de 7.0 resultaron ser 6 veces más tolerantes que el control (Fig. 9). Sin embargo cuando mantuvieron durante 30 y 60 min después del prechoque ácido y antes de aplicar el choque de pH 4.5, estas presentaron una mayor sobrevivencia que los del control. Observando células dos veces más resistentes que el control (Fig. 10 y 11). Sin embargo, cuando los ensayos se realizaron a los 90 min después del prechoque ácido no se detecto diferencia entre las células tratadas y el control. Tabla 1.

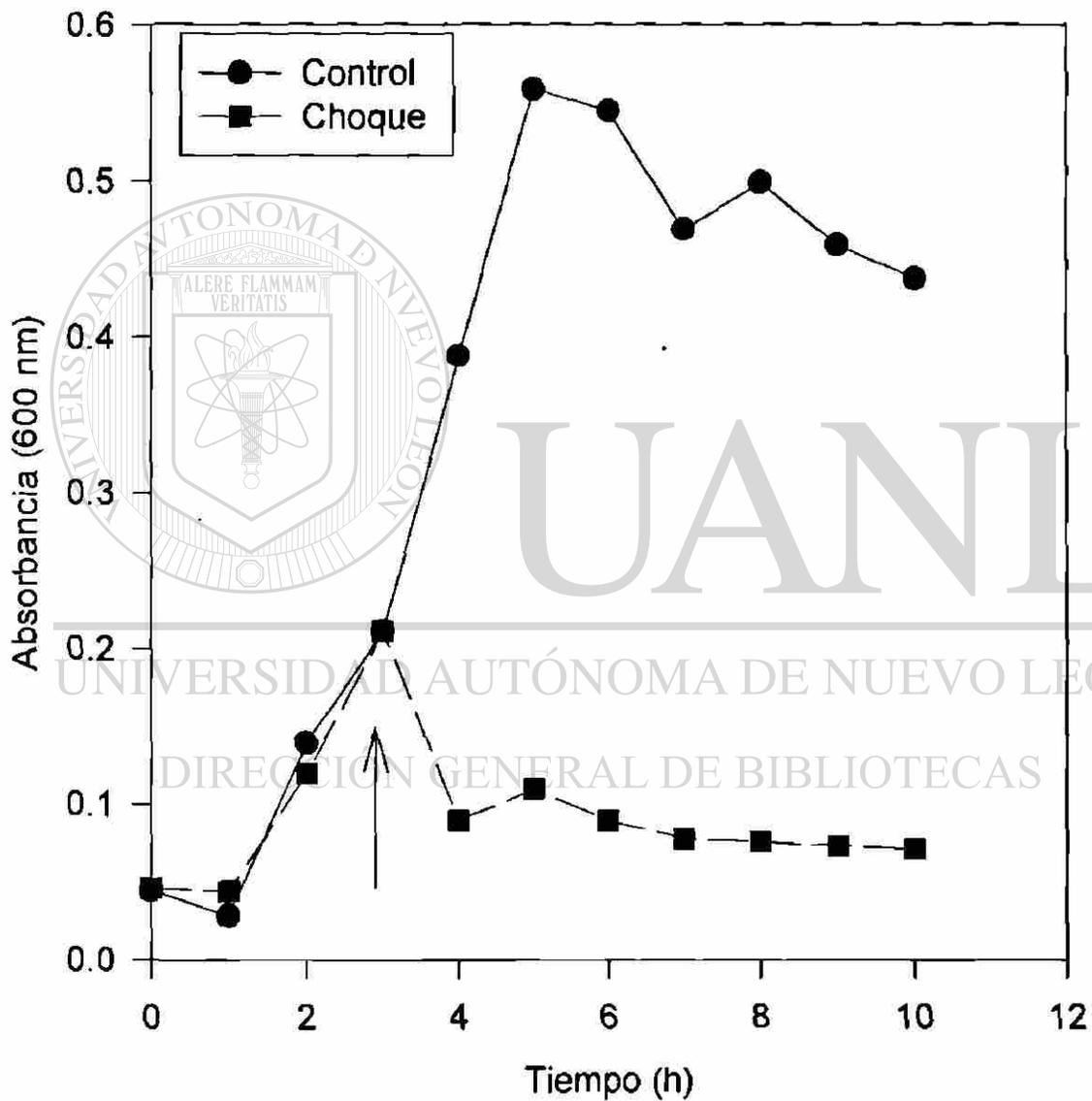


Fig. 1. Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a un choque ácido de pH 3.0 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque.

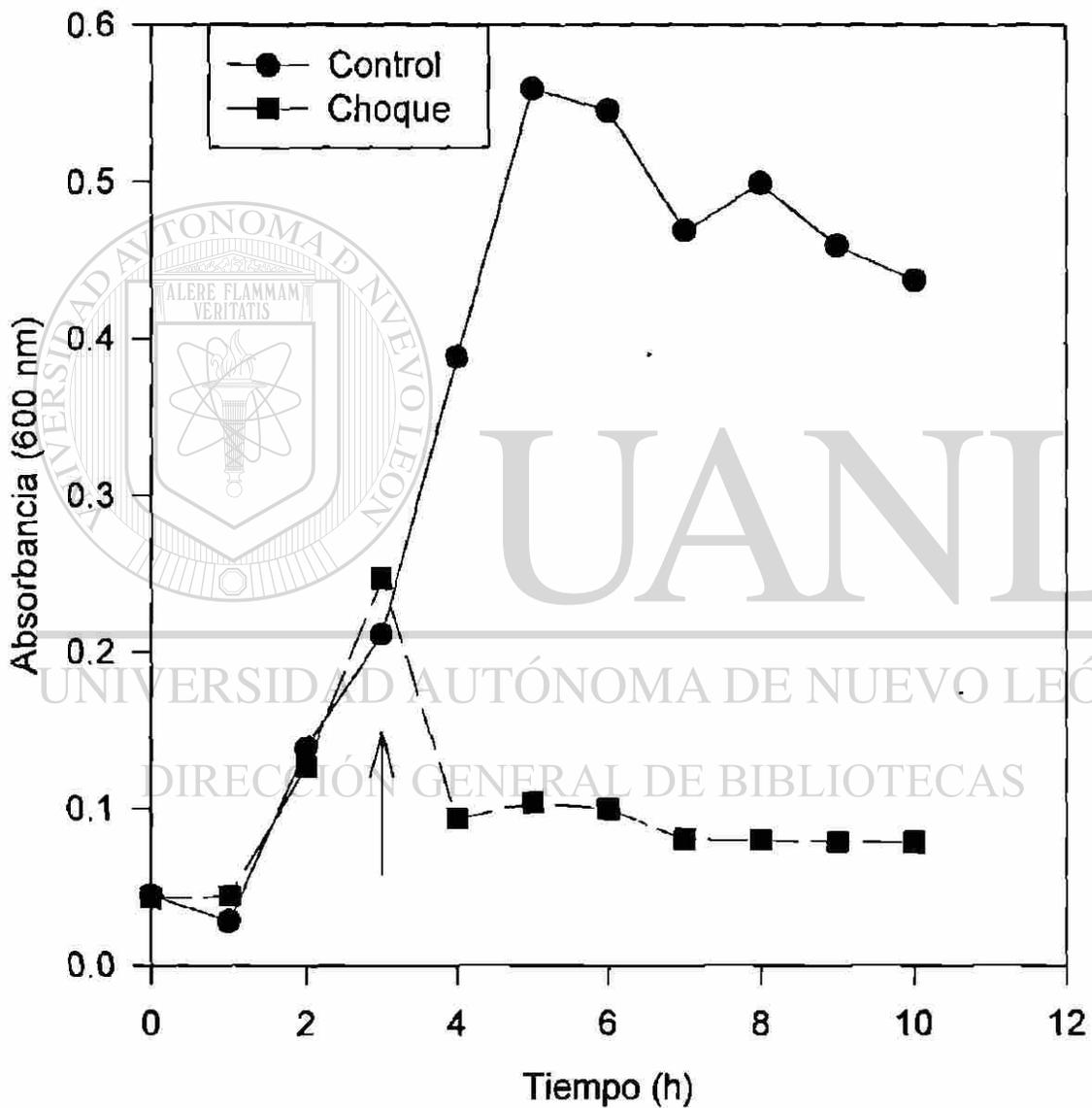


Fig. 2. Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a choque ácido a pH de 3.5 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido.

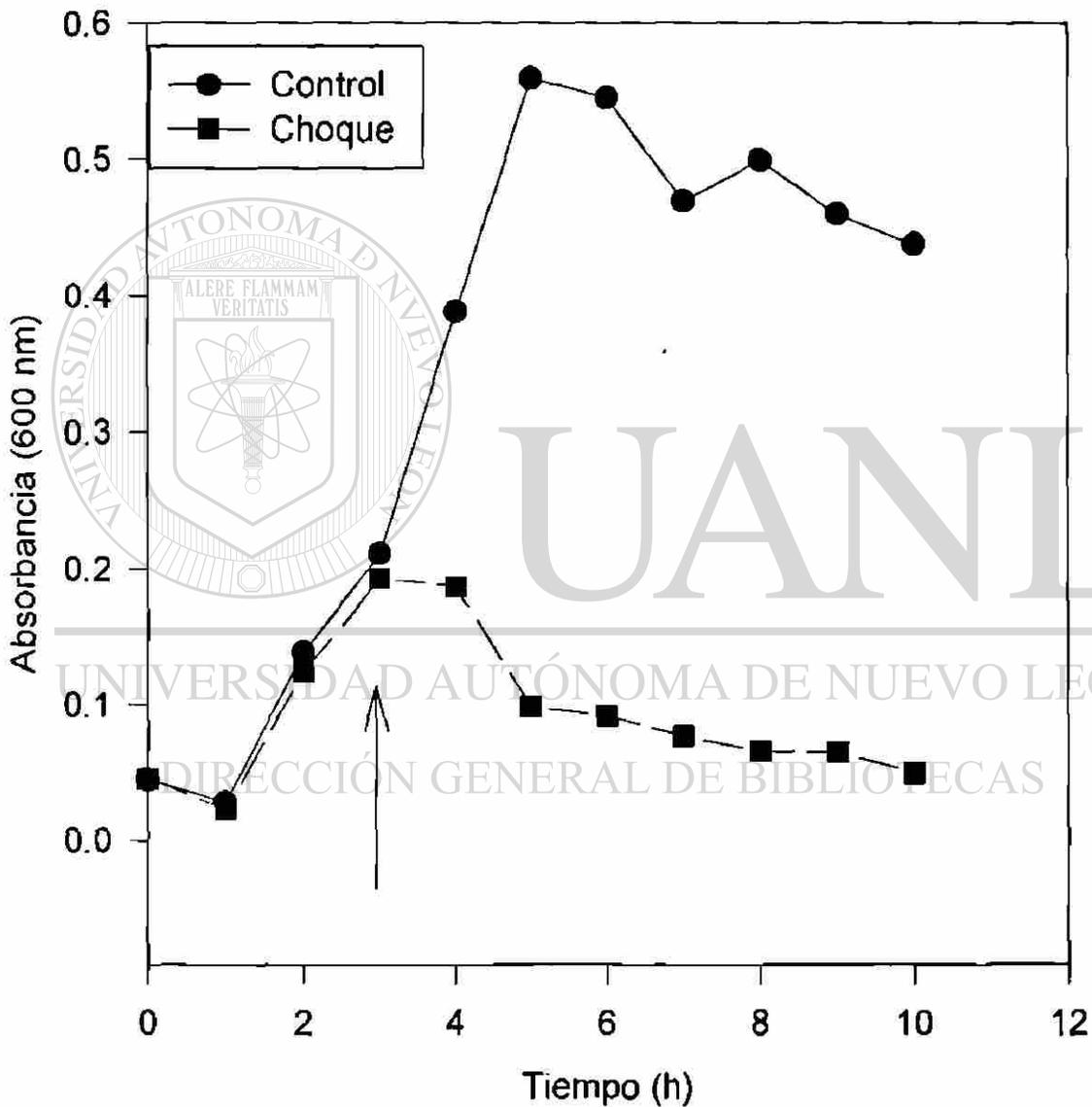


Fig. 3. Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a choque ácido a pH de 4.0 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido.

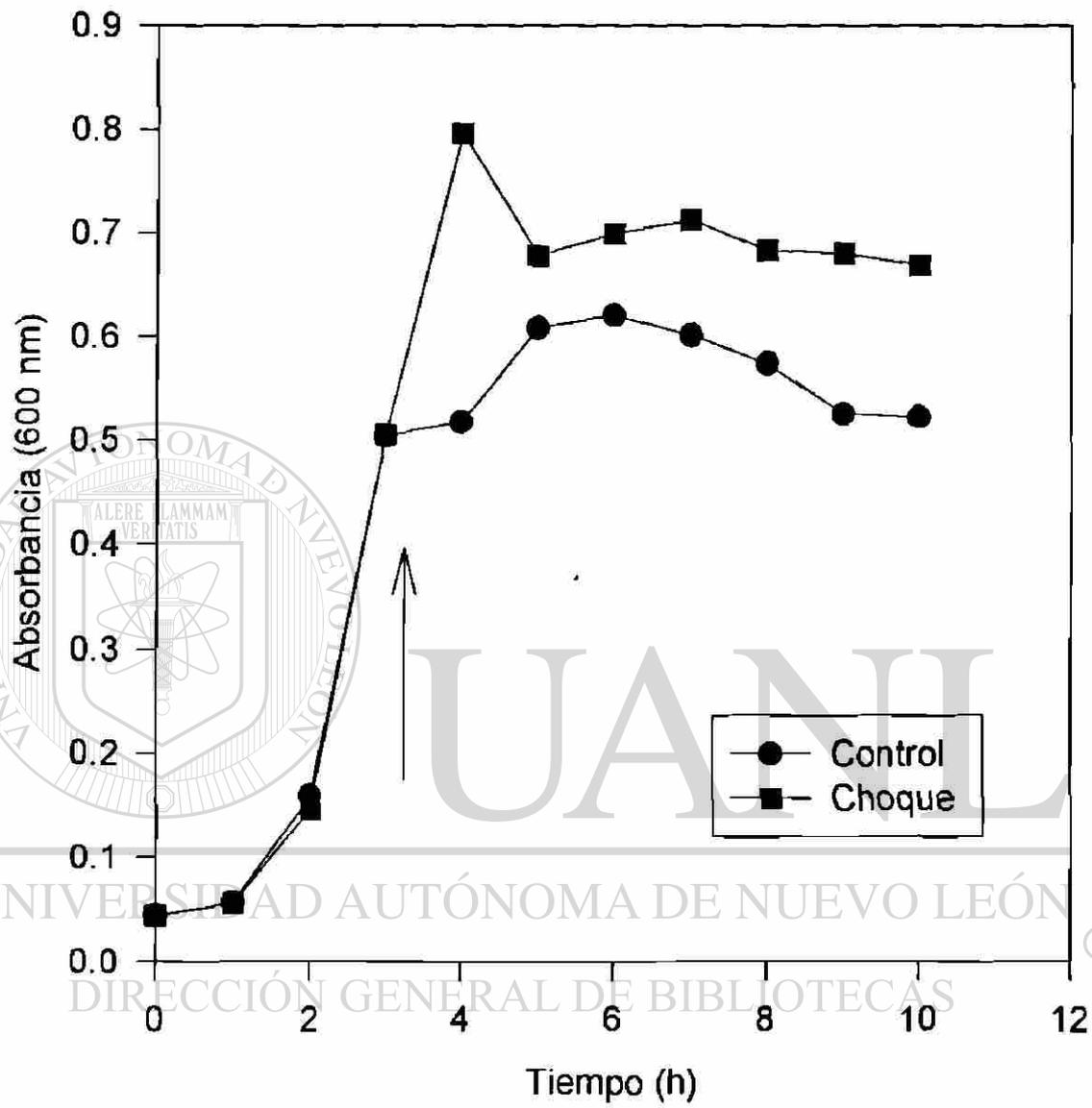


Fig. 4. Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a pH de 4.0 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido.

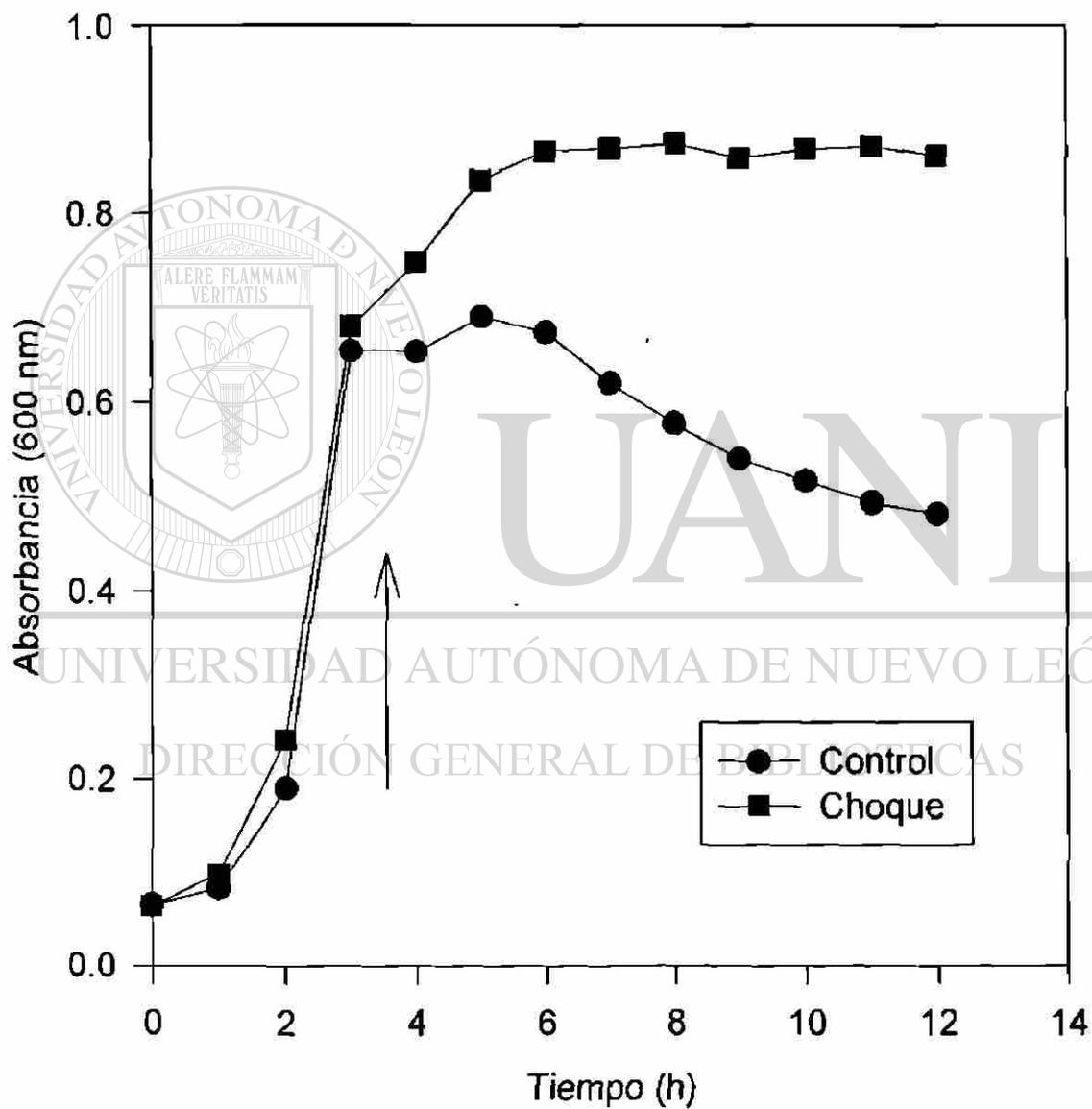


Fig. 5. Curva de crecimiento de *V. cholerae* C7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a pH de 4.5 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido.

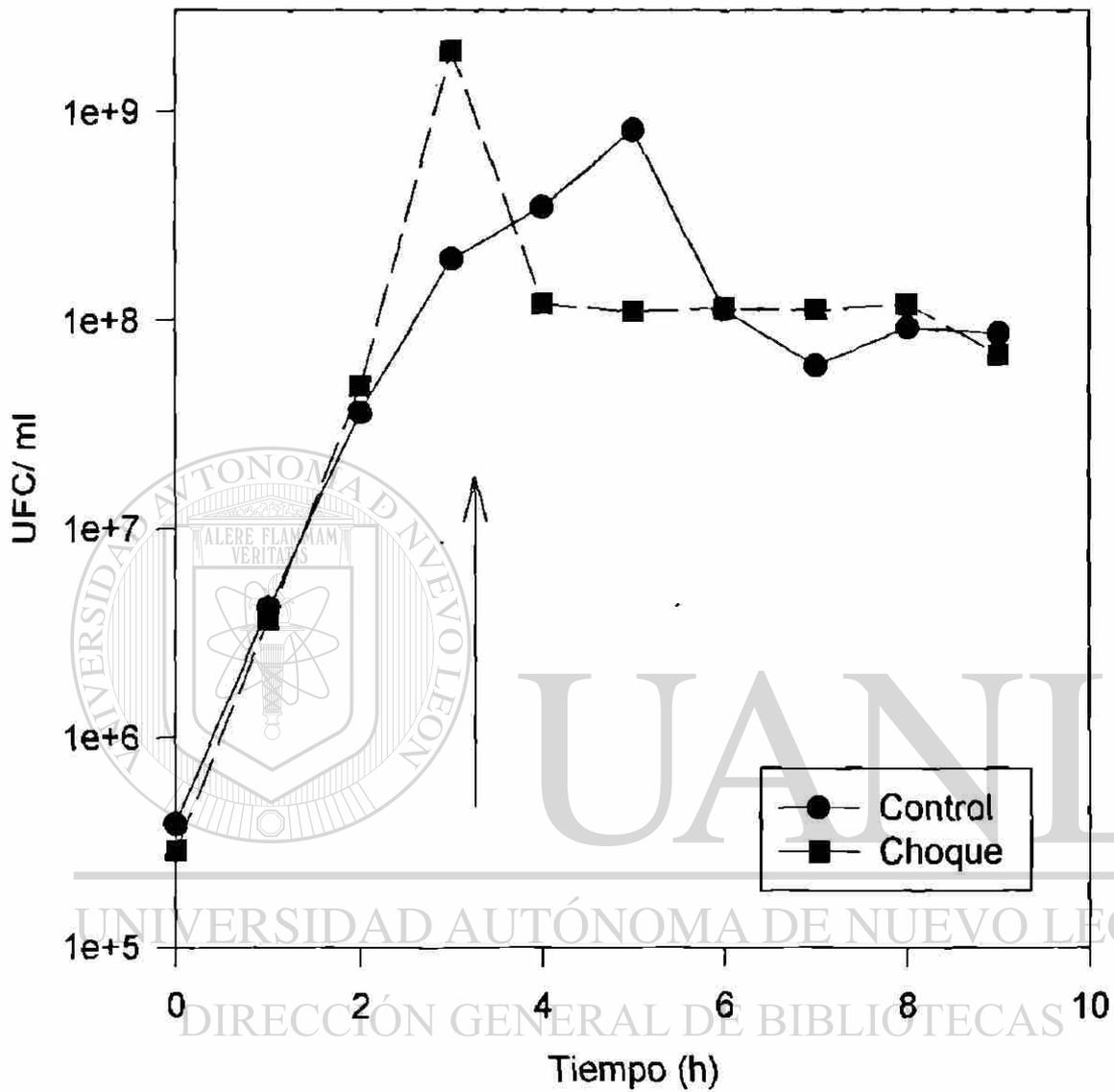


Fig. 6. Curva de crecimiento de *V. cholerae* C 7677 cultivada en ICC a 37°C y sometida a un choque ácido de pH 4.5 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque.

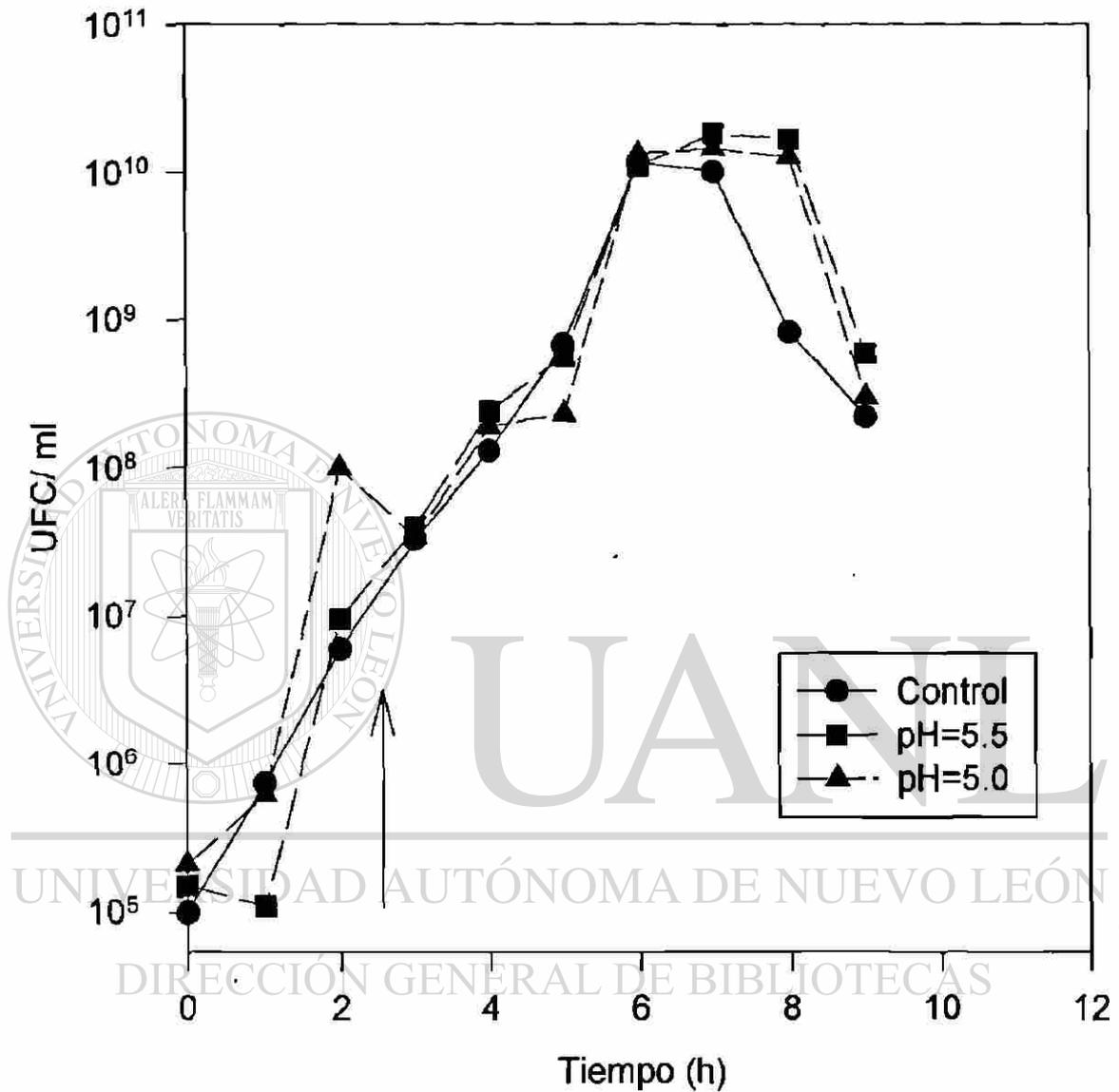


Fig. 7. Curva de crecimiento de *V. cholerae* 7677 cultivada en medio ICC a 37°C y sometida a un choque ácido de pH 5.5 y 5.0 durante 20 min. La flecha indica el momento de aplicación del choque ácido.

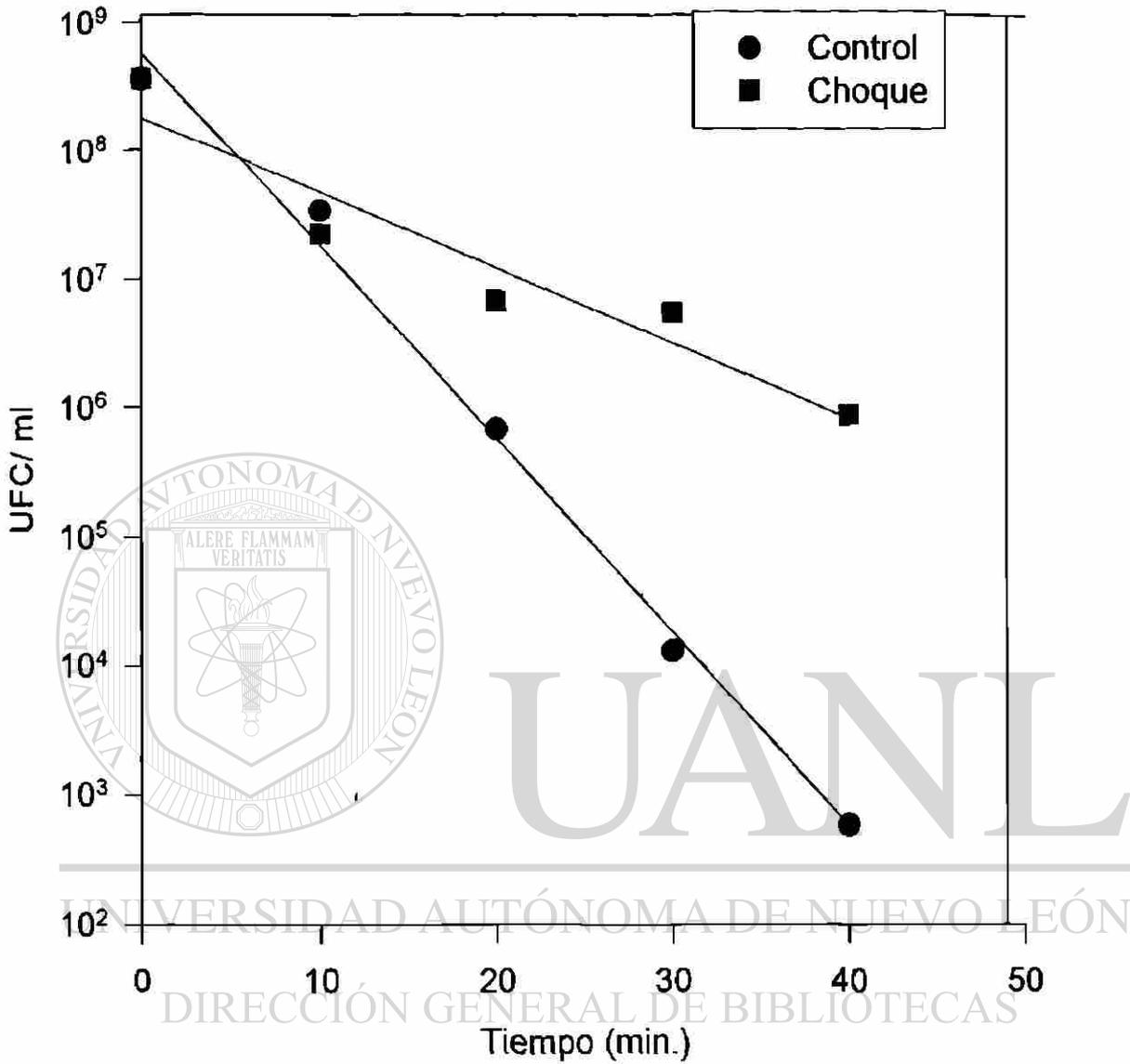


Fig. 8. Curva de muerte de *V. cholerae* C 7677 a pH de 4.5 después de que fué sometida a un prechoque ácido de pH 5.5 por 20 min. El ensayo de tolerancia ácida se realizó inmediatamente después del prechoque ácido.

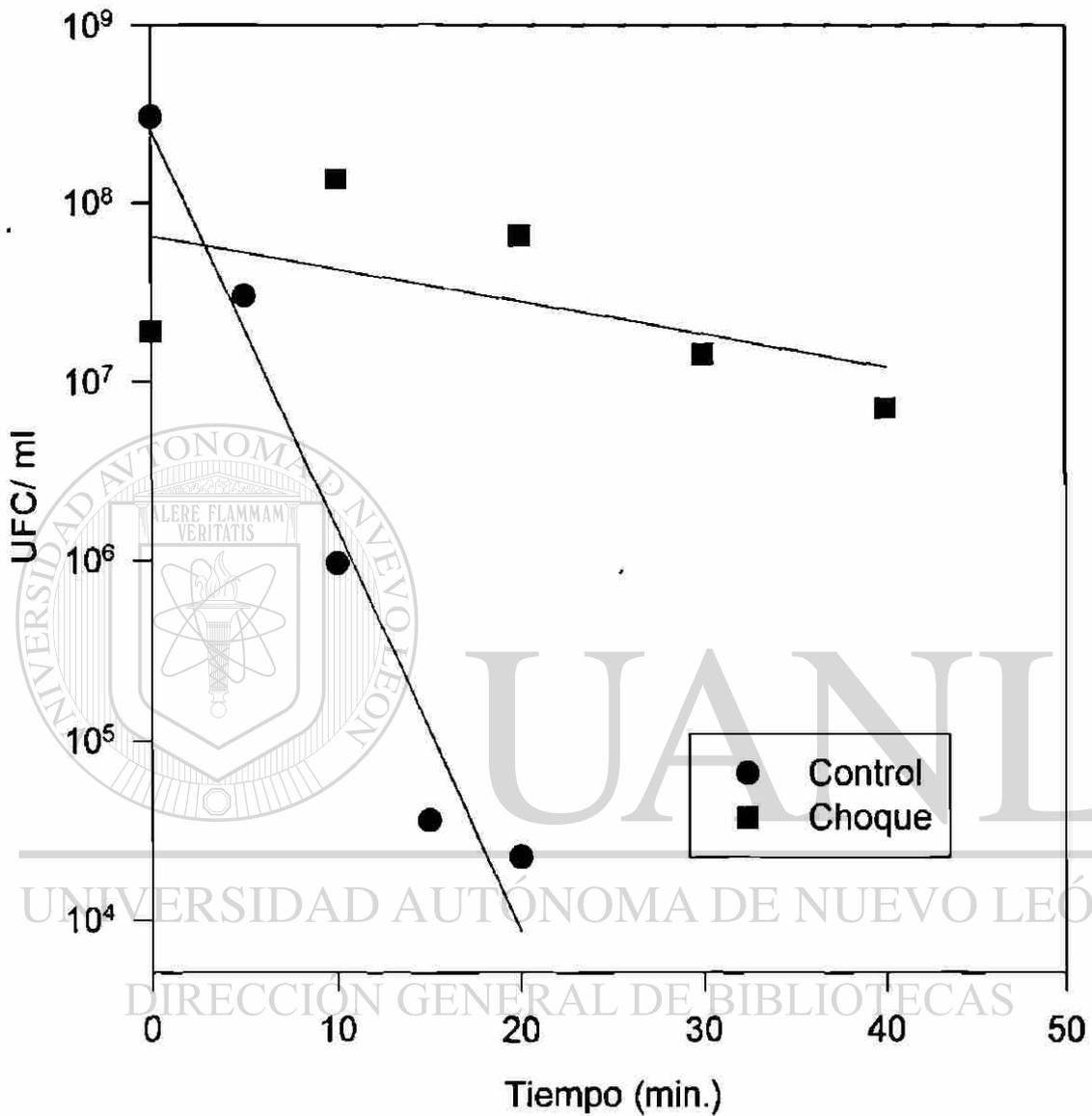


Fig. 9. Curva de muerte de *V. cholerae* C 7677 a pH de 4.5 después de que fueron sometidas a un choque ácido de pH 5.5 por 20 min. Los ensayos de tolerancia se realizaron inmediatamente después del prechoque.

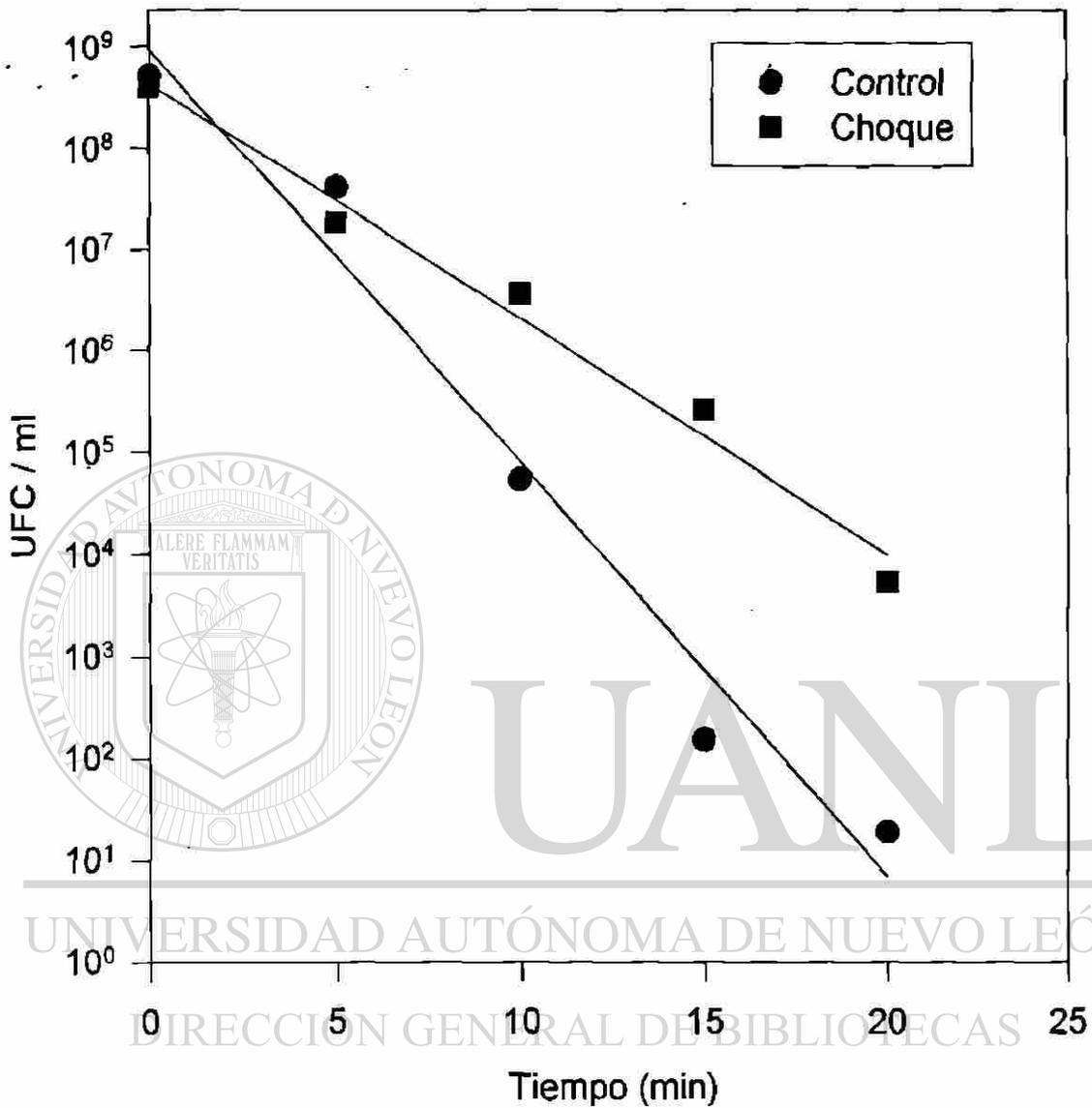


Fig. 10. Curva de muerte de *V. cholerae* C 7677 a pH de 4.5 cultivada a 37°C y sometida a un prechoque ácido de pH 5.5 por 20 min. Los ensayos de tolerancia se realizaron 30 min después del prechoque.

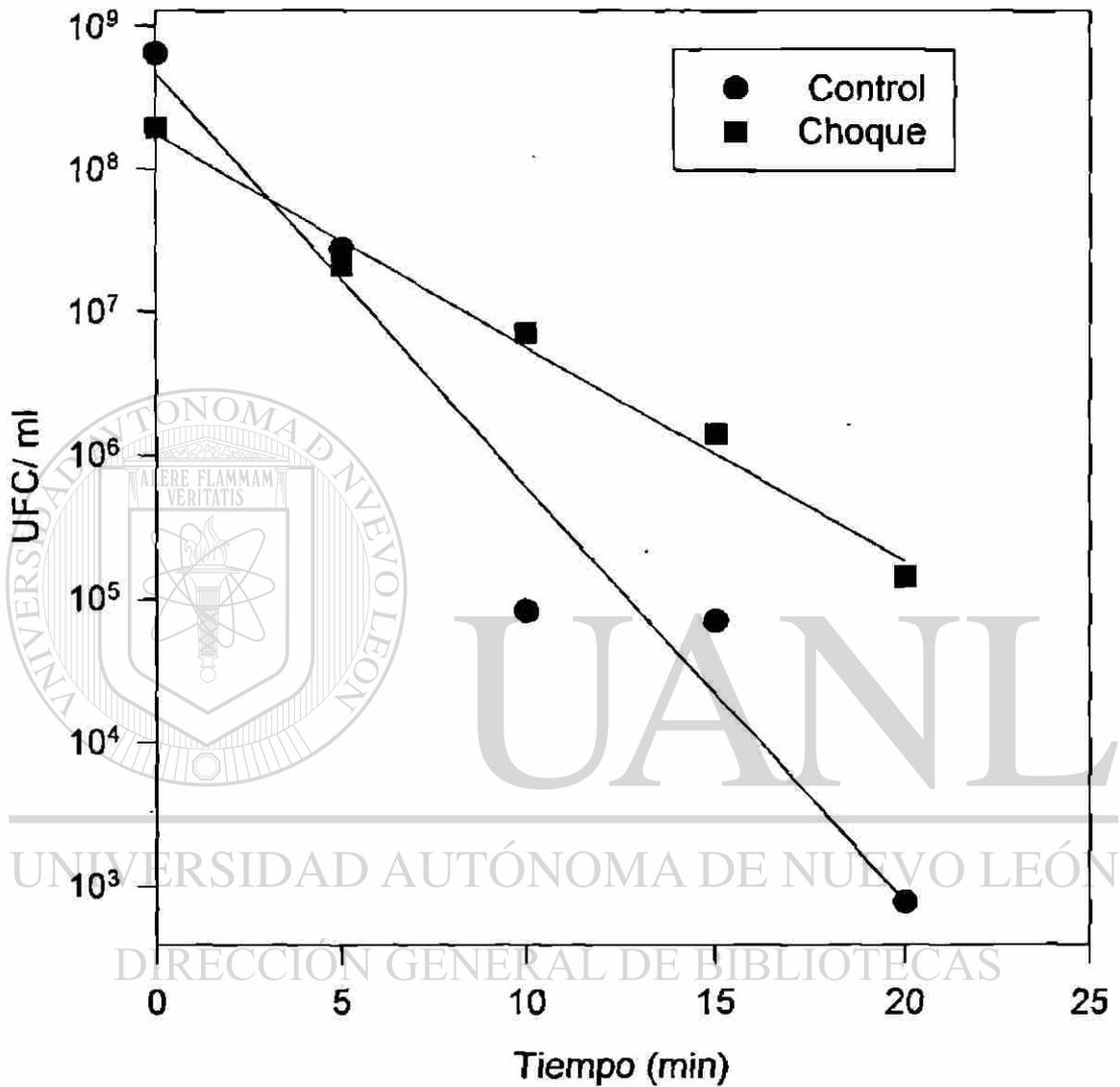


Fig. 11. Curva de muerte de *V. cholerae* C 7677 a pH de 4.5 cultivada a 37°
 Los ensayos de tolerancia se realizaron 1 h después del prechoque
 a pH de 5.5 por 20 min.

Tabla 1. Valores de letalidad a pH 4.5 ($D_{4.5}$) de células de *V. cholerae* C 7677 incubadas a 37°C y sometidas previamente a un choque ácido subletal de pH 5.5 por 20 min. Los ensayos de tolerancia se realizaron a diferentes tiempos después del prechoque ácido.

Tiempo de choque	$D_{4.5}$ (min)				
	Células control	Células choque	D Stand. control	D. Stand choque	Diferencia estadística (P< 0.05)
0 min *	6.08	13.21	+/- 1.28	+/- 5.76	Significativa
0 min **	5.73	34.41	+/- 0.205	+/- 11.23	Significativa
30 min	2.22	4.19	+/- 0.08	+/- 0.99	Significativa
6- min	3.03	6.67	+/-1.50	+/- 1.92	Significativa

* Tiempo (0). Los ensayos de tolerancia se realizaron inmediatamente después del prechoque a pH de 5.5 por 20 min.

** Tiempo (0). Los ensayos de tolerancia se realizaron una vez que se aplicó el prechoque ácido a pH de 5.5 por 20 min y después las células fueron transferidas a un medio de cultivo nuevo.

DISCUSION

Algunos microorganismos entéricos como *Salmonella typhimurium*, *S flexneri* y *E. coli* prefieren crecer en ambientes de pH neutros. Sin embargo, ellos pueden enfrentarse a cambios bruscos de pH en la naturaleza y durante la patogénesis (Bearson, S., 1996). Se ha demostrado que la exposición previa a condiciones ácidas estimula la síntesis de un grupo de proteínas conservadas evolutivamente conocidas como proteínas de choque ácido (PCHA). Estas proteínas presumiblemente actúan para prevenir o reparar macromoléculas dañadas por este estrés (Foster, J.W. 1996). Esta respuesta ha sido estudiada y se ha encontrado en una gran cantidad de organismos tales como *S. typhimurium* (Lee, S., et al, 1993; Foster, et al, 1992), *Lactococcus lactis*. (Hartke, A., et al., 1996), *Listeria monocytogenes* (Davis, et al., 1996), *E. coli* (Heyde, M. y R. Portair. 1996) y *Salmonella enteritidis* PT4 (Humphrey, J. T., et al, 1993) entre otros.

En este trabajo demostramos que la exposición a un choque de pH 5.5 provocó un daño subletal a las células de *V. cholerae* C 7677, ya que permitió su recuperación posterior. Aunque un choque de 5.0 provocó un efecto relativamente similar, establecimos que un choque de 5.5 era más indicado para nuestros experimentos porque la población disminuía menos de una unidad logarítmica, y para después aplicar un HP letal de 4.5.

Por otro lado, se observó que *V. cholerae* fue capaz de adquirir tolerancia a un pH ácido de 4.5 cuando se sometió a un choque subletal de pH 5.5 por 20 min. Estos resultados concuerdan con trabajos reportados en *Brucella suis* (Kulakov, et al., 1997),

S. typhimurium (Park, K. Y., et al., 1996), *E. coli* (O'Hara, W.G. y A. R. Glenn. 1994), y *A. hydrophila* (Karem, K. et al, 1994).

Nuestros resultados indicaron que *V. cholerae* presentó adquisición de ácido tolerancia. Esto es de gran importancia debido a que es una bacteria que se encuentra en los alimentos, tales como el pescado y los mariscos, y en algunas ocasiones estos alimentos son tratados o preparados con algunos ácidos. Esto pudiera ayudar a la bacteria a adaptarse a esta condición y sobrevivir a un pH mas bajo tal como el del estomago. Por lo que debemos de tomar en cuenta esta capacidad de la bacteria y así tomar las medidas pertinentes para su eliminación definitiva.

Además encontramos que dicha tolerancia adquirida se prolongó hasta 1 h después de aplicado el choque subletal, lo cual resultó ser similar a lo encontrado en *L. monocytogenes* (Davis, J. M., et al, 1996).

En general esta tolerancia al pH ácido resulta de gran importancia, ya que frecuentemente los ácidos se utilizan como conservadores de alimentos. Si consideramos que en ocasiones los alimentos son ligeramente ácidos, esto pudiera inducir la adquisición de tolerancia a pH mas ácidos normalmente letales, permitiendo la sobrevivencia y posterior proliferación del patógeno. En base a nuestros resultados aceptamos la hipótesis propuesta en nuestra investigación.

CONCLUSIONES

- 1.- Un choque ácido a pH de 5.5 aplicado a células de *V. cholerae* provocó un daño subletal, permitiendo su recuperación posterior.
- 2.- *V. cholerae* C 7677 adquirió tolerancia a pH de 4.5, como consecuencia de un choque ácido previo a pH 5.5 por 20 min.
- 3.- La adquisición de tolerancia al ácido en *V. cholerae* como resultado del prechoque ácido previo se prolongó hasta 1 h después de aplicar el prechoque ácido.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA

- 1.- Ahamad, N., and E. H. Marth. 1990. Acid-Injury of *Listeria monocytogenes*. *J. Food Prot.* **53**: 26-29.
- 2.- Ahern, H. 1991. Cellular responses to oxidative stress. *Features.* **57**: 627-630.
- 3.- Araki, T. 1990. Changes in rates synthesis of individual proteins in a psychrophilic bacterium after a shift in temperature. *J. Microbiol.* **37**: 840-847.
- 4.- Baik, S. H., S. Bearson, S. Dunbar, and W. J. Foster. 1996. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* provides protection against organic acids. *Microbiol.* **142**: 3195-3200.
- 5.- Bearson, S., B. Bearson, and W. J. Foster. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**: 173-180.
- 6.- Bej, K. A. Ng, Y. W. Morgan, S. D. Jones, and M. H. Mahbubani. 1996. Detection of *Vibrio cholerae* by reverse- transcriptase polymerase chain reaction (RT-PCR). *Mol. Biotech.* **5**: 1-10.
- 7.- Brock, T. D. 1987. *Biología de microorganismos*. Ed. Prentice-Hall. Hispanoamericano S. A. México. Sexta edición 624-633. México.
- 8.- Cabral, D. L., E. G. Sosinsky, R. A. Reed, R. M. McDetmott, and G. G. Shipley, 1994. Orientation of cholera toxin bound to model membranes. *Biophys. J.* **66**: 935-941.

- 9.- Couto, J. A., C. Pina, and T. Hogg. 1997. Enhancement of apparent resistance to ethanol in *Lactobacillus hilgardii*. 1997. *Biotechnol. Lett.* **19**: 487-490.
- 10.- Davis, J. M., J. P. Coote, and C. P. O' Byrne. 1996. Acid tolerance on *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiol.* **142**: 2975- 2980.
- 11.- Dalsgaard, A., T. Bjergskov, F. V. Jeppesen, B. L. Jorgensen, P. Echeverria., and Y. Dalsgaard. 1996. Prevalence and characterization of *Vibrio cholerae* isolated from shrimp products imported into Denmark. *J. Food. Protect.* **59**: 694-697.
- 12.- Díaz, O. C. 1993. Dos pestilencias en México decimonónico: fiebre amarilla y *cholerae morbus*. Instituto de Investigaciones Estéticas UNAM. *Ciencia y Desarrollo.* **113**: 68-71.
- 13.- Farr, S. B. and T. Kogama. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Microbiol. Rev.* **55**: 561- 585.
-
- 14.- Flahaut, S., A. Hartke, Ch. J. Giard, A. Benachour, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1996. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS. Microbiol. Lett.* **138**: 49-54.
- 15.- Flahaut, S., A. Benachour, C. J. Giard, P. Boutibonnes, and Y. Auffray. 1996. Defense against lethal treatments and de novo protein synthesis induced by NaCl en *Enterococcus faecalis* ATCC 19433. *Arch. Microbiol.* **165**: 317-324.
- 16.- Foster, W. J. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response, *J. Bacteriol.* **173**: 6896-6902.

- 17.- Foster, W. J., and H. K. Hall. 1992. Effect of *Salmonella typhimurium* ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron and pH regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* **174**: 4317-4323.
- 18.- Foster, W. J. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella typhimurium* involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* **175**: 1981-1987.
- 19.- Foster, W. J. and P. M. Spector. 1995. How *Salmonella* survive against the odds. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 145-174.
- 20.- Foster W. J. 1995. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**: (4) 215- 237.
- 21.- Gautan, K. S., R. Chowdhury, and J. Das. 1994. Heat shock response and heat shock protein antigens of *Vibrio cholerae*. *Infec. Immun.* **62**: 5624-5631.
- 22.- Goldstein, J., S. N. Pollitt, and M. Inouye. 1990. Major cold shock protein of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 283-287.
- 23.- Gonzalez, S. N., and S. P. Saltigeral. 1992. Cólera conceptos actuales. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. 29-33. México.
- 24.- Guilfoyle, D. E. and I. N. Hirshfield. 1996. The survival benefit of short-chain organic acids and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* **22**: 393-396.
- 25.- Hartke, A., S. Bouché, Ch. J. Giard, A. Benachour, and P. Boutibonnes. 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* **33**: 194-199.

- 26.- Heyde, M. and R. Portair. 1990. Acid shock proteins of *Escherichia coli*. FEMS. Microbiol. Lett. **69**: 19-26.
- 27.- Holmquist, L., A. Jouper-Jaan, D. Weichart, R. Nelson, and S. Kjelleberg, 1993. The induction of stress proteins in three marine *Vibrio* during carbon starvation. FEMS Microbiol. Ecol. **12**: 185- 194.
- 28.- Humphrey, J. T., P. N. Richardson, L. H. A. Gawler, and J. M. Allen. 1991. Heat resistance of *Salmonella enteritidis* PT4: the influence of prior exposure to alkaline conditions. Lett. Appl. Microbiol. 1991. **12**: 258-260.
- 29.- Humphrey, J. T., P. N. Richardson, M. K. Statton, and R. J. Rowbury. 1993. Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in *Salmonella enteritidis* phage type 4. Appl. Environ. Microbiol. **59**: 3120-3122.
- 30.- Jed Gorden, and P. I. C. Small. 1993, Acid resistance in enteric bacteria. Infection and Immunity. Jan. 364-367.
-
- 31.- Jones, P. G., V. Bogelen, and C. F. Neidhardt. 1987. Induction of proteins in response to low temperature in *Escherichia coli*. J. Bacteriol. **169**: 2092-2095.
- 32.- Jyot, J. and A. Ghosh. 1995. Induction of heat shock response in *Vibrio cholerae*. Microbiol. **141**: 2101-1209.
- 33.- Karem, K. L., W. J. Foster, and A. K. Bej. 1994, Adaptive acid tolerance response (ATR) in *Aeromonas hydrophila*, Microbiol. **140**: 1731-1736.
- 34.- Kaper, B. J., J. G. Morris, and M. M. Levine. 1995. Cholera. J. Clin. Microbiol. Rev **8**: 48-86.

35.- Koch, W. H., W. L. Payne, B. A. Wentz, and T. A. Cebula. 1993. Rapid polymerase chain reaction method for detection of *Vibrio cholerae* in foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 556-560.

36.- Koga, T., Nakajyo, and A. Komoto. 1996. Detection of Hsp60 (GroEl)- like proteins in *Vibrio parahaemolyticus* and *Vibrio* species by western immunoblotting analysis. *Lett. J. Appl. Microbiol.* **23** 295-298.

37.- Koo, D., H. Traverso, M. Libel, C. Drasbek, R. Tauxe, and B. D. Bennett. 1997. El cólera epidémico en América Latina de 1991 a 1993: implicaciones de las definiciones de casos usadas en la vigilancia sanitaria. *Rev. Panam Salud publica/ Pan Am J. Public Health* **1** (2). 85-92.

38.- Kulakov, Y. K., G. Talet, M. R. Ramuz, and, D. O' Callaghan. 1997. Response of *Brucella suis* 1330 and *B. canis* RM6/66 to growth at acid pH and induction of an adaptive acid tolerance response. *Res. Microbiol.* **148**: 145-151.

39.- Lanne, B., B. Shierbeck, and K. A. Karlsson. 1994. On the role of the carboxyl group of sialic acid in binding of cholera toxin to the receptor glycosphingolipid, GM1.J. *Biochem.* **116**: 1269-1274.

40.- Leyer, G. J. and E. A. Johnson. 1993. Acid adaptation induces cross protection against environmental stresses in *Salmonella typhimurium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1842.

41.- Lee, S. I., L. J. Slonczewski., and J. W. Foster. 1994. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **176**: (5), 1422-1426.

42.- Ludwig. S. D., R. K. Holmes., and G. K. Schoolnik. 1985. Chemical and immunochemical studies on the receptor binding domain of Cholera toxin B subunit. *J. Biol. Chem.* **260**: 12528-12534.

43.- Makukutu, A. C. and R. A. Guthrie. 1986. Behavior of *Vibrio cholerae* in hot foods. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 824-831.

44.- Miller, J. F. J. Mekalanos, and J. Falkow. 1989. Coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science.* **243**: 919-922.

45.- Morimoto, R. I., A. Tissieres, and C. Georgopoulos. 1990. The stress response function of the proteins, and perspectives. IN Morimoto, R. I., A. Tissieres., C. Georgopoulos. (Ed) *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. New York, USA, pp 1-36.

46.- Nair, G. B., M. J. Albert, T. Shimada., and Y. Takeda. 1996. *Vibrio cholerae* 0139: the new serogroup causing cholera. *Rev. Med. Microbiol.* **7** (1), 43-51.

47.- Nystrom, T., M.R. Olsson, and S. Kjelleberg. 1992. Survival, stress resistance, and alterarions in protein expression in the marine *vibrio* sp. Strain S14 during starvation for different individual nutrients. *Appl Environ. Micribiol.* **58**: (1). 55-65.

48.- O' Hara, W. G. and R. A. Glenn. 1994. The adaptive acid tolerance response in root nodule bacteria and *Escherichia coli*. *Arch. Microbiol.* **161**: 286-292.

49.- Okereke, A. and S. T. Sterling. 1996. Induced acid -tolerance response confers limited nisin resistance on *Listeria monocytogenes* Scott A. *J. Food Protect.* **59**: 1003-1006.

50.- O'Brien, M. L., S. V Gordon, I. S. Roberts, and P. W. Andrew. 1996. Response of *Mycobacterium smegmatis* to acid stress. *FEMS Microbiol. Lett.* **139**: 11-17

51.- Park, K. Y., B. Bearson, H. S. Bang, S. L. Bang, and W. J. Foster. 1996. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Mol. Microbiol.* **20**: 605-611.

52.- Rubio, C. M., and C. L. Tzuc. 1995. 24 horas para morir: epidemia del Cólera morbo en Yucatán en 1833. *Rev. Biomed.* **6**: 102-107.

53.- Schlesinger, M. J. 1988. Function of heat shock proteins. *Atlas Sci. Biochem.* **231**: 161-163.

54.- Tapia, C. R., M. T. Velázquez, M. C. Ruiz, C. R. Montesano, and E. S. Guitiérrez. 1992. Manual para la vigilancia epidemiológica del cólera en México. *Epidemiología. S.S.A.* **1**: 1-60.

55.- Völker, U., H. Mach, R. Schmid, and M. Hecker. 1992. Stress proteins and cross-protection by heat shock and salt stress in *Bacillus subtilis*. *J. Gen. Microbiol.* **138**: 2125-2135.

56.- Visick, E. J. and S. Clarke. 1995. Repair, refold, recycle: how bacteria can deal with spontaneous and environmental damage to proteins. *Mol. Microbiol.* **16**: 835-845.

57.- Waterman, S. R. and P. L. C. Small. 1996. Identification of σ -dependent genes associated with the stationary-phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. *Mol. Microbiol.* **21**: 925-940.

58.- Wilmes, R. M., B. Bearson, and J. W. Foster. 1996. Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infect. Immun.* **64**: 1085-1092.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN®
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS