792

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA AL CHOQUE TERMICO DE *Clostridium perfringens* TIPO A

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
POR:

NORMA LAURA HEREDIA ROJAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO MARZO DE 1996

792

TD
RC116
.C5
H4
c.1

1080073266

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA AL CHOQUE TERMICO DE *Clostridium perfringens* TIPO A

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA
POR:

NORMA LAURA HEREDIA ROJAS

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N.L. MEXICO MARZO DE 1996

TD
RC116
.C5
H4

FO O
TESIS
(73266)

FONDO

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLOGICAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

CARACTERIZACION DE LA RESPUESTA AL CHOQUE TERMICO DE *Clostridium perfringens* TIPO A.

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

POR

NORMA LAURA HEREDIA ROJAS

APROBADA
COMISION DE TESIS:

DR. RONALD G. LABBE
DIRECTOR EXTERNO

DR. JOSE SANTOS GARCIA A.
DIRECTOR INTERNO

DR. MANUEL A. RODRIGUEZ QUINTANILLA
Secretario

DR. LUIS J. GALAN WONG
Vocal

DRA. MARIA JULIA VERDE STAR
Vocal

DR: MARIO MORALES VALLARTA
Vocal

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología, de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. y en el Laboratorio de Microbiología de los Alimentos del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts en Amherst MA, E.U.A. bajo la dirección del Dr. Ronald G. Labbé y del Dr. José Santos García Alvarado. Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología.

A mi esposo,
quien en todo momento ha sido mi amigo,
mi guía, mi maestro y compañero.
Su ejemplo de fortaleza, disciplina,
dedicación y tenacidad ha sido
la inspiración de mi vida.

A mis hijos
Alam y Aldo
quienes son la razón de mi existencia

A mis padres,
Apoyos morales de mi vida

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por haberme brindado el apoyo económico para la realización de mi programa doctoral.

Al Dr. Ronald G. Labbé por su invaluable asesoría y apoyo constante, pero sobre todo por la confianza y la amistad brindada a lo largo de todo este trabajo. Las estancias en su laboratorio fueron experiencias muy bellas.

Al Dr. José Santos García Alvarado, quien en todo momento me brindó su apoyo y asesoría incondicional. Sus consejos, paciencia y palabras de aliento me dieron la energía necesaria para concluir esta investigación.

Al Dr. Abel Ponce de Leon del Departamento de Ciencias Veterinarias de la Universidad de Massachusetts, E.U.A. quien me dió asesoría y me abrió las puertas de su laboratorio para realizar algunos experimentos de esta investigación.

Al Dr. Carl Batt de la Universidad Cornell en E.U.A. y al Dr. Robert McMacken de la Universidad John Hopkins en E.U.A. quienes gentilmente me proporcionaron sueros anti GroEL y anti DnaK, necesarios para esta investigación.

A la Dra. María Julia Verde Star, al Dr. Luis Galán Wong, al Dr. Mario Morales Vallarta y al Dr. Manuel Rodríguez Quintanilla por sus consejos para este trabajo y por su valioso tiempo empleado en la revisión de este escrito.

A la Dirección de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. por el apoyo brindado en todo momento para la realización de mi programa doctoral.

A todo el personal del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, U.A.N.L. y del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, E.U.A. , por las facilidades otorgadas a lo largo de mi trabajo y quienes siempre tuvieron palabras de ánimo. Gracias a todos por su amistad.

INDICE DE CONTENIDO

Página de título i
Dedicatoria iii
Agradecimientos iv
Indice de contenido vi
Lista de figuras x
Lista de tablas xiv
Lista de abreviaturas xv
Resumen 1
Abstract 3
Introducción 5
Antecedentes 6
Principales enfermedades en el hombre por *C. perfringens* 7
a) gangrena gaseosa 7
b) enfermedades alimentarias 9
La esporulación de *C. perfringens* 11
La esporulación y la producción de enterotoxina 14
Proteínas del choque térmico 15
a) generalidades 15
b) PCHT y esporulación 22
c) PCHT y termotolerancia 23
d) PCHT como antígenos inmunodominantes 27
Hipótesis 31
Objetivos 32
Material y métodos 33
Mantenimiento de las cepas 33
Inóculo 33

Efecto de un choque térmico sobre el crecimiento 33
a) células vegetativas 33
b) células en esporulación 34
Efecto de un choque térmico sobre la formación de esporas 35
- cultivo 35
- determinación de esporas 35
Efecto de un choque térmico sobre la producción de toxinas 35
a) enterotoxina 35
- cultivo 35
- extracto celular 36
- determinación de la enterotoxina 36
b) fosfolipasa C 37
- cultivo 37
- determinación de la exotoxina 38
Efecto de choques térmicos sobre la termotolerancia de células vegetativas y esporas 40
a) producción de esporas 40
b) cultivo de células vegetativas 40
c) medición de la termotolerancia 41
Duración de la termotolerancia adquirida de células vegetativas 42
Efecto de un choque térmico sobre el patron de proteínas 42
a) ensayo de incorporación 42
b) métodos de rompimiento celular 43
c) análisis de las PCHT totales 45
d) determinación de la localización subcelular 45

e) electroforesis en gel de poliacrilamida 46
f) fluorografía 47
g) secado del gel 48
h) autoradiografía 48
Determinación de homólogos de DnaK y GroEL en C. perfringens 49
a) electrotransferencia 49
b) detección enzimática 50
Determinación de PCHT que actúan como antígenos inmunodominantes en un cuadro de gangrena gaseosa..... 50
a) inducción de un cuadro gangrenoso en un modelo animal 50
b) detección de PCHT inmunodominantes 52
Microscopía electrónica de trasmisión 52
Determinación de proteínas 53
Resultados 56
Efecto de un choque térmico sobre el crecimiento 56
a) células vegetativas 56
b) crecimiento en un medio de esporulación 62
Efecto de un choque térmico sobre la formación de esporas 65
Efecto de un choque térmico sobre la producción de toxinas 73
a) enterotoxina 73
b) fosfolipasa C 75
Efecto de un choque térmico sobre la termotolerancia de esporas y células vegetativas 77
a) esporas 78
b) células vegetativas 81

Efecto de un choque térmico sobre el patron de proteínas 85
a) concentración de isótopo 85
b) método de rompimiento celular 86
c) análisis de los perfiles proteínicos 86
d) localización subcelular de las PCHT 88
Determinación de homólogos de DnaK y GroEL en *C. perfringens* 91
a) células vegetativas 91
b) células en medio de esporulación 91
Determinación de PCHT que actúan como antígenos inmunodominantes 93
a) inducción de un cuadro gangrenoso 93
b) determinación de PCHT inmunodominantes 94
Discusión 101
Conclusiones 110
Perspectivas sobre futuras investigaciones en el tema 112
Literatura citada 114

LISTA DE FIGURAS

1.-Curva estándar para la determinación de proteínas por el método de Bradford (A) y BCA (B).....55

2.-Curvas de crecimiento de *C. perfringens* cepa FD-1041 sometido a un choque térmico de 65°C (A) o 60°C (B) por diferentes intervalos de tiempo.....57

3.-Curvas de crecimiento de *C. perfringens* cepa FD-1041 sometido a un choque térmico de 58°C (A) o 56°C (B) durante diferentes intervalos de tiempo.....58

4.-Curvas de crecimiento espectrofotométrica (A) y de células viables (B) de *C. perfringens* FD-1041 cultivado a 43°C y sometido a un choque térmico de 55°C por 30 min.....59

5.-Curvas de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 incubado a 43°C y sometido a un choque térmico de 50° (A) o 52°C (B) por 30 min.....60

6.-Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 cultivado a 37°C y sometido a un choque térmico de 52°C por 30 min.....61

7.-Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 cultivado a 37°C y sometido a un choque térmico de 50°C por 30 min.....62

8.-Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1 cultivado en medio de esporulación DS, incubada a 37° C y sometido a un choque térmico de 50° C por 30 min.....63

9.-Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 cultivado en medio DS a 37°C y sometido a un choque térmico de 50°C por 30 min.....64

10.-Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa FD-1 cultivado en medio de DS a 43°C y sometido a choques térmicos de 50° o 52°C por 30 min.....64

11.-Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 cultivado en medio de DS a 43°C y sometido a un choque térmico de 50° o 52°C por 30 min.....65

12.-Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1 cultivada a 37°C y sometida a un choque térmico de 50°C/30 min a diferentes tiempos de incubación.....66

13.-Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1041 cultivada a 37°C y sometida a un choque térmico de 50°Cpor 30 min a diferentes tiempos de incubación....67

14.-Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1 cultivada a 43°C y sometida a un choque térmico de 50°C/30 min a diferentes tiempos de incubación....67

15.-Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1041 cultivada a 43°C y sometida a un choque térmico de 50°C por 30 min a diferentes tiempos de incubación....68

16.-Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1 cultivada a 43°C y sometida a un choque térmico de 52°Cpor 30 min a diferentes tiempos de incubación....68

17.-Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1041 cultivada a 43°C y sometida a un choque térmico de 52°Cpor 30 min a diferentes tiempos de incubación....69

18.- Fotografía al microscopio electrónico de trasmisión de célula de *C. perfringens* cepa FD-1041, cultivadas durante 1 hora a 37°C en medio DS (8,500 X)....74

19.- Fotografía al microscopio electrónico de trasmisión de células de *C. perfringens* cepa FD-1041, cultivadas durante 3 horas a 37°C en medio DS (8,500 X)....74

20.- Producción de enterotoxina de *C. perfringens* cepa FD-1041 sometida a un choque térmico de 50°C por 30 min a la primera o tercera hora de incubación....75

21.- Halos producidos por la acción de fosfolipasa C en el método modificado de difusión....76

22.- Producción de fosfolipasa C por *C. perfringens* FD-1041 sometidaa un choque térmico de 50°C por 30 min....77

23.- Efecto de un choque térmico (50°C por 30 min) aplicado a la primera o segunda hora de incubación de células en esporulación de *C. perfringens* FD-1, sobre la termotolerancia de esporas resultantes....79

24.- Efecto de un choque térmico (50°C por 30 min) aplicado a la tercera hora de incubación de células en esporulación de *C. perfringens* FD-1, sobre la termotolerancia de esporas resultantes....80

25.- Curvas de muerte térmica a 55°C de células vegetativas de *C. perfringens* FD-1041 después de que fueron sometidas a un choque térmico previo de 50°C por 30 min. El ensayo de termotolerancia se realizó inmediatamente o 1 h después del choque.....83

26.- Curvas de muerte térmica a 55°C de células vegetativas de *C. perfringens* FD-1041 después de que fueron sometidas a un choque térmico previo de 50°C por 30 min. El ensayo de termotolerancia se realizó 2 (A) o 3 h (B) después del choque.....84

27.- Curva de incorporación de Trans-S^{35}-label por células de *C. perfringens* durante un choque térmico de 50°C.....85

28.- Autoradiografía de perfiles proteínicos de *C. perfringens* cepa FD-1041. Las células fueron incubadas a 37°C y sometidas a 50°Cy a 43°C y sometidas a un choque térmico de 50°C y 52°C. Las proteínas celulares fueron solubilizadas por el método de Abraham y Rood.....87

29.- Autoradiografía de perfiles proteínicos de *C. perfringes* cepa FD-1041. Se observan las proteínas totales incubadas a 37°C y sometidas a 50°C, la fracción citosólica, la fracción membranal y el sobrenadante.....89

30.- Autoradiografía de perfiles proteínicos de *C. perfringens* FD-1041cultivada en un medio de esporulación (DS). Las células se incubaron a 43°C y se sometieron a 50°C a la primera y tercera hora de incubación.....90

31.- Detección inmunológica de homólogos de DnaK de *L. lactis* y GroEL de *E. coli* en *C. perfringens* FD-1041. Para esta fotografía se utilizaron proteínas de células sometidas a un choque térmico de 50°C por 30 min.....92

32.- Colonias típicas de *C. perfringens* aisladas de la lesión producida en cobayos después de la inoculación con la bacteria.....94

33.- Lesión producida por la inoculación de *C. perfringens* FD-1041en la extremidad posterior de un conejo.....95

34.- Inmunodetección de proteínas de *C. perfringens* utilizando suero de cobayo antes de ser inoculado con la bacteria.....96

35.- Inmunodetección de proteínas de *C. perfringens* utilizando suero de conejo después de ser inoculado con la bacteria.....98

36.- Inmunodetección de proteínas de *C. perfringens* utilizando suero de cobayo después de ser inoculado con la bacteria. 99

37.- Localización subcelular de PCHT inmunodominantes de *C. perfringens* FD-1041. Proteínas de la región citosólica; de la envoltura celular y del sobrenadantes del cultivo.....100

LISTA DE TABLAS

1.- PCHT que son antigénicas en varias enfermedades de animales y humanos.....30

2.- Producción de esporas de *C. perfringens* cepas FD-1 y FD-1041 cultivadas a 37°C y sometidas a un choque térmico de 50°C a diferentes tiempos de incubación.....70

3.- Producción de esporas de *C. perfringens* cepas FD-1 y FD-1041 cultivadas a 43°C y sometidas a un choque térmico de 50°C a diferentes tiempos de incubación.....71

4.- Producción de esporas de *C. perfringens* cepas FD-1 y FD-1041 cultivadas a 43°C y sometidas a un choque térmico de 52°C a diferentes tiempos de incubación.....72

5.- Efecto de un choque térmico a diferentes tiempos durante la incubación de células de *C. perfringens* , sobre la termotolerancia de las esporas formadas.....81

6.- Termotolerancia al calor (55°C) de células vegetativas de *C. perfringens* después de que fueron sometidas y no sometidas a un choque térmico previo.....82

7.- Identificación inmunológica de homólogos de GroEL de *E. coli* y DnaK de *L. lactis* en *C. perfringens* FD-1041.....93

LISTA DE ABREVIATURAS

A_{600}	Absorbancia a 600 nm
ADN	Acido desoxiribonucléico
ASB	Albúmina sérica bovina
BCA	Ensayo de ácido bicinconínico
$CaCl_2$	Cloruro de calcio
$CaCO_3$	Carbonato de calcio
cm	Centímetro(s)
CO_2	Dióxido de carbono
cpm	Cuentas por minuto
°C	Grados centígrados
"D"	Valor de letalidad
DMSO	Di-metil sulfóxido
DS	Medio de cultivo Duncan-Strong
EDTA	Acido etilen di amino tetra acético
Fig.	Figura
GMP	Guanosina 5´-monofosfato
g	Fuerza gravitacional
h	Hora(s)
kDa	Kilodaltones
Kg	Kilogramo(s)
Log	Logaritmo base 10
l	Litro(s)
PCHT	Proteínas del choque térmico
pH	Logaritmo recíproco de la concentración de ion hidrógeno
PPO	Difenil oxazol

M	Molar
mA	Miliamperes
mg	Miligramo(s)
ml	Mililitros
min	Minuto(s)
mM	Milimolar
nm	Nanómetro(s)
µCi	Microcuries
µl	Microlitros
µg	Microgramos
N_2	Nitrógeno (gas)
NaCl	Cloruro de sodio
p	peso
psi	Libras sobre pulgada cuadrada
RNA	Acido ribonucléico
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato de sodio
seg	Segundo(s)
sem	Semana
TRIS-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano
U	Unidades de actividad
UFC	Unidades formadores de colonias
v	Volumen
α	Alfa
%	Porciento