RESUMEN.

C. perfringens es una bacteria causante de varias enfermedades en el hombre y animales. Dentro de ellas, son de gran importancia la gangrena gaseosa y la intoxicación alimentaria.

Se sabe que los organismos responden a condiciones desfavorables, tales como un aumento de temperatura, mediante la inducción de un grupo de proteínas llamadas proteínas del choque térmico y la adquisición de tolerancia al calor. Esas proteínas se han involucrado con una serie de procesos metabólicos, tales como esporulación bacteriana y termotolerancia, además pueden actuar como factores de virulencia y antígenos inmunodominantes en una gran cantidad de enfermedades.

Debido a la importancia de *C. perfringens* como causante de enfermedades, se pensó que el estudio de los factores que favorecen su sobrevivencia y su patogenicidad sería de trascendencia para el control de la bacteria y de las enfermedades que produce.

Se estableció que un choque térmico de 43 a 50°C, 43 a 52°C o 37 a 50°C provocó una disminución de crecimiento moderado, pero posteriormente las células fueron capaces de recuperarse y alcanzar niveles semejantes al control. Se encontró que esos tratamientos produjeron alteraciones en el proceso de esporulación y de producción de toxinas. Cuando el choque térmico se aplicó en las primeras horas de su incubación, se pudo observar un retraso y disminución en la cantidad de esporas; también se produjo un retraso en la producción de enterotoxina y de fosfolipasa C.

Se observó que un choque térmico indujo la adquisición de termotolerancia en células vegetativas, y que esa resistencia al calor se prolonga hasta 2 horas posteriores a dicho tratamiento. Además, cuando este choque se aplicó en las primeras horas del cultivo de la bacteria en

esporulación, se produjeron esporas más termotolerantes que aquellas que no se sometieron al tratamiento.

Se encontró que un choque térmico aplicado a células vegetativas de la bacteria induce la producción de 8 PCHT cuyos pesos moleculares fueron 101, 84, 79, 72, 60, 37, 27 y 11 kDa. Se determinó además que la mayoría de ellas están localizadas principalmente en la envoltura celular (101, 84, 79, 72, 60, 37 y 27 kDa). En el citosol se encontró las PCHT de 11, 60 y 79 kDa, y en el sobrenadante del cultivo se detectaron las PCHT 84, 79 y 72 kDa. Cuando se estudió la respuesta en células en esporulación, solamente se detectaron las PCHT de 101, 79 y 72 kDa.

Se estableció que *C. perfringens* produce homólogos de las PCHT GroEL de *E. coli* y DnaK de *L. lactis*. Los pesos moleculares de dichos homólogos fueron 60 y 84 kDa respectivamente. Estas proteínas se localizaron principalmente en la envoltura celular.

Por otro lado, al inducir un cuadro de gangrena gaseosa, se identificaron 4 PCHT inmunodominantes de *C. perfringens*. El peso molecular de éstas fue de 101, 79, 60, y 37 kDa.

ABSTRACT

It is known that organisms respond to unfavorable conditions, such as an increase in temperature, through the inducement of a set of proteins called heat shock proteins (PCHT) and the acquisition of thermotolerance. Those proteins can act as virulence factors and immunodominant antigens in a variety of diseases.

C. perfringens causes several diseases in men and animals. Among them, gas gangrene and food poisoning are of great importance. The study of the factors that favor the survival and pathogenicity of *C. perfringens,* would be of importance for the control of the bacteria, or the diseases that it produces.

We demonstrated that heat shock induced by a shift in temperature from 43 to 50°C, 43 to 52°C or 37 to 50°C provoked a moderate decrease of viable cells, but the cells recovered and reached similar levels as the control. Those treatments produced alterations in the process of sporulation and toxin production. The heat shock applied in the first h of incubation, caused a delay and decrease in the quantity of spores. This treatment also resulted in a delay in the production of enterotoxin and phospholipase C.

The heat shock induced the acquisition of thermotolerance in vegetative cells, and this resistance lasted at least two h. The treatment applied during the first h of incubation of a culture of sporulating cells produced spores more thermotolerant than the control.

The effect of heat shock on protein synthesis was examined by analysis of ^{35}Sulfur pulse-labeled proteins. Eight PCHT whose molecular weights were 101, 84, 79, 72, 60, 37, 27 and 11 kDa were identified by one-dimensional electrophoresis. Most of them were located mainly in the cellular envelope (101, 84, 79, 72, 60, 37 and 27 kDa). The PCHT of 11, 60 and 79 kDa were found in the cytosol, and the PCHT of 84, 79 and 72 kDa in the supernatant. In sporulating cells, only the PCHT of 101, 79 and 72 kDa were detected.

Two PCHT of *C. perfringens* were found immunologicaly related to GroEL of *E. coli* and DnaK of *L. lactis*. The molecular weights of those proteins were 60

and 84 kDa respectively. These polypeptides were located mainly in the cellular envelope.

Upon inducing gas gangrene in animals, four (37, 60, 79, and 101 kDa) immunodominat PCHT of *C. perfringens* were identified.

INTRODUCCION

Está bien establecido que uno de los principales problemas mundiales en el área de salud son las enfermedades alimentarias. En México y en otros paises en desarrollo, este problema se agrava en muchos casos por la presencia de desnutrición y falta de atención médica.

Las enfermedades alimentarias son causadas principalmente por bacterias, y en menor proporción por virus, hongos, parásitos o sustancias químicas. Dentro de los principales factores que favorecen la contaminación de los alimentos se encuentran el manejo y el mantenimiento inadecuado del producto, manipulación por personal portador de microorganismos y fallas en el procesamiento.

El principal método de control microbiano en alimentos se basa en la utilización de calor. Sin embargo muchos microorganismos han desarrollado mecanismos de adaptación que les permite sobrevivir a tratamientos que de otra manera serían letales.

C. perfringens es uno de los principales microorganismos que causan enfermedades alimentarias. Esto se ve favorecido por la amplia dispersión en la naturaleza y por las características propias de la bacteria. Este organismo causa además gangrena gaseosa, que es otra enfermedad de gran importancia. Ambos padecimientos son de distribución mundial y afectan a todas las clases sociales.

En la actualidad, los métodos de control de la bacteria y de tratamiento de las enfermedades que produce, aún tienen grandes limitantes. Por este motivo, en este trabajo generamos conocimiento que podría ayudar a proponer alternativas y generar ideas para solventar la problemática existente.

ANTECEDENTES

Clostridium perfringens es quizá la bacteria patógena más ampliamente distribuida ya que es encontrada en el suelo, polvo e intestino del hombre y animales (Matches, J.R. *et al.* 1974). Esta característica facilita la contaminación de alimentos, así como la infección en hombre y en animales (Yamagishi, T., *et al.*, 1976).

Este microorganismo, también llamado *C. welchii*, tiene forma bacilar, es gram positivo, formador de esporas, encapsulado, no móvil y productor de una variedad de toxinas y enzimas, las cuales juegan un papel crucial en la patogénesis (Hatheway, C.L. 1990). Las cepas de la bacteria se han clasificado en cinco tipos (A a la E) de acuerdo a la producción de 4 toxinas extracelulares (alfa, beta, épsilon e iota). Sin embargo, la mayoría de las infecciones en humanos son causadas por las cepas del tipo A, aunque en algunas ocasiones se ha visto involucrado el tipo C (Smith, L.D., *et al.* 1984).

La temperatura óptima de crecimiento de esta bacteria es de 43° a 45°C, la cual es la más alta de cualquier bacteria de importancia médica, además tiene el tiempo de generación más corto (7 a 8 min bajo condiciones ideales), que cualquier otra bacteria conocida (Labbé, R.G., 1991).

Este microorganismo causa una serie de patologías en humanos y animales. Se ha reportado que en el hombre es el principal causante de la gangrena gaseosa (Smith, L.D *et al.*, 1984), sin embargo también se conoce que es el responsable de una de las toxi-infecciones por alimentos mas importantes, ya que estudios epidemiológicos revelan que *C. perfringens* se encuentra entre las 5 primeras causas de enfermedades alimentarias bacterianas (Sutton, R.G.A. *et al* 1965; Tood, E.C.D., 1978,; Hatheway, C.L. *et al.*, 1980; Shandera, W.X., 1983; Borrielo, E.P. *et al.* 1985; Sharp, J.C.M., 1988; Centers for Disease Control, 1990). Además, puede causar enteritis necrótica y diarrea

infecciosa asociada a la administración de antibióticos (Labbé, R.G. 1989; Borriello, S.P. *et al.*, 1984; Larson, H.E. *et al.* 1984). Por otro lado también se ha relacionado con el síndrome de muerte fulminante infantil (Murrel, T.G.C., *et al.* 1987). En cuanto a enfermedades en animales se ha reportado que causa la disentería del cordero, la enfermedad del riñón pulposo en cabras, la enterotoxemia de ovejas, de borregos y de ganado vacuno, etc. (Smith , L.D. *et al.* 1984).

PRINCIPALES ENFERMEDADES EN EL HOMBRE CAUSADAS POR *C. perfringens*

a) GANGRENA GASEOSA (MIONECROSIS CLOSTRIDIAL).

Esta enfermedad ha estado asociada estrechamente con *C. perfringens* durante los últimos noventa años, aunque se ha reportado que algunos casos esporádicos han sido causados por otros microorganismos del género, entre los que se incluyen principalmente *C. novyi* y *C. septicum* (Holland, K.T. *et al.*, 1987).

Se ha establecido que la enfermedad progresa en dos estadios: primero, después del trauma inicial, el crecimiento localizado de las bacterias causa una necrosis, esto es debido al efecto de las toxinas, principalmente la fosfolipasa C (α toxina o lecitinasa), la cual destruye a los capilares, lo que reduce el flujo sanguíneo de la zona afectada; segundo, se desarrolla una necrosis progresiva con abundante crecimiento microbiano, hasta que el microorganismo llega al torrente sanguíneo y causa una bacteremia (Holland, K.T. *et al.* 1987).

En general, los síntomas aparecen bruscamente y siguen a un periodo de incubación de 6 a 72 h después de ocurrida la lesión. La zona afectada se muestra edematosa y la piel presenta un color bronceado con exudación de un líquido obscuro transparente. Además existe gas en el tejido subcutaneo y

en los musculos. Hay lesión de los nervios periféricos, por lo que en ocasiones el paciente no se da cuenta del avance de la enfermedad, extendiéndosele hasta causar bacteremia y su muerte (Swartz, M.N., 1985).

Todas las cepas de los cinco tipos de *C. perfringens* producen la fosfolipasa C, la cual es una de las principales responsables del cuadro de gangrena gaseosa. Sin embargo, durante el progreso del proceso patológico otras toxinas también pueden actuar, lo que agrava el cuadro clínico (Mollby, R. *et al*, 1976).

La fosfolipasa C es una proteína termoestable que hidroliza fosfatidilcolina a fosforilcolina y 1,2-diacilglicerol, aunque se ha encontrado que también afecta otros fosfolípidos como esfingomielina y lisofosfatidilcolina (Krug, E.L. y C. Kent, 1984). La toxina tiene un peso molecular de 30 kDa cuando se determina mediante cromatagrafía de exclusión molecular, y un punto isoeléctrico de 5.5 (Smith, C y J.P. Arbuthnott, 1974).

Dentro de la actividad biológica de esta toxina está bien establecido que tiene actividad dermonecrótica, hemolítica y letal para una gran variedad de animales de laboratorio (Sterne, M., *et al.*, 1964). La acción hemolítica se provoca por la hidrólisis de los fosfolípidos en la membrana de las células hemáticas, lo que origina el rompimiento de los eritrocitos ya debilitados (Meduski, J.W. y P. Hochstein, 1972)

La fosfolipasa C también causa la agregación de las plaquetas *in vitro* e *in vivo*, además se ha visto que puede provocar su degradación, así como de leucocitos y de otras células del cuerpo. Por otro lado, se ha establecido que puede incrementar la permeabilidad vascular (Sugahara, T., *et al*, 1977).

La acción de la fosfolipasa C en el cuerpo es dependiente del sitio de inoculación. Se ha observado que una inoculación intravenosa provoca una agregación y degradación de plaquetas. Esto es seguido por una hemólisis intravascular y subsecuentemente hematuria. La toxina intacta o sus fragmentos son excretados en la orina. Cuando la inoculación es intramuscular,

se dificulta establecer los efectos de esta toxina en forma independiente. Aparentemente la toxina debe de fijarse en el sitio de inoculación, ahí afecta la membrana plasmática de las células musculares, y subsecuentemente hay degeneración de estructuras subcelulares como mitocondrias, retículo endoplásmico y membrana nuclear (Smith, L.D y B.L. Williams, 1984).

Debido a que *C. perfringens* es el principal causante de esta enfermedad, el estudio de los factores que pudieran influenciar la síntesis de la fosfolipasa C serían de gran importancia. Tomando en cuenta que se desconoce el efecto de condiciones estresantes sobre este factor de patogenicidad, uno de los objetivos de este trabajo abordó este aspecto.

b) ENFERMEDADES ALIMENTARIAS.

La toxi-infección alimentaria y la diarrea infecciosa son provocados por la acción de una enterotoxina en el tracto gastrointestinal. La toxina está estrechamente relacionada con el proceso de esporulación de la bacteria (Labbé, R.G. 1989).

Las enfermedades alimentarias producidas por *C. perfringens* generalmente ocurren al ingerir alimento contaminado con uno o una combinación de los siguientes eventos: a) células vegetativas (calculándose que se requieren entre 4 a 6 x 10^9 UFC), cuando un número considerable de ellas pasan el entorno ácido del estómago, llegan al ambiente alcalino del intestino delgado y allí comienzan el proceso de esporulación y producen conjuntamente la enterotoxina; b) células en esporulación, las cuales pueden producir intracelularmente la enterotoxina durante su estancia en el alimento y después liberarla ya en el tracto intestinal, y c) enterotoxina preformada, aunque este resulta el menos probable, ya que en experimentos con voluntarios se requirió la ingesta de 8 mg de toxina pura y además de la neutralización del jugo gástrico para poder inducir la sintomatología (Skjelkvalé, R. *et al.* 1977).

Generalmente la toxi-infección alimentaria aparece 7 a 12 h después de ingerir el alimento contaminado, aunque en algunas ocasiones puede presentarse incluso 2 h después de la ingestión del producto (Robinson, J.A. *et al.* 1969). La enfermedad se caracteriza por cólico abdominal severo y una diarrea profusa, puede presentarse también nausea y vómito; la fiebre y el dolor de cabeza están generalmente ausentes (Sutton, R.G.A. y B.C. Hobbs, 1965).

La diarrea infecciosa también se presenta con dolor abdominal severo, vómito y en muchas ocasiones las heces son sanguinolentas. La duración de esta enfermedad es alrededor de 11 días (Larson, H.E. y S.P. Borriello, 1988). Un número importante de estas diarreas se originan después de que los pacientes han recibido tratamientos con antibióticos (Borriello, S.P. *et al.* 1984). Se piensa que esta enfermedad es producida por una sobrepoblación de *C. perfringens* en el intestino donde continuamente liberan la enterotoxina (Larson, H.E. y S.P. Borriello, 1988).

Debido a la importancia de estas enfermedades la enterotoxina ha sido objeto de extensos estudios y se ha establecido que es una proteína termolábil (Duncan, C.L. y D.H. Strong, 1969), de una sola cadena (Labbé, R.G., 1981) compuesta por 309 aminoácidos (Granum, P.E. y O. Harbitz, 1984), con un peso molecular de 34,262 daltones y un punto isoeléctrico de 4.3 (Yatis, W.W. C. Castimpolas, 1975).

Se han realizado estudios sobre el modo de acción de esta toxina en las enfermedades diarréicas y se ha establecido que el sitio de fijación es la membrana de las células epiteliales del borde de cepillo del intestino, en donde se une a un receptor de naturaleza proteínica, el cual se ha sugerido que tiene un peso molecular de 50 kDa. A los 2 o 3 min de la unión ocurre la inserción de la toxina en la membrana y en ese sitio realiza su acción, ya que no hay evidencia de que ocurra internalización de ésta (McClane, B.A. *et al.* 1988). Se ha determinado que estando la enterotoxina insertada provoca

aparición de burbujas y de poros en la membrana. Estos últimos en presencia de calcio se hacen muy grandes, lo que origina alteraciones en la permeabilidad membranal, que incluyen modificaciones en el flujo de iones, aminoácidos y nucleótidos (McDonel, J.L. 1988). Esto provoca la salida de agua, iones y pequeñas moléculas, que produce un desequilibrio osmótico, la inhibición de la síntesis de macromoléculas y del metabolismo energético, además de daño morfológico y eventualmente muerte celular (Wnek, A.P., *et al.* 1989).

En general el conocimiento de las enfermedades alimentarias causadas por esta bacteria es muy amplio, sin embargo, no existe en la literatura información sobre el efecto de un choque térmico sobre la producción de enterotoxina. Pensamos que estudiar esta es de gran importancia para poder conocer la capacidad de sobrevivenvia y de producción de enterotoxina por el patógeno en condiciones hostiles, a las que está expuesto en condiciones silvestres, por lo que uno de los objetivos de este trabajo pretendió estudiar este aspecto

LA ESPORULACION DE *C. perfringens.*

El estudio de la esporulación bacteriana ha adquirido gran importancia ya que un gran número de toxinas, enzimas y antibióticos se producen durante este proceso en muchas especies de los géneros *Clostridium* y *Bacillus* (Schaeffer, P., 1969). Además, la capacidad de formar esporas favorece de manera considerable la sobrevivencia del microorganismo en sus diferentes hábitats.

Las esporas se forman en la bacteria mediante un proceso que involucra todo un conjunto de cambios morfológicos y fisiológicos en el microorganismo.

Este conjunto de cambios se inicia como respuesta a alguna de las siguientes condiciones:

a) disminución en el medio de cultivo de las fuentes de carbono, nitrógeno o fósforo. Las células vegetativas se multiplican en el medio de cultivo, hasta que se reduce la concentración de alguno de los nutrientes arriba mencionados, y esto es reconocido por la célula como una señal para iniciar el proceso de esporulación.

b) falta de un aminoácido esencial en el medio de cultivo: la disminución súbita de uno a más aminoácidos puede provocar una respuesta severa que implica el cese de la síntesis de proteínas y ARN. Esto provoca también una activación en la producción de (p)ppGpp y de la actividad de deshidrogenasa-IMP, lo que resulta en una disminución de la concentración de nucleótidos de guanina, que conduce al inicio del proceso de esporulación (Freese, E., 1981).

c) inhibición directa de la síntesis de nucleótidos de guanosina: se ha comprobado que la decoinina, un inhibidor de la síntesis de GMP, es capaz de promover la esporulación de *Bacillus subtilis* (Mitani, T. *et al.*, 1977) y de *C. perfringens* (Sacks,L.E., 1980). Además Labbé y Nolan (1981 y 1987) establecieron que la cafeína, que inhibe la vía de las pentosas, mostró estimulación del proceso de esporulación.

En el género *Bacillus* la secuencia de cambios morfológicos que ocurren durante la esporulación se han dividido en siete etapas, las cuales son muy similares a las observadas para *C. perfringens*, y difieren solo en aspectos menores (Hoeninger, J.F.M. *et al.*, 1968; Roper, G. *et al.*, 1976). Estas etapas se caracterizan principalmente por los siguientes eventos, primero: formación de un filamento axial de cromatina; segundo: invaginación de la membrana celular para la formación del septo de división; tercero: englobamiento de la pre-espora por la membrana celular; cuarto: depósito de peptidoglicano para formar el cortex; quinto: formación de las capas de la espora; sexto: maduración de la espora y séptimo: liberación de la espora de la célula madre (Mandelstam, J. *et al.* 1988).

La espora es una forma celular de gran resistencia que difiere de su progenitor (la célula madre) en el grado de tolerancia a diferentes condiciones, tales como al calor, en donde es 100,000 veces más resistente; a la luz ultravioleta y a la radiación ionizante, ya que se ha visto que resiste más de 100 veces que la célula vegetativa, y a otras condiciones tales como la desecación, y la exposición a desinfectantes y otros químicos (Khoury, P.H. *et al.*, 1987).

Se ha demostrado que la resistencia al calor es mayor en las esporas de las bacterias termófilas comparada con las mesófilas, y esta es mayor que la de los organismos psicrófilos (Khoury, P.H. *et al.*, 1987).

En algunas especies del género *Bacillus* se ha demostrado que entre mayor sea la temperatura de esporulación, mayor será la tolerancia a altas temperaturas de las esporas formadas (Lechowich, R.V. y Z.J. Ordal, 1962). Recientemente, Garcia-Alvarado *et al* (1992) establecieron que este comportamiento se presentaba también en *C. perfringens*. Ellos demostraron que las esporas formadas a 43°C eran más termotolerantes que las producidas a 37°C y estas a su vez más resistentes que las formadas a 32°C.

La termotolerancia de las esporas se atribuye al menos a tres determinantes fisicoquímicos que afectan al citosol celular: contenido de agua, mineralización y adaptación térmica (Gerhardt, P. y R.E. Marquis, 1989).

El estudio de aquellos factores que permitieran una mayor capacidad de sobrevivencia de este patógeno serían de gran trascendencia, por lo que uno de los objetivos de este trabajo fué determinar si un choque térmico influía en la producción de esporas.

LA ESPORULACION Y PRODUCCION DE ENTEROTOXINA.

Desde hace tiempo se ha reportado una relación estrecha entre la producción de enterotoxina y la esporulación de la bacteria (Craven, S.E. *et al.* 1981). Sin embargo se ha descrito que pequeñas cantidades de enterotoxina son producidas por células vegetativas no esporuladas (Goldner, S.B. *et al.* 1986). Afortunadamente estas cantidades son tan pequeñas que no son de importancia como causa de intoxicaciones alimentarias por el microorganismo (Skjelkvale, R. y T. Uemura, 1977).

Se ha demostrado que la enterotoxina empieza a sintetizarse en los estadíos tempranos del proceso de esporulación, acumulándose intracelularmente, para después ser liberada junto con la espora madura al medio extracelular (Labbé, R.G. 1977). Se había reportado que la enterotoxina era parte estructural importante de las capas de la espora (Frieben, W. y C.L. Duncan, 1975). Sin embargo, Ryu y Labbé encontraron que estas estructuras contienen solo cantidades muy pequeñas de enterotoxina (Ryu, S. y R.G. Labbé, 1989), lo cual sugiere que esta proteína carece de un papel estructural importante en las cubiertas esporales.

Se tiene un conocimiento muy pobre sobre la genética de la produccion de enterotoxina. Solo se sabe que los genes responsables de su síntesis se pueden encontrar tanto en el cromosoma como en plásmidos (Labbé, R.G , 1989), y que aproximadamente solo 6% de las cepas aisladas de muestra fecales de personas sanas contienen el gen que codifica para la enterotoxina (Labbé, R.G., 1991).

PROTEINAS DEL CHOQUE TERMICO

a) GENERALIDADES.

En general los organismos deben adaptarse a una gran variedad de condiciones ambientales tanto físicas, como químicas o biológicas, las cuales en muchas ocasiones provocan estados de estrés para las células. Se ha establecido que casi todos los organismos responden a estas condiciones de tensión mediante la inducción de la síntesis de un grupo de proteínas conocidas como proteínas del estrés. Se piensa que la función de estas proteínas es proteger a las células del cambio adverso, el cual pudiera ser letal (Morimoto, R.I *et al.* 1990).

Ya que la temperatura es uno de los principales factores que gobiernan el crecimiento y el metabolismo de las células, no es sorprendente que la inducción de estas proteínas haya sido ampliamente estudiada en respuesta a cambios en este parámetro. El primero que reportó esta respuesta fue Tissieres *et al* (1974), cuando trabajaron con *Drosophila* y elevaron la temperatura ambiente 5 grados arriba de su rango normal, y observaron la síntesis de un grupo de proteínas como respuesta este cambio. A estos péptidos les llamaron proteínas del choque térmico (PCHT) (Farber,J.M. y B.E. Brown, 1990). Como resultado de la condición estresante se ha observado que junto con la activación de los genes que codifican para las PCHT, se inhibe la expresión de la mayoría de las otros genes.

Se ha establecido que algunas de las PCHT y en general las proteínas del estrés son también sintetizadas en otras condiciones adversas tales, como anoxia, adición de azida de sodio, cambios en el pH (Heyde, M. y R. Portalier, 1990), condiciones adversas de oxígeno (Begonia, G.B. y M.L. Salin, 1991), cambios de presión (Qoronfleh, M.W. y U.N. Streips, 1987), la exposición a luz ultravioleta, infección viral, transformaciones malignas, inflamación (Kaufmann, S.H. *et al.* 1990), presencia de 2,4-dinitrofenol (Heyde, M. R. Portalier, 1990), de

agentes oxidantes (Farr, S.B. y T. Kogoma, 1991), y de alcoholes y de metales pesados (Watson, K. 1990), entre otros.

Las principales PCHT han sido clasificadas en cuatro familias de acuerdo a los pesos moleculares que presentan: a) PCHT de alto peso molecular, variando entre 83 y 90 kDa; b) PCHT 70, cuyos pesos varían entre 66 y 78 kDa; c) PCHT 60, que han sido encontradas en bacterias, mitocondrias y cloroplastos y se les ha llamado "chaperoninas" (Hemmingsen, S.M. *et al.*, 1988) y d) PCHT de bajo peso molecular, la cual comprende un diverso grupo cuyos pesos varían entre 15 a 30 kDa. Además, se han encontrado algunas PCHT de pesos moleculares muy altos (100 a 110 kDa) con propiedades diferentes a las de las otras familias anteriormente mencionadas (Subjeck, J.R. *et al.*, 1983).

Está bien establecido que en condiciones normales no estresantes la mayoría de as PCHT están presentes en bajas concentraciones en las células, lo que sugiere que en todo tiempo tienen funciones indispensables, sin embargo, durante la situación de estrés su síntesis se incrementa hasta 100 veces, disminuyendo posteriormente cuando cesa la condición tensionante (Palter, K.B., *et al.*, 1986).

Se ha observado que la síntesis de las PCHT varía con la magnitud de la condición estresante a que es expuesta la célula. Van Bogelen *et al* (1989) observaron que cuando sometían a células de *E. coli* a un cambio moderado de temperatura se producía una respuesta temporal mediante el aumento de la síntesis de las PCHT; sin embargo, cuando el cambio de temperatura era más severo, hasta una temperatura casi letal, se inducía casi exclusivamente la síntesis de las PCHT y se inhibía la producción de proteínas normales.

Se había establecido que los organismos eucarióticos poseen al menos dos copias de la mayoría de los genes que codifican para las PCHT, en tanto que los procariotes poseen una copia única de estos genes (Morimoto, R.I *et al.*, 1990). Sin embargo, un año mas tarde, en 1991, G. Gugielmi *et al* establecieron la presencia de múltiples genes codificantes para proteínas de la

familia de 60 kDa en *Streptomyces albus*. Esta misma observación fue hecha por Wallington y Lund (1994) cuando trabajaron con *Rhizobium leguminosarum*.

La respuesta al choque térmico ha sido estudiada en una gran cantidad de organismos. Se ha establecido que tiene dos características muy importantes: 1) esta respuesta es prácticamente universal, debido a que en todos los organismos estudiados ha sido encontrada, con excepción de *Hydra oligactis* (Bosch, T.C.G., *et al.*, 1988). Sin embargo la inducción de PCHT varía grandemente en relación al número y a la cantidad de proteínas producidas en las diferentes formas de vida, y 2) las PCHT presentan un alto grado de conservación evolutiva, especialmente la familia de los 70 kDa, ya que se ha reportado una homología del 70% entre la proteína de 70 kDa del humano y la de *D. melanogaster* y de un 50% con la proteína homóloga de *E. coli*. Todo lo anterior ha sugerido una evolución de un dominio proteínico común (Morimoto, R.I., *et al.*, 1990).

Se ha determinado que la respuesta al choque térmico puede ser variable de un organismo a otro e incluso en organismos de la misma especie, tal como lo demostraron Morange *et al* (1993), cuando trabajaron con especies de *Listeria*. Sin embargo, lo que está bien establecido es la importante función protectiva que todas ellas llevan a cabo (Morimoto, R.I., *et al.*, 1990).

Gomes *et al* (1986) realizaron experimentos con *Caulobacter crescentus*. Ellos establecieron que la bacteria era capaz de inducir 20 diferentes PCHT cuando se incubaba a 30°C y recibía un choque térmico de 40°C. En estudios realizados por Terracciano *et al* (1988) con *Clostridium acetobutylicum* se encontró la inducción de 11 PCHT cuando la temperatura se cambiaba de 28 a 45°C. En *B. subtillis* se detectaron 26 PCHT distintas cuando fue sometida a un cambio térmico de 37 a 50°C (Arnosti, D.N., *et al.* 1986).

Una respuesta más limitada fue observada por J. Engel *et al.* (1990) cuando trabajaron con *Chlamydia trachomatis*. Ellos encontraron la inducción de 5 PCHT cuando las células recibieron un choque térmico de 37 a 45°C. Se

ha establecido que algunas arqueobacterias también presentan una respuesta al estrés térmico, induciéndose alrededor de 6 PCHT cuando las células son sometidas a condiciones extremas de temperatura (Conway de Macario, E. y A. Macario, 1994).

Cuando *Helicobacter pylori* fue sometida a un choque térmico de 42°C solo se detectó una proteína perteneciente a la familia de 60 kDa (Yokota, K., *et al.* 1994).

Al someter a *Streptococcus thermophilus* a un choque térmico de 42 a 52°C, se indujo la producción de al menos 22 PCHT (Auffray, Y., *et al.*, 1995). Este mismo investigador había trabajado anteriormente (1992) con *Lactobacillus lactis* y estableció que un cambio térmico de 30 a 40°C induce al menos 16 PCHT.

En *E. coli*, que es la bacteria más extensamente estudiada se ha establecido que se sintetizan entre 17 y 20 proteínas cuando la temperatura de incubación se cambió de 28 a 42°C (Neidhart, F. y R.A. Van Bogelen, 1987). Como lo demuestran estos resultados, la cantidad y el tipo de PCHT es variable con el organismo. De todas las PCHT de *E. coli* existen dos que han sido ampliamente caracterizadas, la GroEL y la DnaK. Se ha encontrado que ambas se sintetizan y tienen funciones en condiciones normales, sin embargo, durante un periodo de estrés la síntesis se incrementa de 20 a 100 veces (Morimoto, R.I., *et al.*, 1990).

La PCHT DnaK es una proteína multifuncional, con un peso molecular de 69 kDa, por lo que se considera que pertenece a la familia de PCHT 70. Es una proteína inducible, que durante un proceso de estrés celular puede llega a constituir el 4.3% del total de proteína celular (Herendeen, S.L., *et al.* 1979).

Terracciano, *et al* (1988) trabajando con *Clostridium acetobutylicum*, demostraron en este organismo la síntesis de un homólogo a la DnaK de *E. coli*, cuyo peso molecular fue de 74 kDa. Auffray, *et al* (1995) observaron que en *Streptococcus thermopilus*, el homólogo de esta proteína tiene un peso

molecular de 72 kDa y en *Lactobacillus lactis* de 70 kDa (Auffray, Y. *et al.* 1992). En tanto que Todd *et al* (1985) establecieron que en *Bacillus subtils* el homólogo era de 84 kDa.

Se ha observado que esta proteína tiene un alto grado de conservación evolutiva. La proteína de *E. coli* presenta un 57% de homología con la proteína producida por *Drosophila melanogaster* (Bardwell, J.C.A. y E.A. Craig, 1984). Por su parte, Varela y Jerez (1992) establecieron que el homólogo de DnaK de *Thiobacillus ferroxidans* presentaba un 80% de identidad con la proteína de *E. coli*.

La proteína DnaK es considerada una chaperona molecular ya que se ha visto que tiene función mediadora en el ensamblaje correcto de las proteínas oligoméricas, también se ha sugerido que cataliza interacciones proteínicas intra e intermoleculares (Guglielmi, G. *et al.* 1991). Se ha establecido que esta proteína tiene otras funciones celulares idénticas en procariotes y eucariotes tales como la disociación de agregados proteínicos y el mantenimiento de algunos polipéptidos en estado no plegado, lo que facilita la translocación a través de la membrana y posteriormente el aceleramiento del plegamiento y oligomerización. Además se ha visto que es indispensable para la replicación del fago lambda *in vivo* (Morimoto, R.I *et al.* 1990). Por otro lado, se ha establecido que la presencia de esta proteína es indispensable para el crecimiento de *E. coli* a altas temperaturas (Dean, D.O. y R. James, 1991).

Se sabe que esta proteína en células eucarióticas está localizada en mitocondrias, cloroplastos, retículo endoplásmico, núcleo y citosol. También en trabajos con *Drosophila* se ha establecido que la PCHT está localizada en citosol y posteriormente migra a núcleo como resultado de un estímulo estresante (Morimoto, R.I *et al.* 1990).

En relación con la localización de DnaK en células procarióticas existía confusión, ya que primero se reportó que se encontraba en la [illegible]n

membranal (Zylicz, M. *et al.* 1983), y posteriormente Kostyal *et al.* (1989) demostró esta proteína en membrana, sin embargo, se estableció que cantidades significativas se encontraban también en citosol.

Recientemente Bukau, *et al* (1993)cuando realizaron trabajos de inmunolocalización con partículas de oro bajo el microscopio electrónico, establecieron que la PCHT DnaK se localiza principalmente en citosol, aunque, un 24% de esta PCHT se encuentra asociada a membrana. Estos investigadores encontraron además que un choque térmico no induce relocalización de esta PCHT, tal como se había reportado para *Drosophila.*

La PCHT GroEL es una proteína que pertenece a la familia de PCHT 60. Se ha determinado que tiene forma de anillo compuesta por 14 subunidades idénticas, cada una con un peso molecular de 58 kDa, las cuales se mantienen unidas mediante interacciones no covalentes (Zeilstra-Ryalls, J. *et al.* 1991).

Cuando estudiaron a *Helicobacter pylori,* Dunn, *et al* (1994) establecieron que este posee una proteína de 54 kDa homologa a la GroEL de *E. coli.* Por su parte, Zeilstra-Ryalls *et al.* (1991) demostraron que el homólogo de esta proteína en *Mycobacterium* spp. posee un peso molecular de 65 kDa. En tanto que Todd *et al* (1985) observaron que en *B. subtilis,* el homólogo posee un peso molecular de 69 kDa.

Otros grupos de investigadores han establecido que el homólogo de *Streptomyces albus* tiene un peso molecular de 56 kDa (Mazodier, P., *et al.* 1991), el de *Caulobacter crescentus,* 62 kDa (Lopes, S. *et al.,* 1986); el de *Campylobacter jejuni* 62 kDa (Takata, T, *et al.,* 1995); el de *Streptococcus thermophilus,* 67 kDa (Auffray, Y. *et al.,* 1995); el de *Lactobacillus lactis,* 63 kDa (Auffray, Y. *et al.,* 1992) y el de *Legionella pneumophila,* 60 kDa (Lema, M.W. y A. Brown, 1995).

Una característica importante, es que en un mismo organismo se ha encontrado la presencia de varias proteínas de diferentes pesos moleculares que son homólogas a la GroEL de *E. coli.* Lo anterior fue observado por E,

Wallington y P. Lund (1994) cuando trabajaron con *Rhizobium leguminosarum*. Ellos observaron que la bacteria posee dos proteínas, una de 60 kDa y otra de 58 kDa que reaccionan con anticuerpos monoclonales dirigidos contra la PCHT GroEL de *E. coli*. Así también G. Gugliemi *et al.* (1991) demostraron que en cuatro especies de *Streptomyces* existen tres proteínas que reaccionan con anticuerpos monoclonales contra la proteína GroEL de *E. coli*.

Se ha establecido que esta proteína no solamente presenta un alto grado de conservación estructural, sino también funcional. Varios autores han encontrado que es indispensable para el crecimiento a todas las temperaturas y que probablemente tenga un papel importante en los procesos de replicación del ADN y en la transcripción. Además de que facilita el plegamiento post-transcripcional, el ensamblaje y en algunos casos el transporte de proteínas oligoméricas a través de la membrana (Khandekar, S.S. *et al.* 1993). Así también se ha especulado que esta proteína pueda actuar como el antígeno causante de enfermedades autoinmunes, debido a la alta homología de esta proteína en las diferentes formas de vida (Cohen, I.R., 1991).

Se han realizado estudios para determinar la localización celular de esta PCHT a fin de entender más su función. A diferencia de la localización de la PCHT DnaK en células procarióticas, en trabajos realizados por Eschweiler *et al* en 1993, la GroEL se ha encontrado tanto en membrana como en region citosólica. Recientemente Lema y Brown (1995) establecieron que esta PCHT se encuentra principalmente en membrana en *Legionella pneumophila* sin embargo pequeñas cantidades son también detectadas en citosol.

Podemos considerar que la cantidad de información que se tiene hacerla de las PCHT, sus características y la presencia de homólogos contra las principales PCHT de *E. coli* es muy amplia, sin embargo no existen reportes sobre la caracterización de la respuesta al choque térmico en *C. perfringens*, por lo que en este trabajo abordamos este tema.

En general las PCHT se han estudiado intensamente y se ha establecido que están involucradas en una serie de procesos biológicos, tales como esporulación, adquisición de termotolerancia, problemas autoinmunes, factores de patogenicidad, etc. La relación existente entre las PCHT y estos procesos se revisará en forma independiente a continuación.

b) PCHT Y ESPORULACION.

Existen evidencias que sugieren que las PCHT pueden jugar un papel importante en el proceso de esporulación bacteriana. Una hipótesis a esta relación menciona que el proceso de esporulación es en sí una condición estresante ejercida sobre la célula, ya que el proceso se inicia cuando algún factor nutricional está ausente del medio de cultivo.

La primera evidencia que establece esta relación viene de trabajos realizados por Piggot y Coote (1976) quienes encontraron que un factor regulador de la expresión de las PCHT requiere la presencia de unas proteínas codificadas por genes, que juegan un papel muy importante durante el proceso de esporulación.

Sin embargo, en un trabajo desarrollado por Streips y Polio (1985) en que utilizaron mutantes incapaces de esporular de *B. subtilis*, se observó que estas cepas producían la mayoría de las PCHT sintetizadas por las bacterias que si esporulaban, por lo que sugirieron que las PCHT no jugaban un papel crucial en la esporulación de la bacteria.

En ese mismo año Todd *et al* también estudiaron la presencia de PCHT en células esporulantes de *Bacillus*. Ellos detectaron que cuando aplicaban a las células en esporulación un choque térmico de 30 a 43°C, se inducía la síntesis de 4 PCHT principales, cuyos pesos moleculares eran de 84, 69, 32 y 22 kDa. Además ellos encontraron que en los estadíos tempranos del proceso de esporulación se detectaban principalmente las PCHT de 84 y 32 kDa. En este estudio se estableció además que el homólogo de la PCHT GroEL de *E. coli*

mostró un peso molecular de 69 kDa y que no fue muy abundante durante los estadíos tardíos de la esporulación, en tanto que el homólogo de DnaK, cuyo peso molecular fue de 84 kDa, se sintetizaba en forma abundante durante todo el proceso de esporulación.

En 1990 Strnadová *et al* establecieron que la PCHT 70 , que se sintetizaba en grandes cantidades en *B. megaterium* , no incrementaba los niveles de esporas resultantes, por lo que sugirieron que esta PCHT no era importante en la formación de esporas.

En general podemos decir que la relación de las PCHT con el proceso de esporulación es controversial. Uno de los objetivos de este trabajo fué determinar si en *C. perfringens* se producía esta relación.

c) PCHT Y TERMOTOLERANCIA.

Muchos de los tratamientos físicos usados en el procesamiento de los alimentos están destinados a matar o disminuir de número de microorganismos contaminantes y deteriorantes. Sin embargo, si el tratamiento no es lo suficientemente severo, la población microbiana puede ser dañada pero después recuperarse y sobrevivir (Iandolo, J.J. y Z.J. Ordal, 1966).

Existe evidencia que sugiere que las PCHT están involucradas en la adquisición, mantenimiento y disminución de la termotolerancia, es decir que cuando las células son expuestas a un choque térmico moderado por un tiempo específico, se produce la inducción de resistencia a temperaturas que, bajo condiciones normales, resultarían letales para la célula (Bunning, V.K. *et al.* 1990).

Li y Werb (1982) al estudiar el efecto de choques térmicos subletales sobre la adquisición de termotolerancia en células eucarióticas (fibroblastos de hámster chino), observaron que un choque térmico de entre 41 y 46°C incrementaba de 10^2 a 10^6 veces la tolerancia de las células a un tratamiento térmico letal; además demostraron que esta resistencia al calor se prolongó

hasta más de 36 h después del choque subletal. Ellos establecieron además que dos proteínas, con masas de 70 y 87 kDa eran especialmente abundantes durante este proceso. Por otra parte, cuando Laszlo (1988) realizó estudios con las mismas células, estableció que la HSP 70 era la única proteína involucrada en la tolerancia al calor.

Sin embargo en trabajos con *Saccharomyces cerevisiae* realizados por Smith y Yaffe (1991), se observó que las PCHT no eran importantes para la adquisición de termotolerancia. Estas deducciones las hicieron al obtener una mutante carente de expresión de PCHT que si podía adquirir resistencia térmica después de un choque térmico moderado. Sin embargo, en ese mismo año Sanchez y Lindquist, establecieron que la PCHT 104 era necesaria para la inducción de termotolerancia en *S. cerevisiae*. Por lo que la relación entre PCHT y termotolerancia hasta ese momento resultaba incierta. Esta controversia motivó a más grupos de investigadores para trabajar en el tema.

Cuando Piper (1993) estudió la relación entre PCHT y adquisición de termotolerancia en esa misma levadura (*S. cerevisiae)* encontró que solo unas cuantas PCHT estaban involucradas en el proceso termotolerante.

Berg *et al* (1987) cuando trabajaron con levaduras psicrofílicas (*Trichosporum pullulans* y *Sporobolomyces salmonicolor*) establecieron que la inducción de las PCHT eran indispensables para la adquisición de termotolerancia. Además determinaron que la respuesta tolerante se prolongaba 4 h después del choque térmico.

Otra evidencia de la importancia de las PCHT en la adquisición de termotolerancia viene de trabajos realizados por Koishi *et al* (1992) en una línea celular humana de carcinoma de colon. Ellos utilizaron un inhibidor de la síntesis de todas las PCHT (quercetina) y observaron que también se inhibía la adquisición de tolerancia al calor.

Cuando el estudio de la relación PCHT y termotolerancia se extendió a los organismos procariotes se observó algo similar a lo encontrado en

eucariotes. Mackey y Derrick (1986) trabajaron con *Salmonella thompson* y demostraron que la resistencia al calor (de 50, 52, 55, 57 o 59°C) se incrementó de 2.6 hasta 20 veces cuando sometían a la bacteria a un choque térmico moderado de 37 a 42, 45 o 48°C. Un año después estos mismos investigadores establecieron que la capacidad protectora debida al choque térmico subletal también era observada cuando el ensayo lo realizaron en alimentos. Ellos sugirieron que este fenómeno de resistencia producido por el choque térmico puede tener grandes implicaciones para la sanidad de los alimentos.

Trent *et al* (1990) realizaron ensayos de termotolerancia en el organismo termófilo *Sulfolobus* sp. y determinaron que un prechoque térmico a 70°C hizo a las células hasta 6 veces más tolerantes a 92°C en comparación con los controles que no recibieron dicho tratamiento. Ellos encontraron que la síntesis de proteínas se detenía parcialmente y que solamente tres proteínas podían detectarse. La más abundante tenía un peso molecular de 55 kDa, en tanto que las otras tenían masas de 28 y 35 kDa. Ninguna de ellas mostró identidad inmunológica con las PCHT GroEL y DnaK de *E. coli*, por lo que sugirieron que las proteínas sintetizadas no jugaban un papel crucial en el proceso de termotolerancia. Sin embargo un año después Dean y James realizaron mutaciones al gen que codifica para la PCHT DnaK de *E. coli*. Ellos establecieron que una deleción pequeña del gen permitía crecer a las células a altas temperaturas, en tanto, que una mutación mayor impedía su crecimiento. Por lo anterior, ellos concluyeron que la proteína DnaK era necesaria en el proceso de termotolerancia.

Para determinar si el fenómeno de adquisición de termotolerancia por efecto de un choque térmico subletal ocurría en organismos filogenéticamente distanciados, Trent *et al* (1994) aplicaron choques térmicos subletales a *Bacillus caldolyticus* (eubacteria), *Sulfulobus shibatae* (arqueobacteria) y *Thermomyces lanuginosus* (eucariote). Ellos establecieron que el choque térmico si inducía tolerancia térmica. Sin embargo, cuando analizaron las proteínas involucradas

en la resistencia, establecieron que los organismos sintetizaban diferentes proteínas. Para *B. caldolyticus* se observó que la proteína dominante tenía un peso molecular de 70 kDa, en tanto que la de *S. shibatae*, era de 55 kDa. En el caso de *T. lanuginosus* se producían dos proteínas principales con masas de 31 y 33 kDa.

Cuando K. Bunning *et al* (1990) realizaron experimentos similares con *Listeria monocytogenes* y *Salmonella thypimurium* . Establecieron que *S. thypimurium* presentaba adquisición de termotolerancia después de un choque térmico moderado; sin embargo con *L. monocytogenes* la tolerancia mostrada no fue significativamente diferente a la de los controles. Por lo anterior sugirieron que en esta bacteria no se presentaba la relación choque térmico-termotolerancia. Contrario a esas observaciones en ese mismo año, Farber y Brown, cuando realizaron los experimentos de tolerancia al calor de *Listeria* en muestras cárnicas, establecieron que un choque térmico de 48°C por 120 min producía termotolerancia a 64°C. Además determinaron que la tolerancia se prolongaba hasta por 24 h posteriores al choque térmico inicial.

En general la relación entre la adquisición de termotolerancia y las PCHT ha sido estudiada y encontrada en otros organismos como Cianobacterias (Blondin, P.A., *et al.*, 1993), *Lactobacillus bulgaricus* (Teixeira, P., *et al.*, 1994), *Salmonella enteritidis* (Humphrey, T.J. *et al.*, 1991) y *Streptococcus thermophilus* (Auffray, Y., *et al.*, 1995).

Recientemente Boutibonnes *et al* (1995) establecieron que en *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* IL1403 se presentaban dos tipos de adquisición de termotolerancia, uno de ellos era dependiente de la síntesis de PCHT, en tanto que otro era independiente. Además ellos mencionaron que en la respuesta dependiente de PCHT los homólogos de las proteínas GroEL , DnaK y la PCHT 104 no jugaban un papel importante.

Los organismos esporulados pueden soportar condiciones adversas, y posteriormente germinar y desarrollarse en el entorno en que se encuentran.

Como ya se mencionó, hay evidencias que establecen la importancia de las PCHT en el proceso de esporulación bacteriana. Debido a esto, varios investigadores estudiaron el efecto de un choque térmico subletal sobre la adquisición de tolerancia al calor en esporas. Tal fue el caso de Etoa y Michiels (1988), quienes demostraron que si las esporas de *B. stearothermophilus* eran sometidas a un choque térmico de 63°C adquirían resistencia para sobrevivir a tratamientos térmicos extremos (121°C).

Sedlák, M., *et al.* (1993) demostraron que un choque térmico aplicado a células de *B. megaterium* durante el proceso de esporulación, incrementaba la termotolerancia de las esporas resultantes.

En trabajos realizados por Roy *et al* (1981) en donde sometieron a calentamiento progresivo controlado, a un producto cárnico contaminado con *C. perfringens*, se determinó que las células eran más resistentes al calor que aquellas que no recibieron esa adaptación térmica. Esto podría semejarse a una condición parecida a aquella producida por un choque térmico subletal.

Por otra parte, se conoce que las esporas de *C. perfringens* formadas a 43°C son más termotolerantes que las producidas a 37°C y estas a su vez que las formadas a 32°C (García-Alvarado, J.S., *et al.*, 1992). Con todo lo anterior, y siendo *C. perfringens* un patógeno de alimentos, la relación existente entre la aplicación de cambios térmicos y la adquisición de termotolerancia, tanto en células vegetativas como en esporas, resulta de gran interés, por su posible influencia en la calidad sanitaria de alimentos, por lo que uno de los objetivos de este trabajo fue abordar este aspecto.

d) PCHT COMO ANTIGENOS INMUNODOMINANTES.

El papel de las PCHT en inmunidad es sumamente extenso. Se ha establecido que las PCHT tienen funciones importantes en diferentes aspectos de la inmunidad. Evidencias recientes sugierén que ciertas PCHT participan en

la síntesis de inmunoglobulinas humanas y en la presentación y procesamiento del antígeno durante la respuesta inmune. Además las PCHT de una amplio espectro de patógenos, figuran entre los principales antígenos reconocidos por el sistema inmune. Finalmente estas proteínas se han visto involucradas en procesos de autoinmunidad tales como artritis reumatoide (Jaattela, M y D. Wissing, 1992).

Durante las infecciones bacterianas, la interacción entre el patógeno y el hospedero genera situaciones de estrés para ambos organismos. Como respuesta a estas condiciones adversas está bien establecido que se sintetizan proteínas del estrés, las cuales permiten a la célula sobrevivir los procesos de tensión. Se ha encontrado que algunas de las proteínas del estrés del patógeno son antígenos inmunodominantes e incluso son factores de virulencia. Esto ha hecho pensar a muchos investigadores en la posibilidad de utilizarlas como vacunas prometedoras contra un grupo de enfermedades, debido a la gran homología entre estas en los diferentes organismos. Sin embargo, un gran problema al que se han enfrentado los investigadores es que dichas vacunas también pudieran actuar contra las PCHT del mismo organismo al que se quiere proteger, lo cual provocaría problemas autoinmunes.

Varios grupos de investigadores trabajan hoy en día a fin de encontrar una PCHT o alguna fracción inmunodominante específica de células procarióticas para la elaboración de la "vacuna del futuro" (Morimoto, R.I., *et al.* 1990; Young, D.B., 1992). Así de acuerdo con esto, una serie de grupos de investigadores han estado determinando la presencia y las características de las PCHT inmunodominantes de varios organismos tales como *Mycobacterium tuberculosis* (Young, D.B. y T.R. Garbe, 1991), *M. leprae* (Jaattela, M y D. Wissing, 1992), *Brucella melitiensis* (Spencer, S.A., *et al.*, 1994), *B. abortus* (Young, D B 1992), *Haemophilus ducrey* (Brown, T.J., *et al.*, 1993), *Salmonella typhimurium* (Ensgraber, M. y M. Loos, 1992), *Cándida albicans* (Young, D.B., 1[illegible]),

Campylobacter jejuni (Wu, Y.L., *et al.*, 1994), *Borrelia burdorferi, Brugia malay, Chamydia trachomatis, Coxiella pneumophila, Plasmodium falciparum, Schistosoma mansoni, Treponema pallidum* y *Trypanosoma cruzi* (Jaattela, M y D. Wissing, 1992), entre otras. Una característica importante es que la mayoría de las PCHT inmunodominantes que se han encontrado, pertenecen a las familias PCHT 60 y PCHT 70. La información anterior se encuentra resumida en la tabla 1.

El papel de las PCHT en autoinmunidad es apoyada por las siguientes evidencias: a) las PCHT inducen la formación de autoanticuerpos en el hospedero, b) los pacientes con varios desórdenes autoinmunes, como lupus eritematoso sistémico y artritis reumatoide, tiene autoanticuerpos contra PCHT, c) la PCHT 60 de micobacterias estimula el crecimiento de células T en tejido sinovial de pacientes con artritis reumatoide y d) se pueden encontrar niveles elevados de PCHT 60 en cartílagos y en nódulos reumatoides de pacientes con artritis reumatoide, pero no se localizan en pacientes sanos (Jaattela, M y D. Wissing, 1992).

Debido a la importancia de las PCHT y las características inmunológicas que presentan en los organismos estudiados, y tomando en cuenta la importancia de *C. perfringens* como causante de varias enfermedades, consideramos de gran interés determinar si el microorganismo posee proteínas del choque térmico inmunodominantes, por lo que uno de los objetivos de este trabajo trata este aspecto.

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

Patógeno	Enfermedad	PCHT encontrada (kDa)
Brucella abortus	brucelosis	60
Brucella melitiensis	brucelosis porcina	62
Borrelia burgdorferi	enfermedad de Lime	60
Brugia malay	filariasis	70
Campylobacter jejuni	gastroenteritis	65, 45, 12 y 10
Candida albicans	candidiasis	90
Chlamydia pneumoniae	neumonia	60
Chlamydia psitaci	psitacosis	60
Chlamydia trachomatis	tracoma	60
Coxiella burnetii	fiebre Q	60
Haemophilus ducrey	chancroide	58.5
Legionella pneumophila	enfermedad de los legionarios	60
Mycobacterium tuberculosis	tuberculosis	60, 70 y PCHT de bajo peso
Mycobacterium leprae	lepra	60, 70 y PCHT de bajo peso
Plasmodium falciparum	malaria	70, 90
Salmonella typhimurium	salmonelosis	66
Schistosoma mansoni	esquistosomiasis	70
Treponema pallidum	Sífilis	60
Trypanosoma cruzi	enfermedad de chagas	70

HIPOTESIS

Clostridium perfringens responde al choque térmico provocando alteraciones en la síntesis de proteínas, en la producción de toxinas y en la resistencia al calor.

OBJETIVOS

1.- Determinar el efecto de un choque térmico sobre el crecimiento de *células vegetativas y en esporulación.*

2.- Estudiar el efecto de un choque térmico sobre la esporulación de la bacteria.

3.- Determinar el efecto de un choque térmico sobre la producción de enterotoxina y fosfolipasas C de *C. perfringens.*

4.- Precisar el efecto de un choque térmico sobre la tolerancia al calor de células vegetativas y esporas.

5.- Estudiar el efecto de un choque térmico sobre el patrón de proteínas producidas por la bacteria. Determianr los pesos moleculares y la localización subcelular de las proteínas específicas.

6.- Determinar la producción de homólogos de GroEL y DnaK en *C. perfringens.*

7.- Establecer la existencia de anticuerpos contra PCHT de *C. perfringens* en animales enfermos de gangrena gaseosa.

MATERIAL Y METODOS

MANTENIMIENTO DE LAS CEPAS.

Las cepas de *C. perfringens* utilizadas en este trabajo fueron la FD-1041 (enterotoxigénica) obtenida del Dr. Stanley Harmon del Centro para el Control de Enfermedades de E.U.A. y la cepa FD-1 (no enterotoxigénica) proporcionada por el Dr. Ronald G. Labbé de la Universidad de Massachusetts, E.U.A.

Las bacterias al ser recibidas se inocularon en caldo con tioglicolato y se incubaron a 37°C durante 16 h. A partir de estos cultivos, para cada cepa se inocularon tubos con medio de carne cocida según Robertson (Willis, A.T., 1960), y se incubaron a 37°C durante 72 h. Estos cultivos se guardaron a -20°C como reserva y se hicieron resiembras de ellos cada 8 a 12 meses.

INOCULO

A partir del cultivo de reserva se tomó una alícuota y se añadió en un tubo con 10 ml de caldo con tioglicolato e inmediatamente se colocó en un baño de agua a 75°C por 15 min (con el fin de activar el proceso de germinación de las esporas). Posteriormente se enfriaron con agua a temperatura ambiente y se incubaron a 37°C por 16 h.

EFECTO DEL CHOQUE TERMICO SOBRE EL CRECIMIENTO.

a) CELULAS VEGETATIVAS.

A partir de la cepa activada, se inocularon (1%) tubos con 2 ml de caldo con tioglicolato recién preparado. Los cultivos fueron incubados a 37 y 43°C en un baño de agua, y cuando alcanzaron la parte media de la fase logarítmica (A_{600} 0.6-0.8, en un espectrofotómetro Sequoia-Turner modelo 340) se

transfirieron a baños de agua a 50, 52, 55, 56, 58, 60 y 65°C por diferentes intervalos de tiempo. Posteriormente los cultivos fueron retornados a la temperatura de incubación original (37 o 43°C), hasta completar un total de 8 h.

Durante todo este proceso se midió el crecimiento de los cultivos cada hora mediante lecturas espectrofotométricas y cuenta viable en placa. Esta última consistió en realizar diluciones decimales de alícuotas de los cultivos y después de sembrarlas en cajas Petri, agregarles medio nutritivo con agar (1.5% tripticasa peptona, BBL, 1.0% extracto de levadura Difco y 1.5% agar, Difco). Después que las cajas solidificaron se incubaron en el sistema de anaerobiosis Gas-Pack Plus (BBL) a 37°C durante 24 a 48 h (Heredia, N.L. *et al.*, 1992).

b) CELULAS EN ESPORULACION.

Se activaron las cepas de la manera descrita anteriormente y se inocularon (1%) tubos con 2 ml de medio de Duncan y Strong (DS) previamente *reducido y suplementado con rafinosa como el carbohidrato del medio* (García-Alvarado, J.S., *et al.*, 1992). Antes de inocular los tubos fueron alcalinizados mediante la adición de 1.25% de una solución de carbonato de sodio estéril 0.66 M. Los tubos se incubaron a 37 o 43°C en un baño de agua y cuando alcanzaron una A_{600} 0.1-0.2 (alrededor de 3 h cuando la incubación fue a 37°C, o 2 h cuando se realizó a 43°C) fueron transferidos a un baño de agua a 50°C o 52°C. Ahí fueron mantenidos por 30 min. Terminado este tiempo, los cultivos se retornaron al baño de agua a 37 o 43°C y se continuó la incubación por un total de 8 h.

Durante todo este tiempo se tomaron alícuotas cada hora y se realizó cuenta viable en placa. El procedimiento utilizado fue como se especificó en el punto anterior.

EFECTO DE UN CHOQUE TERMICO SOBRE LA FORMACION DE ESPORAS.

CULTIVO:

Para esto se utilizaron ambas cepas las cuales se activaron de la manera ya descrita. La forma de cultivarse se realizó de la manera especificada en el punto inmediato anterior, sin embargo, para este ensayo los choques térmicos se aplicaron a la primera, segunda, tercera, cuarta o quinta hora.

DETERMINACION DE ESPORAS

A lo largo del cultivo se tomaron muestras cada hora y se colocaron en agua con hielo. Posteriormente se colocaron en un baño de agua a 75°C por 15 min, con el fin de eliminar a las células vegetativas y dejar sólo a las esporas. Enseguida se realizaron diluciones decimales para después determinar cuenta viable utilizando el medio nutritivo con agar y las condiciones de incubación descritas anteriormente.

EFECTO DE UN CHOQUE TERMICO SOBRE LA PRODUCCIÓN DE TOXINAS.

a) ENTEROTOXINA.

CULTIVO.

Para este fin se utilizó la cepa enterotoxigénica FD-1041, la cual se activó de la manera descrita anteriormente. De esta se inocularon (concentración final 1%) tubos con 2 ml de medio DS y se incubaron en un baño de agua a 43°C.

Cuando los cultivos tenían 1 o 3 h de incubación, se les aplicó un choque térmico de 50°C por 30 min y posteriormente se retornaron a la temperatura de

incubación original (43°C) hasta completar un total de 8 h. A lo largo de este procedimiento se tomaron muestras cada hora para determinar la concentración de enterotoxina presente.

EXTRACTO CELULAR:

Debido a que la enterotoxina se acumula intracelularmente, fue necesario obtener el extracto celular. Para esto los cultivos se centrifugaron a 10,000 x g por 15 min a 4°C, utilizando una centrífuga IEC modelo HN-SII. El paquete celular obtenido se lavó mediante centrifugación y eliminación del sobrenadante, en dos ocasiones con amortiguador de fosfatos 20 mM, pH 6.8. Posteriormente las células se rompieron por ultrasonido utilizando 50 unidades de intensidad, con intérvalos de un minuto de actividad y uno de descanso en un sonicador Biosonik (modelo BIO-II). El procedimiento se mantuvo hasta obtener aproximadamente un 95% de esporas libres. Posteriormente la muestra se centrifugó a 12,000 x g por 20 min a 4°C. Al sobrenadante obtenido (extracto celular) se le determinó la cantidad de enterotoxina.

DETECCION Y CUANTIFICACION DE LA ENTEROTOXINA (CONTRAINMUNOELECTROFORESIS)

Esta técnica se desarrolló de acuerdo a la metodología descrita por Naik y Duncan (1977) con algunas modificaciones, las cuales se describen a continuación.

Se utilizó una solución de agarosa tipo III (alta electroendosmosis) al 0.06% disuelta en amortiguador de barbital 0.06 M, pH 8.6. De esta solución se añadieron 39 ml a una placa de vidrio de 14 x 14 cm previamente recubierta con una fina capa de agar al 1% disuelto en el mismo amortiguador.

Después que la agarosa solidificó, se hicieron 5 hileras de pozos dobles con un diámetro de 4 mm, distanciados 5 mm entre cada pozo y 1.3 cm entre cada hilera.

Los estándares de enterotoxina, producidos en nuestro laboratorio (Heredia, N.L. *et al*, 1994), que contenían 25, 12.5, 6.2, 3.1, 1.6, 0.8, 0.4 y 0.2 µg/ml, así como las muestras a examinar fueron colocadas (10µl) en los pozos de las hileras más cercanas al cátodo. El suero antienterotoxina se diluyó 1:2 y se aplicó en los pozos de las hileras más próximas al ánodo, en la misma cantidad que el antígeno.

Inmediatamente después se realizó una electroforesis horizontal, en una cámara hechiza utilizando el amortiguador de barbital en los reservorios y se utilizó papel filtro como puente entre la placa y los reservorios. Se aplicaron 12 mA por 30 min.

Las placas se colocaron en seguida en una cámara húmeda y se mantuvieron a temperatura ambiente por 12 a 14 h. Posteriormente se determinó la presencia de bandas de precipitación. La concentración de enterotoxina se obtuvo al comparar la última concentración del estándar que mostró banda, con la última dilución de la muestra en que se observó zona de precipitación.

b) FOSFOLIPASA C:

CULTIVO:

Para este punto se utilizó la cepa FD-1041, la cual fue activada de la manera anteriormente descrita. De esta se inocularon al 1% (concentración final del inóculo) tubos con 2 ml de caldo con tioglicolato o caldo infusión cerebro y corazón (Difco) recién reducido. Los cultivos se incubaron en un baño de agua a 37°C. Al obtener una A_{600} de 0.8-0.9 (alrededor de las 3 h de incubación) fueron sometidos a un choque térmico de 50°C por 30 min. Posteriormente se retornaron a la temperatura de incubación original (37°C) y el procedimiento se continuó hasta completar 8 h totales.

A lo largo del procedimiento, se tomaron muestras cada h, las cuales se centrifugaron a 15,000 x g por 20 min a 4°C. Posteriormente se recuperó el

sobrenadante del cultivo, al cual se le determinó la toxina. Este se colocó en tubos limpios (1 ml) y fueron liofilizados a fin de concentrar la muestra. Una vez así se almacenaron a -20°C hasta que se realizó la determinación de fosfolipasa C.

DETERMINACION DE LA EXOTOXINA:

Los sobrenadantes secos fueron resuspendidos en 200 µl de agua destilada estéril y en ellos se cuantificó la fosfolipasa presente mediante los métodos siguientes:

i) Método modificado de difusión.

Este ensayo fue reportado por Wigley (1990), y consistió brevemente en lo siguiente: como sustrato se utilizó fosforil colina (Sigma Chemical Co) a una concentración de 5 mg/ml, resuspendido en amortiguador Tris-HCl 30 mM pH 7.4 con 1 mM de NaCl, 1.1% de agar agar y 0.01% de azida de sodio como conservador. La suspensión se calentó hasta la disolución del agar y se vació en cajas Petri hasta formar una capa de 1.5 mm de grosor, posteriormente se hicieron pozos de 3 mm de diámetro. En estos se colocaron 5 µl de los sobrenadantes a probar o de diferentes concentraciones de un estándar de fosfolipasa C (Sigma Chemical Co).

Las cajas se incubaron a 37°C por 6 h, al término de lo cual se midieron los halos de opalescencia alrededor de cada pozo y se correlacionó con los diámetros mostrados por los estándares.

Método turbidimétrico modificado de Van Heyningen.

Este ensayo se basó en el método descrito por Van Heyningen, perfeccionado por Mollby *et al* (Jolivet, C *et al* 1988) y modificado en nuestro laboratorio. Este se basa en la medición de un incremento en la turbidéz de una suspensión de lecitina después de su incubación con fosfolipasa C.

El método consistió brevemente en lo siguiente: a 100 µl de los sobrenadantes de los cultivos se adicionó un ml de la solución de trabajo del sustrato (0.9 g de lecitina de soya suspendida en 25 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.2 con 0.158 M de NaCl y 2.4% de colato de sodio. La solución de trabajo consistió en diluir 16 ml de esta solución en 100 ml de amortiguador Tris-HCl 20 mM pH 7.2 con 0.158 mM de NaCl, 10 mM de acetato de calcio y 0.2 mM de Cloruro de zinc). Los tubos fueron mezclados e incubados por 1 h a 37°C. Al finalizar este tiempo la reacción se detuvo por la adición de 10 µl de EDTA 0.2 M. El incremento en la turbidéz fue cuantificado a 510 nm en un espectrofotómetro Coleman Junior (mod 340).

Una unidad de actividad se definió arbitrariamente como la cantidad de enzima que causaba un incremento en la turbidéz de 0.2 unidades de absorbancia por hora.

Método colorimétrico de p-nitrofenil fosforil colina

Para este método desarrollado por Sato, Chiba y Sato (1989), se preparó una solución de p-nitrofenilfosforilcolina (Sigma Chemical Co) a una concentración de 10 mg/ml. Se colocaron 50 µl de esta solución en una microplaca (Dynatech) de 96 pozos y se hicieron reaccionar con 100 µl de los sobrenadantes a probar o de los estándares. La mezcla se incubó a 37°C por 60 min al cabo de lo cual se detuvo la reacción mediante la adición de 100 µl de EDTA 5 mM. La densidad óptica de los pozos se determinó a 405 nm en un espectrofotómetro para microplacas (BioTek modelo EL 311).

período de 30 min. Terminado este tiempo, las células se sometieron a los ensayos de termotolerancia a 55°C.

c) MEDICION DE LA TERMOTOLERANCIA

Esporas:

Las suspensiones de esporas lavadas se ajustaron a una densidad óptica de 0.5 (600 nm, en el espectrofotómetro Sequoia Turner modelo 340). Se tomaron alícuotas de 1 ml y se colocaron en tubos de 13 x 100.

Los tubos fueron colocados a 85°C en un baño de agua en el caso de la cepa FD-1 y a 95°C para la FD-1041 por diferentes intervalos de tiempo.

Para determinar la cantidad de esporas sobrevivientes en las suspensiones calentadas, se realizó una cuenta viable en placa de la manera descrita anteriormente.

Tomando en cuenta que durante el proceso de calentamiento siempre ocurre una reducción decimal cada cierto tiempo, el cual es constante, una reducción decimal en el número de esporas sobrevivientes siempre es causada por el mismo número de minutos de calentamiento, y se puede usar ese valor como una medida de resistencia al calor. Este tiempo es conocida como valor "D" (García-Alvarado, J.S., *et al.*, 1992).

Eso significa que si graficamos el tiempo de calentamiento a una temperatura particular contra el $\log_{10n}$ (donde n es el número de esporas sobrevivientes en cierto tiempo), resultaría una línea recta, que representaría una relación descrita como exponencial

Para el trazado de la línea recta, se empleó el método de regresión lineal y para comparación de pendientes se utilizó el análisis de distribución de "t" para muestras pequeñas. Los experimentos se hicieron al menos por duplicado y de cada uno se realizaron al menos tres repeticiones.

Células vegetativas:

Inmediatamente después del choque térmico, las células se transfirieron a un baño de agua a 55°C. Allí se dejaron por intervalos de tiempo diferentes y posteriormente se determinó la sobrevivencia de las células mediante cuenta viable de la manera ya descrita. El valor "D" se determinó de las gráficas de muerte térmica.

DURACION DE LA TERMOTOLERANCIA ADQUIRIDA DE CELULAS VEGETATIVAS.

Para determinar la duración de la termotolerancia adquirida, una vez terminado el choque térmico, los cultivos en medio de tioglicolato se retornaron a la temperatura de incubación original (43°C). Allí fueron mantenidos por 1, 2 o 3 horas. Después de este tiempo, se determinó la termotolerancia a 55°C de la manera descrita anteriormente

EFECTO DEL CHOQUE TERMICO SOBRE EL PATRON DE PROTEINAS.

a) ENSAYO DE INCORPORACION DE ^{35}S

Para determinar la concentración de isótopo a utilizar se realizaron curvas de incorporación. Para esto se activó la cepa FD-1041 de la manera ya especificada y a partir de ella se inocularon tubos con 2 ml de caldo con tioglicolato y se incubaron a 37 o 43°C en un baño de agua.

Al llegar a la parte media de la fase log (A_{600} de 0.6-0.8, en el espectrofotómetro anteriormente especificado), los cultivos fueron transferidos a 50 o 52°C. Después de 5 min se agregaron 12, 20, 50, 75 o 100 µCi/ml de una mezcla de metionina y cisteína marcadas con ^{35}S (Trans ^{35}S-label, ICN

Biomedicals), y se continuó la incubación por 25 min más. Para finalizar el marcaje se adicionaron 40 µg/ml de metionina no radioactiva y las muestras se colocaron en un baño de agua con hielo (2-4°C).

Para determinar la incorporación del isótopo durante el marcaje, se tomaron alícuotas del cultivo cada 5 min y se colocaron en un baño de hielo por 15 min. Después se tomaron 5 µl de la muestra y se colocaron en el centro de un filtro de fibra de vidrio (Whatman, GF/A). Una vez que la muestra se secó, el filtro se colocó en una caja Petri con ácido tricloroacético al 30%, en donde se mantuvo por 5 min con agitación ocasional. Terminado este tiempo los filtros se lavaron utilizando solución salina al 0.85%. Después estos se colocaron en otra caja Petri con etanol al 95%, por 5 min.

Finalmente los filtros se secaron y posteriormente se colocaron en un frasco para centelleo al cual se le agregaron 5 ml de difeniloxazol (Sigma) al 5% disuelto en tolueno. Se determinó la radioactividad en los frascos mediante un contador de centelleo líquido Tm Analytic Delta (mod. 300) leyendo por 5 min cada uno. En el aparto utilizó el estándar de azufre para las lecturas..

b) METODOS DE ROMPIMIENTO CELULAR

Se probaron diferentes métodos con el fin de solubilizar las células para el análisis de proteínas:

1) N-octil- β-D- galactopiranosa:

Se preparó una solución de N-octil-β-D-galactopiranosa al 2% en agua bidestilada. Se mezcló con un volumen igual de suspensión de células y se dejaron incubando por 30 min a 37°C.

2) Amortiguador de muestra 4 X de electroforesis en condiciones disociantes.

Algunos autores lo utilizan como amortiguador para la solubilización celular. Esta solución se compuso de β-mercaptoetanol al 20%, SDS al 10% (p/v), azul de bromofenol al 0.02% (p/v), glicerol al 40% (p/v) y TRIS al 3% (p/v), todo

con un pH final de 6.8. Esta solución se añadió (1:1) a una suspensión de células, se agitó inmediatamente para después se colocó en un baño de agua a 95-100°C por 2 a 3 min (Lopes Gomes, S., *et al.*, 1986; Wallington, E.J. y P.E. Lund, 1994).

3) Amortiguador Tris-HCl pH 8.0

Este consistió en resuspender el paquete celular procedente de 2 ml de cultivo en un volumen igual de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0 e incubar la mezcla a 37°C por un tiempo de 40 min (Holmquist, L., *et al.*, 1993).

4) Amortiguador Tris-HCl pH 8.0 con $CaCl_2$ y NaCl.

En este método se resuspendió el paquete celular de 2 ml de cultivo en un volumen igual de amortiguador Tris-HCl 50 mM pH 8.0 el cual contenía 2 mM de $CaCl_2$ y 0.3 mM de NaCl. Después de una agitación suave, la mezcla se incubó a 37°C por 30 min.

5) Método de Abraham y Rood.

El método consistió en la resuspención del paquete celular procedente de 2 ml de cultivo, en un volumen igual de amortiguador TES (Tris-HCl 30 mM pH 8.0, EDTA 5 mM y 50 mM de NaCl) con sacarosa al 25%. Posteriormente se adicionaron 0.4 ml de una solución de lisozima de huevo (10 mg/ml en TES). La mezcla fue incubada a 37°C por 30 min. Terminado este tiempo se adicionaron 0.8 ml de una solución de EDTA 250 mM y se incubó de nuevo a la misma temperatura por 5 min. El procedimiento de de rompimiento se finalizó con la adición de 0.5 ml de una solución de SDS al 10% y una incubación adicional de 5 min a 37°C (Abraham, J.L. y J.I. Rood, 1995).

6) Método modificado de Qoronfleh y Streips.

Se realizó una modificación al método original reportado por estos autores (1897), y consistió en resuspender el paquete celular procedente de la centrifugación de 2 ml de cultivo en 2 ml de amortiguador Tris-HCl 30 mM pH 7.6, al cual se le adicionó lisozima de huevo (concentración final 500 µg/ml) y DNAsa (concentración final 50 µg/ml). Después de homogeneizar el paquete en esta solución, se incubó a 37°C por 30 min, e inmediatamente después la suspensión fue congelada a -20°C por 12 a 14 h.

c) ANALISIS DE PCHT TOTALES.

Para la determinación de proteínas totales, las suspensiones obtenidas en el paso anterior, se les añadió un volumen igual de amortiguador de muestra 4X (mencionado en los métodos de lisis celular) y después se colocó en un baño de agua a 95-100°C por 2 a 3 min.

d) DETERMINACION DE LA LOCALIZACION SUBCELULAR DE LAS PCHT

Debido a que la respuesta al choque térmico fue mas intensa cuando el cultivo se incubó a 37°C y se sometió después a 50°C, los experimentos de esta sección se realizaron a 37°C.

Los cultivos se centrifugaron a 13,000 x g a 4°C. Los sobrenadantes se recuperaron y congelaron a -20°C hasta su procesamiento. Las células cultivadas se desintegraron mediante el método de Quaronfleh y Streips (especificado anteriormente). Después la suspensión fue ultracentrifugada a 223,000 x g a 4°C por 2 h utilizando una ultracentrífuga Dupont-Sorval (mod. Ultra 80). Enseguida se recuperó cuidadosamente el sobrenadante (extracto celular o fracción citosólica) y el precipitado (envoltura celular). Este último fue resuspendido en solución salina al 0.85% y fue centrifugado nuevamente. El precipitado lavado se secó mediante la utilización de un concentrador Savant (modelo SC-110). La fracción citosólica y el sobrenadante del cultivo fueron

colocados en volúmenes de 1 ml en tubos eppendorff y se secaron de la misma manera. Todas las muestras secas fueron almacenadas a -20°C hasta su uso.

En todas las fracciones (sobrenadante del cultivo, extracto celular y envoltura celular) se cuantificó la radiactividad presente (ccp) utilizando el ensayo de incorporación anteriormente citado.

e) ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA.

Para determinar la cantidad de proteína presente en las muestras marcadas se trató de utilizar el método de ácido bicinconínico (Pierce). Sin embargo, la alta concentración de lisozima utilizada para el rompimiento celular por el método de Abraham y Rood impidió la determinación certera de proteína en las muestras marcadas. Debido a lo anterior, las muestras fueron ajustadas a 20,000 cpm cuando el método de rompimiento fue el de Abraham y Rood. Cuando la muestra fue solubilizada por el método de Quoronfleh y Streips, los sobrenadantes, los extractos y las envolturas celulares fueron ajustados (mediante dilución con agua bidestilada) a 200,000 cpm para el caso de envolturas y extractos celulares y de 500,000 cpm para los sobrenadantes. Todas las muestras se mezclaron con un volumen igual de *amortiguador de muestra 4X (especificada anteriormente) y se mantuvieron en* un baño de agua hirviendo por 2 a 3 min. Después los tubos se centrifugaron a 10,000 x g por 5 min para eliminar el material insoluble.

Para la separación de las proteínas se siguió la metodología descrita por Hames (1981) con ligeras modificaciones. Esta consistió brevemente en lo siguiente: la muestra (25-50 µl) se sometió a electroforesis en un gel de poliacrilamida discontinuo en condiciones disociantes, con un gel separador al 10 o al 12.5% de 1.0 mm de grosor y un gel concentrador al 2.5%. Se aplicaron 120 V para la concentración de las proteínas y 150 Volts para su separación. El

gel se mantuvo a 15°C mediante un sistema de enfriamiento de la cámara de electroforesis.

Después de la electroforesis, el gel se colocó en una solución colorante (azul Coomassie R-250 al 0.1% , metanol al 50% y ácido acético al 10%) durante un tiempo promedio de 3 h con agitación contínua. Para eliminar el exceso de colorante del gel se colocó en una solución desteñidora (ácido acético al 10%) con agitación constante y varios recambios. El proceso de tinción se realizó con el fin de determinar la ubicación de los marcadores de peso molecular y señalarla mediante una punción del gel con una pipeta Pasteur.

Como marcadores de peso molecular se utilizaron anhidrasa carbónica (PM 29 kDa), albúmina de huevo (PM 45 kDa), albúmina bovina (PM 66 kDa), fosforilasa B (PM 97.4 kDa) y β-galactosidasa (PM 116 kDa). Estos se adquirieron en la Compañía Sigma Chemical Co.

f) FLUOROGRAFIA

Este método se realizó para intensificar la señal radioactiva y así poder tener mejores resultados.

Después de la separación de proteínas por la electroforesis y el teñido de los geles, estos fueron colocados en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma Chemical Co) concentrado por 45 min con agitación constante. Al término de este tiempo, se hicieron dos recambios más con la misma solución.

Posteriormente el gel se colocó en una solución de difenil oxazol (PPO, Sigma Chemical Co) al 22% disuelto en DMSO. El gel se mantuvo en esta solución con agitación constante durante 12 a 14 h. Enseguida el gel se lavó con agua por 15 min con recambios y agitación constantes (Harlow, E. y D. Lane, 1988).

g) SECADO DEL GEL.

Una vez realizada la fluorografía el gel se colocó en una solución que contenía metanol al 20%, ácido acético al 7% y glicerol al 5%, por 20 min con agitación constante.

El gel se deshidrató utilizando un secador de geles marca BioRad (mod. 543). Sobre el soporte poroso de este aparato se colocaron varias capas de papel filtro secas y posteriormente una previamente humedecida con agua destilada. Sobre esta última se colocó el gel embebido previamente en la solución de glicerol, metanol y ácido acético. El gel y las tiras de papel se cubrieron con una película de plástico a fin de evitar que la radiactividad se pusiera en contacto con el aparato, eliminándose con esto problemas de contaminación. Enseguida se aplicó una temperatura de 60°C y un vacío de 1 x 10^{-4} torr utilizando una bomba de vacío Presicion (mod. D150) por 1.5 h.

h) AUTORRADIOGRAFIA.

Una vez que el gel se secó, se colocó en la base de un cassette de exposición, sobre de éste se acomodó una película Kodak X-Omat y arriba de esta ultima se agregó una placa intensificadora de señal (Dupont). Todo este procedimiento se realizó en un cuarto obscuro.

El cassette se envolvió en una película de plástico y se mantuvo entre -20° y -70°C por un tiempo promedio de 1 sem. Después la película se reveló en forma manual de la siguiente manera: esta se colocó en una solución reveladora (GBX, "developer and replenisher" Kodak, de la cual se tomaron 103 ml y se aforaron a 473 ml con agua destilada) por 2 min, posteriormente se pasó a una solución ("stop bath", Kodak, del cual se tomaron 20 ml y se aforaron a 500 ml con agua destilada) por 30 seg para detener la reacción. En seguida se colocó en una solución fijadora (GBX "fixer and replenisher" Kodak, de la cual se tomaron 103 ml y se aforaron a 473 ml con agua destilada) por

otros 2 min y después en un recipiente con flujo de agua constante, para posteriormente secarse por exposición al aire.

DETERMINACION DE HOMOLOGOS DE DnaK Y GroEL EN *C. perfringens.*

Tanto las proteínas totales, como las del citosol, región membranal y sobrenadante se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (proceso conocido como electrotrasferencia) y posteriormente se realizó la inmunodetección.

a) ELECTROTRANSFERENCIA

Inmediatamente después del corrimiento electroforético el gel fue colocado en un amortiguador equilibrador (compuesto por Tris-HCl 25 mM pH 6.8, glicina 192 mM y metanol al 20% v/v) por 15 a 20 min.

Para este experimento se utilizó una cámara marca BioRad (mod. 200/0.2). Sobre la placa del portagel que va hacia el lado del cátodo, se colocó una esponja prehumedecida con el amortiguador equilbrador (Tris 25 mM, pH 8.3, glicina 192 mM y metanol al 20% v/v). Inmediatamente después una hoja de papel filtro, también humedecido con el mismo amortiguador y posteriormente el gel ya equilibrado. Sobre el gel se colocó una membrana de nitrocelulosa (con tamaño de poro de 25µm, Sigma Chemical Co) previamente humedecida y sobre esta otra hoja de papel filtro y otra esponja húmeda. El emparedado fue colocado en la cámara de transferencia, la cual estaba llena con amortiguador equilibrador frío. El sistema se corrió a-360 mA por 4 h con el sistema refrigerante encendido a 4°C.

b) DETECCION INMUNOENZIMATICA

Una vez concluida la transferencia, la membrana de nitrocelulosa fue colocada en solución Blotto (Tris-HCl 20 mM pH 7.5 con NaCl 500 mM y leche descremada en polvo al 5% p/v) y se mantuvo por 12-16 h a temperatura ambiente y con agitación constante.

Posteriormente se eliminó esta solución y se lavó en tres ocasiones con TTBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 500 mM y Tween 20 al 0.05%). La membrana posteriormente se colocó en contacto con los sueros anti GroEL de *E. coli* (proporcionado por el Dr. Carl Batt de Cornell University) y/o anti DnaK de *L. lactis* (proporcionado por el Dr. Robert McMacken de la Universidad John Hopkins), los cuales se diluyeron 1:500 en TBS (Tris-HCl 20 mM pH 7.5 y NaCl 500 mM) con 1% de gelatina. El sistema se incubó por 3 h a temperatura ambiente con agitación constante. Una vez concluido este tiempo, se lavó de nuevo por tres ocasiones con TTBS y posteriormente se adicionó el anticuerpo anti IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma Chemical Co), el cual se diluyó 1:2500 en TBS con gelatina al 1%. El sistema se dejó en agitación por espacio de 3 h a temperatura ambiente. Después de 2-3 lavados se adicionó el sustrato de la enzima 4-cloro-1-naftol (BioRad) y peróxido de hidrógeno (Sigma Chemical Co), el cual se dejó en incubación por 30 a 60 min a temperatura ambiente, con agitación constante hasta la aparición de bandas color magenta.

DETERMINACION DE PCHT QUE ACTUAN COMO ANTIGENOS INMUNODOMINANTES EN UN CUADRO DE GANGRENA GASEOSA.

a) INDUCCION DE UN CUADRO GANGRENOSO EN UN MODELO ANIMAL.

EN COBAYO:

Esto se realizó siguiendo el método descrito por Stevens *et al* (1987) con algunas modificaciones.

Se utilizó la cepa FD-1041, la cual fue activada de la manera descrita anteriormente. Con este cultivo se inocularon tubos con 10 ml de caldo con tioglicolato recién preparado, y se incubó a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron una A_{600} de 0.8-1.0, se centrifugaron a 10,000 x g y los precipitados fueron resuspendidos en 1 ml de solución salina estéril. Se tomaron 200 µl (1×10^5 UFC) de esta suspensión celular y se inocularon en la extermidad posterior derecha de un cobayo macho de 250 gm de peso, el cual previamente fue sangrado para obtener el suero control.

El animal permaneció en observación constante por espacio de 7 días. A lo largo de este tiempo se examinó el avance del proceso inflamatorio y la aparición de lesiones características.

Cuando el animal presentó la lesión, se tomó muestra de esta y se sembró en cajas de Petri con agar TSN (triptosa sulfito neomicina, BBL) selectivo para *C. perfringens,* y se incubó en anaerobiosis a 37°C por 24 a 48 h.

Las colonias negras características de *C. perfringens* fueron inoculadas en caldo con tioglicolato y se realizaron las pruebas bioquímicas confirmatorias (movilidad, reducción de nitratos a nitritos, producción de indol y fermentación de lactosa). Una vez que se demostró que el cuadro infeccioso fue provocado por la bacteria, al cabo de 15 días después de la inoculación se tomo una segunda muestra de suero, al cual se le determinó la presencia de anticuerpos contra las PCHT.

EN CONEJO.

Esto se llevó a cabo modificando el método de Stevens *et al* (1987). Básicamente el método fue muy similar al de la inducción de la gangrena gaseosa en el cobayo. Las células se activaron y cultivaron de la manera anteriormente descrita. El ajuste se realizó en forma similar, sin embargo, en este caso las células (procedentes de 10 ml de cultivo) fueron resuspendidas en 1 ml de $CaCl_2$ al 5%.

Se tomaron 150 µl (6.5 x 10^5 UFC/ml) de esta suspensión y se inocularon en la extremidad posterior izquierda de un conejo blanco macho de 1.7 Kg. Se registraron los signos que el animal presentó con el tiempo. Cuando se desarrolló la lesión característica purulenta, se determinó la presencia de *C. perfringens*, en el área infectada, mediante el procedimiento descrito en el punto anterior. El animal fue sangrado a los 15 y 30 días.

b) DETECCION DE PCHT INMUNODOMINANTES.

La inducción de las PCHT se hizo mediante un choque térmico de 37 a 50°C de la manera ya descrita. La células se rompieron utilizando la técnica de Quoronfleh y Streips modificado y las muestras se sometieron a electroforesis y a electrotransferencia de la manera ya descrita.

Para la inmunodetecciónm se utilizó el suero de los animales enfermos diluido 1:500 en TBS con 1% de gelatina. Como control se analizó el suero del animal antes de la inoculación con la bacteria. Posteriormente se agregó anti IgG de conejo o cabayo conjugado con peroxidasa diluido 1:2500 en TBS. El sistema se incubó por 3 h a temperatura ambiente y agitación constante. Una vez concluido, se lavó en 3 ocasiones con TTBS. Finalmente se adicionó el sustato de la enzima (4-cloro-1-naftol y peróxido de hidrógeno), el cual se incubó por 30 min hasta la aparición de bandas color magenta.

MICROSCOPIA ELECTRONICA DE TRASMISION.

Las células correspondientes a la primera y tercera hora de incubación en el medio DS fueron analizadas para deteminar si en estos tiempos ya habían iniciado el porceso de esporulación.

Las células provenientes de 2 ml de cultivo se obtuvieron por centrifugación (10,000 x g por 15 min a 4°C) y fueron lavadas 2 veces con amortiguador de fosfatos 0.1 M, pH 6.8. Posteriormente se resuspendieron en

una solución de glutaraldehido al 2.5% en el mismo amortiguador y se mantuvieron a 4°C por 14-16 horas. Después de lavarse con amortiguador de fosfatos, la muestra se envevió en 200 µl de agar noble al 2% disuelta en amortiguador de fosfatos. Enseguida la muestra se fijó con tetróxido de osmio al 1% disuelto en el amortiguador de fosfatos durante 12 a 15 horas a 4°C.

Posteriormente la muestra se deshidrató en una serie de soluciones de etanol al 20, 50, 70 y 95% durante 15 min en cada concentracion, y finalmente en una solución al 100% durante 30 min. Después el material se infiltró en resina EM bed disuelta en etanol en las siguientes proporciones y tiempos: 1:2 por 60 min, después 1:1 durante 2 horas, luego 2:1 por 12 a 15 horas, y al final resina pura durante 3 horas. La temperatura usada para la infiltración fué de 70°C.

Los cortes se tiñeron con acetato de uranilo al 5% (p/v) durante 15 min y después con acetato de plomo al 0.4% (p/v) temabién durante 15 min.

Las muestras se examinaron utilizando el microscopio electrónico de trasmisión marca Joel modelo JS-100

DETERMINACION DE PROTEINAS

METODO DE BRADFORD.

Se siguió el procedimiento descrito por este autor (1976), el cual consistió en: tomar 100µl de la solución problema o estándares y añadir 5 ml del reactivo de Bradford (que está compuesto por 100 mg de azul brillante Comassie G-250, 50 ml de metanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85% (p/v); la mezcla se aforó a 1 litro con agua bidestilada). La solución se mezcló inmediatamente con ayuda de un agitador eléctrico y se dejó reposar por 15 min. Se determinó la absorbancia a 595 nm. Como estándares se utilizaron diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina. El contenido de proteínas en las

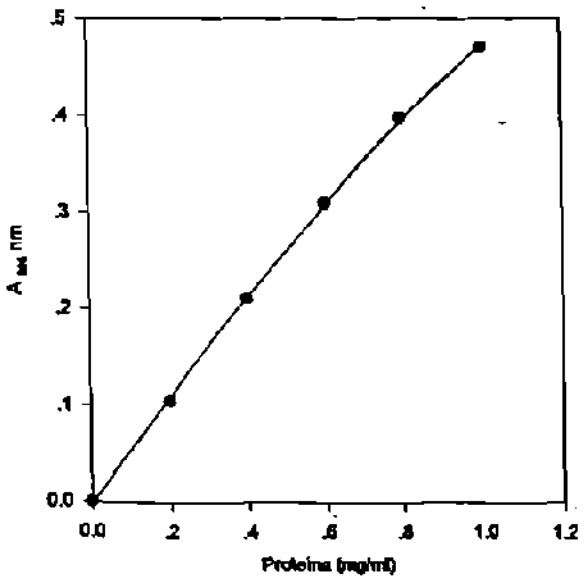
muestras se determinó mediante una curva estándar (Ver Fig.1a). En todos los casos se hicieron triplicados.

METODO DEL ACIDO BICINCONINICO

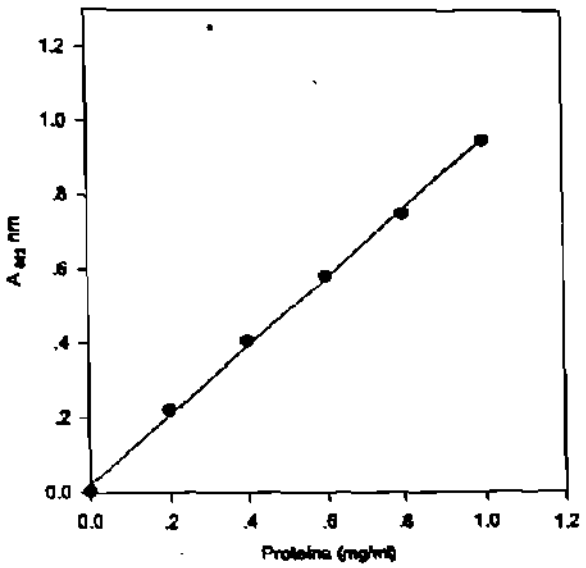
Para esta técnica se utilizó el sistema comercial de la Compañía Pierce. Este consiste en una solución de ácido bicinconínico (reactivo A) y una solución preparada de sulfato de cobre al 4% (reactivo B).

El método consistió en adicionar 100 µl de la muestra a probar o de los estándares de proteínas usados a 2 ml del reactivo de trabajo recién preparado (1 volumen de solución B y 50 volúmenes de solución A). Después de una agitación suave, los tubos se incubaron a 37°C por 30 min en un baño de agua. Posteriormente se determinó la absorbancia a 562 nm. En todos las casos se hicieron triplicados.

En este análisis también se utilizó albúmina serica bovina como estándar. El contenido de proteínas en las muestras se determinó mediante una curva estándar (Ver Fig. 1b).



A



B

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

RESULTADOS

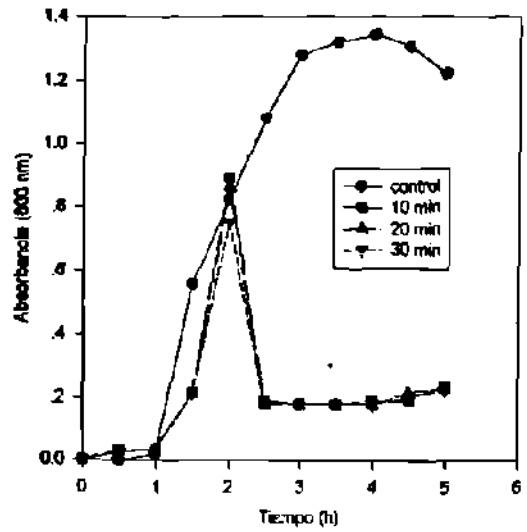
EFECTO DE UN CHOQUE TERMICO SOBRE EL CRECIMIENTO.

a) Células vegetativas.

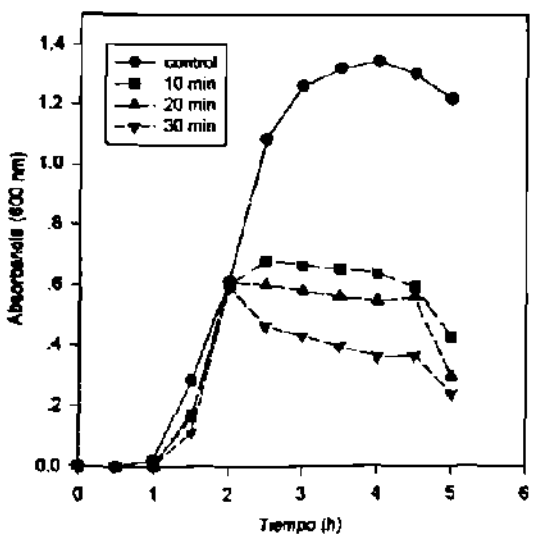
Se probaron diferentes condiciones de choque térmico a fin de establecer aquella temperatura capaz de provocar un daño subletal en la célula, de tal manera que permitiera una recuperación posterior. Cuando estas fueron incubadas a 43°C y se sometieron a un choque térmico de 65, 60, 58 y 56°C por diferentes intervalos de tiempo (10, 20 y 30 min), se observó un daño en las células, manifestado por la disminución o falta de crecimiento. Las células de estos tratamientos no pudieron recuperarse(Fig. 2 y 3), por lo que se supuso que dicha condición provocaba daños irreparables para la célula. Los resultados obtenidos mostraron un comportamiento similar en las dos cepas estudiadas.

Al probar un choque térmico de 55°C se observó una disminución de la densidad óptica inmediatamente después del choque, pero posteriormente fueron capaces de recuperarse (Fig. 4a). Cuando realizamos la curva de crecimiento mediante cuenta viable nos dimos cuenta que aunque las células aparentemente se recuperaban debido a un aumento de la absorbancia, su número no se incrementaba notablemente indicando que esta temperatura impedía una buena recuperación celular (Fig. 4b).

Debido a esto, hubo que probar otras temperaturas menores. Cuando el choque se aplicó a 52 y 50°C por 30 min encontramos que se producía una disminución del crecimiento inmediatamente después de aplicado el choque térmico, sin embargo tiempo después las células mostraron un aumento en su número (Fig. 5 a y b), llegando a alcanzar números semejantes a los del control

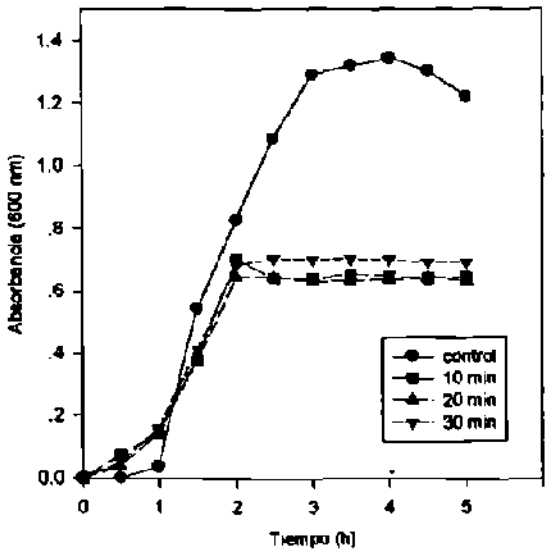


A

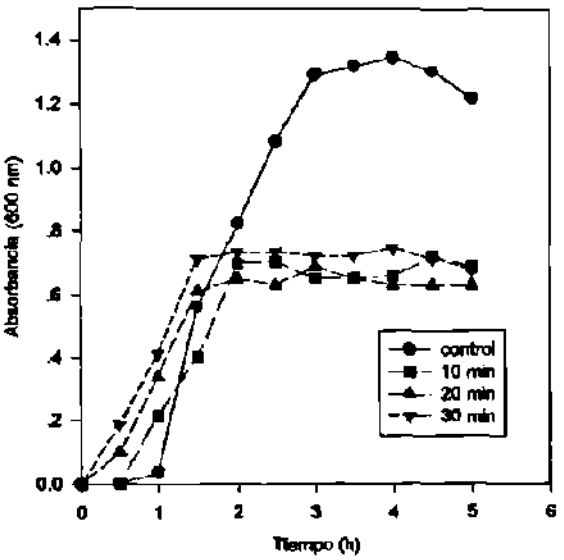


B

Fig. 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.

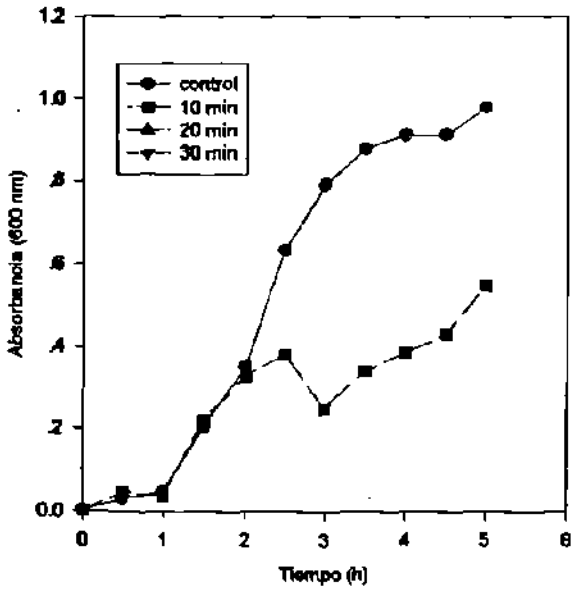


A



B

Fig 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.



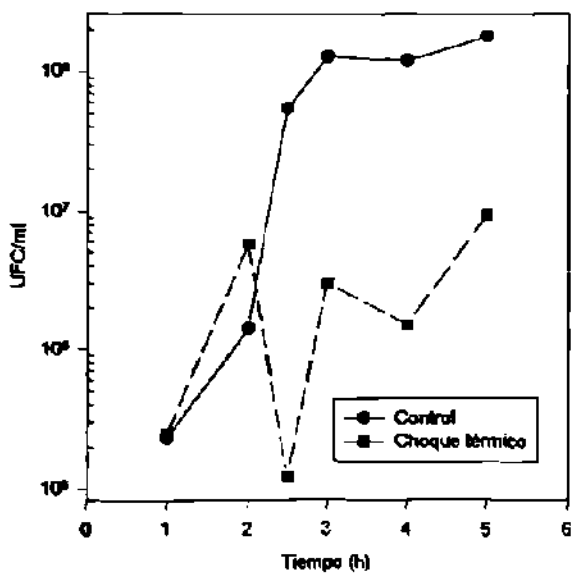
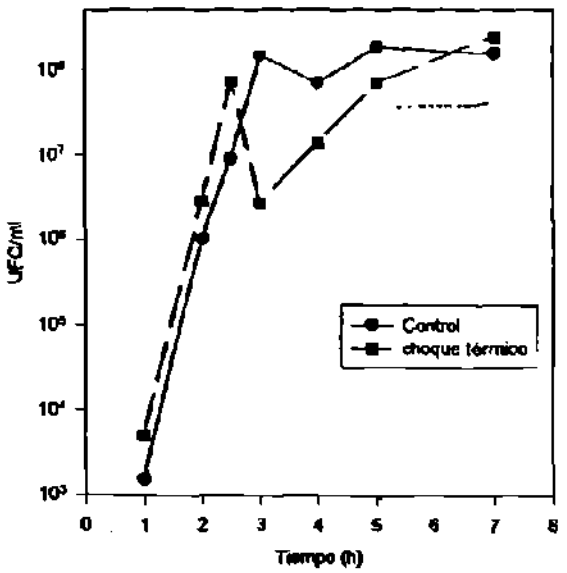
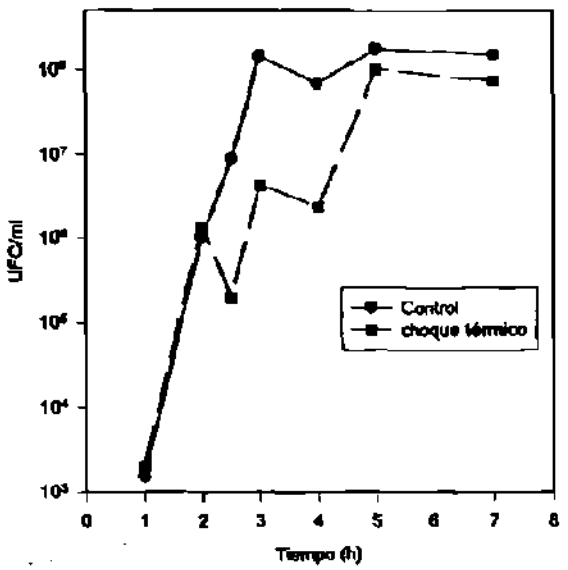


Fig. 4. Curvas de crecimiento espectrofotométrica (A) y de células viables (B) de *C. perfringens* FD-1041 cultivado a 43°C y sometido a un choque térmico de 55°C por 30 min.



A



B

Fig. 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.

Cuando estos experimentos se realizaron a 37°C, encontramos que un choque de 52°C provocaba muerte celular sin recuperación del crecimiento (Fig. 6), en tanto que un choque de 50°C (Fig. 7) hacia disminuir la población, sin embargo tiempo después era capaz de recuperarse hasta alcanzar niveles semejantes a los del control.

En base a lo anterior, escogimos tres condiciones de choque térmico subletal: cuando las células se incubaban a 43°C, el choque térmico podía ser de 50 o 52°C por 30 min, en tanto que para las células incubadas a 37°C, el choque debía ser de 50°C por 30 min.

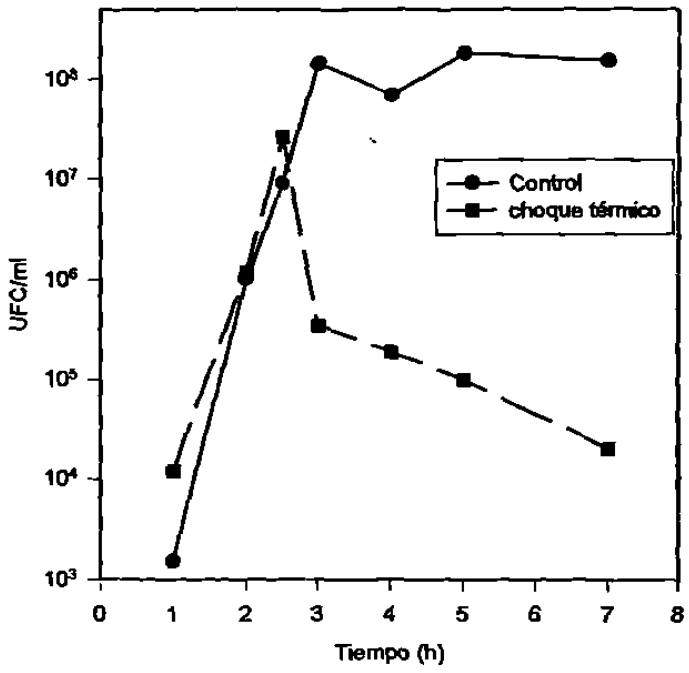


Fig. 6. Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 cultivado a 37°C y sometido a un choque térmico de 52°C por 30 min.

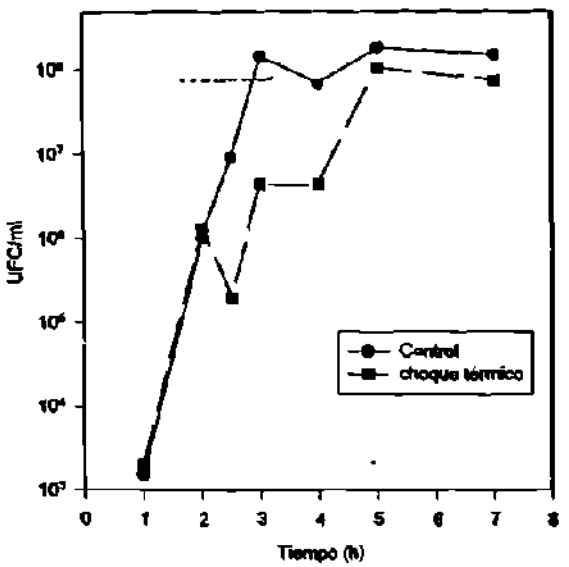


Fig. 7. Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 cultivado a 37°C y sometido a un choque térmico de 50°C por 30 min.

b) Crecimiento en un medio de esporulación.

Después de haber determinado las condiciones del choque térmico subletal para células vegetativas de *C. perfringens*, realizamos los ensayos para determinar esas condiciones en células en esporulación. Para esto se utilizaron los tratamientos similares a los del punto anterior.

Nuestros resultados indicaron que las células de ambas cepas incubadas a 37°C y sometidas a un choque térmico de 50°C por 30 min mostraron una pequeña disminución del crecimiento inmediatamente después del estrés térmico, especialmente la cepa FD-1041. Sin embargo, posteriormente ambas cepas se recuperaron y alcanzaron niveles de crecimiento similares a los del control (Fig. 8 y 9).

Cuando la temperatura de incubación fue de 43°C y se aplicó un choque térmico de 50°C o de 52°C se observó la misma tendencia que cuando la incubación fue de 37°C y se aplicó un choque térmico de 50°C/30 min, es decir que el choque térmico provocó una ligera disminución de la población, sin embargo tiempo después las células fueron capaces de recuperarse hasta niveles similares a los del control (Fig. 10-12).

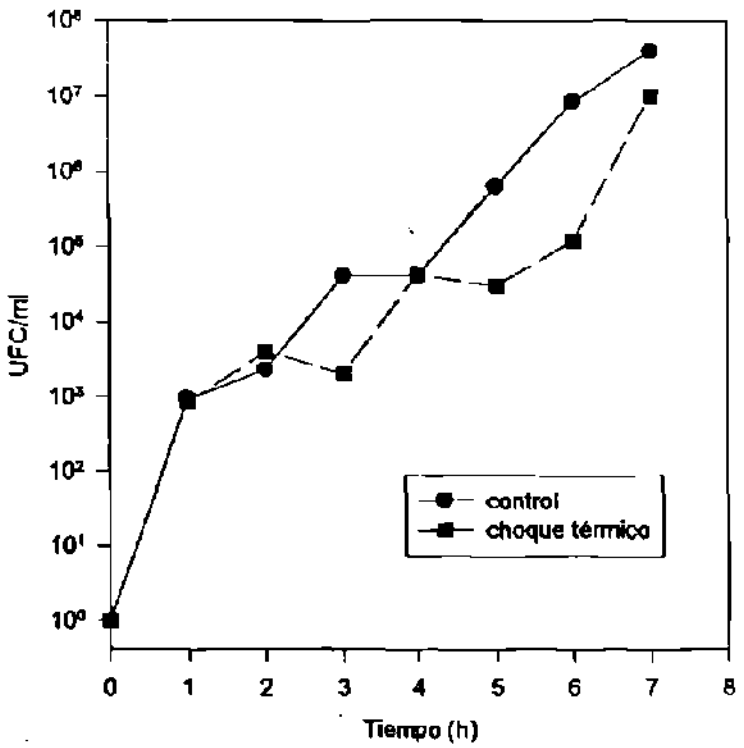


Fig. 8. Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1 cultivado en medio de esporulación DS, incubada a 37° C y sometido a un choque térmico de 50° C por 30 min.

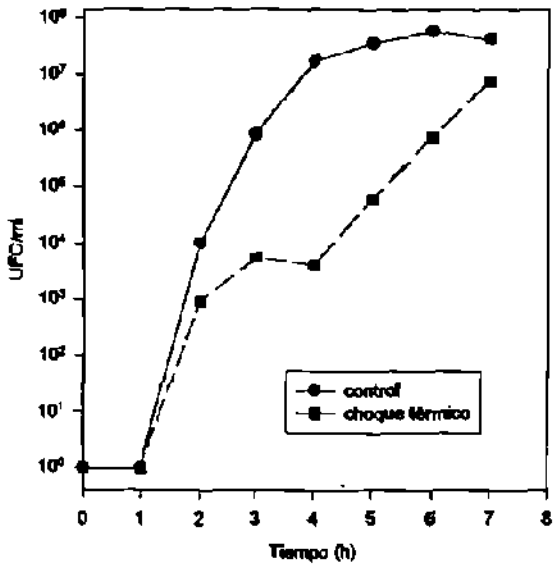


Fig. 9. Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 cultivado en medio DS a 37°C y sometido a un choque térmico de 50°C por 30 min.

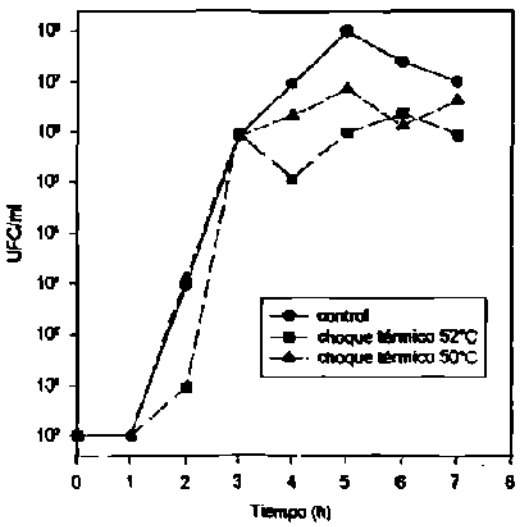


Fig. 10. Curva de crecimiento de *C. perfringens* cepa FD-1 cultivado en medio de DS a 43°C y sometido a choques térmicos de 50° a 52°C por 30 min.

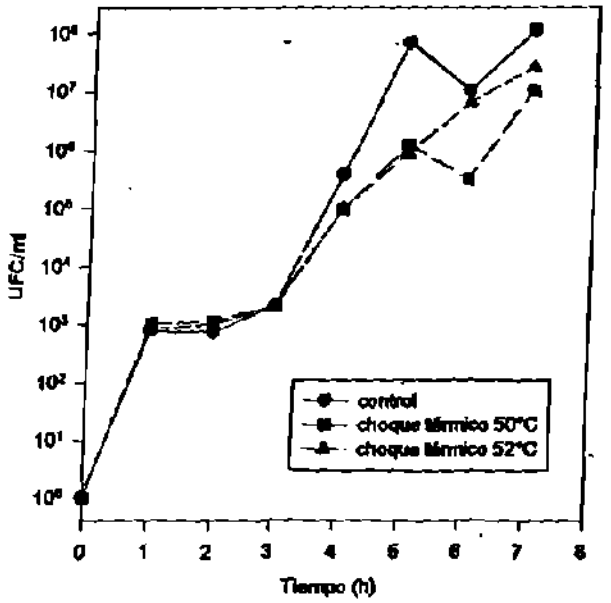


Fig. 11. Curva de crecimiento de *C. perfringens* FD-1041 cultivado en medio de DS a 43°C y sometido a un choque térmico de 50° o 52°C por 30 min.

EFECTO DE UN CHOQUE TERMICO SOBRE LA FORMACION DE ESPORAS.

Este ensayo se realizó incubando las cepas a 37° o 43°C y aplicando choques térmicos de 50° o 52°C durante las primeras 5 h de incubación. Los resultados obtenidos en este punto se encuentran en las figuras 12 a la 17, y para más claridad están resumidos en las tablas 2, 3 y 4.

Establecimos que cuando las células se cultivaron a 37°C y recibieron un choque térmico de 50°C en las primeras horas de incubación, especialmente la segunda y tercera, obtuvimos un retraso en la aparición de esporas y la

cantidad resultó menor a la obtenida por el control (Fig. 12 y 13). Este efecto se observó en ambas cepas, sin embargo, fue un poco más pronunciado en la cepa FD-1 (Fig. 12). Cuando el choque térmico se aplicó en horas posteriores, es decir, cuando presumiblemente el proceso de esporulación ya se había desencadenado, las células se comportaron de una manera similar al control (Fig. 12 y 13, Tabla 2) y los niveles de esporas a las 7 horas eran también similares a las mostradas por el control. En los experimentos en donde cultivamos a las células a 43°C, encontramos un comportamiento similar al que mostraron las células incubadas a 37°C (Fig14 a 17, tablas 3 y 4), es decir, las células de ambas cepas que recibieron un choque térmico (50 o 52°C), durante las primeras horas de incubación, presentaron un retraso en la aparición de esporas. Sin embargo, cuando el choque térmico se aplicó en horas posteriores, el comportamiento fue similar al control. Al igual que para los cultivos incubados a 37°C, los niveles de esporas, hasta las 7 horas, fueron ligeramente más bajos en aquellos tratamientos en que se presentó el retraso del proceso. Además también el retraso y la disminución en la cantidad de esporas fue más pronunciado en la cepa FD-1 (Fig. 14 a 17, Tablas 3 y 4).

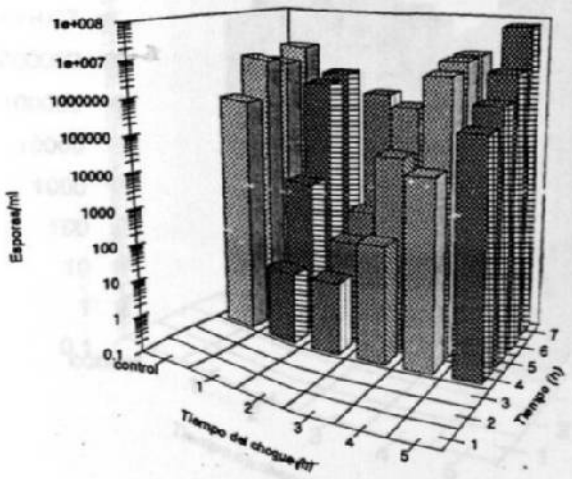


Fig. 12. Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1 cultivada a 37°C y sometida a un choque térmico de 50°C/30 min a diferentes tiempos de incubación.

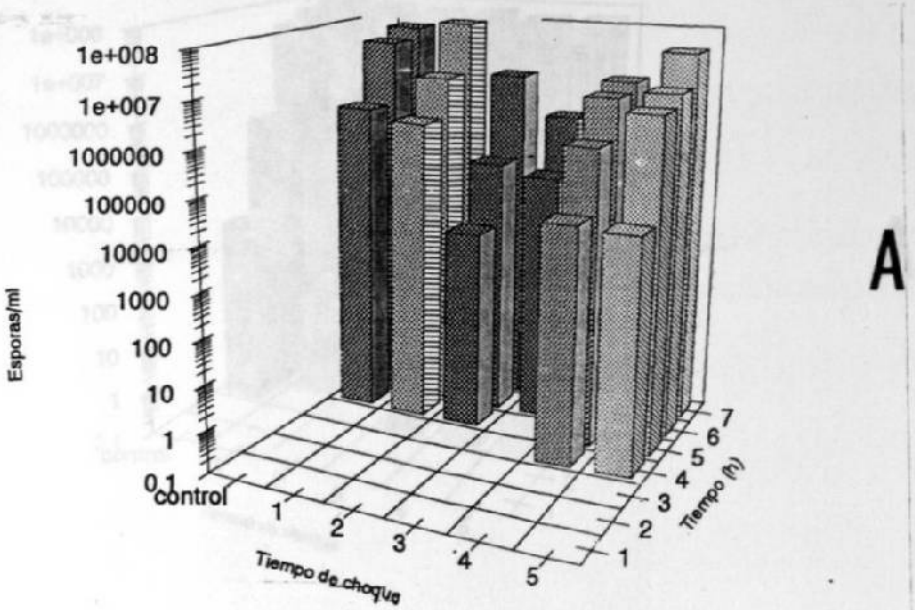


Fig. 13. Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1041 cultivada a 37°C y sometida a un choque térmico de 50°C/30 min a diferentes tiempos de incubación.

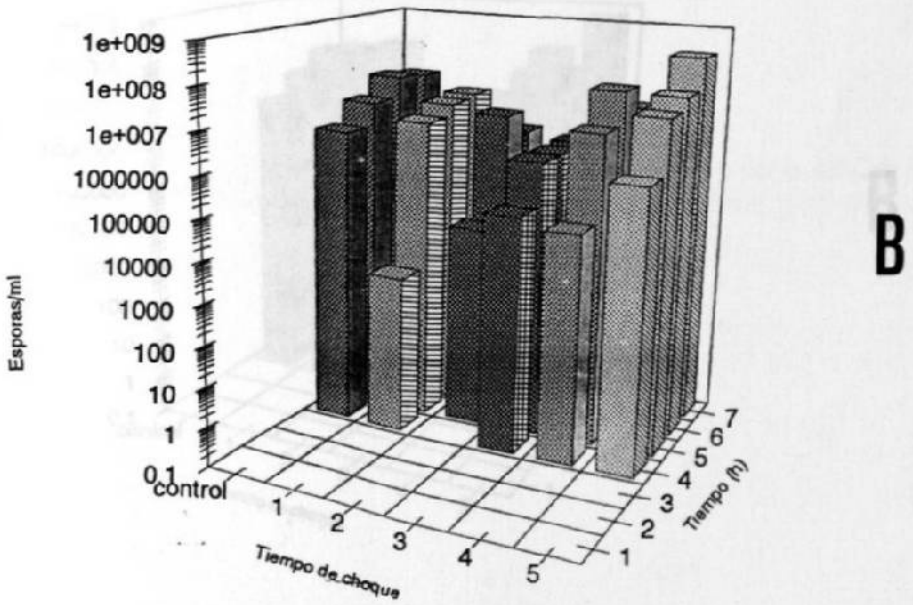
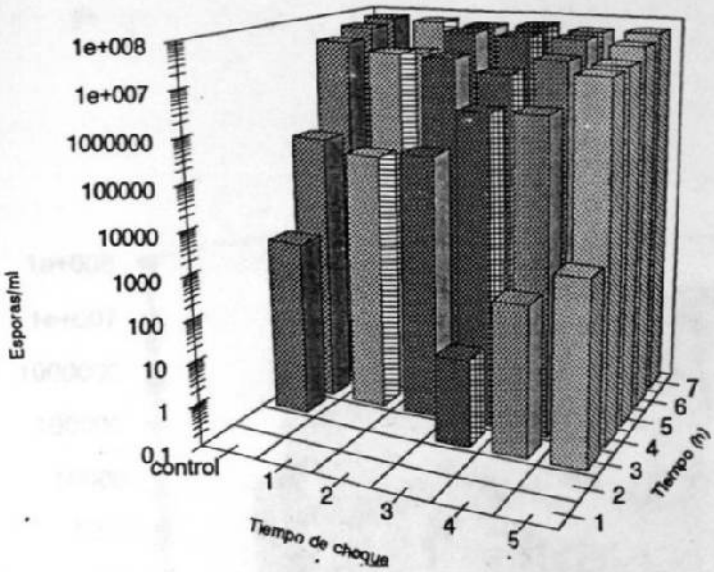
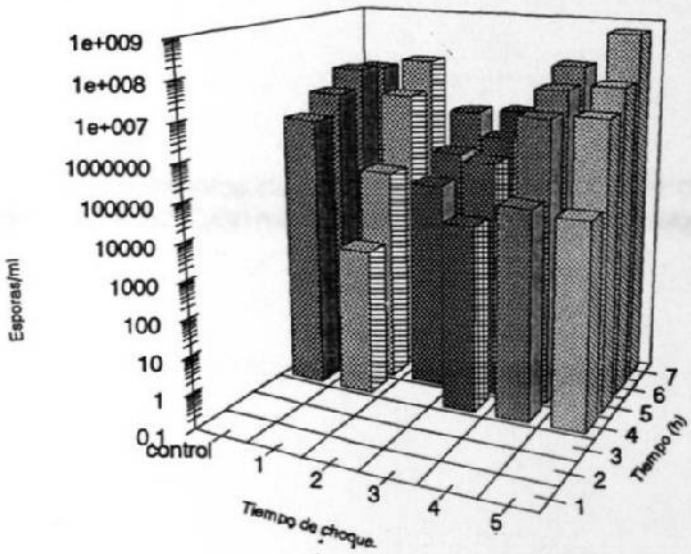


Fig. 14. Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-1 cultivada a 43°C y sometida a un choque térmico de 50°C/30 min a diferentes tiempos de incubación.



A

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



B

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

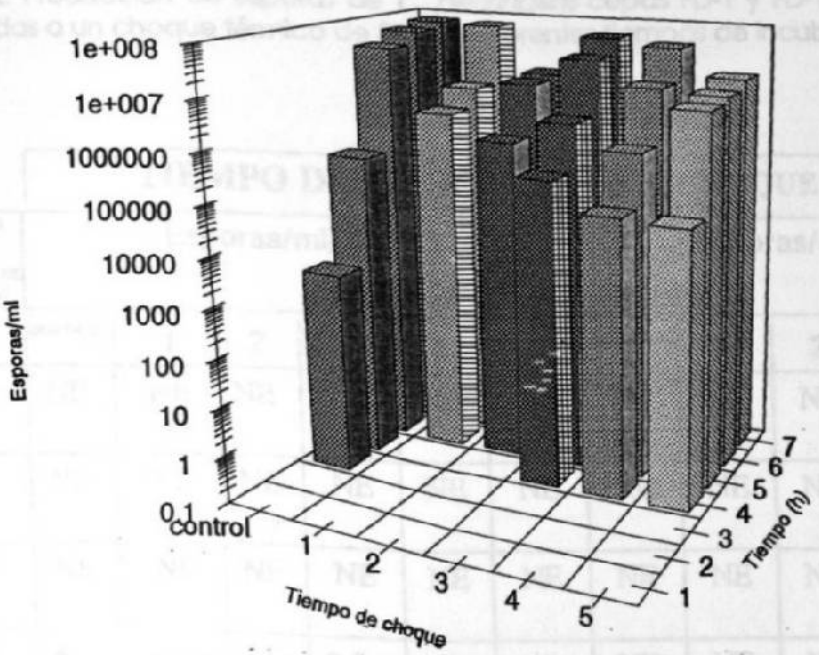


Fig. 17. Producción de esporas de *C. perfringens* cepa FD-0411 cultivada a 43°C y sometida a un choque térmico de 52°C/30 min a diferentes tiempos de incubación.

Tabla 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.

	TIEMPO DE APLICACION DEL CHOQUE TERMICO (h)											
TIEMPO DE TECCION DE ESPORAS	Esporas/ml FD - 1						Esporas/ml FD - 1041					
	CONTROL	1	2	3	4	5	CONTROL	1	2	3	4	5
1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
4	5.1×10^5	1.2×10^1	3.3×10^1	2.5×10^2	2.9×10^4	4.5×10^5	NE	NE	NE	NE	2.3×10^4	1.9×10^4
5	6.2×10^6	2.9×10^3	8.3×10^1	3.4×10^4	6.3×10^6	1.4×10^6	1.4×10^6	8.9×10^5	3.4×10^3	NE	6.1×10^5	3.7×10^6
6	4.5×10^6	1.4×10^6	3.1×10^2	4.5×10^5	9.8×10^6	5.7×10^6	3.3×10^7	6.3×10^6	8.3×10^4	5.4×10^4	4.3×10^6	6.5×10^6
7	9.8×10^6	1.9×10^6	5.4×10^5	1.0×10^5	1.0×10^7	6.9×10^7	5.8×10^7	8.5×10^7	6.3×10^6	8.3×10^5	6.5×10^6	3.4×10^7

NE: no se detectaron esporas (< 10^1UFC/ml)

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

	TIEMPO DE APLICACION DEL CHOQUE TERMICO (h)											
TIEMPO DE DETECCION DE ESPORAS	Esporas/ml FD - 1						Esporas/ml FD - 1041					
	CONTROL	1	2	3	4	5	CONTROL	1	2	3	4	5
1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1.4×10^3	NE	NE	1.1×10^1	3.4×10^2	2.0×10^3
4	2.8×10^6	9.2×10^2	NE	8.4×10^4	5.0×10^4	1.0×10^6	2.3×10^5	1.3×10^5	1.8×10^5	2.1×10^6	2.4×10^6	1.9×10^7
5	9.8×10^6	4.5×10^6	1.2×10^4	9.5×10^5	6.5×10^6	2.1×10^7	3.1×10^7	2.1×10^7	1.9×10^7	1.0×10^7	2.3×10^7	2.1×10^7
6	3.1×10^7	8.3×10^6	5.7×10^6	8.3×10^5	4.3×10^7	4.0×10^7	5.4×10^7	1.5×10^7	5.3×10^7	4.9×10^7	4.7×10^7	3.9×10^7
7	2.4×10^7	1.0×10^7	1.3×10^6	9.1×10^5	1.0×10^7	2.3×10^8	7.0×10^7	6.3×10^7	5.4×10^7	6.1×10^7	5.1×10^7	5.7×10^7

NE: no se detectaron esporas (< 10^1UFC/ml)

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

	TIEMPO DE APLICACION DEL CHOQUE TERMICO (h)											
TIEMPO DE DETECCION DE ESPORAS	FD-1						FD-1041					
	CONTROL	1	2	3	4	5	CONTROL	1	2	3	4	5
1	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
2	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE
3	NE	NE	NE	NE	NE	NE	1.4×10^3	NE	NE	NE	NE	NE
4	2.8×10^6	1.1×10^3	NE	1.3×10^4	5.7×10^4	4.3×10^4	2.3×10^5	NE	NE	2.3×10^5	5.7×10^4	4.9×10^4
5	9.8×10^6	8.5×10^4	5.3×10^4	3.0×10^5	6.5×10^6	8.3×10^6	3.1×10^7	1.8×10^6	5.9×10^5	1.9×10^6	6.1×10^5	5.3×10^6
6	3.1×10^7	7.3×10^6	2.1×10^5	7.5×10^5	2.1×10^7	3.2×10^7	5.4×10^7	4.3×10^6	6.3×10^6	2.4×10^7	7.6×10^6	6.5×10^6
7	2.4×10^7	4.5×10^7	1.9×10^6	2.4×10^6	5.8×10^7	5.4×10^6	7.0×10^7	6.5×10^7	7.1×10^6	5.0×10^7	3.5×10^7	9.7×10^6

NE: no se detectaron esporas (< 10^1UFC/ml)

EFECTO DE UN CHOQUE TERMICO SOBRE LA PRODUCCION DE TOXINAS.

a) ENTEROTOXINA.

Cuando se realizó este ensayo se utilizó la cepa FD-1041, la cual se incubó a 37°C y se sometió a un choque térmico de 50°C por 30 min a la primera y tercera hora de incubación. Estos tiempos se seleccionaron debido a que mediante observaciones al microscopio electrónico (Fig. 18 y 19), las células se encontraban en diferentes estadíos celulares, es decir, a la primera hora de incubación los cultivos se encontraban en crecimiento vegetativo (Fig. 18), en tanto que a la tercera hora ya habían iniciado el proceso de esporulación (Fig. 19).

Los resultados indicaron que un choque térmico aplicado a la primera hora de incubación provocaba un retraso de dos horas en la síntesis de enterotoxina, alcanzando su más alto nivel de producción a las 7 horas, en comparación con el control que fue a las 5 horas. Sin embargo, no se observó alteración en el nivel de producción de enterotoxina, ya que la cantidad fue semejante a la mostrada por el control (Fig. 20).

Cuando el choque térmico se aplicó a la tercera hora de incubación no observamos retraso en la producción de enterotoxina, ya que su máximo nivel se obtuvo a las 5 horas, igual que el control. Sin embargo, encontramos que la cantidad de enterotoxina fue menor en relación con el control.

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

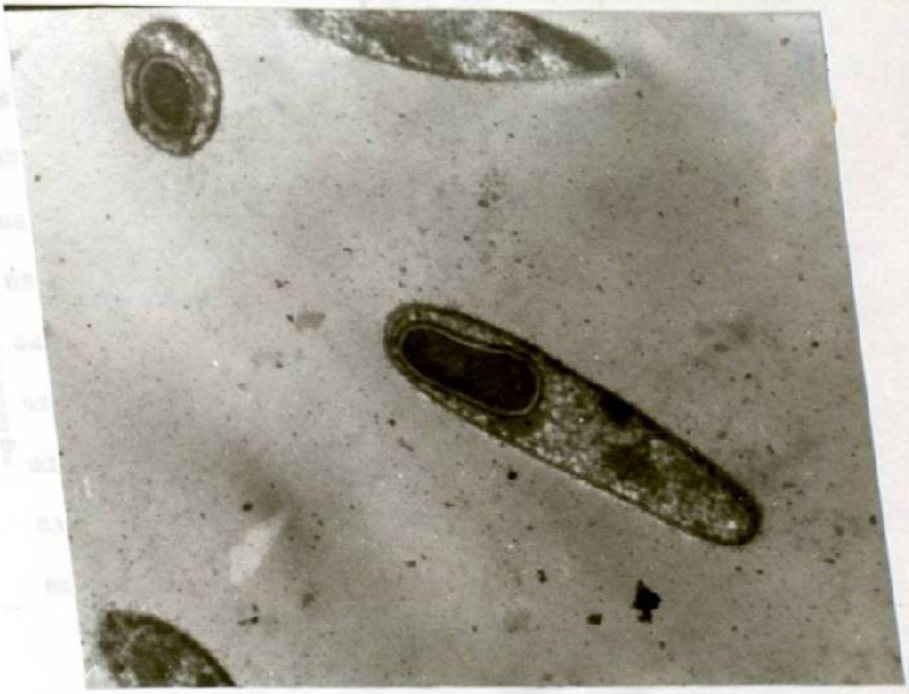


Fig. 19. Fotografía al microscopio electrónico de trasmisión de células de *C. perfringens* cepa FD-1041, cultivadas durante 3 horas a 37°C en medio DS (8,500 X)

b) FOSFOLIPASA C.

Para realizar este ensayo se cultivó a la cepa FD-1041 en el medio de tioglicolato. Sin embargo en este medio no se detectó la actividad de la toxina. Debido a esto, probamos otros medios de cultivo.

Encontramos que en el caldo infusión de cerebro y corazón si se detectaba la presencia esta toxina, por lo que, estos experimentos se realizaron utilizando ese medio de cultivo.

Cuando probamos los métodos reportados para la detección de fosfolipasa, solo el método modificado de difusión (Fig. 21) y la modificación al ensayo de Van Heyningen produjeron resultados satisfactorios. Sin embargo el último método resultó más preciso, por lo que fue el seleccionado para la cuantificación de la fosfolipasa C.

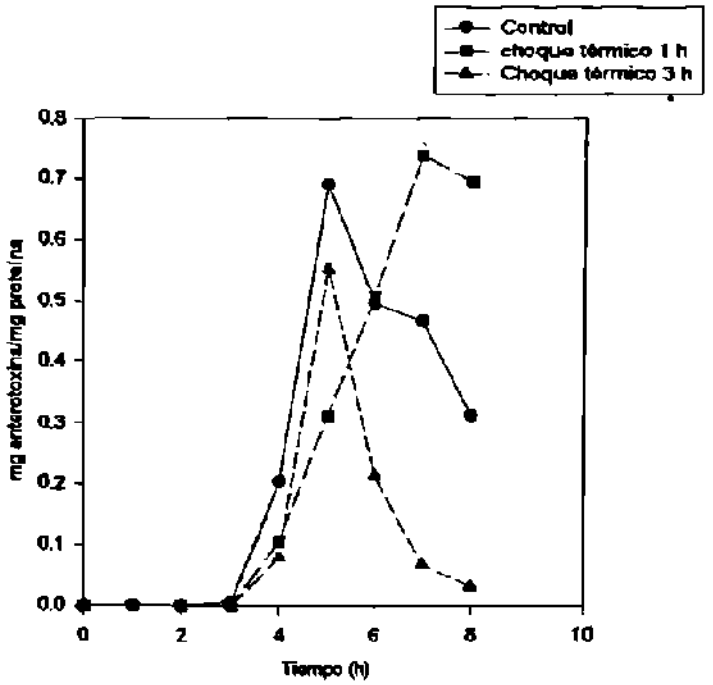


Fig. 20. Producción de enterotoxina de *C. perfringens* cepa FD-1041 sometida a un choque térmico de 50°C por 30 min a la primera o tercera hora de incubación.