

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



Respuesta de *Vibrio cholerae* a condiciones subletales de
acidez y jugo biliar humano.

TESIS

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

PRESENTA:

MC. MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. ENERO 2002

MC. MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA

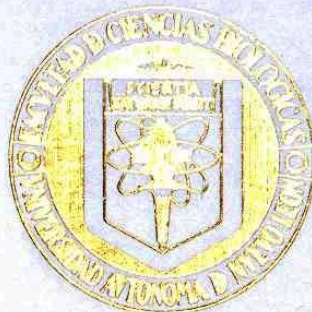
TD
RC126
.A4
2002
c.1

2002



1080124488

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



*Respuesta de Vibrio cholerae a condiciones subletales de
acidez y jugo biliar humano.*

TESIS

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

PRESENTA:

MC. MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA

SAN NICOLAS DE LOS GARZA, N. L. ENERO 2002



TD
RC124
A4
2002



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO

**Respuesta de *Vibrio cholerae* a condiciones subletales de acidez
y jugo biliar humano.**


TESIS

PRESENTA:

M C. MARIA GENOVEVA ALVAREZ OJEDA

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORADO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

APROBADA
COMISIÓN DE TESIS


Dra. Norma L. Herdía Rojas
Director de Tesis


Dr. José Santos García Alvarado
Co. Director de Tesis


Dr. Carlos E. Hernández Luna
Secretario


Dr. Mario R. Morales Vallarta
Vocal


Dra. Lilia H. Morales Ramos
Vocal

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U. A. N. L. bajo la dirección de la Dra. Norma L. Heredia Rojas y la Co-dirección del Dr. José Santos García-Alvarado. Esta investigación fue apoyada en parte por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) y por el Programa de apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT).

DEDICATORIA

A Dios por ser mi guía espiritual en cada instante de mi vida.

A mi madre Leonor Ojeda de Alvarez Por haberme dado la vida; y por sembrar en mi familia el espíritu de superación, pero sobre todo por enseñarnos que con fe se puede lograr todas las metas propuestas.

A mi padre Ignacio Alvarez Rodríguez (†) Porque al paso del tiempo siempre te recuerdo como una persona trabajadora, responsable y por darnos el ejemplo que con el sentido de la responsabilidad y el trabajo se puede llegar a la meta deseada, y sobre todo por los valores morales que nos diste.

A mis HERMANOS, Raúl, Delia, Patricia, Felipe, Ignacio, Ramona, Juan José, Olga Lidia y Blanca Liliana. Con todo cariño y amor por ser ellos amigos y compañeros incondicionales de toda mi vida, y por su apoyo moral invaluable que hicieron posible que cumpliera esta etapa de mi formación profesional.

A mis SOBRINOS. Tania, Mayra, Abraham. Jessica, Dianita, A. Nallely, Rosita, Felipin, Valeria e Ignacio. Con todo mi amor y cariño.

A mis AHIJADOS: Mayra. Nallely. Olga Valeria y Jorge Ignacio. Con mucho amor y cariño. Espero que esta meta que hoy culmino sea superada por ustedes.

AGRADECIMIENTOS

Dra. Norma L. Heredia Rojas

Por su invaluable apoyo y asesoría en la realización de este trabajo, su confianza brindada, su amistad. Además por todas las facilidades otorgadas en su laboratorio y sobre todo porque aprendí que con disciplina se pueden cumplir todos las metas propuestas.

Dr. José Santos García Alvarado

Mi mas sincero agradecimiento por darme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, y sobre todo por la motivación para todos sus tesisas y por su espíritu de superación. Gracias por su valiosa asesoría y consejos que me permitieron incursionar más en el campo de la investigación.

Dr. Carlos E. Hernández Luna.

Por su opinión, sus sugerencias y disponibilidad, para la revisión de este trabajo.

Dr. Mario R. Morales Vallarta.

Por su valioso tiempo empleado en la revisión de este escrito, sus sugerencias y su acertada opinión.

Dra. Lilia H. Morales Ramos.

Por aceptar formar parte de mi comisión de tesis, además de su valioso tiempo empleado en la revisión de este escrito.

Dr. Mark L. Tamplin del Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA).

Por proporcionarme la toxina y los anticuerpos para la elaboración de esta investigación.

A la unidad de Investigación Biomédica del Noroeste IMSS por la oportunidad que me brindó en el uso del contador de centelleo líquido, en especial al Dr. Javier Vargas por las facilidades otorgadas en el uso de este equipó pero sobre todo por su valioso tiempo.

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

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por abrirme sus puertas y permitirme realizar mi trabajo de investigación en sus instalaciones. Y a través de la Dirección de becas de postgrado (Secretaría Académica) me proporcionaron una beca para concluir dicho trabajo.

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS (UANL)

A través de la División de Postgrado por las facilidades otorgadas en toda ocasión especialmente a la Dra. Julia Verde S. por brindarme su apoyo en el momento oportuno.

Un agradecimiento muy especial a todos mis MAESTROS por transmitirme sus conocimientos y experiencias que ayudaron a mi formación.

A mi estimada y apreciable maestra * Dra. MA. DE LOS ANGELES VERASTEGUI M.* Por su amistad incondicional otorgada en momentos difíciles de mi vida.

Al M.C Eduardo Sánchez García: por aceptarme como soy, pero sobre todo por su sincera amistad y consejos.

A mis COMPAÑEROS, EX-COMPAÑEROS Y AMIGOS del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos, muchas gracias por hacer mi estancia agradable en el laboratorio, espero que nuestra amistad perdure al paso del tiempo. Y deseo que triunfen en todos sus proyectos.

ÍNDICE DE CONTENIDO

	Pág.
Página del título.....	I
Comisión de tesis	II
Lugar de trabajo	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Índice	VIII
Lista de figuras	XII
Lista de tablas	XVI
Abreviaciones y símbolos usados	XVII
RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	3
INTRODUCCION	5
ANTECEDENTES.....	9
Epidemiología del cólera	9
Patología y factores de virulencia	9
Mecanismos de acción de la toxina	12
Acción de las sales biliares	15
Proteínas de estrés	20
Adquisición de tolerancia y respuesta cruzada	25
Proteínas de choque ácido	29
HIPÓTESIS	34

OBJETIVOS

Objetivo general35

Objetivos específicos35

MATERIAL Y MÉTODO

Cepas utilizadas37

Activación de las cepas37

Efecto de un pre-choque ácido sobre el crecimiento de *Vibrio cholerae*38

Ensayos de tolerancia ácida39

Duración de la tolerancia ácida39

Efecto de un pre-choque con jugo biliar humano sobre el crecimiento de *Vibrio cholerae*40

Ensayos de tolerancia con jugo biliar humano40

Duración de la tolerancia a diferentes concentraciones de jugo biliar humano41

Determinación de la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de *Vibro cholerae* por cloranfenicol41

Determinación del papel de la síntesis de proteínas en la tolerancia al choque ácido y a jugo biliar humano42

Determinación de protección cruzada entre los estrés probados42

Efecto del estrés subletal sobre la producción de la toxina de *V. cholerae*43

Cuantificación de la toxina por el método de ELISA43

Análisis de la síntesis de proteínas por efecto de un choque subletal ácido o por jugo biliar45

a) Ensayos de incorporación45

b) Efecto de un choque subletal sobre el patrón de proteínas46

I. Ácido46

II. Jugo biliar humano46

c) Rompimiento celular47

i) Amortiguador de fosfatos47

ii) Amortiguador Tris. Hcl pH 8.0 con CaCl₂ y NaCl47

iii) Método de Dascher47

d) Electroforesis en geles de poliacrilamida48

e) Fluorografía49

f) Secado del gel49

g) Autoradiografía.....50

Determinación de las proteínas método de Bradford.....50

Análisis estadístico51

RESULTADOS

Efecto de un choque ácido sobre el crecimiento de *V. cholerae*52

Adquisición de tolerancia al ácido provocado por la exposición previa a un choque subletal ácido 54

Duración de la tolerancia adquirida al ácido56

Efecto de un choque subletal con jugo biliar humano En el crecimiento de *V.cholerae*58

Adquisición de tolerancia a condiciones letales de jugo biliar humano como resultado de la exposición previa de un choque subletal de jugo biliar.....	60
Duración de la tolerancia adquirida al jugo biliar humano	61
Efecto del cloranfenicol en la adquisición de la tolerancia al ácido y al jugo biliar humano	63
Respuesta cruzada	64
Efecto de un choque subletal en la producción de la toxina de <i>V. cholerae</i>	65
Efecto de un choque ácido sobre la síntesis de proteínas	66
Análisis de la síntesis de proteínas de <i>V. cholerae</i> sometida a un choque subletal de jugo biliar humano	68
Análisis de los patrones electroforeticos de proteínas inducidas por un choque ácido subletal	69
Análisis de los patrones electroforeticos de proteínas inducidas por un choque con jugo biliar humano	70
DISCUSIÓN	73
CONCLUSIONES	80
PERSPECTIVAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES	82
LITERATURA CITADA	84

LISTA DE FIGURAS

Figuras	Descripción	Paginas
1.	Modo de acción de la toxina de <i>V. cholerae</i>	14
2.	Derivación de los ácidos biliares de humanos	16
3.	Curva estándar de albúmina bovina por el método de Bradford.....	51
4.	Curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> ATCC 7677 sometida en la parte media de la fase log a diferentes valores de pH durante 20 min.....	52
5.	Curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> ATCC 1837 sometida en la parte media de la fase log a diferentes valores de pH durante 20 min.....	53
6.	Curva de crecimiento de <i>V. cholerae</i> ATCC 7677 sometida en la parte media de la fase log a diferentes valores de pH durante 20 min.....	53
7.	Curva de viabilidad de <i>V. cholerae</i> ATCC 1837 sometida en la parte media de la fase log a diferentes valores de pH durante 20 min.....	54
8.	Curva de sobrevivencia de <i>V. cholerae</i> ATCC 7677 sometida en la parte media de la fase log a pH 5.5 durante 20 min. Inmediatamente después se aplicó un choque letal de pH 4.5.....	55

9. **Curva de sobrevivencia de *V. cholerae* ATCC 1837 sometida en la parte media de la fase log a pH 5.5 durante 20 min. Inmediatamente después se aplicó un choque letal de pH 4.5.....55**
10. **Curva de sobrevivencia a pH 4.5 de *V. cholerae* ATCC 7677. Las células fueron sometidas previamente a un choque subletal (pH 5.5) y después de varios tiempos se aplicó la condición letal.....57**
11. **Curva de sobrevivencia a pH 4.5 de *V. cholerae* ATCC 1837. Las células fueron sometidas previamente a un choque subletal (pH 5.5) y después de varios tiempos se aplicó la condición letal.....57**
12. **Curva de viabilidad de *V. cholerae* ATCC 7677 sometida en la parte media de la fase log a diferentes concentraciones de jugo biliar humano durante 20 min.....58**
13. **Curva de viabilidad de *V. cholerae* ATCC 1837 sometida en la parte media de la fase log a diferentes concentraciones de jugo biliar humano durante 20 min59**
14. **Curva de viabilidad de *V. cholerae* ATCC 7677 sometida en la parte media de la fase log a 3.0 mg/ml de jugo biliar humano durante 20 min.....59**

15. **Curva de viabilidad de *V. cholerae* ATCC 1837 sometida en la parte media de la fase log a una concentración de (3.0 mg/ml) de jugo biliar humano durante 20 min.....60**
16. **Curva de sobrevivencia de *V. cholerae* ATCC 7677 a 30 mg/ml de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a un choque subletal (3.0 mg/ml) y después de varios tiempos se aplicó la condición letal.....62**
17. **Curva de sobrevivencia de *V. cholerae* ATCC 1837 a 30 mg/ml de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a un choque subletal (3.0 mg/ml) y después de varios tiempos se aplicó la condición letal.....62**
18. **Curva de incorporación de ^{35}S por las células de *V. cholerae* ATCC 7677. La concentración del isótopo fue de 200 $\mu\text{Ci/ml}$67**
19. **Curva de incorporación de ^{35}S por las células de *V. cholerae* ATCC 1837. La concentración del isótopo en el ensayo fue de 200 $\mu\text{Ci/ml}$67**
20. **Curva de incorporación de ^{35}S por las células de *V. cholerae* ATCC 7677. La concentración del isótopo fue de 200 $\mu\text{Ci/ml}$68**

21. Curva de incorporación de ^{35}S por las células de *V. cholerae* ATCC 1837. La concentración del isótopo fue de 200 $\mu\text{Ci/ml}$69
22. Autoradiografía de los patrones de proteínas totales de *V. cholerae* ATCC 7677. Las células fueron sometidas a choque ácido (pH 5.5 por 20 min)
a) control, b) 0 min, c) 30 min, d) 60 min y
e) 90 min después del choque subletal.....70
23. Autoradiografía de los patrones de proteínas totales de *V. cholerae* ATCC 1837. Las células fueron sometidas a choque ácido (pH 5.5 por 20 min)
a) control, b) tiempo 0, c) 30 min, d) 60 min y
e) 90 min después del choque subletal.....71
24. Autoradiografía de los patrones de proteínas totales de *V. cholerae* ATCC 7677 a) control, b) 30 min
b) 60 min y d) 90 min. Células sometidas a choque subletal con jugo biliar humano (3 mg/ml por 20 min) en la mitad de la fase log71
25. Autoradiografía de los patrones de proteínas totales de *V. cholerae* ATCC 1837 a) control, b) tiempo 0
c). 90 min células sometidas a choque subletal con jugo biliar humano (3 mg/ml por 20 min) en la mitad de la fase log.....72

LISTA DE TABLAS

No.	Descripción	Páginas
1.	Tolerancia de <i>V. cholerae</i> a pH 4.5. Las células fueron sometidas previamente a un choque subletal de pH 4.5.....	56
2.	Tolerancia de <i>V. cholerae</i> a 30 mg/ml de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a una concentración subletal de 3.0 mg/ml.....	61
3.	Crecimiento de <i>V. cholerae</i> expuesta a diferentes concentraciones de cloranfenicol	63
4.	Valores de letalidad de <i>V. cholerae</i> sometidos a un estrés letal (jugo biliar humano o acidez) y en algunos casos durante este tratamiento se aplicó cloranfenicol.....	64
5.	Valores de letalidad de <i>V. cholerae</i> expuesta a pH 4.5. Las células fueron expuestas previamente a una concentración subletal de jugo biliar.....	65

6. **Tolerancia de *V. cholerae* a 30 mg/ml de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a una concentración subletal de acidez (pH 5.5).....65**

7. **Producción de la toxina de *V. cholerae*. Las células fueron sometidas a un choque subletal.....66**

ABREVIACIONES Y SÍMBOLOS USADOS

ATCC	Colección Americana de cultivos
	Tipo
A	Absorbancia
ANOVA	Análisis de varianza
ASPs	Proteínas de choque ácido
ADP	Adenosin difosfato ribosa
A₆₀₀	Absorbancia a 600
AMP_c	Adenocil monofosfato ciclico
ATP	Adenosin trifosfato
CT	Toxina del cólera
CaCl₂	Cloruro de calcio
CFTR	Canal iónico
CtxA	Subunidad A de la toxina del cólera
CtxB	Subunidad B de la toxina del cólera
cpm	Cuentas por minuto
DNAasa	Desoxiribonucleasa
"D"	Valor de letalidad
DMSO	Dimetil sulfóxido
Desv. Std	Desviación estándar
DNA	Ácido desoxirubonucléico
EDTA	Ácido etilendiaminotetracético

Fig	Figura (s)
GBP	Nucleotido de guanina bifosfato
GM1	Gangliosido (m 1)
GDP	Difosfato de guanosina
GTP	Trifosfato de guanosina
h	Hora (s)
H₂O₂	Peróxido de hidrógeno
HCl	Ácido clorhídrico
IgG	Inmunoglobulina G
K	Potasio
kDa	Kilodaltons
KCl	Cloruro de potasio
LB	Lurian Bertani
Log	Logaritmo
mg	Miligramos (s)
M	Molar
min	Minuto (s)
ml	Mililitro (s)
nm	Nanómetro (s)
mM	Milimolar
NaCO₃	Bicarbonato de sodio
NaCl	Cloruro de sodio
NaOH	Hidróxido de sodio
NAD	Nicotin adenil fosfato

PE	Proteínas de estrés
PE60	Proteína de estrés de 60
(pHi)	Potencial de hidrógeno interno
(pHo)	Potencial de hidrógeno externo
pH	Potencial de hidrógeno
PCHA	Proteínas de choque ácido
PCHJBH	Proteínas de choque con jugo biliar humano
PPO	Difenil oxazol
RTA	Respuesta a la tolerancia ácida
rpm	Revoluciones por minuto
RD	Dominio regulatorio
³⁵S	Azufre 35
SDS	Dodecil sulfato de sodio
TCP	Toxina del pili
ToxR	Proteína regulatoria de la toxina del cólera
TCA	Ácido tricloroacético
Tris-HCl	Tris-hidroximetil-aminometano
X	Concentración
>	Mayor que
<	Menor que
°C	Grado centígrado (s)
%	Por ciento

σ^B	Factor sigma B
μ l	Microlitro (s)
μ g	Microgramo (s)
μ Ci	Microcuries
UFC	Unidades formadoras de colonia

RESUMEN

Vibrio cholerae es la bacteria que causa el cólera, enfermedad que en países subdesarrollados puede llegar a presentar una alta mortalidad.

Investigaciones realizadas han demostrado que muchos microorganismos desarrollan una respuesta adaptativa cuando crecen bajo condiciones de estrés moderado. En general, la adaptación parece involucrar múltiples genes como es indicado por las proteínas excretadas. Se cree que la función de estas proteínas es proteger a las células de cambios adversos, los cuales pudieran ser letales.

El pH y las sales biliares, son algunas barreras a las que se expone este microorganismo desde la preparación de alimentos hasta la producción de la enfermedad. Por lo que resulta de gran interés investigar si este microorganismo posee la capacidad de producir proteínas del estrés, como respuesta a estos factores, así como si esas proteínas pudieran favorecer la sobrevivencia a condiciones letales de ese u otro estrés.

Las células fueron sometidas a un choque subletal ácido utilizando una solución de HCl 1M (pH 5.5) y jugo biliar humano (3 mg/ml) por 20 min. Las células alcanzaron niveles de crecimiento semejantes al control. Cuando aplicamos un choque subletal ácido y con jugo biliar humano a las células se logró la inducción de tolerancia a condiciones ácidas y con jugo biliar, además se observó que al aplicar el choque subletal (pH 5.5 y 3.0 mg/ml) de jugo biliar las

células resultaron ser 2 a 3 veces mas tolerantes a pH 4.5 y a jugo biliar humano (30mg/ml); esta tolerancia se prolongó hasta por 90min. Además, establecimos que cuando las células se sometían a un estrés subletal ácido (pH 5.5), las células adquirieron tolerancia con jugo biliar humano (30 mg/ml) y esta tolerancia permanecía por 60 min después de aplicado el choque. Cuando analizamos si el choque subletal ácido y con jugo biliar producen un efecto en la producción de toxina, encontramos que al aplicar el choque ácido no se afectó la producción de la toxina, sin embargo al aplicar un choque con jugo biliar establecimos en una de las cepas analizadas una disminución de la toxina. También demostramos que un choque subletal ácido induce la síntesis de 4 proteínas de choque ácido para la cepa C7677 con pesos moleculares de (106, 94, 88 y 77 kDa) mientras que en la cepa 1837 sólo se indujo 1 una proteína con un peso molecular de (106). Las proteínas de choque ácido se siguen sintetizando aun después de 90 min. Además se observó que un choque subletal con jugo biliar provocó la inducción de al menos 7 proteínas de choque con jugo biliar humano para la cepa C7677 (114, 106, 101, 88, 84, 56 y 46 kDa), mientras que en la cepa 1837 solo se indujeron 3 proteínas (97, 88 y 77 kDa). Con todo lo anterior podemos entender algunos mecanismos de que se valen estos microorganismos para poder sobrevivir a condiciones adversas de acidez y jugo biliar humano.

ABSTRACT

Vibrio cholerae is the bacterium that causes cholera, a disease that in developing countries can cause high mortality rate.

Research has been done which shows that many microorganisms develop an adaptive response when grow under moderate stress conditions. In general, adaptation seems to involve multiple genes as it is indicated by synthesis of different proteins. It is believed that the function of these proteins is to protect cells from harsh changes that could be lethal.

pH and bile salts are stresses at which this microorganism is exposed from food preparation to disease production. Because of this, it is of great interest to investigate if this microorganism has the ability to produce stress related proteins, as a response to these factors, as well as if the cells became adapted to those stresses.

Cells were given a sublethal acid shock (pH5.5) and a human bile juice shock (3 mg/ml) for 20 min. After these treatments, tolerance to acid and bile juice was induced. Cells turned out to be 2 to 3 times more tolerant to pH 4.5 and human bile juice (30 mg/ml); this tolerance was maintained by at least 90 min. On the other hand, when the cells were subjected to the acid stress (pH 5.5), they acquired tolerance to human bile juice (30 mg/ml), this tolerance remained for 60 min after the treatment was applied.

Applying the acid shock did not affect enterotoxin production, but bile juice induced a reduction in the production of this protein. Acid shock induced the synthesis of 4 proteins (106, 94, 88 and 77 kDa) in the strain C7677, while in the strain 1837 only the 106 kDa, was induced. These proteins are synthesized even after 90 min of the acid shock. Bile juice induced at least 7 proteins (114, 106, 101, 88, 84, 56 y 46 kDa) in the strain C7677, while in strain 1837 only 3 proteins (97, 88 y 77 kDa) were induced. These results are important to the knowledge of *V. cholera* pathogenesis, and provide useful information for the control of the diseases caused by this bacterium.

INTRODUCCIÓN

El cólera es una enfermedad infecciosa causada por un bacilo gram negativo, *Vibrio cholerae* (Kaper, J. B., et al, 1995).

V.cholerae se clasifica en grupos serológicos con base en la estructura antigénica de uno de sus componentes principales denominados antígenos somáticos O. Así, se han identificado aproximadamente 152 formas del antígeno O. Los serogrupos responsables de cólera epidémico comprenden *V. cholerae* O1 que se divide en tres serogrupos (Inaba, Ogawa e Hikojima) y el *Vibrio cholerae* O139 Bengal (Villeneuve, et al, 1999; Nesper, et al, 2001). De estas bacterias, solamente dos serogrupos, O1 El Tor, Inaba y Ogawa, se han identificado en la epidemia latinoamericana de 1991 (Koo, et al, 1997).

Todos estos *vibrios* pueden colonizar el intestino humano, en donde producen la toxina colérica (CT), la cual causa una alteración en el transporte hidro-electrolítico a través de la mucosa intestinal. De esta manera, se estima que la bacteria provoca una diarrea profusa en 5 de cada 100 infectados, que en caso de no atenderse, puede causar la muerte en pocas horas. Además sólo un 20% presenta manifestaciones clínicas en tanto que en el porcentaje restante, no se presenta sintomatología; sin embargo, excretan el *V. cholerae* en las heces y posiblemente tienen un papel importante en

la diseminación de la bacteria durante las epidemias (Faruque, *et al*, 1998).

El agua representa el medio principal de dispersión de la enfermedad, pero los alimentos contaminados con heces de individuos infectados se sitúan como el vehículo a través del cual la enfermedad es adquirida (Miller, *et al*, 1989; Kaper, J. B., *et al*, 1995).

Después de un periodo de incubación de 12 horas a 5 días, (en un promedio de 2 a 3 días), aparece súbitamente la diarrea abundante y acuosa. Esta diarrea constituye la principal manifestación clínica en todos los pacientes. Sin embargo, puede existir sintomatología previa como anorexia, irritabilidad y malestar abdominal (Kaper, J., *et al*, 1995; Tapia, C. R., *et al*, 1992 y JeevanJyot, *et al*, 1995).

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

Otro mecanismo de defensa que tiene el huésped contra el vibrión es la inmunidad natural, la cual en parte está constituida por producción de anticuerpos

que se estimulan por exposiciones previas a la bacteria. Por esta razón, en las zonas endémicas, la enfermedad afecta, a los niños entre dos y nueve años de edad (Tapia, C. R., *et al*, 1992).

Una vez que se ha ingerido la bacteria, es necesario que sobreviva a la acidez gástrica; llegar a la parte superior del intestino delgado, penetrar a la membrana mucosa y colonizar el epitelio. A partir de este sitio, los microorganismos se multiplican y producen la toxina (CT) que causa la sintomatología característica (Kaper, J. B., *et al*, 1995).

Se han realizado varias investigaciones donde han demostrado que muchos organismos desarrollan una respuesta adaptativa cuando crecen bajo condiciones de estrés moderado. En general, la adaptación parece involucrar múltiples genes como es indicado por las proteínas sintetizadas. Se cree que la función de estas proteínas es proteger a las células de cambios adversos, los cuales pudieran ser letales (Gautan, K., *et al*, 1994; Visick, E. y Sclarke. 1995). La respuesta a estos cambios no deseables en el medio ambiente es crucial para la sobrevivencia de los organismos. El pH bajo y las sales biliares, son algunas barreras a las que puede exponerse este microorganismo desde la preparación de alimentos hasta su desarrollo en el intestino, y dado que hay mucho desconocimiento al respecto con *V. cholerae*, nosotros nos propusimos analizar el efecto de un choque subletal ácido y con jugo biliar humano en el crecimiento y la producción de la toxina de *V. cholerae*, así como determinar si estas condiciones inducen la síntesis de proteínas del estrés. Esto nos ayudaría a tener un conocimiento más amplio sobre la fisiología de este microorganismo, lo cual serviría para tomar medidas de control más adecuadas que nos permitan prevenir

y controlar la enfermedad del cólera.

ANTECEDENTES

EPIDEMIOLOGIA DEL CÓLERA

Se estima que 120,000 defunciones son causadas por el cólera cada año en el mundo, afectando principalmente a niños.

El cólera ha sido categorizado como una de las infecciones emergentes y dispersantes en el mundo. Recientemente se suscitaron eventos que marcaron la reemergencia de la enfermedad. En 1991 se presentaron muchos casos de cólera en América Latina. En 1994 cerca de 70,000 refugiados de Rwanda y Zaire fueron afectados con la enfermedad, y de ellos 12,000 murieron. De 1992 a 1993 reemergió el cólera en la India. Todos estos episodios posiblemente marcaron el inicio de la octava pandemia de cólera (Faruque., *et al*, 1998).

PATOLOGÍA Y FACTORES DE VIRULENCIA

La infección de *V. cholerae* empieza con la ingesta de alimentos o agua contaminada con este organismo. En voluntarios se ha podido demostrar que la dosis infectiva es de 10^4 a 10^8 unidades formadoras de colonias (UFC). (Kaper, *et al*, 1995).

La acidez gástrica constituye uno de los principales mecanismos de defensa del hospedero. Sin embargo, existen otros factores que influyen en la patogénesis de *V. cholerae*; éstos pueden

estar relacionados con el hospedero o directamente con el bacilo (González, S. N y S. P. Saltigeral, 1992).

Se ha demostrado que individuos que tienen el grupo sanguíneo O, son mas susceptibles a presentar infecciones más severas, que los que tienen otros tipos. También se han realizado estudios en voluntarios donde se demostró que ingiriendo 25 µg de la toxina pura (ingerida con cimetidina y NaCO₃ para contrarrestar la acidez) fue suficiente para producir la sintomatología característica del cólera. Sin embargo, otras investigaciones realizadas también en voluntarios demostraron que sólo 5 µg de la toxina bastaron para producir la diarrea (Kaper, *et al*, 1995).

Se ha visto que esta bacteria posee además otros factores involucrados en la virulencia, como son las estructuras de colonización que intervienen en la adhesión de la bacteria a las células del huésped. Entre estas estructuras se encuentran los pili (*Tcp*), una hemaglutinina y algunas proteínas de membrana. Aunque la CT es la responsable de la mayor parte de los síntomas de la enfermedad, los vibrios también producen otras toxinas, que contribuyen en menor grado a la severidad de la diarrea (Champion, *et al*, 1997).

Muchas bacterias patógenas regulan la expresión de genes de virulencia de una manera coordinada con cambios en el medio ambiente. Por ejemplo, *V. cholerae* posee un regulon de virulencia compuesto de aproximadamente 20 genes involucrados en la colonización, la producción de la toxina y la

sobrevivencia de las bacterias con el hospedero. Se ha visto que estos factores están coordinadamente regulados por estímulos externos, tales como la temperatura, pH y la osmolaridad. La expresión del regulón es dependiente del activador transcripcional *ToxR*, que es influenciado por ciertas condiciones ambientales (Skorupski. K., and Taylor. R. K. 1997).

Waldor y Mekalanos (1996), estudiaron los genes para la producción de la toxina del cólera (*ctxA* y *ctxB*), así como otras toxinas (*zot* y *ace*). Ellos encontraron que todos ellos están ubicados en una misma región del cromosoma bacteriano, flanqueada por secuencias de inserción (*attRS1*). Se ha establecido que estos genes integrados al cromosoma, son en realidad parte del ADN de un bacteriófago filamentoso (CTX *), semejante al colifago M 13, que confiere a estos factores de virulencia la capacidad de transmitirse a otras bacterias, tanto vertical como horizontalmente. La expresión de estos factores se da bajo una compleja interacción entre genes ubicados dentro (*ctxAB*) y fuera (*toxR* y TCP) de dicha región. Este bacteriófago requiere de la expresión de los TCP bacterianos, ya que éstos actúan como sus receptores. Estos investigadores también demostraron que la eficiencia con que se transfieren dichos fagos entre las bacterias depende de las condiciones ambientales en que se encuentren.

MECANISMOS DE ACCION DE LA TOXINA

La enterotoxina es una molécula compuesta por cinco subunidades B, inmunogénicas, que además son las responsables de la adhesión de la toxina al epitelio; y una subunidad A, no inmunogénica, responsable de la alteración en la permeabilidad de la membrana intestinal. La enterotoxina se une a la superficie de las células epiteliales de revestimiento del intestino a través de un receptor específico (gangliósido GM1) expresado en la superficie de los enterocitos. Después de la unión de la toxina al receptor GM1, se produce la endocitosis del complejo toxina-receptor. En este proceso se forma un endosoma a partir de la membrana celular, el cual transporta la toxina a través del complejo de Golgi y del retículo endoplásmico, hasta la membrana basolateral de la célula donde las subunidades A y B son liberadas. Este mecanismo de transporte se denomina transcitosis, y durante él, la subunidad A de la toxina del cólera experimenta su activación como resultado de la proteólisis por la reducción de un puente disulfuro. (Kaper, J. B., *et al*, 1995; Sandvig, *et al*, 1996).

Un segmento de la subunidad A (A1) activa a la proteína ligadora de nucleótidos de guanina (GBP), la cual posee la capacidad de unir moléculas de trifosfato de guanosina (GTP) para luego unirse a un componente regulador de la enzima adenilatociclase y promover la activación. La adenilatociclase, cataliza la conversión de ATP

AMPc y el incremento en las concentraciones intracelulares de ésta molécula, activa la enzima proteína cinasa A. Esta última fosforila residuos de serina en múltiples proteínas. La importancia de éste mecanismo mediado por AMPc radica en que en los enterocitos, el transporte a través de la membrana celular de algunos electrolitos esta regulado por la generación de éste segundo mensajero (Hirst, T. R., *et al* 1987; Lencer, *et al*, 1995; Finkelstein, R. 1987).

La toxina del cólera induce el desarrollo de diarrea mediante la inhibición de la absorción de cloruro de sodio y la facilitación de la secreción de cloro. Los enterocitos realizan la excreción de cloro a través de un canal iónico localizado en la superficie apical de los enterocitos denominados CFTR constituido por dos dominios, a los cuales se unen moléculas de ATP, y un dominio regulador (RD), que bloquea el poro central del canal a través del cual se realiza la excreción de cloro desde el citoplasma celular [(De Wolf, 2000; Connell, *et al*, 1995). (Fig 1)].

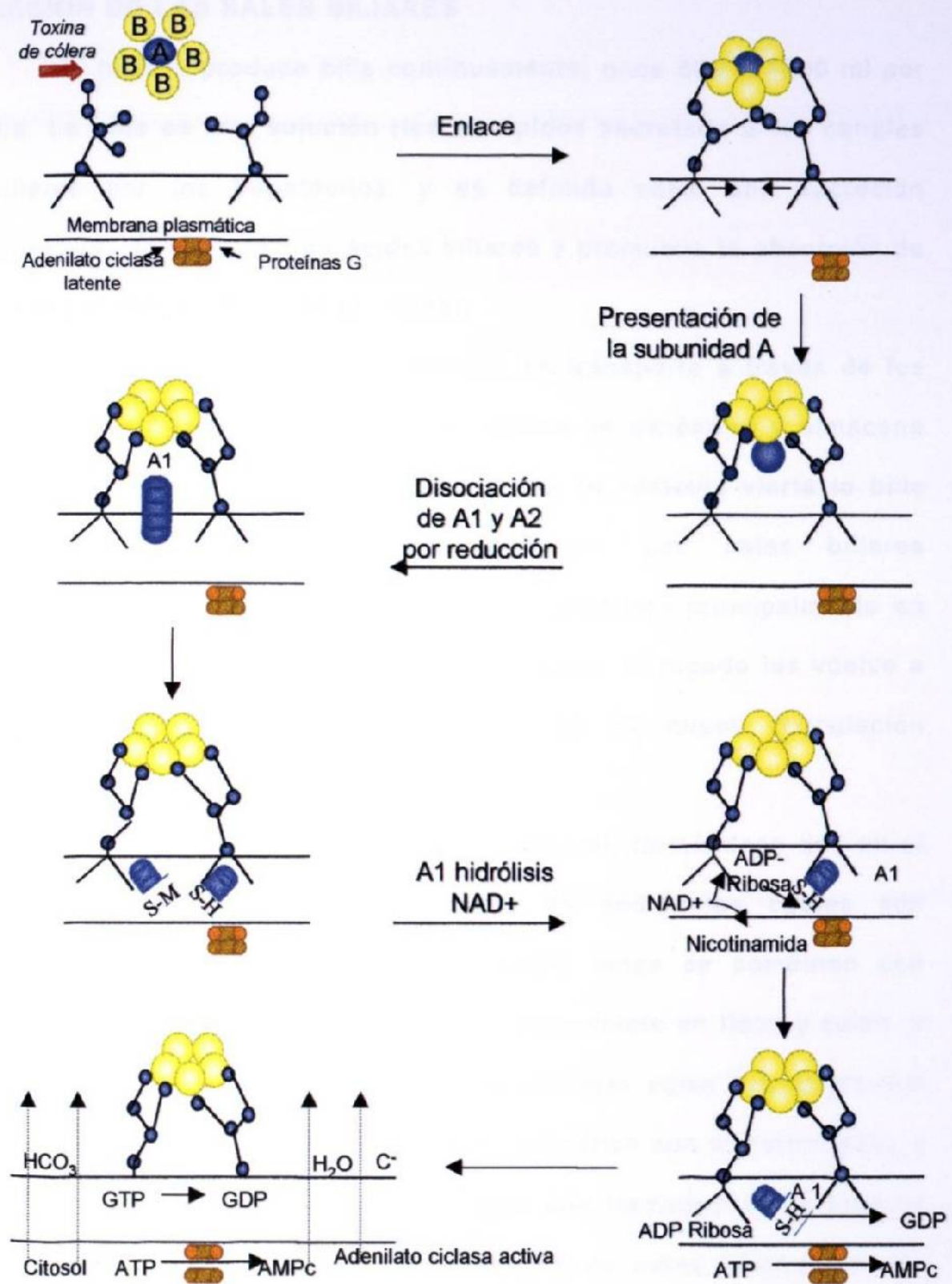


Fig. 1) Modo de acción de la toxina de *V. cholerae*

ACCION DE LAS SALES BILIARES

El hígado produce bilis continuamente, unos 800 a 1000 ml por día. La bilis es una solución rica en lípidos secretada a los canales biliares por los hepatocitos, y es definida como una secreción digestiva, porque conjuga ácidos biliares y promueve la absorción de lípidos (Granger. N.D., *et al.*, 1985).

La bilis producida en el hígado, se transporta a través de los canalículos hasta la vesícula biliar, donde se concentra y almacena durante el ayuno. Después de la comida, la vesícula vierte la bilis almacenada y concentrada al duodeno. Las sales biliares (constituyente principal de la bilis) se reabsorben principalmente en la porción distal del intestino delgado (íleon). El hígado las vuelve a captar desde la sangre para utilizarlas de nuevo (circulación enterohepática) (Wright. R., *et al.*, 1985).

Las sales biliares derivan del colesterol, formándose dos en el humano: colato y quenodesoxicolato de sodio, las cuales son llamadas sales primarias. Posteriormente estas se combinan con residuos de glicina y taurina formando taurocolato en íleon y colon, y por la acción de algunas bacterias anaerobias como *Fusobacterium sp* y *Bacteroides sp*, las sales biliares primarias son transformadas a desoxicolato y litocolato de sodio que son llamadas sales biliares secundarias. La subsiguiente modificación de estas últimas, resulta en la producción de sales biliares terciarias las cuales son insolubles

en agua y se eliminan casi totalmente en las heces [(Wright, R., et al, 1985), Fig 2].

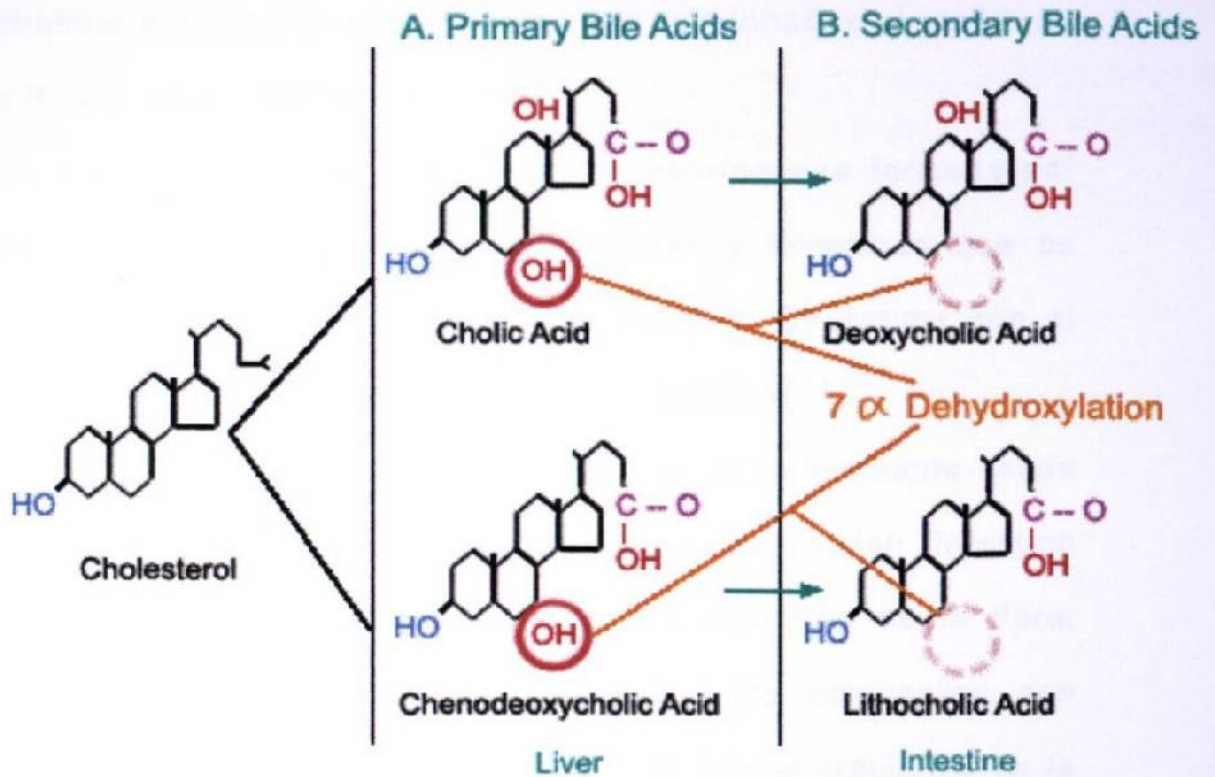


Fig 2. Derivación de los ácidos biliares de humanos

La función de las sales biliares es la emulsificación de las grasas, debido a su naturaleza anfipática, las sales biliares poseen acción detergente, ya que son capaces de disminuir la tensión superficial de las partículas de grasa, rompiéndolas y formando micelas. En segundo lugar contribuyen en la absorción de ácidos

También se ha observado que las sales biliares son capaces de inhibir el crecimiento de bacterias de la flora normal entre ellas *Lactobacillus sp*, *Bacteroides fragilis*, *Enterococcus sp*, *klebsiella sp* y *Clostridium perfringens* cuando estas son adicionadas al medio de cultivo (Floch, et al, 1972).

La flora intestinal es una población heterogénea formada por más de 400 especies distintas de bacterias y levaduras que se encuentran en el tubo digestivo del ser humano. Se estima que el numero total de bacterias que la constituyen es de 10^{14} .

La densidad de estas bacterias aumenta paulatinamente desde el estómago, que es prácticamente estéril, hasta el colon (intestino grueso) donde alcanza su máximo. Algunas bacterias de la flora, tales como las *Bifidobacterias*, *estreptococos* y *los lactobacilos*, son considerados beneficiosas para el individuo. Las alteraciones de la flora se asocian con múltiples patologías por lo cual es importante poder impedir su desaparición (Dunne. C., et al, 2001).

En condiciones normales toda la flora intestinal permanece en un estado de equilibrio dinámico, es decir, que aunque esté sometida a constantes cambios se reequilibra, siempre y cuando no se den situaciones muy drásticas. El estrés puede provocar cambios que llegan a persistir hasta 2 ó 3 semanas después de haber finalizado este (Dunne, C., et al, 2001).

Las condiciones ambientales que pueden presentarse en el lumen intestinal, como anaerobiosis, temperatura de 37°C y la

presencia de sales biliares, fueron analizadas por Fernández., *et al* en 1977, para determinar su efecto sobre el crecimiento y la producción de la toxina en *V. cholerae*. Cuando la temperatura de incubación fue aumentada a 37°C, no se detectó toxina (< 0.1 µg ml⁻¹) y no se encontraron formas pleomórficas, observadas regularmente en los cultivos incubados aeróbicamente a 30 o 37°C. Cuando se adicionó 0.1% de deoxicolato de sodio al medio de cultivo, el crecimiento fue inhibido bajo condiciones aeróbicas tanto a 30 como a 37°C. También se observó que a 30°C bajo condiciones aeróbicas y 37°C bajo anaerobiosis, la producción de la toxina no fue afectada significativamente por la presencia de deoxicolato de sodio, causando un incremento en la producción de la toxina (5 µg ml⁻¹) debido a la liberación de la toxina unida a la célula.

Heredia, *et al* en 1991 estudiaron el efecto que tienen las sales biliares y el jugo biliar sobre el crecimiento, la esporulación y la producción de enterotoxina de *C. perfringens* y encontraron que las sales inhibieron el crecimiento en diferentes grados. Una mezcla de sales biliares completa inhibió el crecimiento de la cepa productora de enterotoxina, sin embargo cuando adicionaron jugo biliar humano observaron que se inhibía completamente la producción de enterotoxina.

Cuando las células de *V. cholerae* se ponen en contacto con las sales biliares, se ha encontrado un aumento de pH, el cual estimula a

la bacteria y esto favorece para que la infección se presente (Gupta, S., y R. Chowdhury., 1997).

La resistencia a detergentes o la tolerancia inducida a estos por organismos gastrointestinales como *Enterococcus faecalis* ATCC 19433 fue analizada por Flahaut, *et al*, (1996). Ellos encontraron una respuesta rápida de las células cuando se pusieron en contacto con sales biliares y dodecil-sulfato-de sodio (SDS). La muerte por altas concentraciones de detergentes fue casi instantánea, sin embargo con una adaptación con concentraciones subletales de sales o de SDS se produjo una tolerancia que permitió sobrevivir niveles letales. Sin embargo la resistencia a cambios letales subsecuentes se incrementó progresivamente alcanzando un máximo después de 30 min de adaptación.

En el mismo año Tannock, *et al*, observaron el efecto sobre el crecimiento de *Lactobacillus* usando (taurocolato de sodio) a concentraciones fisiológicas. Ellos encontraron que esta sal biliar inhibió el crecimiento de cepas que producen relativamente grandes cantidades enzimas hidrolasas. Demostrando que esta inhibición en el crecimiento fue debida a la acumulación de ácido cólico en el medio de cultivo como un resultado de la actividad enzimática.

PROTEINAS DE ESTRÉS

Las proteínas de estrés (PE) son producidas como parte de la respuesta celular a condiciones no favorables, como la exposición a calor, a sustancias químicas incluyendo los farmacéuticos y contaminantes ambientales y patógenos incluyendo virus, bacterias y parásitos eucarióticos, (Lawrence, E. H, y J. A. Ryan. 1997). Se cree que la función de estas proteínas es proteger a las células de cambios adversos, los cuales pueden ser letales (Morimoto, R. J., *et al*, 1990; Byrd, *et al* 1999; Seymour *et al*, 1999; Nepple, *et al* 1997; Foster, W. J. 1999; Ferianc, *et al* 1998; Yildiz, *et al* 1998; Farr, y Kogoma 1991).

Se ha determinado que las PE están involucradas en funciones esenciales para la célula, tales como translocación, construcción y ensamblaje de proteínas. Debido a que primeramente esta respuesta se estudió por cambios de temperatura, actualmente muchos investigadores utilizan indistintamente proteínas del estrés o proteínas del choque térmico (Schlesinger, M.J. 1988).

La mayoría de las proteínas de choque térmico se clasifican en 4 familias de acuerdo a su peso molecular; la familia de peso molecular alto que comprenden proteínas con pesos de 90 a 83 kDa, la familia de 70 kDa que comprenden proteínas de (78 a 66 kDa) entre estas se encuentra la DnaK, la cual es considerada como 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, la familia de 60 kDa presentes en bacterias, mitocondrias y cloroplastos, entre las que destaca la GroEI estas proteínas no solamente presentan un alto grado de conservación estructural, sino también funcional. Varios investigadores han demostrado que son indispensables para el crecimiento a todas las temperaturas y probablemente tiene un papel importante en los procesos de replicación del DNA y en la transcripción. Y las proteínas de bajo peso molecular (menores de 30 kDa) (Morimoto, I.R, et al., 1990).

Muchos investigadores han estudiado la estructura y función de estas proteínas. Yamaguchi, H., et al (1997) estudiaron las relaciones entre la expresión de proteínas de choque térmico (PE60) por *Helicobacter pylori* y su adhesión a células de carcinoma gástrico (MKN45). Se encontró que la inducción de esta respuesta provocaba una disminución de células de adhesión bacteriana. Ellos establecieron que la responsable de esta disminución fue la proteína MabH20, la cual es homóloga a la PE60 de *E. coli*.

La producción de proteínas de choque térmico en *V. parahaemolyticus* y otras especies de *Vibrios* fue investigada por Koga, et al, en (1996), ellos encontraron que al cambiar las células de 30 a 42°C se producía al menos una PE de 58 kDa, la cual era

homóloga a la GroEL de *E. coli*. Además se detectaron seis de otras especies de *Vibrios*.

Benkirane, R., *et al*, en (1997), estudiaron la presencia de proteínas de choque térmico en *Streptococcus suis* se encontró que la proteína de 60 kDa aumentó significativamente su síntesis, además se demostró que la mayoría de esta se excretaba al sobrenadante, en tanto que sólo una pequeña cantidad permaneció unida a la célula.

Desde hace tiempo se ha reportado que el regulador central de los genes de virulencia de *V. cholerae* es *ToxR* una proteína unida al DNA transmembranal. Una mutante de *V. cholerae* carente de DnaK presentó características fenotípicas de células deficientes de actividad de *ToxR* por lo que se especula que DnaK juega un papel crucial en la patogénesis de *V. cholerae*. (Chakrabarti, S., *et al* 1999).

Hamel, J., *et al*, en 1997, caracterizaron la respuesta al choque térmico de *S. pneumoniae*. Ellos observaron la inducción de proteínas de choque térmico (P62, 72 y 80) después de cambiar la temperatura de 37 a 45°C. Además establecieron que entre ellas, la de 72 kDa era muy inmunogénica.

La respuesta al estrés se ha involucrado en algunos procesos fisiológicos celulares, tales como el fenómeno de adquisición de tolerancia, el cual se define como la capacidad que tienen las células de tolerar una condición letal como resultado de la exposición previa a una condición subletal (Watanabe. J, 1997).

Heredia, et al (1998), estudiaron la alteración en la esporulación, la producción de la toxina y la síntesis de proteínas por *C. perfringens* seguida de un choque térmico.

Ellos observando que al aplicar un choque térmico de 43 a 50°C aplicado las primeras horas de incubación, retrasó la producción de la enterotoxina y la cantidad de esporas. Se identificaron 7 PGHT en células vegetativas y 4 en células en esporulación. Además se estableció que la mayoría de ellas se localizaba en membrana, y dos de ellas eran homologas a las proteínas GroEL y DnaK de *E. coli*. Y *L. lactis*.

La respuesta a diferentes condiciones de estrés de la bacteria fototrófica *Rhodobacter shaeroides* fue investigada. Las condiciones estresantes incluyeron disminución de etanol, radiación ultravioleta, y cambios de temperatura (42°C). Los resultados mostraron que todos los factores de estrés aplicados, causaron modificaciones en el patrón de proteínas, observándose la inducción de proteínas comunes, así como otras específicas de la condición de estrés (Nepple, B. B y Bachofen, R. 1997).

Se ha establecido que la respuesta al estrés de *B.subtilis* es disparada por una gran variedad de condiciones ambientales y metabólicas. Se ha establecido que estos activan el factor transcripcional σ^B , El cual se ha involucrado con la resistencia al estrés oxidativo, la desnaturalización de proteínas y al estrés osmótico. (Akbar, et al, 1999).

Así, estudios semejantes se han realizado en una gran variedad de organismos, en donde se ha buscado y se ha encontrado esta respuesta. Dentro de estos se encuentran *Yersinia enterocolitica* (Shenoy, K. y E. A. Murano, 1996), *Erwinia carotovora* subespecie *carotovora* (Andersson, et al 1999), hongos como *Aspergillus nidulans* (Fillinger, et al, 2001) y una bacteria psicrófila (*Vibro sp*) (Araki, 1991).

ADQUISICIÓN DE TOLERANCIA Y RESPUESTA CRUZADA

Heredia, *et al* (1997) estudiaron la resistencia conferida en *Clostridium perfringens* por un choque térmico. Observando que el cambio a 50°C por 30 min incrementó la tolerancia a 55°C de células vegetativas al menos dos a tres veces. También observaron que la tolerancia fue mantenida 2 h después del choque térmico.

La capacidad que confiere la aplicación de una condición de estrés subletal para dar protección contra otras condiciones letales de estrés es referida como protección cruzada. Varios estudios han demostrado que la adaptación ácida confiere resistencia a un amplio rango de condiciones de estrés incluyendo el calor, sales, H₂O₂, cristal violeta y polimixina. (Bearson, *et al*, 1997).

Algunos factores utilizados para la preservación de alimentos, tales como la temperatura, la actividad de agua, el pH etc, constituyen un estrés ambiental que pudiera alterar a un organismo haciéndolo responder contra condiciones subsecuentes de estrés, por ejemplo un estrés subletal térmico en un organismo pudiera conferir resistencia a un subsecuente tratamiento que podría ser distinto a temperaturas, es decir que los cambios inducidos por un estrés pudieran proteger a las células contra otros cambios ambientales (Leyer, *et al*, 1993; Skorupski y Taylor., 1997).

Esta respuesta fue estudiada en *Enterococcus faecalis*. Las células se expusieron a estrés subletal de sales biliares, pH ácido y choque térmico. Las

células sometidas a altas temperaturas y a sales biliares, indujeron resistencia a condiciones extremas tanto del mismo como de diferente estrés, mientras que las sometidas a bajos pH no mostraron protección contra la exposición a sales biliares. Este análisis reveló que cada tratamiento era capaz de inducir a un conjunto de proteínas particulares, entre ellas estaban la DnaK y GroEl (Flahaut, *et al*, 1996).

Estos mismos investigadores, pero en 1997, estudiaron la respuesta al estrés alcalino en *E. faecalis*: observando que las células adaptadas a un pH de 10.5 fueron tolerantes a condiciones de pH 11.9 pero fueron más sensibles a pH ácidos. El análisis de las proteínas de estrés reveló que 37 polipeptidos fueron inducidos, entre los cuales se encontraban la DnaK y GroEl. Ellos sugirieron que la exposición de las células a las sales biliares y condiciones alcalinas provocan respuestas semejantes.

Taglicht, *et al* (1987) determinaron que un cambio alcalino induce una respuesta a choque térmico en *Echerichia coli*. Ellos encontraron que la respuesta fue dependiente de un gen celular funcional (*rpoH*) que es un regulador de la respuesta a choque térmico. Sin embargo, esta respuesta fue observada solamente cuando se alcalinizaba el pH extracelular, sin que hubiera modificaciones del pH intracelular.

Holmquist, *et al* (1993) analizaron la inducción de proteínas del estrés en especies marinas de *Vibrios* durante un periodo de deficiencia de carbono y un cambio de temperatura. Ellos demostraron que estas condiciones inducían la síntesis de proteínas del estrés tales como DnaK y GroEl. Sin embargo, después de un largo periodo de carencia de carbono solo se indujo la DnaK.

Humphrey, *et al.* (1993), estudió el efecto de la variación de la temperatura sobre la tolerancia al ácido y al calor en *Salmonella enteritidis*, demostrando que cuando las células se transferían a temperaturas de 20, 37 y 46°C, se producía un incremento en la tolerancia tanto al ácido como al calor.

Estos mismos investigadores en 1996, observaron que dos aislados de *Salmonella enteritidis* PT4 que fueron tolerantes al calor, ácido y H₂O₂ fueron más virulentos en ratones y más invasivos en gallinas

Lewis, *et al.* (1995), estudiaron la inducción de tolerancia a calor, congelación y sales en *Saccharomyces cerevisiae*. Observaron que después de exponer a la levadura a un choque por calor y a sales se producía un incremento en la tolerancia al calor, a la congelación y a las sales. Al agregar un inhibidor de la síntesis de proteínas, esta respuesta tolerante se vio muy reducida y la tolerancia a la congelación fue completamente inhibida.

García, *et al.* (2001), demostraron que un choque subletal térmico en *Clostridium perfringens* brindó protección contra una subsiguiente exposición letal al frío y viceversa. Las células expuestas a un choque subletal térmico fueron dos veces más tolerantes al frío con respecto a las que no fueron adaptadas. En el caso en que se aplicó un choque subletal frío, las células también fueron más termotolerantes comparadas con el control. La adición del cloranfenicol en los experimentos demostró que la síntesis de proteínas del estrés fue necesaria para la protección cruzada entre ambos tratamientos.

Continuando con lo mismo, Juneja, *et al.* (1998) estudiaron la influencia de pH, acidulantes y temperatura de crecimiento al calor y composición de ácidos grasos de *Listeria monocytogenes*. Ellos observaron que la sensibilidad de la

bacteria al calor se ve incrementada al crecer las células a bajas temperaturas y pH neutro, por otro lado, este efecto se revertió cuando el pH del medio fue acidificado.

Sin embargo, Ravishankar y Harrison en 1999, encontraron que *L. monocytogenes* no presentó protección cruzada al exponerse previamente a un choque subletal ácido contra un sistema de lactoperoxidasa.

También Garren, et al (1998) comprobaron que las cepas de *E.coli* O157:H7 y no O157:H7 incrementaban su resistencia a pH ácidos, si recibían previamente un choque subletal frío. Sin embargo, cuando el choque subletal fue ácido, no se registró protección contra otras condiciones estresantes.

Svensäter, et al (2000) demostraron que *Streptococcus mutans* también presenta una respuesta cruzada, la aplicación de un choque ácido subletal capacitó a las células a sobrevivir a condiciones letales de sales, calor, oxidación e inanición.

Wong, et al (1998) investigaron el efecto de un tratamiento ácido subletal en la sobrevivencia, enteropatogenicidad y producción de proteínas en *Vibrio parahaemolyticus*. Ellos aplicaron un choque ácido, y encontraron que las células fueron más resistentes a un cambio drástico de acidez y a otras condiciones de estrés como baja salinidad e inanición. Ellos caracterizaron las proteínas durante este estrés y encontraron la inducción de proteínas.

PROTEINAS DEL CHOQUE ÁCIDO

Algunas condiciones de estrés forman parte del sistema de defensa del hospedero para prevenir o limitar colonizaciones bacterianas. Una importante condición de estrés que tiene que ser afrontada por muchos microorganismos enteropatógenos, es el pH bajo. Por ejemplo, en algunos microhabitats del cuerpo humano, los patógenos microbianos son expuestos al pH ácido del estómago, del tracto urinario y en los fagolisosomas (Karem, L., *et al*, 1994).

La respuesta a pH ácido en microorganismos como *Salmonella Typhimurium*, *E. coli* y *Shigella*, ha sido ampliamente estudiada por Foster, (1991, 1993, 1995 y 1999; Garren, *et al*, (1997) y por Waterman y Small (1996) entre otros. Sin embargo las comparaciones entre los investigadores es difícil debido a variaciones en las condiciones de ensayos realizados (Foster 1999).

El estrés ácido puede ser descrito como el efecto biológico provocado por ácidos inorgánicos y orgánicos débiles. Estos ácidos pueden difundirse a través de la membrana celular y disociarse dentro de las células, bajando el pH interno (pH_i). (Bearson, *et al*, 1997).

Se ha establecido que las células crecidas a un pH 5.8 producen sistemas homeostáticos que mantienen el pH interno (pH_i) a niveles compatibles que son mantenidos cuando las células son posteriormente sometidas a pH 3.0. El (pH_i) parece ser el responsable de la inducción de una señal que estimula las síntesis de algunas proteínas de choque ácido (ASPs) (Foster. J. 1999).

Foster, *et al.*, (1991, 1995); estudiaron a *S. Typhimurium* al ser sometida a un choque ácido. Ellos encontraron que las bacterias tuvieron la capacidad de

sobrevivir a un pH bajo (3.0 - 4.0), si primeramente se adaptaban a un pH moderadamente ácido (5.5 - 6.0). Este fenómeno se denominó como respuesta a la tolerancia ácida (RTA). La condición de los cambios ácidos moderados es conocida como pre-choque (o/ choque subletal), y las proteínas que se sintetizan como respuesta a esta condición son conocidas como proteínas de choque ácido (PCHA)

Este mismo investigador pero en el año 1994 demostró que varios genes están asociados con la tolerancia ácida en *Salmonella*. Los genes identificados (*fur*, *ent*, *atrD*) afectaron el metabolismo del hierro, aumentando la capacidad amortiguadora interna de la célula; aumentando la sobrevivencia al ácido.

Los factores sigma juegan un papel importante en la respuesta a la tolerancia ácida. Los mutantes del gen *rpoS* son capaces de inducir sólo una modesta respuesta a la tolerancia ácida, y no pueden producir los niveles de tolerancia ácida logrados por una cepa de *rpoS*^{*}. La razón aparente es la producción de 7 proteínas de choque ácido dependientes del factor sigma (Lee, et al, 1994; Foster 1995 A).

En diversos nichos ecológicos, se han encontrado como constituyentes comunes ciertos compuestos orgánicos como los ácidos propiónico y butírico, por ejemplo el contenido intestinal de humanos puede tener ciertos niveles de ácidos grasos volátiles, producidos como resultado de la fermentación por la flora natural, sin embargo, estos ácidos orgánicos pueden tener también un efecto contra el crecimiento y la viabilidad de otras bacterias. En la actualidad, los ácidos anteriormente citados, son comúnmente usados para la conservación de alimentos (Guifoyle, y Hirshfield., 1995).

McKellar y Knight (1999), aislaron 19 cepas de *E. coli* O157:H7 de humanos y alimentos y posteriormente fueron examinadas en su capacidad para crecer y sobrevivir a pH bajo en ácidos inorgánicos (HCl) y orgánicos (acético). Encontrando que el HCl fue más efectivo para inhibir las bacterias después de 6 h de exposición, mientras que el ácido acético fue inhibitorio después de 24 h. Además, las cepas aisladas de humanos sobrevivieron al tratamiento ácido significativamente mejor que las cepas aisladas de alimentos fermentados.

V. cholerae es un patógeno facultativo de humanos que puede sobrevivir a exposiciones de ácidos orgánicos e inorgánicos en el estómago e intestino delgado. Merrel y Camilli (2001), demostraron que *V. cholerae* es capaz de inducir una RTA por exposición a ácidos orgánicos e inorgánicos.

Cuestiones semejantes fueron estudiadas por Brudzinsky y Harrison en 1998, utilizando como modelo a *E. coli* O157:H7 y la condición de acidez (ácido acético). Ellos encontraron que células sometidas a un choque subletal de pH 5.0 fueron capaces de sobrevivir hasta 1000 veces más, comparadas con las que no recibieron el prechoque.

Schaik, *et al* (1999), Demostraron que células de *Listeria monocytogenes* en fase log se volvieron más tolerantes a una gran variedad de estímulos ambientales seguido de una adaptación ácida a pH 5.5. Estos investigadores demostraron que las células adaptadas también presentaron un incremento en la tolerancia a nisina y en menor grado a la lacticina.

Waterman, *et al*, (1998) analizaron que ciertos patógenos entéricos sensibles al ácido son protegidos contra condiciones extremas ácidas cuando son inoculados dentro de alimentos sólidos. *Salmonella* también pudo sobrevivir

cuando se inoculó en huevo cocido, que es una fuente de proteínas y bajo en grasa. Estos resultados pueden explicar porqué las especies de *Salmonella* tienen una alta dosis infectiva (10^5 células) cuando se administraron en forma aislada, sin embargo se ha observado que causan enfermedad a dosis bajas (50 a 100 organismos) cuando son consumidos como contaminante de alimentos.

En un trabajo realizado con *Shigella flexneri*, se observó que la bacteria tenía la capacidad de sobrevivir a un pH de 2.5. Se determinó que esta resistencia ácida podría contribuir a que se presentara la infección, además que ésta respuesta dependía de proteínas protectoras y del factor sigma (Waterman y Small., 1996).

Karem, *et al*, (1994), diseñaron un estudio para examinar la respuesta fisiológica y celular al estrés ácido en *Aeromona hydrophila*. Ellos demostraron que la bacteria presentó una importante RTA que era capaz de proteger a las células a pH 3.5. Dicha tolerancia al ácido era inducida por la exposición previa a un pH 5.0 por 20 min. Así mismo, la adición de cloranfenicol al medio durante la primera exposición al ácido, impidió el desarrollo de la tolerancia, indicando el importante papel que jugaban las proteínas en el proceso. También en este trabajo, caracterizaron las proteínas inducidas por este estrés que fueron 28.

Los microorganismos han sido usados en tecnologías de alimentos en donde frecuentemente se someten a estrés ácidos durante procesos de fermentación, por ejemplo. Muchos microorganismos sin embargo pueden salir airosos de estas condiciones, entre ellos se encuentran muchos probióticos los cuales pueden sobrevivir al estrés ácido del estómago y llegar al intestino y jugar un papel benéfico. Las Propionibacterias son usadas en la preparación de quesos

y como reconstituyentes de la flora intestinal (Hyronimus, *et al*, 2000; Moser y Savage 2001; Dunne, *et al*, 2001).

Jan, *et al*, (2001), estudiaron los cambios en la síntesis de proteínas y la morfología durante la adaptación ácida de *Propionibacterium freudenreichii*. Las células fueron expuestas a un choque moderado de pH 5.0 y posteriormente se aplicó un choque letal de pH 2.0. Se observó que las células adaptadas fueron más resistentes que las que no fueron tratadas, además demostraron que la síntesis de proteínas fue requerida para la RTA al suprimirse su respuesta al agregar cloranfenicol a los cultivos.

Esto mismo fue observado con *Lactobacillus sanfranciscensis* cuando De Angelis, *et al*, (2001) observaron que cuando adicionaron cloranfenicol a los cultivos en la fase de adaptación hubo una completa inhibición del efecto protector, sugiriendo que la inducción de la síntesis de proteínas fue requerido para la respuesta a la tolerancia ácida.

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

Villarreal, *et al* (1999) estudiaron la inducción de las proteínas de choque ácido y el grado de resistencia ácida conferida en *Clostridium perfringers* por un choque ácido. Observando que un choque subletal a pH 4.5 por 20 min incrementó la tolerancia a células al menos 5 veces con respecto al control. Además también determinaron 5 proteínas que se indujeron con el choque subletal.

HIPÓTESIS

Vibrio cholerae responde a condiciones subletales de acidez y jugo biliar humano mediante la síntesis de proteínas de estrés y la adquisición de tolerancia a esos factores.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar la respuesta de *V. cholerae* al choque ácido y al jugo biliar humano.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

- 1.- Determinar el efecto de un choque ácido y de jugo biliar humano sobre el crecimiento de *V. cholerae*.
- 2.- Determinar si existe adquisición de tolerancia a condiciones de pH ácido y presencia de jugo biliar humano sobre el crecimiento de *V. cholerae*, por exposición previa a esas condiciones.
3. Determinar la duración de tolerancia adquirida al ácido y jugo biliar humano.
4. Determinar si un choque subletal (ácido o por jugo biliar) es capaz de inducir una tolerancia cruzada, entre esos tipos de estrés.

5.- Establecer si un choque ácido o por jugo biliar producen algún efecto en la producción de la enterotoxina de *V. cholerae*.

6.- Establecer el efecto del choque ácido y jugo biliar sobre el patrón de proteínas producidas por la bacteria.

MATERIAL Y METODOS

CEPAS UTILIZADAS

Se usaron las cepas de *Vibrio cholerae* C7677 - O1 Ogawa y la cepa 1837 no O1 (0139) toxigénicas, proporcionadas por la Dra. Elisa I. Elliot de la División de Microbiología del Centro para la Seguridad de Alimentos y Nutrición Aplicada de la FDA, Washington D.C. EUA. Estas fueron conservadas en agar infusión cerebro corazón (ICC, DIFCO) a temperatura ambiente, y se realizaron resiembras cada 3 meses.

ACTIVACION DE LAS CEPAS

Para la activación de las cepas se utilizaron tubos con 5 ml de caldo LB (Luria Bertani, [10 g de tripticasa peptona de caseína, BBL; 5 g de extracto de levadura, BBL; 10 g de NaCl, el pH final fue de 7.0 ± 2]). Los cuales se inocularon con una asada del cultivo de reserva y se incubaron a 37°C por 20 a 24 h.

EFFECTO DE UN PRE-CHOQUE ÁCIDO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Vibrio cholerae*

Estos experimentos tuvieron como fin conocer las condiciones de pH ácido que eran subletales a *V. cholerae*. Las cepas ya activadas se inocularon (1%) en tubos con 5 ml de caldo LB y se incubaron a 37°C. Cuando los cultivos alcanzaron la parte media de la fase logarítmica (A_{600} 0.100 a 0.150, en un espectrofotómetro Sequoia Turner modelo 340), se les adicionaron diferentes concentraciones de HCl 1 M hasta alcanzar los pH deseados (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5). Los cultivos se mantuvieron en estas condiciones por diferentes intervalos (20, 30 y 60 min). Posteriormente las células se centrifugaron y se transfirieron a un medio de cultivo nuevo.

Durante todo este procedimiento se midió el crecimiento de los cultivos cada hora mediante lecturas espectrofotométricas y cuenta viable en placa, para el cual, se tomaron alícuotas y se realizaron diluciones decimales, las cuales se inocularon en cajas de petri y posteriormente se agregó agar LB (pH 7.0) fundido. Una vez que solidificaron las placas, fueron incubadas a 37°C por 24 a 48 h.

ENSAYOS DE TOLERANCIA ACIDA

Se activaron las cepas C 7677 y 1837 de la manera ya descrita, y se incubaron a 37°C. Cuando los cultivos llegaron a la parte media de la fase log se sometieron al choque subletal ácido previamente determinado (pH 5.5 por 20 min). Posteriormente los cultivos fueron centrifugados (IEC HN-S II) a 5000 rpm por 10 min y el paquete celular se transfirió a un medio de cultivo LB fresco con pH 7.0 ± 2 y se incubó a 37°C. Inmediatamente después, las células se sometieron a un choque ácido letal, (pH 4.5) agregando HCl 1M para tal fin. Se determinó la viabilidad a este pH en diferentes intervalos, tomando alícuotas y sembrándolas en cajas de petri como se especificó en el punto anterior.

DURACIÓN DE LA TOLERANCIA ACIDA

Se siguió la metodología descrita en el punto anterior, solo que después del choque subletal, las células se centrifugaron y se resuspendieron en medio fresco neutro y en este se mantuvieron por diferentes tiempos (30, 60, ó 90 min) y posteriormente se sometieron a los ensayos de tolerancia, tal como se especificó en el punto anterior.

Se determinó el tiempo requerido para que la población celular disminuyera un logaritmo (Valor D).

EFECTO DE UN PRE-CHOQUE CON JUGO BILIAR HUMANO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Vibrio cholerae*

El procedimiento a seguir fue igual al especificado para choque ácido. Las condiciones que se aplicaron fueron 3, 5, 10 y 15 mg/ml por diferentes intervalos de tiempo. El procedimiento posterior y la determinación de la viabilidad celular se realizó como se especificó para las condiciones de acidez.

ENSAYOS DE TOLERANCIA CON JUGO BILIAR HUMANO

Este procedimiento se realizó tal como se estableció para las condiciones de acidez. En este caso la condición subletal fue 3.0 mg/ml por 20 min y los ensayos de tolerancia fueron a 30 mg/ml.

DURACIÓN DE LA TOLERANCIA A DIFERENTES CONCENTRACIONES DE JUGO BILIAR HUMANO

Después de aplicar el choque subletal (3 mg/ml por 20 min) los cultivos se centrifugaron por 10 min y el paquete celular se transfirió a un medio nuevo sin jugo biliar por 30, 60 y 90 min, posteriormente se realizaron los ensayos de tolerancia como se especificaron en el punto anterior.

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MINIMA INHIBITORIA DEL CRECIMIENTO DE *Vibrio cholerae* POR CLORANFENICOL

Se inocularon (1%) tubos con 5 ml de medio LB el cual contenía diferentes concentraciones de cloranfenicol [(10, 20,30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, y 100 µg/ml), Sigma Chemical Company, San Luis Mo, EUA]. Los tubos se incubaron a 37°C por 24 h y después de lo cual se observó presencia de crecimiento visualmente. La CMI se tomó como la menor concentración donde se presentó crecimiento de la bacteria.

DETERMINACIÓN DEL PAPEL DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS EN LA TOLERANCIA AL CHOQUE ÁCIDO Y A JUGO BILIAR HUMANO

Cuando los cultivos se encontraron en la parte media de la fase logarítmica se adicionó cloranfenicol (100 µg/ml) 5 min después de iniciado el tratamiento. Inmediatamente después los cultivos se sometieron a un choque ácido ó con jugo biliar humano como previamente se describió. Se continuó con la metodología de tolerancia como se describió previamente.

DETERMINACION DE PROTECCION CRUZADA ENTRE LOS ESTRÉS PROBADOS.

Los cultivos fueron expuestos a las condiciones de estrés subletal ácido y por jugo biliar humano como se ha especificado anteriormente e inmediatamente después se realizaron los ensayos de tolerancia tal como se especifica a continuación:

Estrés subletal	Ensayo de tolerancia a condiciones letales de
1.- Choque ácido (pH 5.5 por 20 min)	Altas concentración de sales biliares (30 mg/ ml)
2.- Jugo biliar humano (3.0 mg/ml por 20 minutos)	pH ácido (Choque letal pH 4.5)

EFECTO DEL ESTRÉS SUBLETAL SOBRE LA PRODUCCIÓN DE LA TOXINA DE *V. cholerae*.

Después de aplicar el estrés subletal, los cultivos se centrifugaron y las células se resuspendieron en un medio de cultivo nuevo y fueron incubadas a 37°C por 16-18 h. Posteriormente los cultivos se centrifugaron a 22,000 rpm por 20 min a 4°C y el sobrenadante fue recuperado y liofilizado. En este se realizó la determinación y cuantificación de la enterotoxina presente por un método de ELISA.

CUANTIFICACIÓN DE LA TOXINA POR EL MÉTODO DE ELISA

Se siguió el método descrito por Tamplin, *et al.* (1988), 100 µl de sobrenadantes de cultivo fueron fijados a una placa de microtitulación de poliestireno (Costar 33611). La placa se incubó a

4°C durante 15 h en cámara húmeda, posteriormente las placas fueron lavadas en 4 ocasiones con la solución 1 (NaCl 0.15 M, Tween 20 al 0.015% y azida de sodio 0.0001%) y luego se adicionaron 100 µl de solución bloqueadora (NaCl 0.15 M, EDTA 0.001 M, Tris-HCl 0.05 M, Tween 20 al 0.05% suplementado con 1% de albúmina de suero bovino). Las placas se incubaron a 37°C en cámara húmeda por 1 h. Después de lavar los pozos en 4 ocasiones con la solución 1, fueron cubiertos con 100 µl de anticuerpos policlonales de conejo contra la enterotoxina de *V.cholerae* y se incubó la placa de nuevo a 37°C por 1 h en cámara húmeda. Posteriormente se realizaron 4 lavados con la solución 1, y se adicionaron 100 µl de suero anti IgG de ratón conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Chemical Co, 1: 25,000). La placa se incubó durante 2 h a 37°C y posteriormente, después de 4 lavados, se adicionaron 100 µl del sustrato (p-nitrophenil-fosfatasa disodio), el cual se dejó por 25 min y se detuvo el desarrollo de color adicionando 100 µl de NaOH 4 N. Se determinó la densidad óptica en un espectrofotómetro BioRad (550) a 490 nm.

Para cada uno de los ensayos se realizó una curva estándar. Todos los ensayos se realizaron por triplicado cada uno con dos repeticiones.

ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS POR EFECTO DE UN CHOQUE SUBLETAL ACIDO O POR JUGO BILIAR.

a) ENSAYO DE INCORPORACIÓN

Este ensayo se realizó a fin de determinar la cantidad de isótopo que había que agregar al cultivo para tener una buena incorporación y poder detectar claramente las proteínas de interés. Cuando los cultivos llegaron a la parte media de la fase log se adicionaron diferentes concentraciones del isótopo (100, 150 y 200 $\mu\text{Ci/ml}$) y durante este tiempo se tomaron muestras del cultivo (5 μl) y se colocaron en un filtro de fibra de vidrio (Whatman 1829-025). Cuando se secaron se colocaron en una caja de petri con ácido tricloroacético (TCA al 10%) durante 5min, posteriormente el filtro se lavó con solución salina al 85% por 2 ocasiones y finalmente se pasó por etanol al 95% 3 veces. Los filtros se dejaron secar y se colocaron en frascos de centelleo conteniendo cada uno 5 ml de difeniloxazol (PPO) al 0.6% disuelto en tolueno.

La radiactividad se determinó en un contador de centelleo líquido *Analytic Delta* (mod. 300) y se utilizó un estándar de carbono para las lecturas.

b) EFECTO DE UN CHOQUE SUBLETAL SOBRE EL PATRÓN DE PROTEÍNAS

I) ACIDO

Se activó la cepa como se mencionó anteriormente y a partir de ella se inocularon tubos con 2 ml de caldo LB y se incubaron a 37°C en un baño de agua. Cuando los cultivos llegaron a la mitad de la fase logarítmica, se sometieron a un pH 5.5 Después de 5 min en esta condición se les agregaron 100 µCi/ml de metionina marcada (³⁵S Cell- Labelling mix, Amersham Pharmacia Biotech), se dejaron incubando por 15 min más, al final de lo cual se añadieron 2 ml de ácido tricloroacético (TCA) al 30% frío, a fin de detener el proceso de incorporación, y posteriormente las muestras se colocaron en un recipiente con hielo durante 20 a 30 min.

Otros juegos de tubos, después del marcaje fueron centrifugados y el paquete celular se transfirió a medio LB fresco (pH 7.0), los cultivos se incubaron en baño de agua a 37°C por 30, 60 y 90 min.

II) JUGO BILIAR HUMANO

Se realizó igual que como se especificó para el choque ácido, sin embargo en este caso la condición subletal fue de 3.0 mg/ml por 20 min. El procedimiento que se siguió fue semejante al que se describió anteriormente.

c). ROMPIMIENTO CELULAR

Las células fueron centrifugadas y se probaron diferentes condiciones para lograr un buen rompimiento celular.

i) Amortiguador de Fosfatos

Se resuspendieron en 2ml del amortiguador de fosfatos pH 7.4 (NaCl al 0.8%, fosfato de sodio dibásico al 0.115%, potasio monobásico al 0.02%, y KCl al 0.62%). La suspensión fue incubada 37°C durante 30 min.

ii) Amortiguador Tris-HCl pH 8.0 con CaCl₂ y NaCl.

El paquete celular se resuspendió en 2 ml del amortiguador Tris- HCl pH 8.0, suplementado con 2 mM de CaCl₂ y 0.3 mM de NaCl. Las células se suspendieron y se incubaron a 37°C por 30 min.

iii) Método de Dascher

Se llevó a cabo tal como lo describió Dascher, *et al.*, (1990) con algunas modificaciones. Las células se resuspendieron en 2 ml del amortiguador Tris- HCl 30 mM pH 8.0 con 10% de TBS, ácido bórico 0.41 M, SDS al 1%, sacarosa al 5%, y DNAsa 0.005 mg/ml.

La muestra se homogenizó y se incubó a 37°C por 30 min. Finalmente la suspensión se congeló a -20°C durante toda la noche. Las muestras se liofilizaron (Labconco modelo 4.5).

Las proteínas liberadas fueron analizadas por electroforesis unidimensional en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (Laemmli, U., *et al*, 1970).

d) ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

La muestra liofilizada fue resuspendida en 500 μ l de agua desionizada y 500 μ l de amortiguador de muestra [(2X) β -mercaptoetanol al 10%, SDS al 5%, azul de bromofenol al 0.01% glicerol al 10% y Tris al 1.5% con un pH final de 6.8) Después de homogenizar la muestra se colocó en un baño de agua a 100°C por 2-3 min (Maniatics, *et al.*, 1989).

Se llevo a cabo una electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones disociantes, con un gel concentrador al 2.5% y un gel separador al 12.5 y/o 10%), se aplicaron 100,000 cpm en cada carril. El voltaje aplicado fue 120 volts para el gel concentrador y 150 volts para el separador. Durante el proceso el gel se mantuvo a 5°C con un sistema de enfriamiento (Fisher Scientific modelo 910).

Una vez terminada la electroforesis, el gel se colocó en una solución colorante de azul de Comassie R-250 al 0.1%, metanol al 50% y ácido acético al 10% durante 2 h en agitación constante, se destiño con ácido acético al 10%.

e) FLUOROGRAFÍA

Los geles se colocaron en una solución de dimetilsulfóxido (DMSO) concentrado durante 1 h y se repitió el proceso en 2 ocasiones. Posteriormente, éstos se colocaron en una solución de difenil oxazol (PPO al 22% disuelto en DMSO) y se lavó el gel con agua en varias ocasiones (Harlow, E. y D. Lane, 1988).

f) SECADO DEL GEL

Después de la fluorografía el gel se colocó en una solución que contenía metanol al 20%, ácido acético al 7% y glicerol al 5% por 20 minutos en agitación constante. El gel se deshidrató en un secador de geles (Bio Rad modelo 543). Se colocó primeramente una capa de papel filtro humedecida en la misma solución y sobre ella el gel y de nuevo papel filtro. Se aplicó una temperatura de 60°C durante 2 h.

g) AUTORADIOGRAFIA

Cuando el gel estuvo seco, se puso en contacto con una película virgen Kodak X-Omat y se mantuvo en oscuridad en un cassette a -20°C por 1 o varias semanas. Después se reveló la película colocándola en una solución reveladora (Kodak) durante 2 min, seguida de una solución stop bath (Kodak) durante 30 seg y finalmente se colocó por 2 min en una solución fijadora (Kodak).

DETERMINACIÓN DE LAS PROTEÍNAS MÉTODO DE BRADFORD.

Se tomaron 100 μl de la solución problema y se añadieron 5 ml del reactivo de Bradford (azul brillante Comassie G-250, 50 ml de metanol al 95% y 100 ml de ácido fosfórico al 85%, la mezcla se aforó a 1 litro con agua bidestilada). Se mezcló y se dejó reposar por 15 min. Se determinó la absorbancia a 595 nm. Se utilizaron diferentes concentraciones de albúmina sérica bovina como estándares. Las proteínas presentes en las muestras se determinaron mediante una curva estándar Fig 3 (Bradford, M. M., 1976).

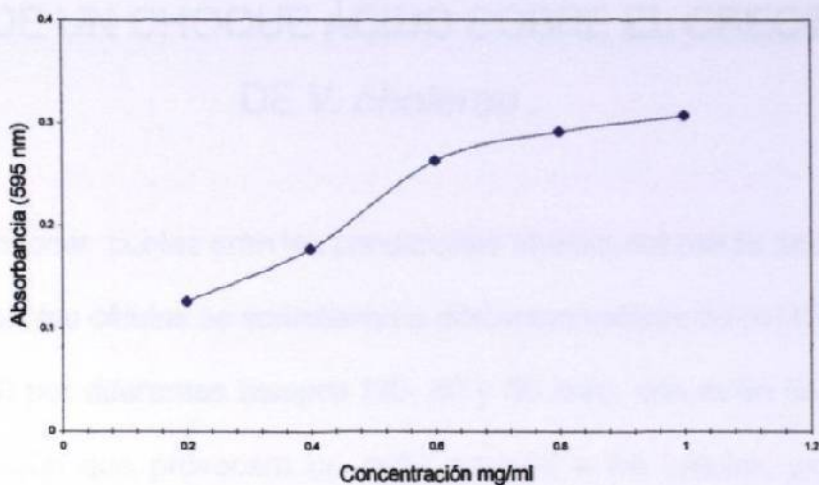


Figura 3. Curva estándar de albúmina bovina por el método de Bradford

ANÁLISIS ESTADÍSTICO.

Todos los experimentos se realizaron por triplicado cada uno con dos repeticiones.

Los resultados de tolerancia se sometieron a un análisis de comparación de pendientes y posteriormente a una prueba de t pareada para pequeñas muestras.

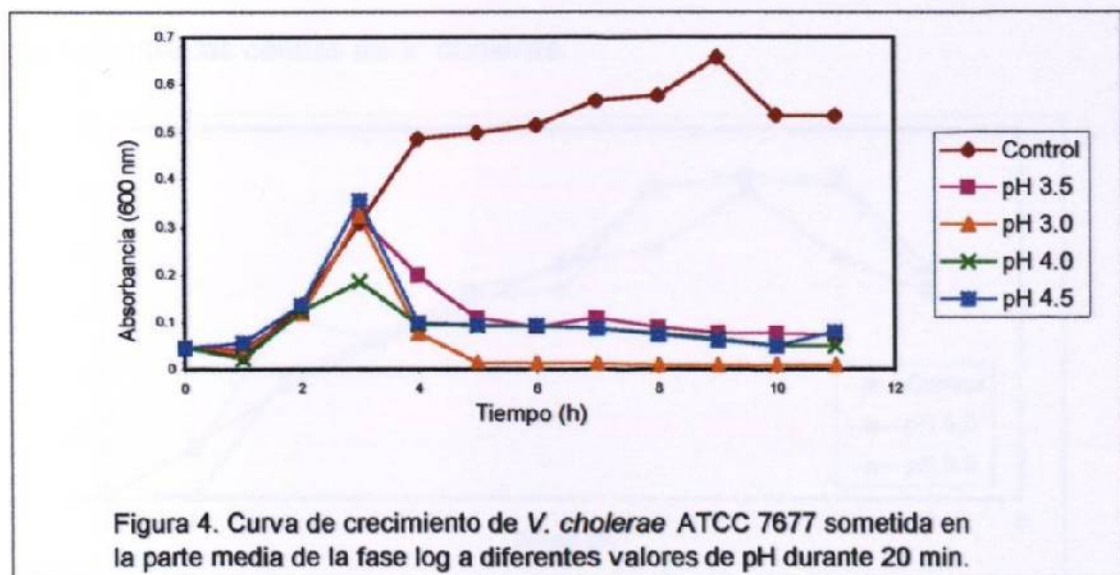
Los resultados de los ensayos donde se aplicó el cloranfenicol fueron analizados mediante un ANOVA (análisis de varianza) de una sola vía por el método de Fisher.

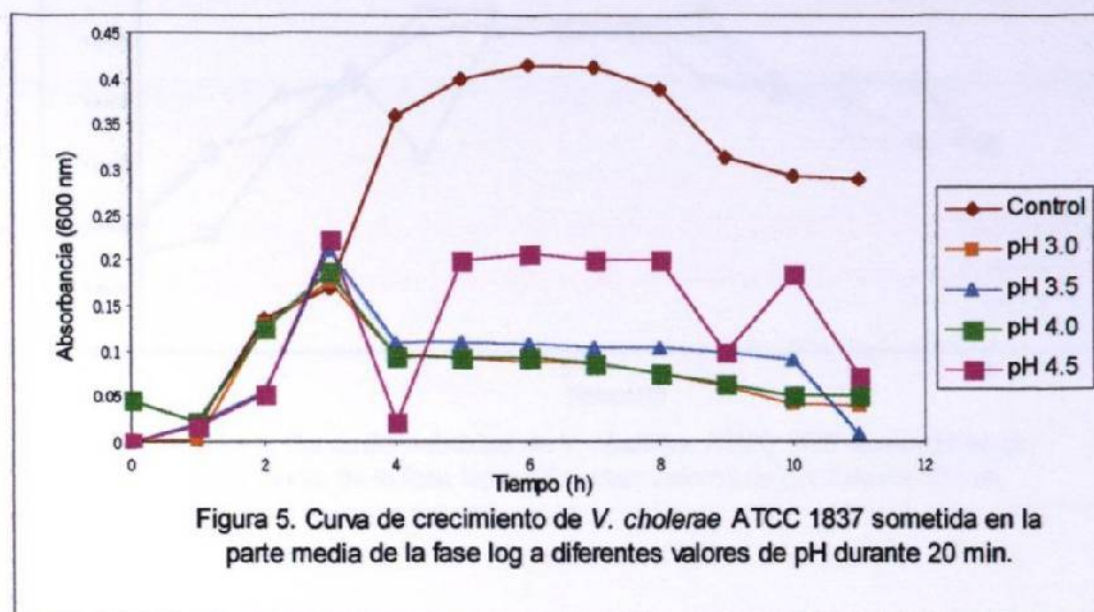
RESULTADOS.

EFFECTO DE UN CHOQUE ÁCIDO SOBRE EL CRECIMIENTO DE *V. cholerae* .

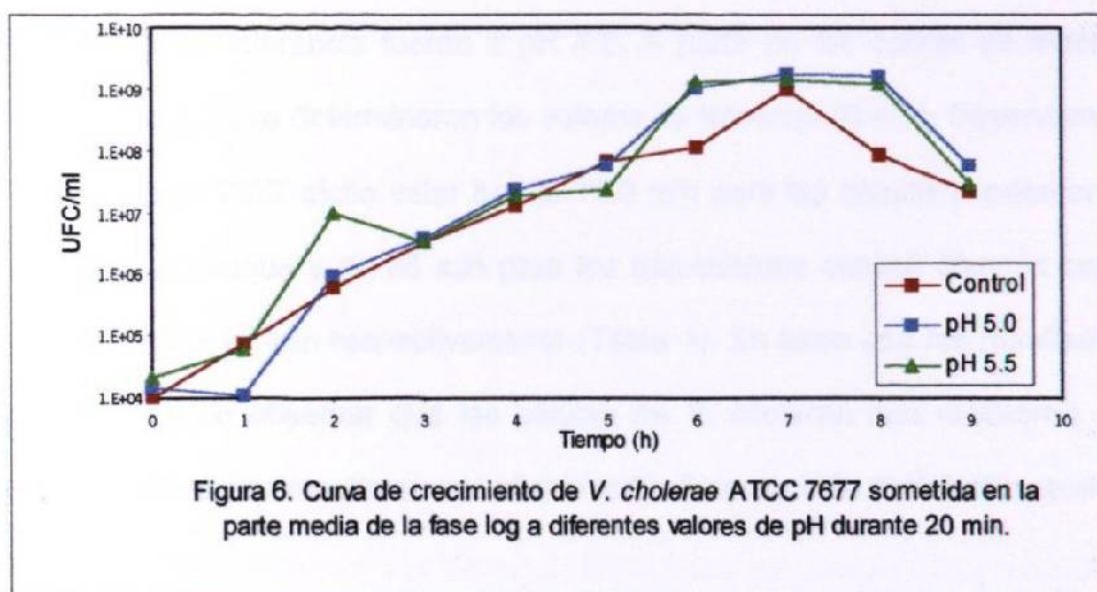
Para conocer cuales eran las condiciones ideales del estrés ácido a aplicar en los ensayos, las células se sometieron a diferentes valores de pH (3.0, 3.5, 4.0, 4.5, 5.0 y 5.5) por diferentes tiempos (20, 30 y 60 min), con el fin de establecer aquella condición que provocara un daño subletal a las células, pero que les permitiera recuperarse posteriormente.

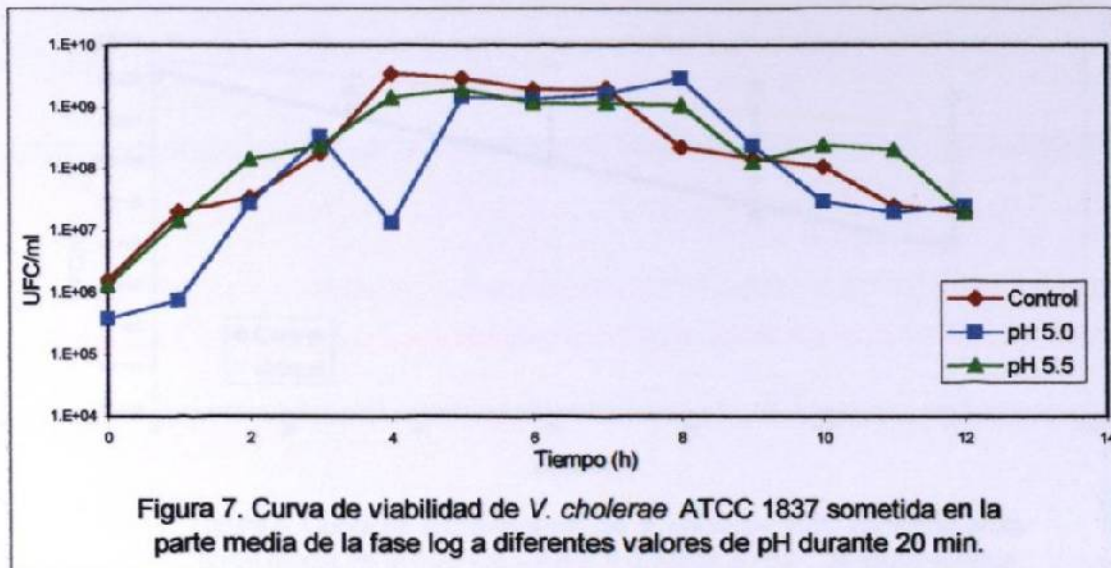
Cuando se aplicaron los pH de 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 por diferentes tiempos se observó la disminución total de la densidad celular, no permitiendo la recuperación de las células en ambas cepas (Fig 4 y 5).





Cuando se aplicó un choque ácido de pH 5.0 y 5.5 se observó que la densidad óptica y la viabilidad de los cultivos fue muy similar a las células control en ambas cepas (Fig. 6 y 7), de tal forma que elegimos la condición subletal de pH 5.5 por 20 min para las células de *V. cholerae*.





ADQUISICIÓN DE TOLERANCIA AL ÁCIDO PROVOCADO POR LA EXPOSICIÓN PREVIA A UN CHOQUE SUBLETAL ÁCIDO

En este caso la condición aplicada fue el choque subletal pH 5.5 por 20 min y los ensayos de tolerancia fueron a pH 4.5. A partir de las curvas de muerte obtenidas (Fig 8, 9) se determinaron los valores de letalidad ($D_{4.5}$). Observamos que para la cepa 7677 dicho valor fue de 73.3 min para las células previamente tratadas con el choque y de 28 min para los tratamientos control. Para la cepa 1837 fue de 60 y 27 min respectivamente (Tabla 1). En base con los resultados obtenidos se pudo observar que las células de *V. cholerae* que recibieron un choque subletal ácido resultaron ser al promedio 2 veces más resistentes que el control.

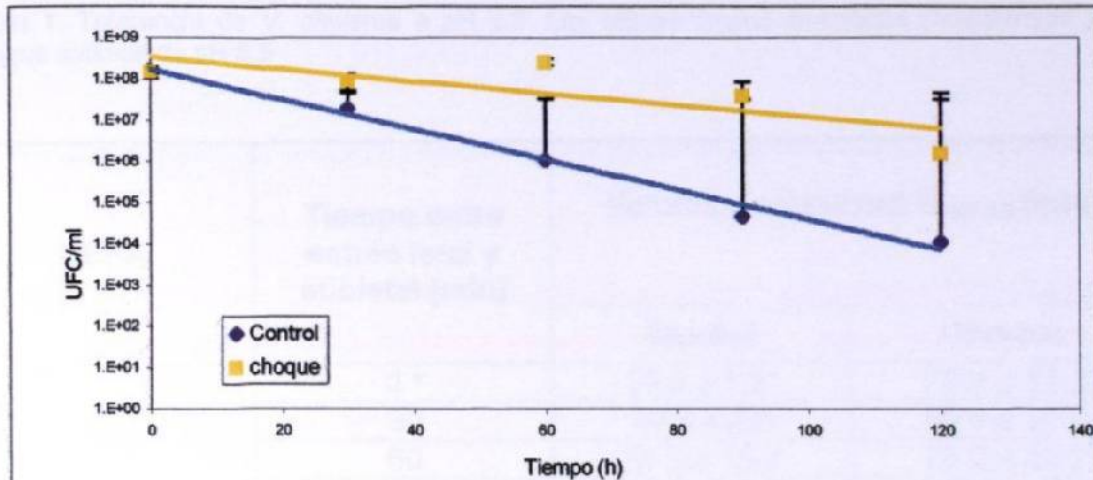


Figura 8. Curva de sobrevivencia de *V. cholerae* 7677 sometida en la parte media de la fase log a pH 5.5 durante 20 min. Inmediatamente después se aplicó choque letal de pH 4.5

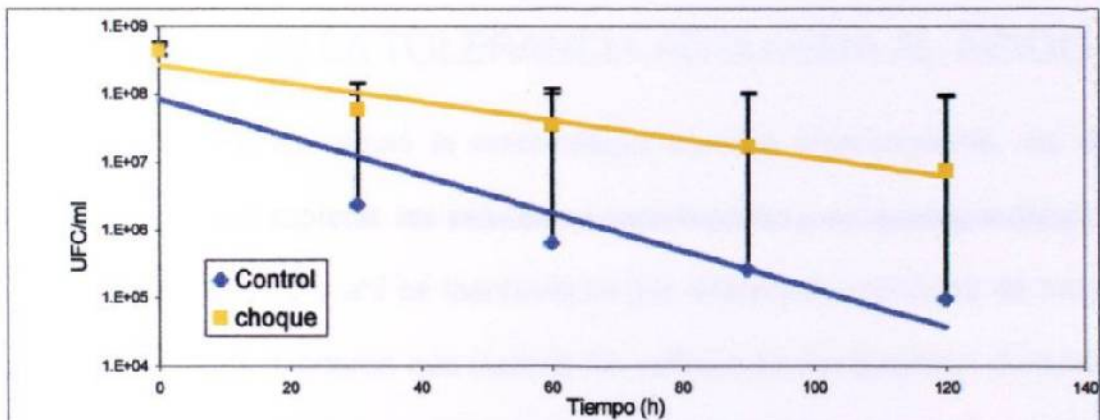


Figura 9. Curva de sobrevivencia de *V. cholerae* ATCC 1837 sometida en la parte media de la fase log a pH 5.5 durante 20 min. Inmediatamente después se aplicó un choque letal de pH 4.5.

Tabla 1. Tolerancia de *V. cholerae* a pH 4.5. Las células fueron sometidas previamente a un choque subletal de pH 5.5

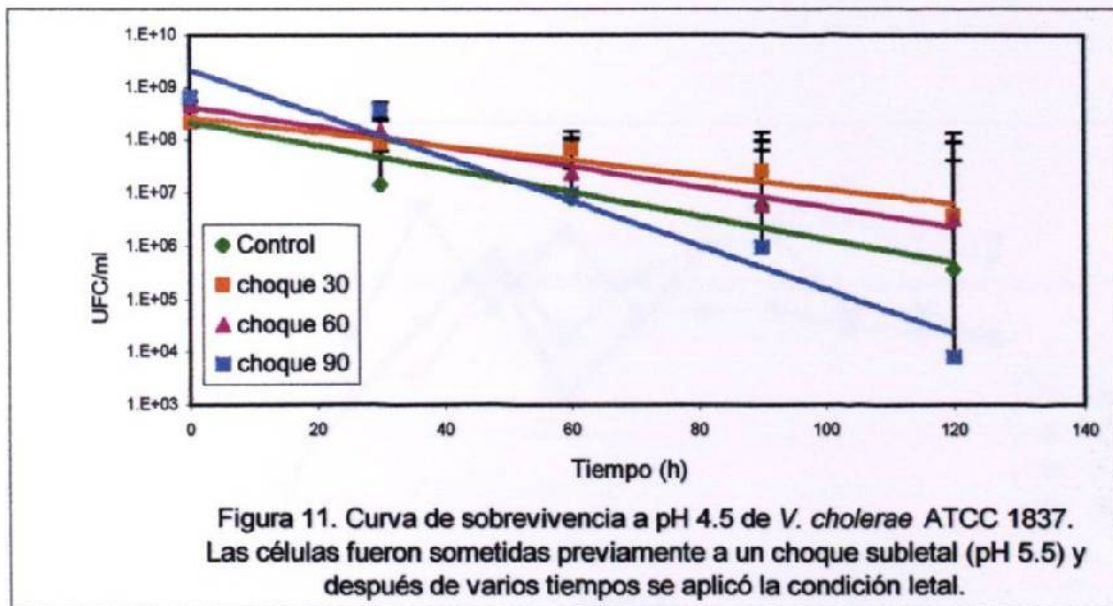
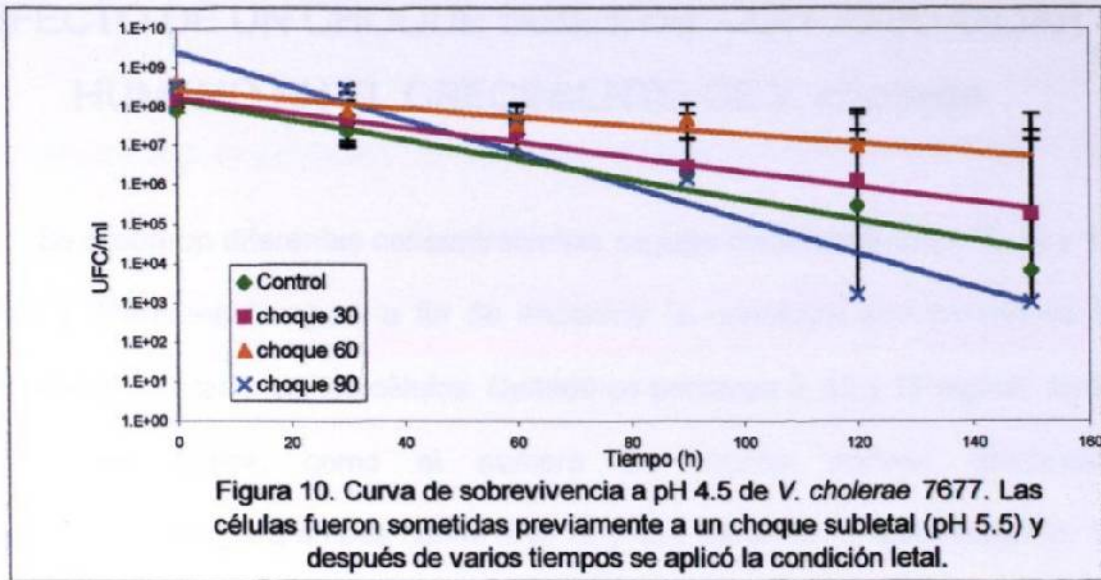
CEPA	Tiempo entre estrés letal y subletal (min)	Valores de letalidad D _{pH 4.5} (min)	
		Control	Choque
7677	0 *	28.8 ± 7.2 ^a	73.3 ± 11.2
	30	40.3 ± 2.0	58.9 ± 12.0
	60	35.5 ± 13.4	73.2 ± 23.2
	90	22.76 ± 1.2	23.6 ± 2.2
1837	0	27.1 ± 5.0	59.1 ± 17.4
	30	38.9 ± 14.8	62.7 ± 17.27
	60	32.8 ± 10.5	46.1 ± 14.6
	90	24.60 ± 4.96	25.6 ± 6.22

* Tiempo transcurrido entre el choque subletal y los ensayos de tolerancia.

a): desviación estándar

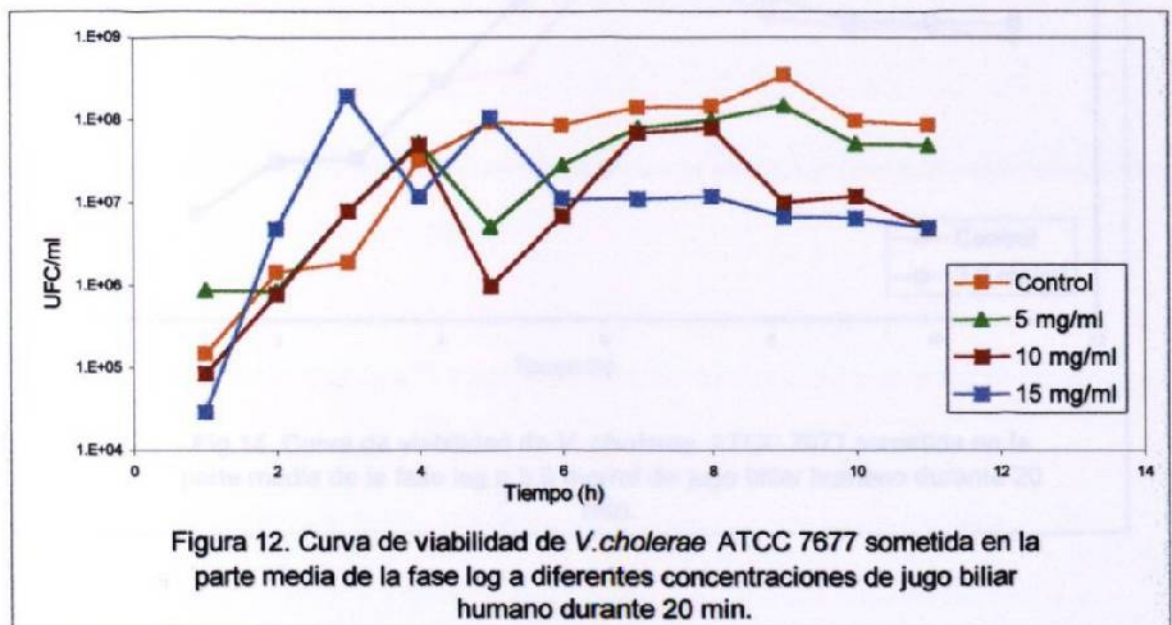
DURACIÓN DE LA TOLERANCIA ADQUIRIDA AL ÁCIDO

En este caso se siguió la metodología descrita anteriormente, es decir después del choque subletal, las células se centrifugaron y se resuspendieron en un medio fresco pH 7.0 y ahí se mantuvieron por diferentes intervalos de tiempo. Nuestros resultados indicaron que cuando los cultivos se mantuvieron durante 30 y 60 min, las células siguieron presentando el doble de tolerancia que los controles (Tabla 2). Sin embargo cuando las células se mantuvieron por 90 min ya no se observó diferencia entre los tratamientos y los controles (Fig 10 y 11).



EFFECTO DE UN CHOQUE SUBLETAL CON JUGO BILIAR HUMANO EN EL CRECIMIENTO DE *V. cholerae*

Se probaron diferentes concentraciones de jugo biliar humano (3, 5, 10 y 15 mg/ml) y diferentes tiempos, a fin de encontrar la condición que permitiera la recuperación posterior de las células. Cuando se probaron 5, 10 y 15 mg/ml, tanto la densidad óptica, como el número de células viables, disminuyó significativamente para ambas cepas (Fig 12 y 13). En tanto, la concentración de 3 mg/ml permitió la recuperación de las células (Fig 14 y 15) por lo que esta fue la concentración de choque subletal que utilizamos para los ensayos posteriores.



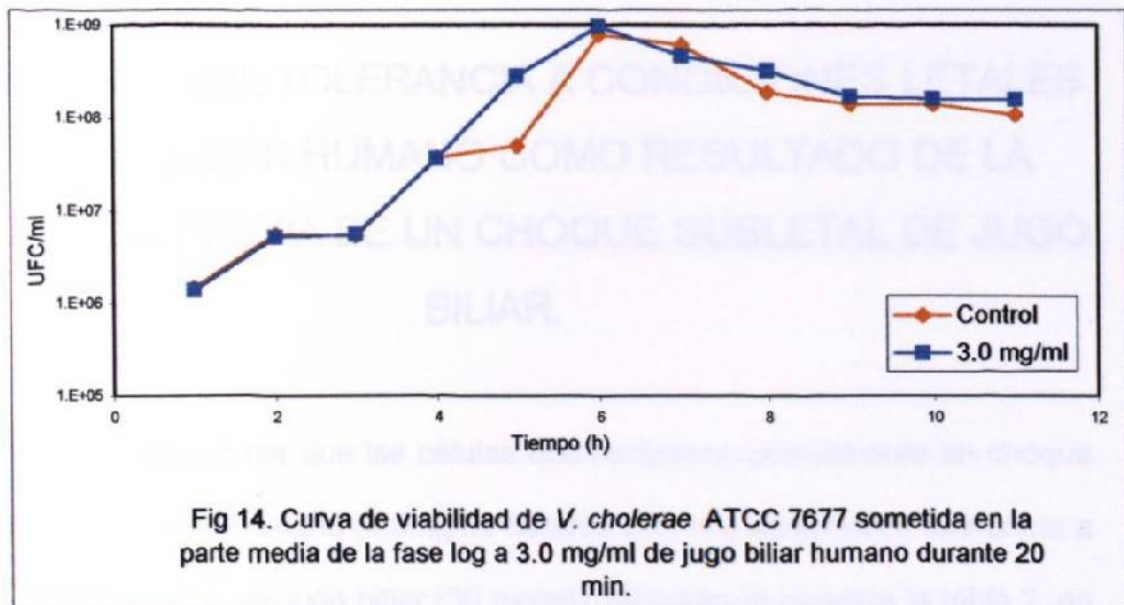
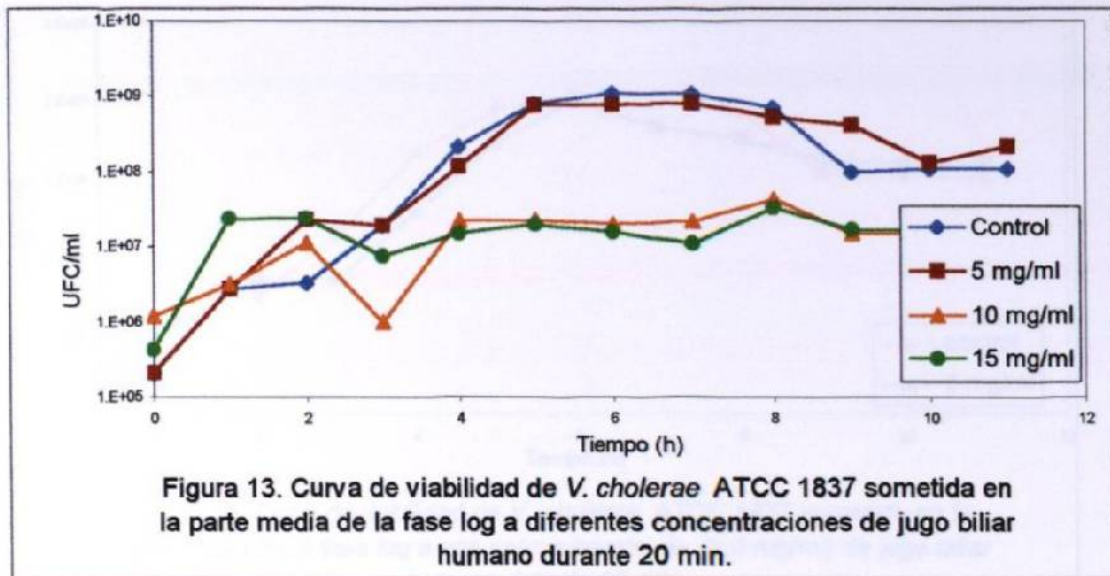
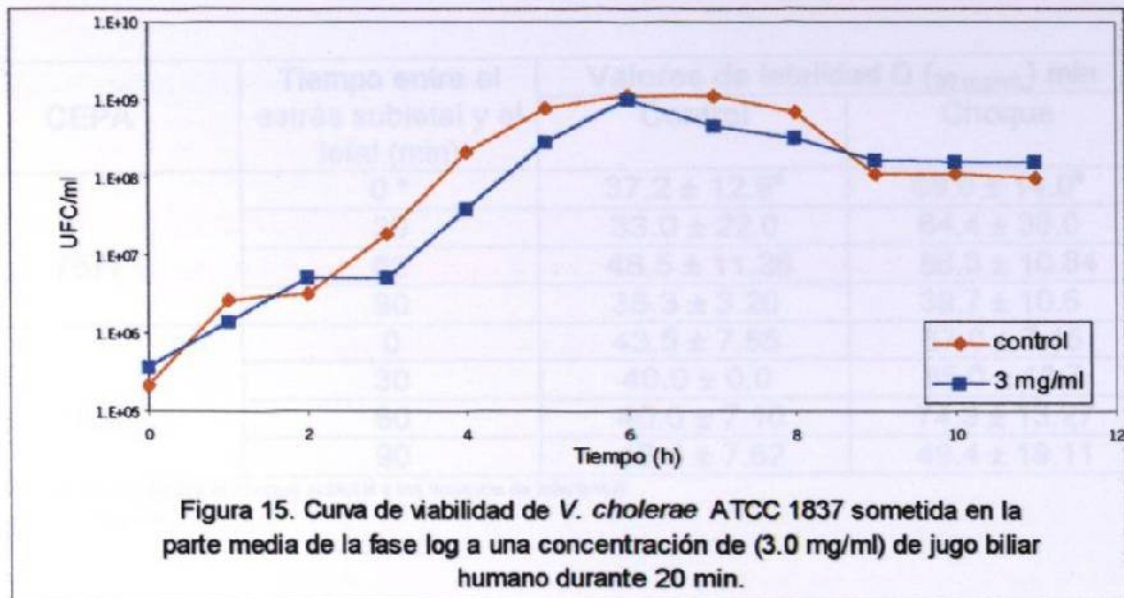


Tabla 2. Tolerancia de *V. cholerae* a 20 mg/ml de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a una concentración subletal de 3.0 mg/ml.



ADQUISICIÓN DE TOLERANCIA A CONDICIONES LETALES DE JUGO BILIAR HUMANO COMO RESULTADO DE LA EXPOSICIÓN PREVIA DE UN CHOQUE SUBLETAL DE JUGO BILIAR.

Pudimos determinar que las células que recibieron previamente un choque subletal de jugo biliar humano (3.0mg/ml durante 20 min) adquirieron tolerancia a altas concentraciones de jugo biliar (30 mg/ml), tal como lo muestra la tabla 2, en donde podemos observar que las células fueron de 2 a 3 veces más resistentes a altas concentraciones de jugo biliar, en comparación con los controles.

Tabla 2. Tolerancia de *V. cholerae* a 30 mg/ml de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a una concentración subletal de 3.0 mg/ml

CEPA	Tiempo entre el estrés subletal y el letal (min)	Valores de letalidad D (30 mg/ml) min	
		Control	Choque
7677	0 *	37.2 ± 12.9 ^a	68.0 ± 14.0 ^a
	30	33.0 ± 22.0	64.4 ± 38.0
	60	48.5 ± 11.26	86.3 ± 10.84
	90	38.3 ± 3.20	39.7 ± 10.6
1837	0	43.5 ± 7.55	87.0 ± 7.15
	30	40.0 ± 0.0	85.0 ± 13.7
	60	40.0 ± 7.10	74.9 ± 13.27
	90	42.4 ± 7.62	49.4 ± 19.11

*Tiempo transcurrido entre el choque subletal y los ensayos de tolerancia.

a) Desviación estándar.

DURACIÓN DE LA TOLERANCIA ADQUIRIDA AL JUGO BILIAR HUMANO

En nuestro trabajo encontramos que las células conservaron la tolerancia adquirida a altas concentraciones de jugo biliar humano por 30 y 60 min posteriores al choque subletal. A los 90 min no se encontró diferencia significativa entre tratamientos y los controles en ambas cepas (Fig 16 y 17)

EFFECTO DEL CLORANFENICOL EN LA ADQUISICIÓN DE LA

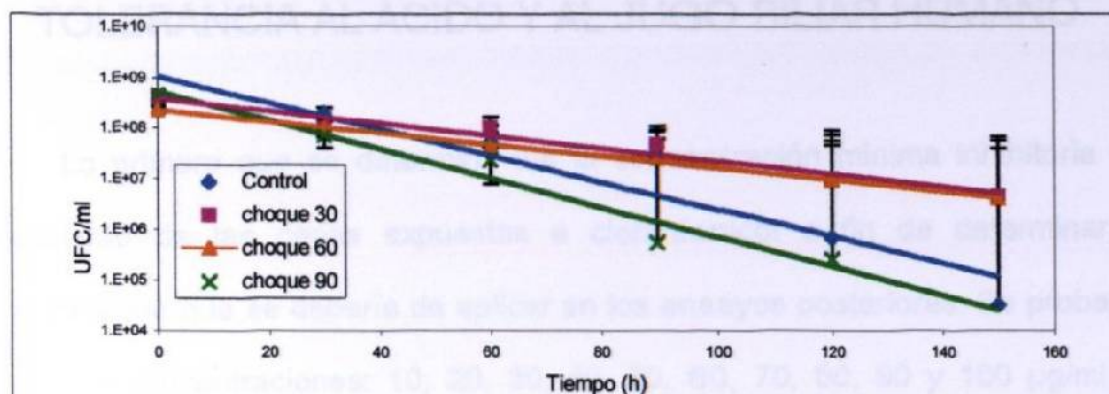


Figura 16. Curva de sobrevivencia de *V. cholerae* ATCC 7677 a 30 mg/ml de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a un choque subletal (3.0 mg/ml) y después de varios tiempos se aplicó la condición letal.

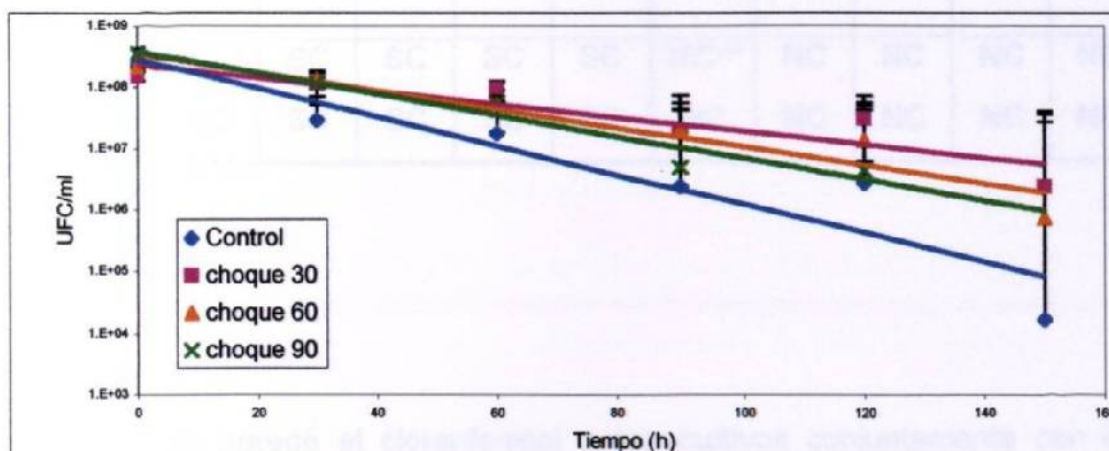


Figura 17. Curva de sobrevivencia de *V. cholerae* ATCC 1837 a 30 mg/ml de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a un choque subletal (3.0 mg/ml) y después de varios tiempos se aplicó la condición letal.

EFFECTO DEL CLORANFENICOL EN LA ADQUISICIÓN DE LA TOLERANCIA AL ÁCIDO Y AL JUGO BILIAR HUMANO

Lo primero que se determinó fue la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de las cepas expuestas a cloranfenicol a fin de determinar la concentración que se debería de aplicar en los ensayos posteriores. Se probaron diferentes concentraciones: 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90 y 100 µg/ml de cloranfenicol. Encontramos que en ambas cepas la CMI fue de 60 µg/ml (Tabla 3).

TABLA 3. Crecimiento de *V. cholerae* expuesta a diferentes concentraciones de cloranfenicol.

Antibiótico Cepa	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100
7677	SC *	SC	SC	SC	SC	NC**	NC	NC	NC	NC
1837	SC	SC	SC	SC	SC	NC	NC	NC	NC	NC

(µg/ml)

* Si creció

**No creció

Cuando se agregó el cloranfenicol a los cultivos conjuntamente con el estrés subletal, pudimos observar que las células perdían la capacidad de tolerar altas concentraciones de ácido o jugo biliar humano (Tabla 4). El análisis estadístico reveló que no había diferencia entre estos tratamientos y los controles.

Tabla 4. Valores de letalidad de *V. cholerae* sometidos a un estrés letal (jugo biliar humano o acidez) y en algunos casos durante este tratamiento se aplicó cloranfenicol.

Cepa	Condición letal	Valores de letalidad (min)			
		Control	Choque	Control + cloranfenicol	Choque + cloranfenicol
	Jugo biliar 30 mg/ml				
7677		53.6 ± 2.0 ^a	71.2 ± 20.8	43.8 ± 4.4	49.8 ± 4.6
1837		70.0 ± 4.3	75.4 ± 7.2	51.7 ± 5.7	57.2 ± 14.8
	pH ácido 4.5				
7677		25.5 ± 6.3	33.7 ± 6.1	16.7 ± 0.0	18.2 ± 0.6
1837		41.4 ± 1.2	48.2 ± 7.0	12.9 ± 7.0	15.8 ± 0.7

^a. Desviación estándar

RESPUESTA CRUZADA

En este apartado encontramos resultados contrastantes. Por un lado demostramos que la exposición de células de *V. cholerae* a 3.0 mg/mL de jugo biliar humano por 20 min hacía a las células ligeramente más sensibles a un pH de 4.5 (Tabla 5), en comparación con las células que no recibieron el tratamiento subletal con jugo biliar. Sin embargo, la sensibilidad observada no fue estadísticamente significativa. Por otro lado cuando aplicamos primero un choque subletal ácido a las células, estas presentaron el doble de resistencia a una condición letal de jugo biliar humano en comparación con el control (Tabla 6). Además observamos que la duración de esta tolerancia se prolongó hasta por 60 min después del choque subletal en ambas cepas.

Tabla 5. Valores de letalidad de *V. cholerae* expuesta a pH 4.5. Las células fueron expuestas previamente a una concentración subletal de jugo biliar humano.

Cepa	Valores de letalidad D _(pH 4.5) min	
	Control	Choque
7677	20.00 ± 2.9 ^a	19.6 ± 9.0
1837	6.9 ± 1.3	6.3 ± 0.7

a) desviación estándar

Tabla 6. Tolerancia de *V. cholerae* a 30 mg/mL de jugo biliar humano. Las células fueron sometidas previamente a una concentración subletal de acidez (pH 5.5)

Cepa	Tiempo entre el choque subletal y el letal	Valores de letalidad D _(30 mg/mL) min	
		Control	Choque
7677	0	20.1 ± 3.0 ^a	55.0 ± 13.4
	30	35.0 ± 6.0	60.3 ± 25.0
	60	40.0 ± 7.4	47.22 ± 23.0
1837	0	33.0 ± 11.0	65.4 ± 21.8
	30	24.2 ± 10.4	37.0 ± 17.7
	60	36.0 ± 8.4	56.1 ± 7.8

a) desviación estándar

EFFECTO DE UN CHOQUE SUBLETAL EN LA PRODUCCIÓN DE LA TOXINA DE *V. cholerae*

Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 7. Cuando analizamos la cepa 7677, y aplicamos un choque subletal ácido, no encontramos diferencia entre los controles y tratamientos. Sin embargo cuando el choque subletal fue con jugo biliar humano, la toxina producida fue menor y el análisis estadístico mostró la existencia de diferencia entre tratamientos y controles. Cuando analizamos la cepa

1837 encontramos el mismo comportamiento que en la cepa anterior; es decir que el choque ácido no afectó la producción de la toxina pero si disminuyó ligeramente con un choque subletal con jugo biliar humano, sin embargo en este caso el análisis estadístico mostró que no existía diferencia significativa con respecto al control.

Tabla 7. Producción de toxina de *V. cholerae*. Las células fueron sometidas a un choque subletal.

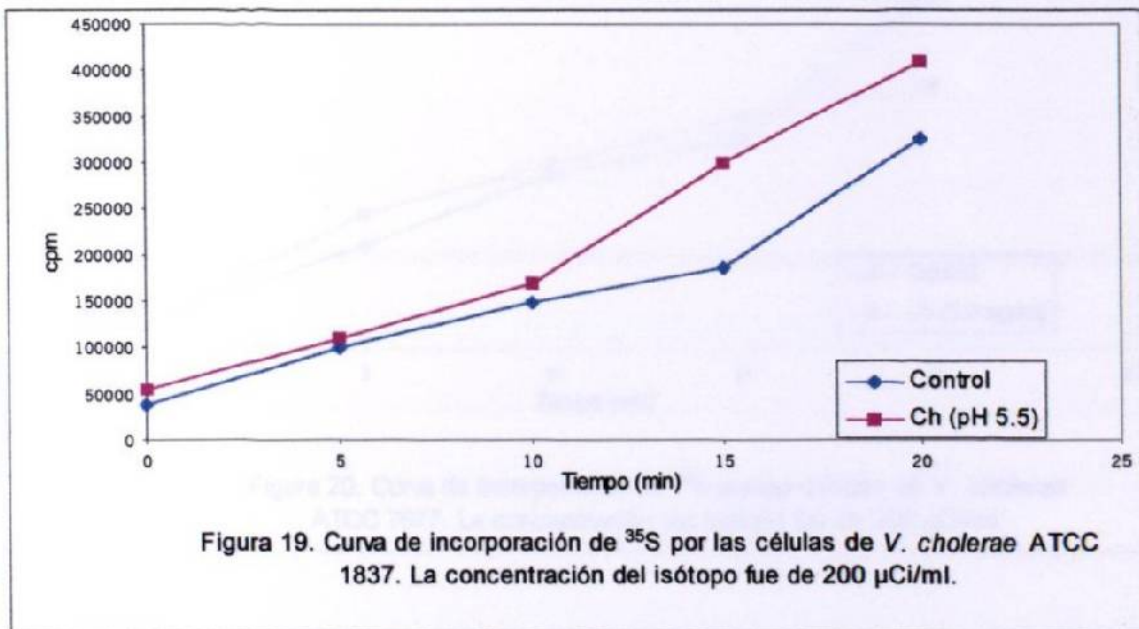
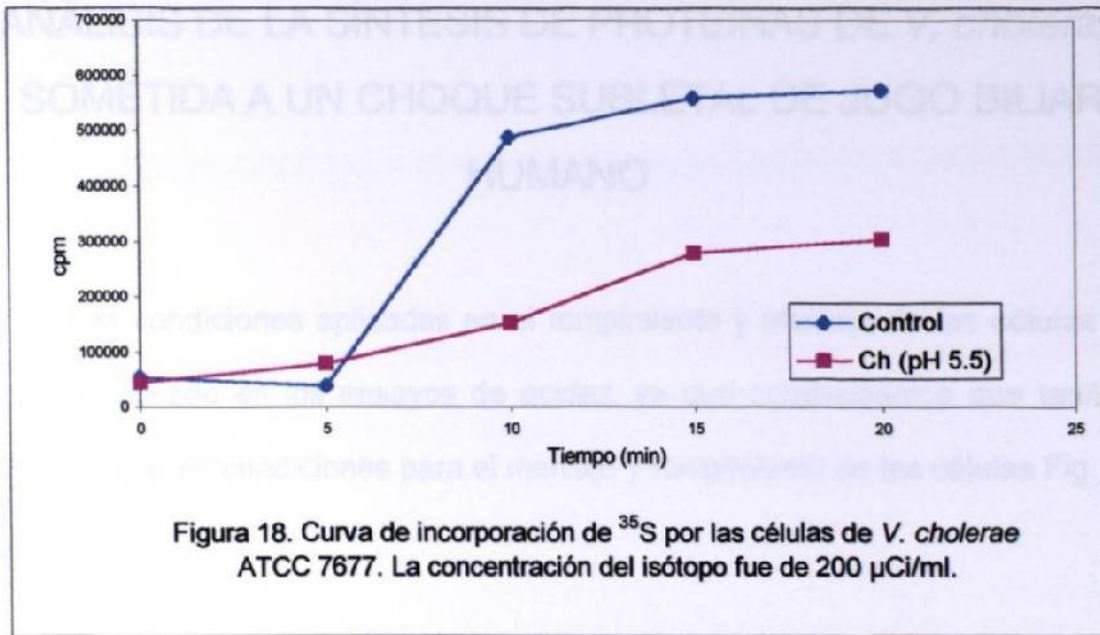
Cepa	Choque subletal	Concentración de la toxina mg/ml proteína total.		Diferencia significativa
		Control	Choque	
7677	pH 5.5	31.4 ± 5.4 * (2.7) **	30.2 ± 6.0 * (3.0) **	No
	3.0 mg/ml j.biliar	27.1 ± 2.86 (1.4)	20.3 ± 3.0 (1.5)	Si
1837	pH 5.5	27.7 ± 7.3 (3.6)	31.0 ± 0.5 (0.3)	No
	3.0 mg/ml	28.95 ± 5.4 (2.7)	31.8 ± 1.4 (0.7)	No

*desviación estándar

** error estándar de la media

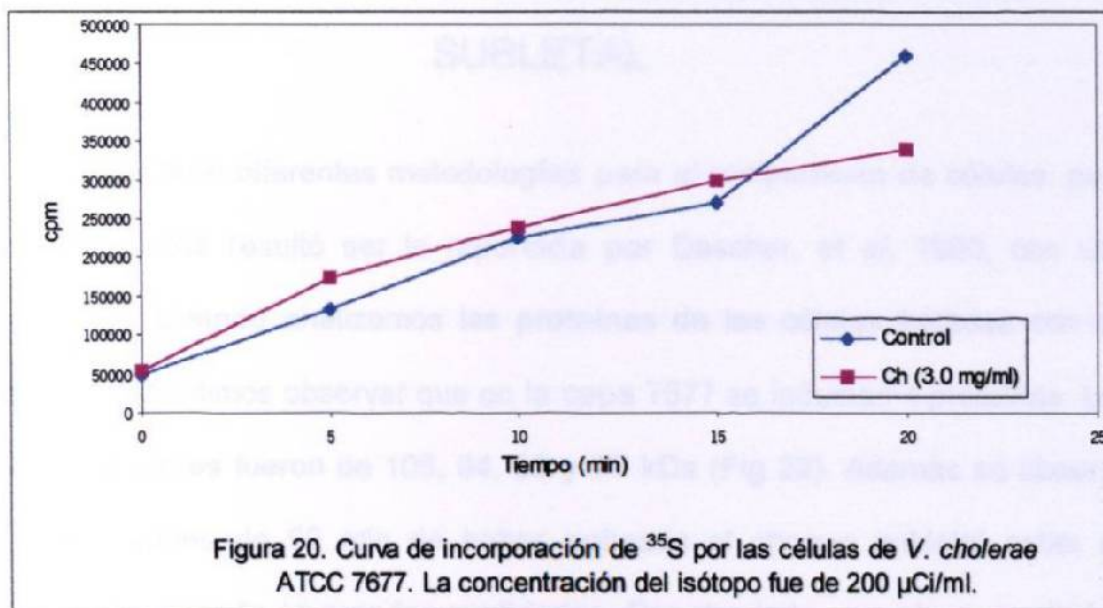
EFFECTO DE UN CHOQUE ÁCIDO SOBRE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS

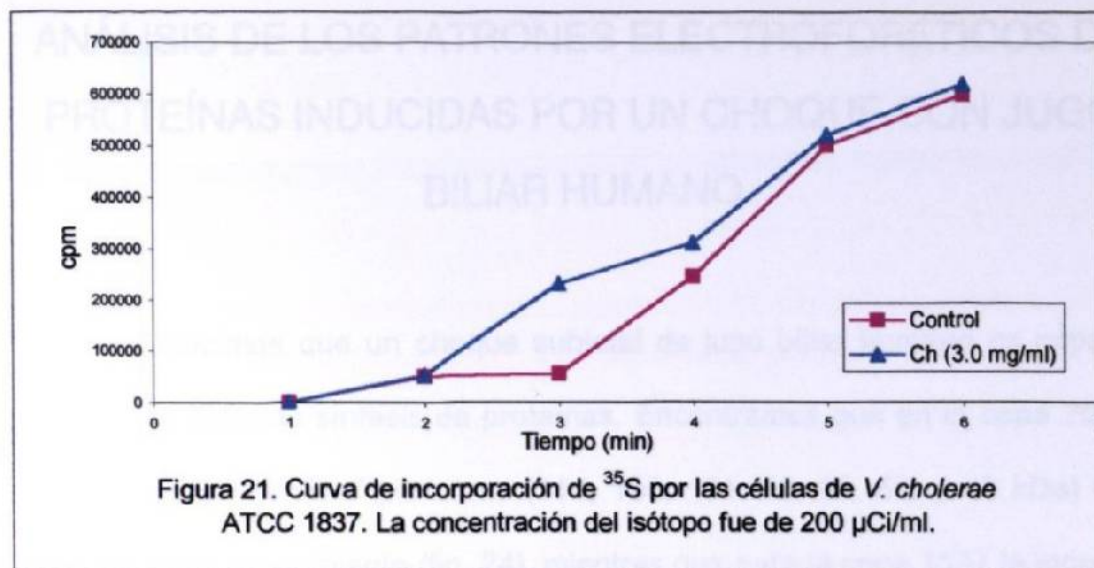
Se midió la síntesis de proteínas mediante la incorporación de metionina (^{35}S) de nuestras cepas. Esto lo realizamos utilizando diferentes concentraciones del isótopo (100, 150 y 200 $\mu\text{Ci/ml}$), durante 20 min. Establecimos que la mejor incorporación se produjo a 200 $\mu\text{Ci/mL}$, por lo que utilizamos esta concentración en los ensayos posteriores (Fig 18 y 19).



ANÁLISIS DE LA SÍNTESIS DE PROTEÍNAS DE *V. cholerae* SOMETIDA A UN CHOQUE SUBLETAL DE JUGO BILIAR HUMANO

Las condiciones aplicadas en el rompimiento y marcaje de las células fue igual al aplicado en los ensayos de acidez, ya que comprobamos que también eran las mejores condiciones para el marcaje y rompimiento de las células Fig. (20 y 21)





ANÁLISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORETICOS DE PROTEÍNAS INDUCIDAS POR UN CHOQUE ÁCIDO SUBLETAL

Se probaron diferentes metodologías para el rompimiento de células, pero la más adecuada resultó ser la reportada por Dascher, *et al*, 1990, con una modificación. Cuando analizamos las proteínas de las células tratadas con un choque ácido pudimos observar que en la cepa 7677 se inducían 4 proteínas. Los pesos moleculares fueron de 106, 94, 88 y 77 kDa (Fig 22). Además se observó que aún después de 90 min de haber aplicado el choque subletal estas se siguieron sintetizando en grandes cantidades. Por otro lado, cuando se analizó la cepa 1837 se observó la inducción de 1 PCHA con un peso molecular de 106 kDa y también permaneció por 90 min después del choque subletal (Fig 23).

ANÁLISIS DE LOS PATRONES ELECTROFORETICOS DE PROTEÍNAS INDUCIDAS POR UN CHOQUE CON JUGO BILIAR HUMANO

Establecimos que un choque subletal de jugo biliar humano es capaz de alterar el proceso de síntesis de proteínas. Encontramos que en la cepa 7677 la inducción de al menos 7 proteínas (114, 106, 101, 88, 84, 56, y 46 kDa) como respuesta a este tratamiento (fig. 24), mientras que para la cepa 1837 la inducción fue menor detectándose 3 proteínas (97, 88 y 77 kDa). (Fig 25).

En ambas cepas la inducción de estas proteínas permaneció 90 min después de la aplicación del choque subletal.

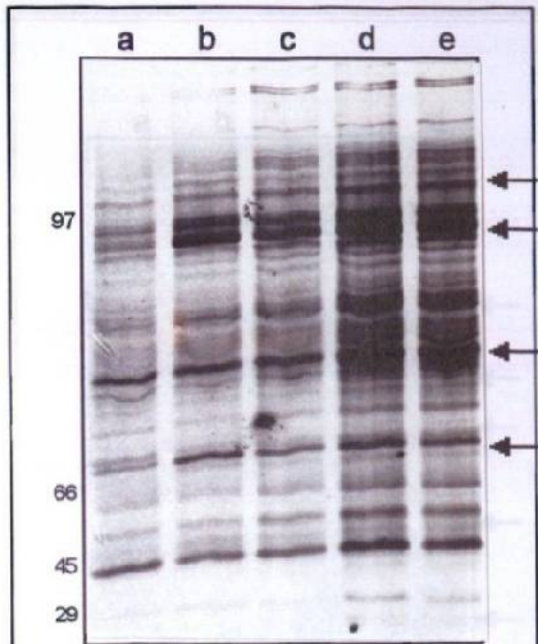


Figura 22. Autoradiografía de los patrones de proteínas totales de *V. cholerae* ATCC 7677. Las células fueron sometidas a choque ácido (pH 5.5 por 20 min) a) control, b) 0 min, c) 30 min, d) 60 min y e) 90 min después del choque subletal.

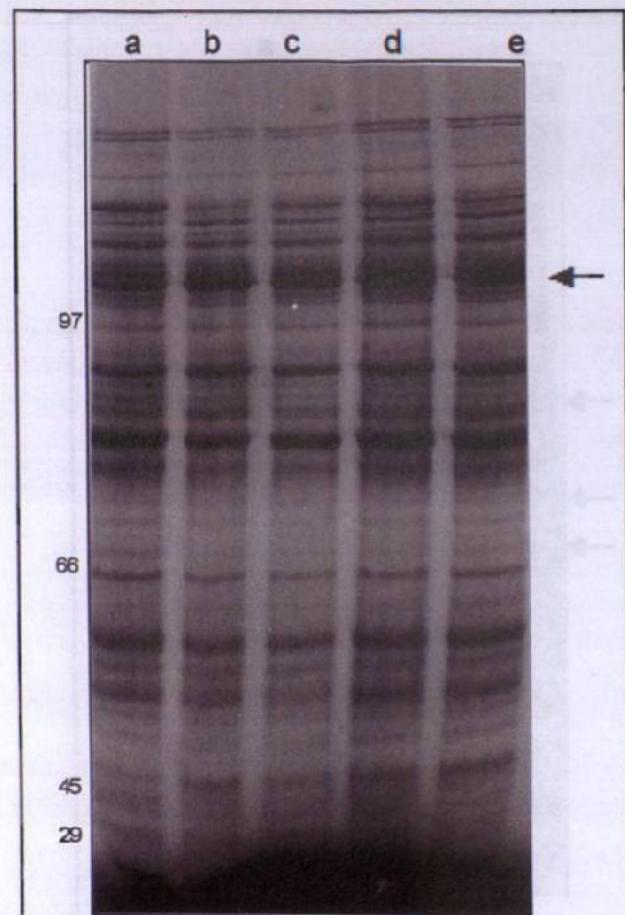


Figura 23. Autoradiografía de los patrones de proteínas totales de *V. cholerae* ATCC 1837. Las células fueron sometidas a choque ácido (pH 5.5 por 20 min) a) control, b) tiempo 0 c) 30 min, d) 60 min y e) 90 min después del choque subletal.

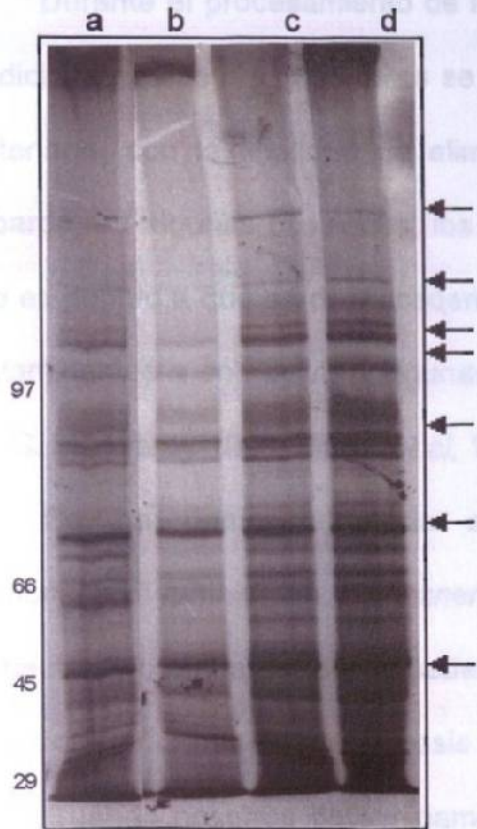


Figura 24. Autoradiografía de los patrones de proteínas totales de *V. cholerae* ATCC 7677 a) control, b) 30 min, c) 60 min y d) 90 min. Células sometidas a choque subletal con jugo biliar humano (3 mg/ml por 20 min) en la mitad de la fase log.

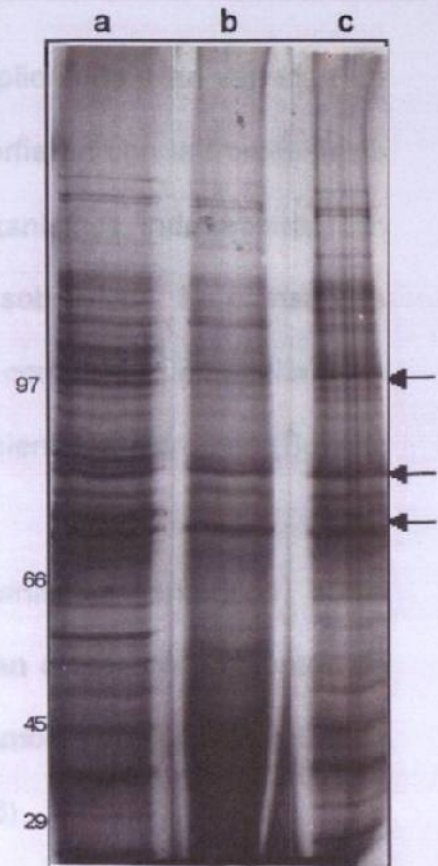


Figura 25. Autoradiografía de los patrones de proteínas totales de *V. cholerae* ATCC 1837. a) control, b) tiempo 0 y c) 90 min células sometidas a choque subletal con jugo biliar humano (3 mg/ml por 20 min) en la mitad de la fase log

DISCUSIÓN

Durante el procesamiento de los alimentos se aplica una gran variedad de condiciones de estrés, los cuales se pretende que interfieran con la homeostasis bacteriana, con la finalidad de eliminar los microorganismos indeseables. Sin embargo, en algunas ocasiones, los microorganismos sobreviven. Se piensa que esto es debido a que se desencadenan una respuesta compleja que habilita a los contaminantes a sobrevivir a algunas condiciones ambientales extremas (Buncic, S y S. M. Avery 1998; Miller, *et al*, 1989).

Se ha demostrado que algunos microorganismos entéricos como *Salmonella Typhimurium*, *S. flexneri* y *E. coli*, prefieren crecer en ambientes de pH neutro, sin embargo, ellos pueden enfrentarse a cambios bruscos de pH en la naturaleza y durante su patogénesis (Bearson, S., 1996).

Cuando nosotros determinamos las condiciones ideales del choque ácido en las células de *V. cholerae*, pudimos observar que al aplicar pH de 3.0, 3.5, 4.0 y 4.5 por 20 y 30 min, las células murieron, no permitiendo su recuperación. Cuando analizamos un choque de pH 5.5 se estresaron las células pero una gran proporción se mantuvo viable, sin embargo en nuestros ensayos seleccionamos un pH de 5.5 ya que a esta condición la población disminuía menos de una unidad logarítmica. Merrell y Camili (1999) utilizaron estas mismas condiciones de estrés sobre otras cepas de *V. cholerae*. Se observó que *V. cholerae* fue capaz de adquirir tolerancia a un pH ácido de 4.5 cuando se sometió previamente a un choque subletal de pH 5.5 por 20 min. Nuestros resultados concuerdan con lo reportado por estos autores, quienes trabajaron con una cepa virulenta de *V.*

cholerae biotipo El Tor. Ellos encontraron que a un pH de 5.7 las células se estresaron pero pudieron recuperarse posteriormente. Y además fueron más tolerantes a un pH de 4.5 que aquellas células que no recibieron el pH ácido moderado.

También nuestros resultados concuerdan con trabajos en otros microorganismos donde se observó la adquisición de tolerancia al ácido [*Brucella Suis* (Kulakov, *et al.*, 1997; *L. monocytogenes* (Juneja, V. K., *et al.*, 1998); *Streptococcus mutans* (Svensäter, G. *et al.*, 2000) *V. cholerae* el Tor (Nesper, J., *et al.*, 2001)].

Este proceso de adquisición de tolerancia al ácido es de gran importancia debido a que cuando una bacteria contamina alimentos que pudieran ser sometidos a condiciones ácidas moderadas, el estrés pudiera habilitar a estos microorganismos a tolerar condiciones más ácidas, tales como el pH del estómago. Por lo que se debe de tomar en cuenta esta capacidad de la bacteria para establecer las medidas pertinentes a fin de lograr su eliminación total.

Se ha establecido que la respuesta de adquisición de tolerancia al ácido es una respuesta temporal, sin embargo varía grandemente de organismo a organismo. Nosotros encontramos que se prolongó 1 h después de aplicado el choque subletal. Esto mismo se ha reportado para *L. monocytogenes* (Davis, J. M., *et al.*, 1996).

Por otro lado, analizamos si la síntesis de proteínas era importante en la adquisición de tolerancia en *V. cholerae*, ya que reportes previos han indicado que la adquisición de tolerancia a condiciones letales puede ser dependiente o independiente de proteínas. (Morimoto, *et al.*, 1990; Kareem, K. L., *et al.* 1994;

Foster, J. W., 1995, 1999; Waterman, S. R. y P. L. C. Small. 1996). Encontramos que en *V. cholerae* la síntesis de proteínas es muy importante en la adquisición de tolerancia.

Se tienen reportes de que los factores ambientales pueden estimular algunos genes involucrados en la producción de la toxina del cólera, al afectarse la expresión del regulon ToxR (Skorupski, K. y R. K. Taylor 1997).

V. cholerae es considerado un organismo alcalinófilo, ya que su mejor crecimiento se obtiene a pH alcalinos, de hecho crece muy bien en medios adicionados con sales biliares. En este trabajo nosotros tratamos de entender algo de esta capacidad de resistencia.

Establecimos las concentraciones ideales de jugo biliar para estresar a las células pero no para provocar disminución de su población, encontrando que a 3 mg/ml por 20 min se lograba nuestro objetivo.

Además, encontramos que al igual que para condiciones estresantes de acidez, se lograba la adquisición de tolerancia a condiciones letales de jugo biliar humano, si previamente se sometían a una condición subletal. Esta misma respuesta ha sido observada en otros microorganismos como *Enterococcus faecalis* (Flahaut, et al, 1996) y *Lactobacillus* (Tonnock, G. W., et al, 1997; Gilliland, S. E., et al 1977; Yokata, A., et al, 2000 y Dunne, C., et al, 2001). Cuando analizamos cuanto tiempo se mantenía esta tolerancia adquirida encontramos que permanecía por 60 min.

Se ha reportado un fenómeno conocido como respuesta cruzada, es decir la tolerancia a un estrés letal como resultado de la exposición previa a un estrés subletal diferente. Nosotros tratamos de determinar si en *V. cholerae* también se

presentaba este fenómeno, y encontramos resultados muy interesantes; establecimos que cuando las células se sometían a un estrés subletal ácido, adquirieron tolerancia a concentraciones letales de jugo biliar, sin embargo cuando invertimos las condiciones la respuesta adaptativa no se presentó. Estas observaciones concuerdan con lo que realmente pasa en el organismo; primeramente las células pueden recibir un estrés subletal ácido y posteriormente sobrevivir las descargas biliares en el duodeno. Sin embargo, sería muy importante estudiar mas a fondo este aspecto.

Algo semejante ha sido observado por otros investigadores como Ravishankar, (1999) que al trabajar con *Listeria monocytogenes* estableció que la adaptación al ácido no brindó protección a altas concentraciones de lactoperoxidasa. Contrariamente Leyer, *et al*, (1993) demostraron que un choque ácido provocaba protección al calor, al estrés oxidativo y a estrés osmótico en *S. Typhimurium*. Sin embargo, en esos mismos ensayos, ni el choque térmico, ni el osmótico indujeron tolerancia al ácido. También, Flahaut, *et al*, (1996), estudiaron la protección cruzada en *E. faecalis* al ser expuesto a las sales biliares, pH ácido y un choque térmico, encontrando que las células sometidas a altas temperaturas y a sales biliares indujeron resistencia a condiciones extremas de un estrés diferente, mientras que las sometidas a bajos pH no mostraron protección contra la exposición a sales biliares.

Nesper, *et al* (2001) establecieron que el papel del jugo biliar en el intestino es, aparte de su acción digestiva, impedir la activación transcripcional de *ToxT*, incrementar la motilidad intestinal y la quimiotaxis, impidiendo de esta manera que la bacteria cubra el mucus, por lo que en personas sanas con descargas biliares

normales, esta puede ser una barrera para impedir la colonización por microorganismos indeseables.

Ya desde hace mas de una década se ha establecido que las condiciones de estrés ambiental influyen en la producción de la toxina coleragena. Se ha encontrado que el activador transcripcional *ToxR*, es modulado por una respuesta de choque térmico (Parson y Mekalanos, 1990). De acuerdo con lo anterior, nosotros nos propusimos investigar si un choque subletal ácido o con jugo biliar afectaban la producción de la toxina. A diferencia con lo reportado, encontramos que el choque ácido no afectó la producción de la toxina. Sin embargo cuando aplicamos un choque subletal con jugo biliar humano en una de las cepas analizadas encontramos una disminución de esta. Trabajos anteriores demostraron que señales ambientales modulan la expresión de un factor dependiente de *ToxT* en *V. cholerae*, y esto por consiguiente da pie a que disminuyan las defensas inmunológicas y puede ser otro factor para que la enfermedad se presente (Provenzano, *et al*, 2000).

Al estudiar la síntesis de proteínas durante un choque ácido y con jugo biliar fue necesario determinar la concentración del isótopo necesario para marcar nuestras células. Reportes de trabajos similares indicaban cantidades muy variables (Kilstrup, M., *et al* 1997; Jørgensen, F. *et al* 1999; Svensäter, G. *et al* 2000), por lo que nosotros determinamos la cantidad adecuada. Encontramos que 200 $\mu\text{Ci/ml}$ era la cantidad que permitía un buen marcaje. Esta concentración resultó ser muy alta en comparación con otros trabajos, consideramos que esto fue debido a que el medio que usamos era muy rico en aminoácidos los cuales competían con los reactivos que agregamos (Karem K. L., *et al* , 1994; Wai, S. N.,

et al 1996). Además durante estos ensayos se probaron varios métodos de rompimiento celular ya que los reportados en la literatura utilizaban lisozima y comprobamos que causaba problemas a la hora de estandarizar la cantidad de proteínas durante la separación electroforética. Nosotros encontramos que al modificar levemente el método de Dascher, *et al*, (1990), se obtenían buenos resultados.

Cuando estudiamos los patrones de proteína producidos durante el choque ácido pudimos observar la inducción de 4 PCHA para la cepa C7677 mientras que en la cepa 1837 solo indujo 1 PCHA. Estas diferencias pudieran deberse a que la última es serotipo O139 y la otra es O1.

Las proteínas inducidas se presentaron hasta 90 min después de aplicar el choque ácido, que fue lo mismo que duró la tolerancia. Algo que llamó la atención fue que la cepa que indujo una sola proteína resultó ser más sensible a la condición de acidez comparada con la otra cepa.

En relación con la respuesta al jugo biliar humano, también se presentaron diferencias en cuanto al número y peso de las proteínas encontradas, ya que para las cepas C7677 se detectaron 7 proteínas, mientras que para la cepa 1837 solo se indujeron 3. Sin embargo, en ambos casos las proteínas inducidas permanecieron 30 min después de aplicado el estrés. Algo que encontramos fue que la mayor concentración de proteínas se observó después de 90 min de que se había quitado el estrés subletal. Consideramos que sería interesante estudiar más al respecto a fin de encontrar una explicación a esta observación.

JeevanJyot y Ghosh en 1995 demostraron que al aplicar un choque térmico a las células de *V. cholerae* se inducían 5 proteínas. En nuestro trabajo encontramos algunas proteínas con pesos moleculares similares a estas.

Se ha reportado que se pueden inducir proteínas homologas bajo diferentes condiciones de estrés. Resultaría de gran interés determinar esto en *V. cholerae*.

En base con todos nuestros resultados, podemos tratar de entender el posible mecanismo adaptativo que sufre *V. cholerae* al pasar por la acidez de estómago y posteriormente enfrentarse a jugo biliar. Aunque para establecer esto con certeza hace falta estudios mas profundos al respecto.

CONCLUSIONES

Los choques subletales ácido (pH 5.5) y por jugo biliar humano (3 mg/ml) aplicado a las células de *V. cholerae* provocaron un estado adaptativo que permitió su recuperación posterior.

V. cholerae ATCC C7677 y 1837 adquirieron tolerancia a pH 4.5, como consecuencia de un choque ácido previo de pH 5.5 por 20 min.

V. cholerae ATCC C7677 y 1837 adquirieron tolerancia a 30 mg/ml de jugo biliar humano si previamente se expusieron las células a la condición subletal de 3 mg/ml

La adquisición de tolerancia al ácido y jugo biliar en *V. cholerae* como resultado del choque subletal previo se prolongó hasta 1 h después de aplicado esta condición subletal.

V. cholerae es capaz de sobrevivir a un choque letal de jugo biliar (30 mg/ml) si previamente es sometido a un choque subletal ácido (pH 5.5/ 20 min).

La síntesis de proteínas durante un choque ácido y con jugo biliar en *V. cholerae*, es importante para la adquisición de tolerancia a condiciones extremas de estos tipos de estrés.

En ambas cepas la producción de la enterotoxina de *V. cholerae* no es afectada por un choque subletal ácido ni por jugo biliar humano.

Cuando se aplicó un choque ácido subletal de pH 5.5 en la cepa 7677 se indujeron 4 PCHA (106, 94, 88, y 77 kDa), mientras que en la cepa 1837 solo se indujo 1 PCHA (106 kDa). Además se observó que aun después de 90 min de haber aplicado este estrés, las proteínas se siguieron sintetizando en grandes cantidades.

Al aplicar un choque subletal de jugo biliar humano se indujeron 7 proteínas para la cepa 7677 (114, 106, 101, 88, 84, 56, y 46 kDa), mientras que para la cepa 1837 solo se indujeron 3 (97, 88, y 77 kDa). En ambas cepas la inducción se prolongó hasta 90 min después de aplicado el estrés, tiempo en el cual se observó la mayor cantidad de proteínas inducidas.

PERSPECTIVAS PARA FUTURAS INVESTIGACIONES

Las proteínas del estrés pertenecen a un grupo de proteínas esenciales sintetizadas por todos los organismos incluyendo bacterias gram positivas, como gram negativas, levaduras, plantas, células humanas y arqueobacterias. Diferentes estudios concuerdan con que estas proteínas son miembros de una clase de proteínas altamente conservadas, previamente designadas como antígeno común. Por lo que sería interesante determinar si algunas de las proteínas encontradas tienen homología con las que se han caracterizado en otros organismos.

Se ha establecido que las proteínas del estrés pueden actuar como potentes inmunogenos y factores de virulencia en algunos microorganismos, por lo que también sería de gran interés establecer si durante un proceso infectivo, se induce una respuesta humoral en contra de algunas proteínas del estrés.

En nuestro trabajo estudiamos la respuesta del microorganismo contra una condición de acidez producida por un ácido inorgánico. Sin embargo, sabemos que los ácidos orgánicos se han utilizado desde hace tiempo como conservadores de alimentos. Tomando en cuenta que *V. cholerae* contamina estos, sería sumamente importante estudiar si la respuesta es semejante contra estos ácidos, a fin de predecir la capacidad de resistencia del microorganismo en productos alimenticios. Además, para entender la fisiología del microorganismo, también

sería interesante estudiar, si la respuesta observada es semejante al exponer a la bacteria a jugo biliar, en donde aparte de las sales biliares se encuentran otros compuestos que pudieran modificar la respuesta observada.

Como es conocido, *V. cholerae* es un patógeno que se encuentra ampliamente distribuido en la naturaleza, normalmente en estuarios asociado con otros organismos tales como moluscos y algas. Se ha reportado en otros organismos que el estrés osmótico y el oxidativo, provocan un cambio en la morfología de la membrana externa e incluso se ha reportado que el lipopolisacarido juega un papel importante en la resistencia al estrés. En este trabajo nosotros proponemos estudiar si el choque ácido o con jugo biliar afecta la morfología del vibrión, así como la composición de la cápsula.

LITERATURA CITADA

Ahem, H. 1991. Cellular responses to oxidative stress. *Features*. 57: 627-630

Akbar, S., S. Y. Lee., S. A. Boylan and Ch W. Price. 1999. Two genes from *Bacillus subtilis* under the sole control of the general stress transcription factor σ^B . *Microbiol.* 145: 1069-1078

Andersson, R. A., V. Kõiv., C. N. Setterblad and M. Pirhonen. 1999. Role of *RpoS* in virulence and stress tolerance of the plant pathogen *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*. *Microbiol.* 145: 3547-3556

Araki, Tadashi. 1991. Changes in rates of synthesis of individual proteins in a psychrophilic bacterium after a shift in temperature. *J. Microbiol.* 37: 840-847

Baik, H. S., S. Bearson., S. Dunbar and J. W. Foster. 1996. The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium provides protection against organic acids. *Microbiol.* 142 (11) 3195-3200

Bearson, S., B. Bearson and Foster. J. W. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. *FEMS Microbiol. Lett.* 147: 173-180

Benkiane, R., M. G. Gottschalk and J. D. Dubreuil. 1997. Identification of a *Streptococcus suis* 60-kDa heat-shock protein using Western blotting. *FEMS Microbiol. Lett.* **153**: 379-385

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254

Brudzinski, L. and M. A. Harrison. 1998. Influence of incubation conditions on survival and acid tolerance response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates exposed to acetic acid. *J. Food Prot.* **61**: 542-546

Buncic, S and S. M. Avery. 1998. Effects of cold storage and heat-acid shocks on growth and verotoxin 2 production of *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiol.* **15**: 319-328

Byrd, J. J., A. M. Cheville., J. L. Bose and Ch. W. Kaspar. 1999. Lethality of heat- and phosphate-catalyzed glucose by-product to *Escherichia coli* O157:H7 and partial protection conferred by the *rpoS* regulon. *Appl. Environ. Microbiol.* **65**: 2396-2401

Chakrabarti, S., N. Sengupta and R. Chowdhury. 1999. Role of *DnaK* in *In Vitro* and *In Vivo* Expression of Virulence Factors of *Vibrio cholerae*. 1999. *Infect. Immun.* **67**: 1025-1033

Champion, G. A., M. N. Neely., M. A. Brennan and V. J. DiRita. 1997. A branch in the *ToxR* regulatory cascade of *Vibrio cholerae* revealed by characterization of *toxT* mutant strains. **23**: 323-331

Connell, T. D., D.J. Metzger., M. Wang., M. G. Jobling and R. K. Holmes. 1995. Initial Studies of the Structural Signal for extracellular Transport of Cholera toxin and other proteins recognized by *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* **63**: 4091-4098

Dascher, Ch. C., S. K. Poddar and J. Maniloff. 1990. Heat shock response in micoplasmas, genome-limited organisms. *J. Bacteriol.* **172**: 1823-1827

Davis, M. J., P. J. Coote and C. P. O'Byrne. 1996. Acid tolerance in *Listeria monocytogenes*: the adaptive acid tolerance response (ATR) and growth-phase-dependent acid resistance. *Microbiol.* **142**: 2975-2982

De Angelis, M., L. Bini., V. Pallini., P. S. Cocconcelli and M. Gobbetti. 2001. The acid-stress response in *Lactobacillus sanfranciscensis* CB1. *Microbiol.* **147**: 1863-1873

Dunne C., L. O'Mahony., L. Murphy., G. Thomson., D. Morrissey., M. F. O'Hall., S. Flynn., Fitzgerald. G., C. Daly., B. Kiely., G. C. O'Sullivan and J. K. Sha. Collins. 2001. *In vitro* selection criteria for probiotic bacteria of human origi correlation with *in vivo* findings. *Am. J. Clin. Nutr.* **73**: 386S- 392S

Farr, S. B and T. Kogoma. 1991. Oxidative stress responses in *Escherichia coli* and *Salmonella Typhimurium*. *Microbiol. Rev.* 561-585

Faruque, S. M., M. J. Albert and J. J. Mekalanos. 1998. Epidemiology, Genetics, and Ecology of Toxigenic *Vibrio cholerae*. *62 (4)* 1301-1314

Ferianc, P., A. Farewell and T. Nyström. 1998. The cadmium-stress stimulon of *Escherichia coli* K-12. *Microbiol.* **144**: 1045-1050

Fernández, P and H. L. Smith. 1977. The effect of anaerobiosis and bile salts on the growth and toxin production by *Vibrio cholerae*. *J. General Microbiol* **98**: 77-86

Fillinger, S., M. K. Chaveroche., P. V. Dijck., R. Vries., G. Ruijter., J. Thevelein and Ch. d'Enfert. 2001. Trehalose is required for the acquisition of tolerance to a variety of stresses in the filamentous *Aspergillus nidulans*. *Microbiol.* **147**: 1851-1862

Finkelstein. R. A., M. F. Burks and A. Zupan. 1987. Epitopes of the cholera family of enterotoxins. *J. Infect. Dis.* **9**: 544.

Flahaut, S., A. Hartke., J. Ch. Giard., A. Benachour., P. Boutibonnes and Y. Auffray. 1997. Relationship between stress response towards bile salts, acid and heat treatment in *Enterococcus faecalis*. *FEMS. Microbiol. Letters.* **138**: 49-54

Flahaut, S., A. Hartke., J-Ch. Giard and Yanick Auffray. 1997. Alkaline stress response in *Enterococcus faecalis*: adaptation, cross- protection, and changes in protein synthesis. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 812-814

Flahaut, S., J. Frere., P. Boutibonnes and Y. Auffray.1996. Comparison of the bile salts sodium dodecyl sulfate stress in *Enterococcus faecalis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 2416-2420

Floch. M. H., M.S., M.D., H. J. Binder., M. D., B. Filbirn., and W. Gershengaren. 1972. Effect of bile acids on intestinal microflora. *Am. J. Clin. Nutr.* **25**: 1418-1426

Foster, J. W. 1991. *Salmonella* acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response, *J. Bacteriol.* **173**: 6896-6902.

Foster, J. W. 1993. The acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium involves transient synthesis of key acid shock proteins. *J. Bacteriol.* **175**: 1981-1987

Foster, J. W. 1995. Low pH adaptation and the acid tolerance response of *Salmonella* Typhimurium. *Crit. Rev. Microbiol.* **21**: 215- 237

Foster, J. W. 1999. When protons attack: microbial strategies of acid adaptation. **2**: 170-174

Foster, J. W. and B. Bearson. 1994. Acid-sensitive mutants of *Salmonella* Typhimurium identified through a dinitrophenol lethal screening strategy. *J. Bacteriol.* **176**: 2596-2602

Foster, J. W. and H. K. Hall. 1992. Effect of *Salmonella* Typhimurium ferric uptake regulator (*fur*) mutations on iron- and pH-regulated protein synthesis. *J. Bacteriol.* **174**: 4317-4323

Foster, J. W. and M. P. Spector. 1995. How *Salmonella* survive against the odds. *Annu. Rev. Microbiol.* **49**: 145-174

Foster, J. W., Y. K. Park., I. S. Bang, K. Karem., H. Betts., H. K. Hall and E. Shaw. 1994. Regulatory circuits involved with pH-regulated gene expression in *Salmonella* Typhimurium. *Microbiol.* **140**: 341-352

García, S. J. C. Limón and N. L. Heredia. 2001. Cross protection by heat and cold shock to lethal temperatures in *Clostridium perfringens*. *Brazilian. J. Microbiol.* **32**: 110-112

Garren, D. M., M. Harrison and S. M. Russell. 1997. Retention of acid tolerance and acid shock responses of *Escherichia coli* O157:H7 and non- O157:H7 isolates. *J. Food. Prot.* **60**: 1478-1482

Garren, D. M., M. Harrison and S. M. Russell. 1998. Acid tolerance and acid shock response of *Escherichia coli* O157:H7 y non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride. *J. Food. Prot.* **61**: 158-161

Gautan, K. S., R. Chowdhury, and J. Das. 1994. Heat shock response and heat shock protein antigens of *Vibrio cholerae*. *Infec. Immun.* **62**: 5624-5631

Gershengoren, M. S. 1972. The effect of bile acids on the intestinal microflora. **25**: 1418-1426

Giannella, S., A. Broitman. and N. Zamcheck. 1972. Gastric acid barrier to ingested microorganisms man: studies *in vivo* and *in vitro*. *Gut* **13**: 251-256

Gilliland, S. E C. R. Nelson and C. Maxwell. 1985. Assimilation of cholesterol by *Lactobacillus acidophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **49**: 377-381

Gilliland. S. E and M. L. Speck 1977. Desconjugation of bile acids by intestinal Lactobacilli. *Appl. Environ. Microbiol.* **33**: 15-18

González, S. N., and Saltigeral, S. P. 1992. Cólera. conceptos actuales. Ed. Interamericana. McGraw-Hill. 29-33

Granger. Neil, D., J. A. Barrowman., P. R. Kviety. 1985. Clinical gastro-intestinal physiology. W. B. Saunders Co. Pp 117-139

Guilfoyle, D. E. and I. N. Hirshfield. 1996. The survival benefit of short-chain organic acids and the inducible arginine and lysine decarboxylase genes for *Escherichia coli*. *Lett. Appl. Microbiol.* 22: 393-396

Gupta, S and R. Chowdhury. 1997. Bile affects production of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect. Immunity.* 65: 1131-1134

Hamel, J., D. Martin & B. Brodeur. 1997. Heat shock response of *Streptococcus pneumoniae*: identification of immunoreactive stress proteins. *Microbiol. Pathogen.* 23: 11-21

Harlow, E and D. Lane. 1988. *Antibodies. A laboratory manual.* Cold spring harbor laboratory, N. Y. pp 636-652

Hartke, A., S. Bouché., J. Ch. Giard., A. Benachour., P. Boutibonnes and Y. Auffray. 1996. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Curr. Microbiol.* 33: 194-199

Heredia, N. L., G. A. García., R. Luévano., R.G. Labbé., and J. S. García-Alvarado. 1997. Elevation of the heat resistance of vegetative cells and spores of *Clostridium perfringens* Type A by sublethal heat shock. *J. Food Prot.* 60: 998-1000

Heredia, N. L., R. G. Labbé., M. A. Rodríguez and J. S. García-Alvarado. 1991. Growth, sporulation and enterotoxin production by *Clostridium perfringens* Type A in the presence of human bile salts. *FEMS Microbiol Letters* 84: 15-22

Heredia, N. L., R.G. Labbé and J. S. García-Alvarado. 1998. Alteration in sporulation, enterotoxina production, and protein synthesis by *Clostridium perfringens* tipe A following heat shock. *J. Food Prot.* 61: 1143-1147

Hirst, T and J. Holmgren. 1987. Conformation of protein secreted across bacterial outer membranes: A study of enterotoxin translocation from *Vibrio cholerae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 7418-7422

Holmquist, L., A. Jouper-Jaan., D. Weichart., D. R. Nelson and S. Kjelleberg. 1993. The induction of stress proteins in three marine *Vibrio* during carbon starvation. *FEMS Microbiol. Ecol.* 12: 185- 194

Humphrey, T. J., N. P. Richardson., K. M. Statton and R. J. Rowbury. 1993. Effects of temperature shift on acid and heat tolerance in *Salmonella enteritidis* phage type 4. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 3120-3122

Humphrey, T.J., A. Williams., K. McAlpine., M. S. Lever., J. Guard-Petter and J. M. Cox. 1996. Isolates of *Salmonella enterica* Enteritidis PT4 with enhanced heat and acid tolerance are more virulent in mice and more invasive in chickens. *Epidemiol. Infect.* 117: 79-88

Hyromimus, B., L. C. Marrec., A. H. Sassi and A. Deschamps. 2000. Acid and bile tolerance of spore-forming lactic acid bacteria. *Int. J. Food Microbiol.* **61**: 193-197

Iwanaga, M and T. Kuyyakanond. 1987. Large production of cholera toxin by *Vibrio cholerae* O1 in yeast extract peptone water. *J. Clin. Bacteriol.* **25**: 2314-2316

Jan, G., P. Leverrier., V. Pichereau and P. Boyaval. 2001. changes in protein synthesis and morphology during acid adaptation of *Propionibacterium freudenreichii*. *Appl. Environ. Microbiol.* **67**: 2029-2036

JeevanJyot and A. Ghosh. 1995. Induction of heat shock response in *Vibrio cholerae*. *Microbiol.* **141**: 2101-1209

Juneja, V. K., T. A. Foglia and B. S. Marmer. 1998. Heat resistance and Fatty acid composition of *Listeria monocytogenes*: effect of pH, acidulant, and growth temperature. *J. Food Prot.* **61**: 683-687

Jørgensen, F., M. Bally., V. Ch. Herve., G. Michel., A. Lazduski., P. Williams and G. S. A. B. Stewart. 1999. *RpoS*-dependent stress tolerance in *Pseudomonas aeruginosa*. **145**: 835-844

Kaper, B. J., Morris, J. G., and M. M. Levine. 1995. Cholera. *J. Clin. Microbiol. Rev.* **8**: 48-86

Karem, K. L., J. W. Foster and A. K. Bej. 1994. Adaptive acid tolerance response (ATR) in *Aeromonas hydrophila*. *Microbiol.* **140**: 1731-1736

Kilstrup, M., S. Jacobsen., K. Hammer and f. K. Vogensen. 1997. Induction of heat shock protein DnaK, GroEL, and GroES by salt stress in *Lactococcus lactis*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 1826-1837

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

Koo, D., H. Traverso., M. Libel., Ch. Drasbek., R. Tauxe y D. Brandling-Bennett. 1997. El cólera epidémico en América Latina de 1991 a 1993: implicaciones de las definiciones de casos usadas en la vigilancia sanitaria. *Rev. Panam. Salud Publica.* **1(2)** 85-92

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

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *nature* **227**: 680-685

Lawrence, E. H and J. A. Ryan. 1997. Are stress proteins part of a cells solution to toxicity or are they part of the antibodies. *Hepatology*. **25**: 1279-1281

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

Lencer, W. I., S. Moe., P. A. Rufo and J. L. Madara. 1995. Transcytosis of cholera toxin subunits across model human intestinal epithelia. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. **92**: 10094-10098

Lewis, J. G., R. P. Learmonth and K. Watson. 1995. Induction of heat, freezing and salt tolerance by heat and salt shock in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol.* **141**: 687-694

Leyer, J. G and E. A. Johnson, 1993. Acid adaptation induces cross protection against environmental stresses in *Salmonella* Typhimurium. *Appl. Environ. Microbiol.* **52**: 1842-1847

Maniatis, Sambrook, Fritsch. 1989. *Molecular cloning a laboratory manual*. Second. Ed. Cold spring harbor laboratory, USA. Press (3) chapter 18 : pp 47-59

Marc, J. S. De Wolf. 2000. A dopeptide metalloendoprotease substrate completely blocks the response of cells in culture to cholera toxin. *J. Biol. Chem.* **275**: 30240-30247

McKellar, R and K. P. Knight. 1999. Growth and survival of various strains of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* in Hydrochloric and acetic acid. *J. Food Protect.* **62**: 1466-1469

Merrell, D. S. and A. Camilli. 1999. The *cadA* gene of *Vibrio cholerae* is induced during infection and plays a role in acid tolerance. *Mol. Microbiol.* **34**: 836-849

Merrell, D. S., C. Bailey., J. B. Kaper and A. Camilli. 2001. The *ToxR*- mediated organic acid tolerance response of *Vibrio cholerae* requires OmpU. *J. Bacteriol.* **183**: 2746-2754

Miller, J. F., J. J. Mekalanos and S. Falkow. 1989. coordinate regulation and sensory transduction in the control of bacterial virulence. *Science.* **243**: 916-922

Morimoto, I. R., A. Tissieres and C. Georgopoulos. 1990. The stress response, function of proteins and perspectives. Pp. 1-59. In Morimoto, R. I., A. Tissieres and C. Georgopoulos (ed). *Stress proteins in biology and medicine*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N. Y. Pp 1-59

Moser., S. A and D. C. Savage. 2001. Bile salt hydrolase activity and resistance to toxicity of conjug salts are unrelated properties in lactobacilli. *Appl. Environ Microbiol.* **67**: 3476- 3480

Nepple, B. B and R. Bachofen. 1997. Induction of stress proteins in the phototrophic bacterium *Rhodobacter sphaeroides*. *FEMS Microbiol. Letters.* **153**: 173-180

Nesper, J., C. M. Lauriano., K. E. Klose., D. Kapfhammer., A. Kraiß and J. Reidl. 2001. Characterization of *Vibrio cholerae* O1 El Tor *galU* and *galE* mutants: Influence on lipopolysaccharide structure, colonization, and biofilm formation. *Infect. Immun.* **69**: 435-445

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

Parsot, C and J. J. Mekalanos. 1990. Expression of *ToxR*, the transcriptional activator of the virulence factors in *Vibrio cholerae*, is modulated by the heat shock response. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**: 9898-9902

Provenzano, D., D. A. Schuhmacher., J. L. Barker and K. E. Klose. 2000. The virulence regulatory protein *ToxR* mediates enhanced bile resistance in *Vibrio cholerae* and other pathogenic *Vibrio* species. *Infect. Immun.* **68**: 1491-1497

Ravishankar, S and M. Harrison. 1999. Acid adaptation of *Listeria monocytogenes* strains does not offer cross-protection against an activated lactoperoxidase system. *J. Food. Prot.* **62**: 670-673

Sandvig, K., Ø. Garred and B. V. Deurs. 1996. Thapsigargin-induced transport of cholera toxin to the endoplasmic reticulum. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **93**: 12339-12343

Schaik, W. V., C. G. M. Gahan and C. Hill. 1999. Acid-adapted *Listeria monocytogenes* displays enhanced tolerance against the lantibiotics nisin and lactacin 3114. *J. Food. Protect.* **62**: 536-539

Schlesinger, M. J. 1988. Function of heat shock proteins. *Atlas Science Biochemistry.* 161-164

Seymour, I.J and P.W. Piper. 1999. Stress induction of HSP30, the plasma membrane heat shock protein gene of *Saccharomyces cerevisiae*, appears not to use known stress-regulated transcription factors. *Microbiol.* **145**: 231-239

Shenoy, K and E. A. Murano. 1996. Effect of heat shock on the thermotolerance and protein composition of *Yersinia enterocolitica* in brain heart infusion broth and ground pork. *J. Food. Prot.* **59**: 360-364

Skorupski, K., and R. K. Taylor. 1997. Control of the *ToxR* virulence regulon in *Vibrio cholerae* by environmental stimuli. *Mol. Microbiol.* 25: 1003-1009

Strayer. Lubert., 1995. *Biochemistry*. Fourth edition. Ed. Freeman. Chapter 27., p 696

Svensäter, G., B. Sjögren. and J. R. Hamilton. 2000. Multiple stress responses in *Streptococcus mutans* and the induction of general and stress-specific proteins. *Microbiol.* 146: 107-117

Taglicht, D., E. Padan., A. B. Oppenheim and S. Shuldiner. 1987. An alkaline shift induces the heat shock response in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 169: 885-887

Tamplin, M. L., T. Honda, T. Tsuji, T. Miwatani and R. R. Colwell. 1988. Evidence of common epitopes in the ganglioside binding site of *Vibrio cholerae* and *Escherichia coli* Heat-labile enterotoxins. *FEMS Microbiol. Letters.* 49: 7-11

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

Tonnack, G. W., J. M. Beteup and H. F. Jenkinson. 1997. Effect of sodium taurocholate on the in vitro growth of *Lactobacilli*. *Microbil. Ecol* 33: 163- 167

Villarreal, L., N. L. Heredia and S. García. 2000. Changes in protein synthesis and acid tolerance in *Clostridium perfringens* type A in response to acid shock. *Internatl. Microbiol.* 3: 113-116

Villeneuve, S., A. Boutonnier., L. A. Mulard and J.M. Fournier. 1999. Immunochemical characterization of an Ogawa-Inaba common antigenic determinant of *Vibrio cholerae* O1. *Microbiol.* 145: 2477-2484

Wai, S. N., T. Moriya., k. Kondo., H. Misumi and K. Amako. 1996. Resuscitation of *Vibrio cholerae* O1 strain TSI-4 from a viable but nonculturable state by heat shock . *FEMS. Microbiol.* 136: 187-191

Waldor, M. K. and Mekalanos, J.J. 1996. Lysogenic conversion by a filamentous phage encoding cholera toxin. *Science.* 272: 1910-1914

Watanabe. Junichi. 1997. Cloning and characterization of heat shock protein DnaJ homologues from *Plasmodium falciparum* and comparason with ring infected eritrocyte surface antigen. *Mol. Biochem Parasitol.* 88: 253-258

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

Waterman, S. R and P. L. C. Small. 1998. Acid-sensitive enteric pathogens are protected from killing under extremely acidic conditions of pH 2.5 when they are inoculated onto certain solid food sources. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 3882-3886

Wong, H. Ch., P. Y. Peng., J. M. Han., Ch. Y. Chang and S. L. Lun. 1998. Effect of mild acid treatment on the survival, enteropathogenicity, and protein production in *Vibrio parahaemolyticus*. *Infect Immun-* **66**: 3066-3071

Wright, Ralph., G. M. Millward-Sadler., K. G. Albertic., M.N and Karran Stephen. 1985. Liver and Biliary disease. Second Edition. Bailliere. Tindall. W. B. Saunders Company. p 277-299

Yamaguchi, H., T. Osaki., N. Kurihara., H. Taguchi., T. Hanawa., T. Yamamoto and S. Kamiya. 1997. heat-shock protein 60 homologue of *Helicobacter pylori* is associated with adhesion of *H. pylori* to human gastric epithelial cells. *Bacterial pathol.* **46**:828-831

Yildiz, F. H and G. K. Shoalnik. 1998. Role of *rpoS* in stress survival and irulence of *Vibrio cholerae*. *J. Bacteriol.* **180**: 773-784

Yokota, A., M. Veenstra., P. Kurdi., H. W. V. Veen and W. N. Konings. 2000. Cholate resistance in *Lactococcus lactis* is mediated by an ATP-dependent multispecific organic anion transporter. *J. Bacteriol.* **182**: 5196-5201



