

00528
24



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO**

FACULTAD DE QUIMICA

PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA
RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A LA
ACIDEZ EN *Escherichia coli*

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:
QUIMICA EN ALIMENTOS
P R E S E N T A :
COLMENARES MALDONADO HEIDI



MEXICO D.F.



EXAMENES PROFESIONALES
FACULTAD DE QUIMICA

2003



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente: Prof. Eduardo Bárzana García
Vocal: Profa. Ma. del Carmen Wachter Rodarte
Secretario: Profa. Ruth Edith Martín Fuentes
1er Suplente: Profa. Ma. del Carmen Urzúa Hernández
2do Suplente: Prof. Francisco Ruiz Terán

Sitio donde se desarrolló el tema:

**Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM
Laboratorio 324, Edif. E, Facultad de Química UNAM**

Asesor:

Ma. del Carmen Wachter
Dra. María del Carmen Wachter Rodarte

Supervisor técnico:

Dr. Carlos Eslava Campos
Dr. Carlos Eslava Campos

Sustentante:

Heidi Colmenares Maldonado
Heidi Colmenares Maldonado

Autorizo a la Dirección General de Bibliotecas de la UNAM a difundir en formato electrónico e impreso el contenido de mi trabajo recepcional.

NOMBRE: HEIDI COLMENARES
MALDONADO
FECHA: 27 Mayo
FIRMA: *Heidi Colmenares*

AGRADECIMIENTOS

A mis padres por el amor, apoyo, paciencia y ejemplo que siempre me han dado.

A mi hermano cuyo ejemplo me impulsa a seguir adelante.

A la Dra. Carmen Wachter por otorgarme su confianza, apoyo y guía a lo largo del proyecto y por su dirección de tesis.

Al Dr. Carlos Eslava Campos por su gran apoyo durante todo el proyecto, así como su dedicación, paciencia y gentileza.

A mis compañeros del laboratorio de Salud Pública, Jorge, Ulises, Armando, Lulú, Gloria, Sandra y Martha por su valiosa ayuda.

A Samuel Aguilar por su amable cooperación en este proyecto.

A todos mis amigos de la generación 97 que en algún momento me dieron su apoyo y comprensión y que sin cuya amistad no tendrían el mismo significado estos años de estudio. Particularmente a Ruth Gutiérrez, Lorelei Martínez, Jimena Aguirre, Gerónimo Rivera, Luis Trejo, Alejandro Rodarte, Teresa Sosa, Claudia Ovando, Mina Koo, Minerva Jiménez, Alicia Braun, Nadia Pascoe, Berenice Gaona, Berenice Madrigal, Jorge López, Mario García, Adriana Arévalo, Gabriela Baltierra, Vanesa Acosta, Itzel, Raúl y Fernanda Ravel.

A Diego, por el amor, apoyo y paciencia brindados en todo este tiempo.

A Dios que me ha dado la fortaleza para seguir adelante en todo momento.

**PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA RELACIONADAS CON LA
RESISTENCIA A LA ACIDEZ EN *Escherichia coli***

CONTENIDO

RESUMEN	1
I. INTRODUCCIÓN	3
II. GENERALIDADES	5
2.1 El Pozol	5
2.2 Clasificación de <i>Escherichia coli</i>	6
2.3 Respuestas bacterianas al pH	9
2.3.1 Estrés ácido	11
2.3.2 Efectos del pH extracelular	12
2.3.3 Protección y reparación de daños en condiciones de pH ácido	12
2.3.4 Mantenimiento del pH intracelular	13
2.3.5 Membranas citoplasmática y externa como barreras al ácido	14
2.3.6 El factor sigma S y el estrés	15
2.3.7 Respuestas al estrés por ácido en enterobacterias	17
2.4 Membrana citoplasmática y proteínas de membrana	20
2.4.1 Protección del citoplasma a pH ácido, proteínas de choque térmico	24
2.4.2 Proteínas de choque térmico e inmunidad protectora	27
III. OBJETIVOS	30

IV. MATERIALES Y MÉTODOS	31
4.1 Material biológico, cepas de <i>Escherichia coli</i>	31
4.2 Pureza de las cepas	31
4.3 Confirmación de la identidad de las cepas	32
4.4 Identificación serológica	32
4.4.1 Antígeno somático O y flagelar H	32
4.5 Condiciones de estrés	33
4.6 Supervivencia de las cepas	34
4.7 Obtención de las proteínas de membrana externa (OMPs)	34
4.7.1 Cuantificación de proteína	36
4.8 Electroforesis de proteínas	36
4.9 Western Blot	37
V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
5.1 Identificación de las cepas	40
5.2 Capacidad de supervivencia a diferentes condiciones de estrés	40
5.3 SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia de proteínas de membrana externa	42
VI. CONCLUSIONES	57
VII. RECOMENDACIONES	58
VIII. REFERENCIAS	59

PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA RELACIONADAS CON LA RESISTENCIA A LA ACIDEZ EN *Escherichia coli*

RESUMEN

La acidificación de los alimentos es un procedimiento utilizado para su conservación, sin embargo, algunos microorganismos han desarrollado mecanismos que les permiten tolerar condiciones de pH ácido. Esto representa un grave problema cuando se desea controlar el desarrollo de microorganismos patógenos.

Los estudios de resistencia a la acidez se han centrado principalmente en *Escherichia coli* O157:H7 por su asociación con el síndrome urémico hemolítico. Estudios previos refieren un incremento en la resistencia a la acidez en esta bacteria, después de un tratamiento térmico subletal, el cual se ha relacionado con la expresión de proteínas de membrana externa (OMPs) de bajo peso molecular.

El serogrupo O88 de *Escherichia coli* es considerado como patógeno, asociado a brotes de diarrea. En estudios previos se aislaron cepas con este serogrupo del pozol, que es una bebida ácida fermentada de maíz. También se comparó la sobrevivencia de esta cepa con la de O157 a valores bajos de pH (2.0, 2.5 y 3.0), sin encontrarse diferencias significativas entre una y otra. En este mismo estudio, se analizó el tratamiento con choque térmico (48°C por 10min), para determinar la expresión de OMPs. El resultado fue la expresión de éstas, tanto en la cepa de pozol como en la O157 además de un aumento en la resistencia a la acidez de ambas cepas.

El presente trabajo muestra datos relacionados con la expresión de proteínas de membrana externa, posiblemente asociadas con la sobrevivencia de las bacterias sometidas a diferentes tipos de estrés. Así mismo se presentan resultados relacionados con la expresión de proteínas compartidas por ambas cepas (O88:H25, O157:H7).

Después de someter a las bacterias a estrés ácido, térmico más ácido y térmico, se analizaron los perfiles electroforéticos de las OMPs de las cepas O157:H7 y O88:H25 de *E. coli*. Los resultados mostraron la presencia de proteínas expresadas específicamente para cada condición y cada cepa, así como también algunas que se comparten. La identidad de algunas de ellas se corroboró al hacer análisis por Western Blot, empleando el suero humano de una paciente convaleciente de una infección por *E. coli* O157:H7. Al mismo tiempo se identificaron otras proteínas que reaccionaron con este suero. Lo anterior permitió establecer qué proteínas son sintetizadas en cada condición de estrés.

Los resultados obtenidos sugieren que con cada tipo de estrés se generan respuestas diferentes, dependiendo del tipo de estrés que la bacteria detecte, aunque también existe respuesta compartida entre algunos de ellos.

CAPÍTULO I. INTRODUCCIÓN

El pozol es una bebida ácida, no alcohólica, consumida tradicionalmente en el sureste de México que se obtiene a partir de una masa fermentada de maíz nixtamalizado (Wacher, 1999). Su proceso de elaboración es casero y sin ningún control de las condiciones higiénicas durante su preparación, lo cual permite la introducción de grandes cantidades de microorganismos a la masa durante la molienda, amasado y moldeado del nixtamal. La fermentación es un proceso natural debido a la acción de bacterias, levaduras y hongos. Además de los microorganismos participantes en el proceso de fermentación, se pueden introducir otros causantes de enfermedad, principalmente por un manejo higiénico inadecuado durante el proceso de elaboración del pozol. Las enterobacterias incluyen algunas de las bacterias patógenas que se han aislado las cuales persisten durante varias horas después de iniciada la fermentación. Entre las enterobacterias, *Escherichia coli* ha sido una de las identificadas y se ha podido aislar de muestras de pozol con valores de pH de 3.85, a las 48 horas de iniciada la fermentación de la masa (Sainz y col., 2001).

Las bacterias experimentan periódicamente situaciones de estrés en gran variedad de eventos naturales o de patogénesis. Con la finalidad de aumentar la posibilidad de sobrevivencia en estas circunstancias, los microorganismos son capaces de detectar señales de alarma y desencadenar una respuesta molecular, sintetizando proteínas específicas.

En sus hábitats naturales las enterobacterias son constantemente sometidas a variadas situaciones de estrés ambiental, siendo el ácido una de las condiciones hostiles más frecuentes. Microorganismos neutrófilos como *Escherichia coli*, encuentran estas condiciones en su tránsito por el tracto gastrointestinal, con valores de pH extremadamente bajos en el estómago y presencia de ácidos grasos volátiles en el intestino. Fuera de un huésped los microorganismos entéricos enfrentan estrés ácido en los residuos industriales, el

procesamiento de alimentos y la degradación de la materia orgánica. Así, la capacidad de detectar y responder a cambios de pH potencialmente letales, es crucial para la sobrevivencia de un microorganismo.

Uno de los factores extrínsecos de los alimentos en contra de los cuales las bacterias pueden desarrollar resistencia es la temperatura; se sabe que al exponer las células a un choque térmico subletal se induce la resistencia a temperaturas mayores. Se ha observado que en respuesta a este tratamiento, se sintetizan proteínas conocidas como proteínas de choque térmico (HSP). La síntesis de proteínas de choque en respuesta a un factor estresante puede proteger también en contra de otros, lo cual se conoce como protección cruzada (Madigan, 1997).

La capacidad de los microorganismos patógenos para desarrollar respuestas de adaptación a condiciones de estrés, recibe cada vez más atención en la microbiología de alimentos. La adaptación a condiciones ácidas por parte de los patógenos entéricos puede incrementar significativamente su sobrevivencia en alimentos ácidos.

La mayoría de los estudios de resistencia a valores de pH bajo en *Escherichia coli* se centran en la cepa O157, debido a la gravedad de los síntomas que ocasiona; sin embargo, en México, donde aparentemente esta cepa no causa problemas, son las cepas EPEC y ETEC, como las aisladas del pozol, las que ocasionan episodios graves de diarreas, sobre todo en niños.

Al identificar algunas de las proteínas de membrana externa que pudieran cumplir una función importante para la sobrevivencia de estas cepas patógenas, se puede avanzar en la comprensión del mecanismo de resistencia a condiciones de estrés y de este modo poder combatir las, con lo que el presente trabajo representa un adelanto importante para la identificación de las mismas.

CAPÍTULO II. GENERALIDADES

2.1 El Pozol

La palabra pozol viene del vocablo náhuatl *pozolli*, que significa espumoso. Es una bebida ácida y refrescante que se consume desde la época prehispánica en el sureste de México. Se prepara diluyendo en agua una masa fermentada de nixtamal (Cruz y Ulloa, 1973). Se ingiere como bebida ceremonial y alimento básico por las poblaciones indígenas del sureste de México y como bebida refrescante por los mestizos de la misma región del país (Ulloa y Herrera, 1976-1982).

El pozol se elabora a partir de granos de maíz, de preferencia blanco, que se hierven en agua con cal (aprox. 10% de $\text{Ca}(\text{OH})_2$), durante 1h, o hasta que los granos se hinchan y los pericarpios se separan fácilmente. Posteriormente se enfrían y se enjuagan con agua; a los granos resultantes se les llama nixtamal. El nixtamal se transfiere a un molino metálico del cual se obtiene una masa martajada a la que se le da forma de bola manualmente. Estas bolas se envuelven en hojas de plátano para evitar la desecación y se dejan fermentar a temperatura ambiente de 1 a 14 días, dependiendo de las preferencias del consumidor y de las circunstancias prevalecientes (Sainz y col., 2001).

El proceso de fermentación del pozol es llevado a cabo por una microbiota mixta que incluye bacterias lácticas, enterobacterias, levaduras, así como varios hongos filamentosos (mohos). Es común la presencia de enterobacterias al inicio de las fermentaciones en las que interviene una microbiota mixta, así como la transmisión de estos microorganismos por contaminación fecal directa o a través del agua utilizada. El pozol es un alimento muy manipulado, sobre todo durante la molienda, el amasado y el moldeado, procedimientos que se realizan en condiciones poco higiénicas, hecho que muestra por qué es probable que se aislen de la masa enterobacterias con propiedades patógenas (Wacher, 1995).

Sainz y col., (2001), aislaron de 10 muestras de pozol recién hechas, un total de 73 cepas de *E. coli*, de las cuales a 37 identificaron serológicamente. Algunas de las aisladas fueron identificadas como pertenecientes a grupos patógenos de *E. coli* ETEC (*E. coli* enterotoxigénica), como: O20:HNM, O173:H23, O8:H7, O8:H8, O8:H49, O11:H47; EPEC (*E. coli* enteropatógena), como: O88:H25, O18:H53 y UPEC (*E. coli* uropatógena), como: O1:H6, O1:H10, O1:H?. También señalan que la presencia y sobrevivencia de cepas potencialmente patógenas de *E. coli* en el pozol, sugiere que los alimentos fermentados puedan ser una fuente potencial de brotes de enfermedad por alimentos.

2.2 Clasificación de *Escherichia coli*

Bacteria de forma bacilar, gramnegativa, anaerobia facultativa, no esporulada, oxidasa negativa, móvil o inmóvil, fermenta la glucosa con formación de ácido y gas (algunas cepas no producen gas), produce indol a partir de triptofano, no produce acetoina, y no puede utilizar citratos como única fuente de carbono. Forma parte de la microbiota intestinal y tiene un papel nutricional importante ya que produce vitaminas, en especial la vitamina K (Madigan, Martinko y Parker, 1997).

Escherichia coli es de los microorganismos anaerobios facultativos más importantes del tracto intestinal, permanece confinada dentro del lumen intestinal como un saprófito inocuo, pero en huéspedes debilitados o inmunosuprimidos, causa infecciones oportunistas. También existe un conjunto de cepas de *E. coli* que poseen un arreglo específico de propiedades de virulencia que les permite contrarrestar los mecanismos de defensa del huésped y causar enfermedad.

La tipificación serológica es utilizada ampliamente para la detección del origen de brotes de enfermedades intestinales y para la identificación de cepas

patógenas. La identificación serológica utiliza la detección de los antígenos somático (O) y flagelar (H). Por otro lado hay un esquema de clasificación basado en los factores de virulencia que incluye patrones característicos de adherencia a las células del huésped, producción de toxinas e invasividad. De este modo se han definido cinco tipos de *E. coli*: enterotoxigénica, enteroinvasiva, enteropatógena, enteroagregativa y enterohemorrágica.

Doyle (1997), describe las principales características de los diferentes grupos de *Escherichia coli*, de la siguiente manera:

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)

Estas bacterias son los agentes causantes de la mayoría de las diarreas en niños de países en desarrollo y de los viajeros que visitan estos países. No hay cambios aparentes en las células a las que la bacteria se adhiere, la inflamación es mínima y la diarrea no es tan severa, pero puede ser fatal, especialmente en infantes y niños de hasta 3 años. La infección es adquirida por la ingestión de agua y alimentos contaminados.

Las cepas ETEC no invaden las células epiteliales pero se adhieren a la mucosa intestinal. Elaboran dos tipos diferentes de toxinas: la termolábil (LT), se inactiva a 100°C durante 10 minutos y la termoestable (ST), que conserva su toxicidad después de incubarla a 100°C durante 30 minutos. La adhesión es mediada por factores de colonización CFA, que son adhesinas fimbriadas.

Escherichia coli enteroinvasiva (EIEC)

Las cepas de EIEC se parecen mucho a *Shigella spp.*, causan una enfermedad indistinguible a nivel sintomático de la disentería que causa *Shigella spp.*, ya que se observa la presencia de moco y sangre en las heces. Estas cepas afectan a adultos principalmente y se aíslan muy poco en niños, identificándose preferentemente a partir del sexto mes de vida. Invaden y se multiplican

activamente en los eritrocitos colonizados, diseminándose lateralmente a las células vecinas, tal y como se ha descrito en *Shigella spp.* Son altamente virulentas y de distribución mundial.

***Escherichia coli* enteroagregativa (EAggEC)**

Estas cepas se asocian con diarrea persistente, mayor de 14 días, en niños en países en vías de desarrollo. También se asocia con diarreas en adultos, transmitidas por alimentos contaminados en países desarrollados. Presentan un patrón de adherencia a células, caracterizado por la formación de agregados que se han definido como ladrillos apilados. El mecanismo de patogenicidad comienza a ser elucidado, considerándose dos eventos como los más importantes, la adherencia y la producción de toxinas.

***Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)**

La cepa prototipo de este grupo es la O157:H7, responsable de brotes a gran escala en países desarrollados por infección a través de alimentos contaminados. La bacteria se ha relacionado con casos de colitis hemorrágicas y cuadros de síndrome urémico hemolítico en humanos. Se distingue de otras cepas de *E. coli*, por su incapacidad para fermentar el sorbitol, su incapacidad para producir β -glucuronidasa y su gran tolerancia a valores bajos de pH, esta última característica la hace incrementar la posibilidad de su participación en infecciones alimentarias a partir de productos fermentados. Tiene varios factores implicados en la patogénesis como son las toxinas tipo Shiga, así como una isla de patogenicidad (LEE), que codifica para proteínas como la intimina, involucrada en el evento de adhesión y esfacelamiento.

Los brotes más recientes se relacionan frecuentemente con la ingesta de alimentos contaminados, como hamburguesas de carne de res, leche, agua, etc., y también por contacto con animales y de persona a persona.

Escherichia coli enteropatógena (EPEC)

Es una importante causa de diarrea aguda especialmente en niños, de países en desarrollo. Su mecanismo de patogenicidad se caracteriza por la adherencia de las bacterias a la porción apical del enterocito con formación de un pedestal y posterior destrucción del borde rugoso de las microvellosidades, es decir, deforman y destruyen las microvellosidades del intestino. Dentro de los serogrupos O reconocidos en la categoría EPEC, se encuentra el O88.

2.3 Respuestas bacterianas al pH

La sobrevivencia y colonización de las bacterias requiere de su capacidad para detectar y adaptarse a cambios ambientales. La capacidad de los microorganismos patógenos de adaptarse a un pH moderadamente ácido debida a la expresión de ciertos productos regulada por genes específicos, ha provocado un gran interés por la respuesta de las bacterias expuestas a valores extremos de pH. Lo anterior debido al reconocimiento de que todos los organismos que se establecen en el intestino deben pasar a través del estómago, en donde el pH alcanza valores tan bajos de hasta 1.5 unidades.

Los estudios más completos acerca de la tolerancia al ácido son aquéllos realizados con las bacterias entéricas, los cuales han proporcionado una evidencia convincente de que la tolerancia al ácido no es una respuesta única gobernada por un regulador global. El mejor modelo explica que la tolerancia al ácido se debe a que múltiples sistemas perciben los cambios en el pH de manera diferente, utilizando estructuras regulatorias distintas e incluso a veces compartidas (Booth y col., 2001).

Es un hecho que los mecanismos de resistencia a condiciones adversas de pH son relevantes en varios campos, por ejemplo, en la medicina, en relación a la

invasión patogénica y en la industria alimentaria, en términos de su potencial para transmitir patógenos.

Los mecanismos que dan a las bacterias neutrófilas la capacidad de tolerar pH ácido o alcalino son muy interesantes, ya que estos les permiten soportar la acción de los ácidos del estómago y la acidez de los alimentos, por ello son de considerable interés.

Una propiedad importante de los patógenos microbianos asociados con vías de transmisión oral-fecal, es la habilidad de sobrevivir en ambientes extremadamente ácidos, así como en los moderadamente ácidos que contienen ácidos débiles (Lin y col, 1996). Esta resistencia a valores bajos de pH puede ser importante para la sobrevivencia de patógenos en alimentos específicos y en el tracto intestinal. Por ejemplo, un pH ácido y la presencia de ácidos débiles en algunos alimentos, no sólo confieren sabor, sino que además se encargan de evitar el crecimiento de microorganismos contaminantes. En muchos alimentos, los ácidos débiles son producidos por los mismos microorganismos vía fermentativa. Los ácidos débiles son también utilizados en el procesamiento de los alimentos, designados para controlar patógenos contaminantes en la superficie de la carne, y en los piensos para animales. Consecuentemente, la habilidad para resistir el ácido puede permitir a los microorganismos patógenos sobrevivir en alimentos acidificados y al procesamiento de mismos hasta que son ingeridos.

Los alimentos son ecosistemas complejos, compuestos por el ambiente y los organismos que viven en él (Doyle y col., 1997). El ambiente del alimento está compuesto por factores extrínsecos, como por ejemplo, pH, actividad acuosa, nutrientes, así como factores intrínsecos, que pueden ser la temperatura, gases ambientales, presencia de otros microorganismos, etc. Los dos tipos de factores pueden ser manipulados para conservar el alimento.

2.3.1 Estrés Ácido

El estrés ácido puede describirse como el efecto biológico combinado del pH bajo y la presencia de ácidos orgánicos en el ambiente, incluye ácidos como el lactato, butirato, propionato y acetato, producidos comúnmente como resultado de la fermentación. Los ácidos débiles en su forma protonada, no cargada, pueden difundir a través de la membrana celular y disociarse en el interior de la célula, disminuyendo en el proceso el pH interno (pH_i). Los efectos letales de estos ácidos no sólo son dependientes de su concentración, sino del pH ambiental y de sus constantes de disociación. A menor pH externo (pH_o), más ácidos débiles no disociados estarán disponibles (según sus valores de pK_a), para atravesar la membrana y afectar el pH_i (Bearson y col., 1997).

Existen tres funciones fundamentales que son afectadas cuando la célula es expuesta a condiciones ácidas: La capacidad de adquirir nutrientes y por lo tanto de generar energía; la homeostasis del pH citoplasmático y la protección de proteínas y DNA.

Cualquier organismo que sobreviva a un cambio brusco de pH debe tener mecanismos que permitan mantener la función biológica de las estructuras superficiales de la célula; proteger a las proteínas citoplasmáticas y al DNA, o bien tener la capacidad para poder repararlos en caso de daño. Existe evidencia suficiente que sugiere la existencia de dos mecanismos que contribuyen con la protección de estructuras superficiales: la producción de proteínas chaperonas y la alcalinización del periplasma (Booth y col., 2002).

2.3.2 Efectos del pH extracelular

Las macromoléculas externas en la superficie de la membrana citoplasmática (flagelos, pili, quimiorreceptores, proteínas periplásmicas, pared celular, etc.) se encuentran expuestas al pH externo (pH_o) cualquiera que este sea, por lo mismo son las primeras en sufrir daño. Las células cuentan con opciones limitadas para proteger estas estructuras, por lo que deben producir versiones modificadas que les permitan resistir el pH adverso. Un ejemplo al respecto lo constituye la pérdida de movilidad en el flagelo y por tanto de la respuesta quimiostática bajo condiciones de acidez (Bowra y Dilworth, 1981).

2.3.3 Protección y reparación de daños en condiciones de pH ácido

La acidificación del ambiente afecta la actividad de proteínas asociadas con la superficie de la célula (superficie externa de la membrana plasmática, periplasma, membrana externa, pared celular). Investigaciones recientes han identificado un sistema en el periplasma de *E. coli* y de *Shigella* que contribuye con la sobrevivencia de estas dos bacterias al pH ácido (Waterman y Small, 1996; Gajiwala Y Burley, 1999). Se trata de las proteínas HdeA y B, que son expresadas por el operón *hdeAB* bajo el control del factor sigma RpoS y también de la proteína H-NS. Lo que hasta ahora se entiende de este sistema es que las proteínas HdeA y B forman un heterodímero que se disocia a pH ácido y así las partes liberadas se unen con las proteínas que se encuentran desnaturalizadas en el periplasma, evitando su aglomeración. Lo anterior podría asemejarse a lo que ocurre cuando hay un choque térmico, donde los sistemas de protección son inducidos para evitar que se desnaturalicen las proteínas en el periplasma.

2.3.4 Mantenimiento del pH intracelular

El pH intracelular (pH_i) de las células bacterianas tiende a mantenerse en los límites propios de su condición. Para un neutrófilo, como *Escherichia coli*, el pH_i se mantiene a 7.6-7.8; mientras que para otros, este rango puede ser más amplio o mucho más bajo, particularmente para bacterias fermentativas. Dado que el pH_i debe mantenerse constante, las bacterias cuentan con diversos mecanismos para minimizar el estrés producido por un pH externo que no es óptimo. Dichos mecanismos son los siguientes:

- ✓ Disminución en la permeabilidad de la membrana
- ✓ Capacidad amortiguadora del citoplasma
- ✓ Neutralización del pH_o externo
- ✓ Salida de protones del citoplasma, o limitación de su entrada

Las bacterias que crecen en un intervalo de pH de ácido a neutro, generalmente mantienen su pH_i en un valor más alcalino que el de su ambiente (Booth, 1999) y cambios en éste alteran su fisiología celular y la expresión génica con cambios tan pequeños como 0.2 unidades de pH.

La capacidad para mantener el pH_i dentro de un intervalo estrecho de valores a pesar de las variaciones del pH ambiental se llama homeostasis de pH y la hay pasiva y activa. El principal componente de la primera es la baja permeabilidad de la membrana a los iones, especialmente protones; mientras que la segunda implica la capacidad de detectar y responder a perturbaciones del pH_i . Esta se logra principalmente por el movimiento controlado de cationes y aniones a través de la membrana, siendo principales los iones potasio, sodio y protones.

2.3.5 Membranas citoplasmática y externa como barreras al ácido

La permeabilidad de la membrana a los protones es muy importante. Células de *E. coli* adaptadas al ácido muestran una reducción significativa en la permeabilidad de los protones, lo cual correlaciona bien con el incremento en la tolerancia a valores bajos de pH. Las bicapas lipídicas son relativamente impermeables a los protones. La sobrevivencia de células de *E. coli* O157 habituadas al ácido expuestas a pH de 3.0, ha sido correlacionado con el incremento del ácido graso ciclopropano en la membrana (Brown, y col., 1997). Investigaciones posteriores sugieren que el incremento de este durante la fase estacionaria puede ser parcialmente responsable del incremento en la ácido tolerancia de *E. coli*.

Estudios recientes (McGowan y col., 1998) sugieren que la membrana externa es una barrera importante para el paso de los protones. La pérdida de lipopolisacáridos provoca cambios en la estructura de la membrana externa, lo cual es suficiente para provocar en la bacteria sensibilidad al ácido.

Por otra parte, Rowbury ha mostrado que cambios en las porinas de la membrana externa, especialmente la inducción de la porina PhoE, contribuye en la sensibilidad al ácido de *E. coli* (Rowbury y Goodson, 1993).

La estructura de las capas superficiales de la célula es un factor determinante en la sensibilidad que ésta presenta a ácidos orgánicos e inorgánicos, aunque no queda lo suficientemente claro cómo estas estructuras contribuyen con la protección contra el estrés ácido (Booth, 2002).

2.3.6 El factor sigma S y el estrés

Las células que entran a la fase estacionaria pasan por una adaptación física para asegurar que pueden combatir el estrés. El cambio más llamativo en la morfología ocurre en las células de *E. coli*, que se hacen mucho más pequeñas y casi esféricas, el citoplasma se condensa mientras el volumen del periplasma incrementa, la composición de la membrana se altera y ocurre un cambio concomitante en la estructura de la pared celular, incrementando su resistencia a agentes caotróficos. La acción de la DNA girasa y de la síntesis de proteínas de unión al DNA provoca un incremento en la superhelicidad del DNA cromosomal, lo que le permite empacarse más densamente. Algunas de las proteínas de unión del DNA, actúan protegiéndolo de daño oxidativo.

Fenotípicamente, las bacterias en la fase estacionaria de crecimiento son más resistentes a estrés térmico, oxidativo, ácido, y están mejor equipadas para sobrevivir al estrés osmótico y a la inanición. Mucho del incremento en la resistencia de las bacterias a diferentes tipos de estrés, es ahora relacionada con la expresión de genes, que ahora se sabe son regulados por la inducción de rpoS (Cuadro 1).

El factor σ es una proteína que se une a la RNA polimerasa, confiriéndole la capacidad de iniciar la transcripción en un cierto promotor. En *E. coli*, σ^{70} codificado por rpoD, inicia la transcripción de la mayoría de los promotores del genoma de *E. coli*. Al inicio de la fase estacionaria σ^{70} es sustituido por σ^S (codificado por rpoS).

Cuadro 1. Ejemplo de genes regulados por RpoS

Gene	Función	Resistencia contra
<i>otsA, otsB, treA</i> ^a	Síntesis de trehalosa	Protege a la membrana y a las proteínas del incremento en la temperatura y da resistencia osmótica.
<i>katE</i> ^b <i>xthA</i>	Inducción de catalasa Exonucleasa III Síntesis de DPS (proteína de unión no específica al DNA)	Resistencia contra estrés oxidativo
DnaK, GroEL y HtpG ^a	Inducción de chaperonas moleculares	Resistencia contra la acidez y choque térmico, ya que promueven el doblamiento correcto de las proteínas en el interior de las células

^aHengge-Aronis (1993), ^bStrom y Kaasen (1993).

Durante un estado normal de crecimiento a cualquier temperatura, el factor sigma σ^{32} es una proteína inestable, con una vida media de sólo 1 minuto. Sin embargo, después de un cambio en la temperatura por ejemplo de 30° a 42°C, la proteína se estabiliza en poco tiempo, y como consecuencia de ello incrementa su cantidad. Adicionalmente, hay un aumento en la velocidad de traducción del mRNA para σ^{32} durante el período en el que incrementa la síntesis de proteínas de choque térmico. Resulta interesante que después de que baja la temperatura, la actividad de σ^{32} decrece, y esto, en lugar de resultar en una disminución de la concentración de σ^{32} , resulta en una más baja velocidad de síntesis de proteínas de choque térmico (White, 2000).

2.3.7 Respuestas al estrés por ácido en enterobacterias

Una vez ingeridos, los patógenos deben lidiar con una serie de exposiciones al ácido en el organismo huésped. La importancia de las secreciones gastrointestinales como mecanismo de defensa en contra de patógenos entéricos ha sido reconocida desde hace mucho tiempo. Después de pasar por el estómago, donde los microorganismos enfrentan un pH con valores bajos (1 – 3) debido al HCl secretado, al avanzar hacia el intestino, encuentran un ambiente menos ácido (pH de 4 a 6); sin embargo ahí están presentes productos finales de la fermentación (ácidos débiles), producidos por la flora intestinal. Así que, aunque el intestino tiene un ambiente menos ácido, la presencia de ácidos débiles incrementa el estrés a niveles potencialmente letales para las bacterias entéricas (Lin, 1996).

Términos como resistencia a la acidez (AR), tolerancia a la acidez (ATR) y habituación a la acidez (AH), se usan para describir la sobrevivencia a valores bajos de pH, en diferentes condiciones de crecimiento de los diferentes microorganismos.

Los microorganismos que crecen en un medio moderadamente ácido sobreviven la transferencia a un medio extremadamente ácido mucho mejor que cuando crecen a valores de pH 7 o mayores. Dos componentes principales cumplen un papel importante en esta respuesta. La incubación de enterobacterias en un pH moderadamente ácido, induce la síntesis de un conjunto de proteínas que permiten la sobrevivencia a valores de pH de 2.5 – 3.0. Adicionalmente, la ácido tolerancia en la fase estacionaria está bajo el control del factor sigma RpoS. Aunque RpoS estaba originalmente descrito como un gene regulador de la fase estacionaria temprana, ahora se reconoce como un factor importante durante el crecimiento exponencial bajo ciertas condiciones. Específicamente, RpoS prepara la línea principal en la tolerancia al ácido de las enterobacterias en fase exponencial y estacionaria (Booth y col., 2001).

ATR abarca sistemas de sobrevivencia al ácido en fase exponencial o fase estacionaria que pueden funcionar para proteger a las células de valores de pH 3.0 (Lin y col, 1995).

AR, abarca sistemas de sobrevivencia al ácido evidentes en células en fase estacionaria que protegen a las células de valores de pH_o menores o iguales a 2.5. Lin y col., demostraron que un medio completo y las células en fase estacionaria son importantes para el fenómeno de resistencia a la acidez (AR) a valores de pH_o de 2.5.

Escherichia coli presenta tres sistemas AR dependientes de medio completo. La actividad de estos sistemas depende, en parte, si el metabolismo de las células es oxidativo o fermentativo. Dos sistemas AR fermentativos involucran a las descarboxilasas inducibles, arginina descarboxilasa y glutamato descarboxilasa. El tercer sistema, llamado oxidativo, es inducido por el crecimiento en la fase estacionaria en medio Luria Bertani, es reprimido por glucosa, y una vez inducido, no requiere de la presencia de aminoácidos en el medio durante un cambio subsecuente a un pH_o de 2.5 (Bearson y col., 1997).

El sistema de las descarboxilasas, consta normalmente de una o más enzimas descarboxilasas, que convierten al sustrato en su amina respectiva y CO₂ así como de un un antiporte que intercambia el aminoácido por la amina que es producto de la descarboxilación. En *S. flexneri* y *E. coli* el sistema glutamato descarboxilasa tiene un papel complementario al de las chaperonas del periplasma. Mutantes que carecen de este sistema están extremadamente expuestas en su sobrevivencia al incubarse a valores de pH de 2.5 (Waterman y Small, 1996).

El mecanismo de protección proveído por las descarboxilasas no queda completamente claro, sin embargo lo más probable es que suceda la alcalinización del periplasma. Tomando la glutamato descarboxilasa como un ejemplo, se sugiere que el glutamato es descarboxilado en el citoplasma. El producto, γ -

aminobutirato, sale de la célula por intercambio con el glutamato vía el antiporte GadC. Se ha considerado normalmente que el consumo de un protón en el citoplasma durante la descarboxilación con el aumento consecuente en el pH citoplasmático, es el mecanismo por el cual se logra la ácido tolerancia (Figura 1) (Park y col., 1996).

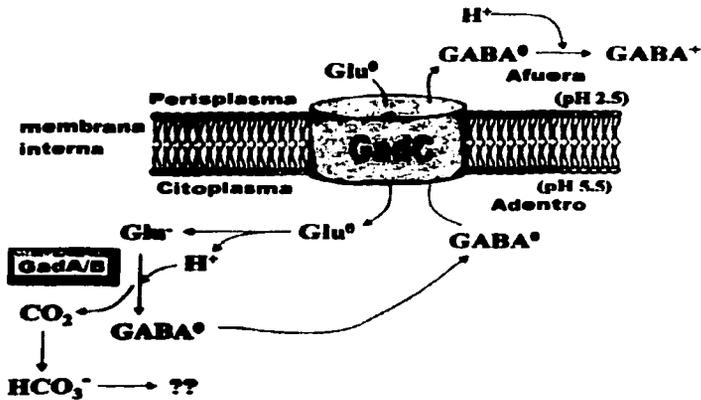


Figura 1. Sistema glutamato descarboxilasa (Booth, 2002).

El glutamato protege a las células de *E. coli* contra los efectos del benzoato a pH ácido (Lin y col., 1996). El benzoato entra a la célula y se disocia liberando un protón; cuando el benzoato entra completamente y la disociación rebasa la capacidad amortiguadora del citoplasma, el pH citoplasmático cae. La inhibición del benzoato depende del pH externo. Consecuentemente, si aumenta el pH externo, se reduce el estrés causado por el benzoato. La producción y salida de aminas a partir de aminoácidos ofrece una eficiente manera para lograrlo. La protección del efecto tóxico que tiene el benzoato sobre las células, proporcionada por el glutamato representa un modelo de protección por descarboxilación que es mediado vía alcalinización del periplasma.

La habituación al ácido (AH) ocurre en *E. coli* cuando crece en fase exponencial en medio nutritivo a un pH de 5. Esta habituación permite su sobrevivencia al ser transferida a un medio con valores de pH entre 3 y 3.5. La habituación al ácido aparentemente involucra síntesis de proteínas que, como un evento clave, reparan daños en el DNA.

2.4 Membrana citoplasmática y proteínas de membrana

La membrana plasmática rodea a todas las células, definiendo su extensión y manteniendo las diferencias esenciales entre el contenido de la célula y su entorno. Esta membrana es un filtro altamente selectivo y un mecanismo para el transporte activo; controla la entrada de nutrientes y la salida de productos residuales, y genera diferencia en la concentración de iones entre el interior y el exterior de la célula. La membrana plasmática también actúa como un sensor de señales externas, permitiendo que la célula cambie en respuesta a indicaciones ambientales.

Todas las membranas biológicas tienen una estructura básica común: se trata de agrupaciones de moléculas lipídicas y protéicas, unidas en gran parte por interacciones no covalentes. Las membranas celulares son estructuras dinámicas, y la mayoría de sus lípidos y de sus moléculas protéicas son capaces de moverse en el plano de la membrana. Las moléculas lipídicas están dispuestas en forma de una doble capa continua. Esta bicapa lipídica constituye la estructura básica de la membrana y actúa como una barrera relativamente impermeable al paso de la mayoría de las moléculas hidrosolubles. Las moléculas protéicas median la mayoría del resto de funciones de la membrana. Algunas, por ejemplo, son transportadoras de moléculas específicas hacia el interior o exterior de la célula, mientras que otras son enzimas que catalizan reacciones asociadas con la membrana. Otro tipo de proteínas de membrana actúan como eslabones estructurales que conectan a la membrana plasmática con el citoesqueleto y/o con

la matriz celular de células adyacentes. Otras son proteínas receptoras que reciben y transducen señales químicas procedentes del entorno celular, etc.

Aunque la estructura básica de las membranas biológicas está determinada por la bicapa lipídica, la mayoría de sus funciones específicas están desempeñadas por proteínas. Muchas proteínas de membrana atraviesan la bicapa lipídica y son denominadas proteínas transmembranales. Otras proteínas de membrana no ocupan el interior de la bicapa lipídica, sino que están unidas mediante interacciones no covalentes con otras proteínas de membrana (proteínas periféricas de membrana). Muchas de ellas pueden ser liberadas de la membrana mediante procedimientos de extracción relativamente suaves, como la exposición a soluciones de muy alta o baja fuerza iónica o de pH extremo que interfieren con las interacciones protéicas pero mantienen intacta la bicapa lipídica. Algunas proteínas unidas a la bicapa por cadenas de ácidos grasos, y algunas otras proteínas íntimamente unidas a la membrana, sólo pueden ser liberadas rompiendo la bicapa con detergentes o solventes orgánicos, por lo que se les denomina proteínas integrales de membrana.

En general, las proteínas transmembranales y también algunas otras que estén estrachamente unidas a la membrana, pueden ser solubilizadas únicamente por medio de agentes que rompan las interacciones hidrofóbicas y destruyan la bicapa. De entre estos compuestos que alteran las propiedades bioquímicas de la membrana, los más útiles son los detergentes, pequeñas moléculas anfipáticas que tienden a formar micelas en el agua. Al mezclarlos con las membranas, los extremos hidrofóbicos de las moléculas de detergente se unen a las regiones hidrofóbicas de la zona externa de las proteínas de membrana, desplazando así las moléculas lipídicas. Puesto que el otro extremo de detergente es polar, la unión detergente–proteína tiende a dispersar en agua a las proteínas de membrana, a pesar de que algunas moléculas lipídicas intensamente asociadas a las proteínas quedan unidas a estos complejos. Los extremos polares de los detergentes pueden estar cargados (ser iónicos) como en el caso del dodecil

sulfato de sodio (SDS), o no cargados (ser no iónicos), como en el caso de los detergentes tipo Tritón.

Además de la capa de peptidoglucanos que rodea la membrana citoplasmática de las células, las bacterias gramnegativas tienen una membrana adicional constituida de lipopolisacáridos; las moléculas de LPS están compuestas por dos regiones conservadas: el lípido A, que ancla la molécula en la membrana y el núcleo de oligosacáridos, unido a un polisacárido O (antígeno somático). Las proteínas que constituyen esta segunda membrana, tienen diferentes estructuras, por lo cual cumplen diversas y muy variadas funciones dentro de la célula (Nikaido, 1985), por ejemplo, las **porinas** que son proteínas transportadoras / receptoras como: el precursor de la maltoporina (*lamB*), que está involucrada en el transporte de maltosa y maltodextrinas; el precursor de la proteína de membrana externa A (*ompA*), requerida para la acción de las colicinas K y L y que también puede funcionar como porina de baja afinidad permitiendo una lenta penetración de solutos pequeños; los precursores de las proteínas de membrana externa C (*ompC*) y F (*ompF*), que funcionan como poros de difusión pasiva para moléculas hidrofílicas de bajo peso molecular; el precursor de la proteína de membrana externa E (*phoE*), que es un poro que transporta fosfato inorgánico, compuestos fosforilados y solutos con carga negativa, etc.

Además de las porinas hay otras proteínas de membrana externa encargadas del transporte y recepción de moléculas, algunos ejemplos al respecto son: el precursor del receptor de la Vitamina B₁₂ (*btuB*), que es receptor para cobalamina y bacteriófago Bf23, necesaria para el transporte de colicinas E; la colicina I, que participa en el transporte de hierro; la proteína transportadora de ácidos grasos de cadena larga, involucrada en la translocación de ácidos grasos de cadena larga a través de la membrana; el precursor de la proteína involucrada en una probable vía de secreción general de proteínas (*gspD*).

Hay proteínas de membrana externa que actúan como **enzimas** que pueden ser hidrolasas y actuar sobre enlaces éster (carboxil-éster hidrolasa, fosfórico-monoéster hidrolasa); glucosidasas encargadas de hidrolizar compuestos o-glicosídicos; peptidasas, las cuales actúan sobre enlaces peptídicos como la serina peptidasa. También hay **lipoproteínas** como el precursor BLc que puede funcionar como respuesta a la inanición; la proteína de membrana externa Slp, que estabiliza la membrana externa durante la fase estacionaria y periodos de inanición.

Existen otras OMPs como son las de autoagregación, que pueden ser proteínas de adherencia conocidas como **intiminas**, necesarias para la producción de lesiones en el tejido celular.

La función de las porinas resulta de gran relevancia cuando las bacterias se ven amenazadas por un descenso en el pH del medio. El crecimiento a valores bajos de pH provoca el incremento en la expresión de OmpC, mientras que disminuye la de OmpF. Son dos los posibles mecanismos que han sido postulados para la regulación a pH ácido: (1) la actividad de estos dos componentes del sistema regulatorio se ve alterada por el pH, y (2) *E. coli* emplea diferentes sistemas a diferentes valores de pH para la expresión de porinas (Sato y col., 2000). La acumulación de nutrientes disminuye cuando el pH es ácido debido a la baja actividad energética en el metabolismo. Por lo mismo una aceleración en el transporte de nutrientes a través de la membrana externa mediado por las porinas, es especialmente importante.

2.4.1 Protección del citoplasma a pH ácido, proteínas de choque térmico

La disminución de la estabilidad de las proteínas es una consecuencia de la acidificación del citoplasma, lo cual puede afectar indirectamente la integridad del DNA.

Uno de los mecanismos utilizados por las bacterias para aumentar las posibilidades de sobrevivencia ante situaciones de estrés ácido es la respuesta programada, por la cual se sintetizan proteínas específicas inducibles. Presumiblemente estas proteínas actúan previniendo o reparando daño molecular causado por el estrés ácido. Algunas de ellas son inducidas bajo distintas condiciones estresantes, como el choque térmico y otras únicamente en respuesta a un estrés específico.

Cuando *E. coli* es sometida a inanición, o a un cambio osmótico en el medio, se induce la síntesis de una gran cantidad de proteínas cuya transcripción es dependiente del factor sigma, lo cual hace a las células más resistentes a la temperatura, a un choque osmótico o a inanición prolongada (White, 2000).

Cuando las bacterias son expuestas a temperaturas mayores a las que están acostumbradas, responden transitoriamente, al incrementar la síntesis de un grupo de proteínas, llamado proteínas de choque térmico (heat-shock proteins, Hsp). Por ejemplo, al cambiar la temperatura de 30 a 42°C para *E. coli*, las células incrementan el rango de síntesis a 20 de estas proteínas durante 5 – 10 minutos.

La mayoría de las proteínas de choque térmico desarrollan funciones importantes en el doblamiento, desdoblamiento y/o translocación de las proteínas, así como también en el agrupamiento y desagrupamiento de complejos proteínicos, o en la proteólisis de proteínas anormales así como de las dobladas de manera incorrecta. Las proteínas de choque térmico que cumplen la primera de las funciones antes mencionadas pertenecen a la clase de proteínas llamadas

CHAPERONAS. Una proteína chaperona es aquella proteína que toma parte en el doblamiento o ensamblamiento de otras proteínas, pero no es parte final de la proteína o complejo de proteínas que ayudó a doblar o ensamblar.

Las proteínas chaperonas evitan ya sea la agregación con otras proteínas o un mal doblamiento de las mismas. Se piensa que ellas se unen a las superficies expuestas de las proteínas evitando que estas superficies interactúen inapropiadamente con otras. Esto es especialmente importante a altas temperaturas, cuando el doblamiento inadecuado y la agregación de proteínas ocurre de manera más frecuente. Se ha encontrado que en *E. coli* hay tres proteínas chaperonas muy importantes que asisten el doblamiento, estas son DnaK, DnaJ y GrpE, las cuales actúan juntas y otras dos que son GroEL y GroES que también cooperan para producir un doblamiento adecuado (White, D., 2000).

Dentro de las proteínas de choque térmico, se encuentran unas identificadas como proteasas dependientes de ATP que se encargan de degradar proteínas dobladas de manera incorrecta o aquéllas que han sido desnaturalizadas. El ATP es requerido para desdoblar a la proteína antes de su proteólisis.

Lon es una proteasa dependiente de ATP y es codificada por el gene *capR*. Como otras proteínas de choque térmico, Lon funciona no sólo durante la respuesta al choque térmico, sino también a temperaturas ordinarias de crecimiento. Lon es importante en la degradación de proteínas anormales, como proteínas que son el resultado de mutaciones mal censadas, o de proteínas desnaturalizadas en general. De hecho, parece que Lon es responsable de la degradación de la mayoría de las proteínas anormales de *Escherichia coli*.

Otras proteasas dependientes de ATP en *E. coli*, incluyen a la proteasa ClpP (proteasa caseinolítica) y a FtsH una proteína de unión a la membrana. Se ha propuesto que FtsH además de ser una proteasa dependiente de ATP que

degrada proteínas selectivamente, es una chaperona de unión a la membrana que de alguna manera, no definida todavía, juega un papel en la secreción de ciertas proteínas. También se ha sugerido que la familia de proteínas Clp ATPasa, son chaperonas que entregan proteínas específicas a ClpP para su proteólisis (White, 2000).

Cuando un microorganismo patógeno se interna en un huésped es confrontado a muchos cambios, algunos de los cuales son altamente estresantes. Esto incluye alteraciones en la temperatura, pH, etc., más aún, el patógeno se enfrenta con defensas naturales del huésped como es la fagocitosis y como consecuencia de esta se enfrenta con oxígeno reactivo, intermediarios de nitrógeno, ataque de lizosimas y a un agotamiento de Fe^{2+} . Así que, para protegerse a sí mismo del huésped, el patógeno activa sus sistemas de evasión, uno de los cuales es la síntesis de proteínas de choque térmico (Hsp) (Zügel y Kaufmann, 1999).

La infección es un proceso bimodal, determinado por el huésped y el patógeno. Durante la infección, tanto el patógeno como el huésped, incrementan la producción de Hsp. La inducción de la síntesis de Hsp por el huésped cuando se enfrenta a un patógeno, se debe a por lo menos dos causas principales. Primero, que los macrófagos infectados son confrontados con mecanismos antimicrobianos que han sido activados durante la infección. La protección eficiente contra sus propias moléculas efectoras (p.ej. radicales libres) resulta vital para la sobrevivencia de los macrófagos. Segundo, una vez dentro del fagocito, muchos microorganismos, especialmente aquellos que persisten en el huésped, interfieren con el metabolismo intracelular (Zügel y Kaufmann, 1999).

2.4.2 Proteínas de choque térmico e inmunidad protectora

Tanto las células del huésped como las de los microorganismos se confrontan con alteraciones dramáticas durante sus condiciones de vida a lo largo de la infección. Con estas condiciones cambiantes, la inducción a la síntesis de proteínas de choque térmico es vital para la sobrevivencia del patógeno. El papel de las Hsp en la inmunidad a las infecciones microbianas no está completamente entendido. Aparentemente las proteínas de choque térmico sirven como antígenos importantes que defienden en contra de agentes infecciosos. El hallazgo reciente de que el complejo GroE está involucrado en la síntesis de la pared celular, sugiere la accesibilidad de estas Hsp como anticuerpos (McLennan, 1998).

Al menos dos factores contribuyen al hecho de que las proteínas de choque térmico representan la mayoría de anticuerpos en un amplio espectro de infecciones: Primero, estas proteínas son abundantes en los patógenos, especialmente bajo condiciones de estrés; segundo, la memoria inmunológica para reacción cruzada determinada por las Hsp conservadas, es generada durante la vida basada en frecuentes estimulaciones por medio de encuentros subsecuentes con microorganismos con diferentes grados de virulencia. Bajo estas condiciones, un individuo infectado por un patógeno, pondría en uso su sistema inmune ya preparado a reaccionar rápidamente antes de que la respuesta inmune desarrolle más antígenos para patógenos específicos. Una respuesta inmune que conserva determinantes de Hsp compartidas para diferentes microorganismos, podría prevenir la colonización del huésped por bacterias patógenas (Zügel y Kaufmann, 1999).

Zügel y Kaufmann concluyen de su revisión que las proteínas de choque térmico, en lugar de iniciar respuestas inmunes anti-infecciosas o autoagresivas, acompañan la respuesta inmune inducida por otros anticuerpos. Así, ambos influyen su fuerza y la sostienen. De esta manera, el término de chaperonas

originalmente usado para describir la función biológica de las Hsp, también ajusta bien a la descripción de su papel como antígenos en la infección y autoagresión.

En estudios sobre la sobrevivencia de células de *E. coli* O157:H7 sometidas a choque térmico subletal y luego a pH de 2.5 se observó que esta fue 10 a 100 veces mayor, comparada con las células no tratadas, dependiendo de la cepa (Wang y Doyle, 1998). Se ha comprobado que la exposición a calor medio o la adaptación al ácido, pueden contribuir a la tolerancia al ácido de *E. coli* O157:H7. Se ha propuesto que el bajo pH interno bacteriano induce enzimas específicas que influyen la homeostasis; por tanto, es posible que proteínas de membrana recién sintetizadas, puedan incrementar la sobrevivencia de este organismo cuando se expone a acidez letal, ya sea por mantenimiento del pH transportando H⁺, o por reparación de componentes dañados.

En la investigación citada por Wang y Doyle, (1998) se reportaron dos proteínas de membrana externa (OMPs) de 22 y 15 kDa, a los 10 minutos del choque térmico y expresadas por lo menos 6h en células mantenidas a 37°C. En dicho estudio no se observaron diferencias significativas entre el choque térmico y la adaptación al ácido. La secuencia N terminal de la OMP de 22 kDa es el componente de una alquil hidroperoxidasa reductasa que contiene un sulfito redox activo, posiblemente involucrado en el transporte de H⁺. La proteína de 15 kDa tiene 100% de homología con otra de función desconocida de *E. coli* y su secuencia de nucleótidos está localizada en el gene de uracilo glucosidasa DNA, encargada del inicio de la reparación del DNA que ha sufrido daños oxidativos. En esta cepa la adaptación al ácido produce el aumento de la síntesis de dos OMPs, que posiblemente sean componentes de regulación global que responden a tensiones ambientales como el calor o el choque ácido, para reparar daños en el DNA o lípidos de membrana.

En otro estudio acerca de la resistencia a la acidez de algunas cepas patógenas de *E. coli* aisladas de pozol (Cueto, 2001), entre las que se incluyen la

de serotipo O88:H25. Se investigó si el choque térmico influye en la resistencia a la acidez de las cepas a valores de pH 2.0 y 2.5 y se evaluó si las cepas aisladas de pozol, sometidas a estrés térmico, expresaban proteínas de membrana externa semejantes a las que se han relacionado con la resistencia a la acidez. De esta investigación se obtuvo la comprobación de que las cepas de *E. coli* aisladas de pozol sometidas a choque térmico subletal (48°C, 10 minutos) incrementan sensiblemente su tolerancia a la acidez. También del análisis del perfil electroforético de las OMPs de las diferentes cepas posteriores al choque térmico, mostró que las cepas O157:H7 y O88:H25 presentan dos proteínas de aproximadamente 19 y 22 kDa, semejantes a las ya reportadas por Wang y Doyle, 1998.

Es así que este trabajo tiene como propósito identificar las proteínas de membrana externa expresadas como consecuencia al estrés en la cepa de *Escherichia coli* O157:H7 y en una de las cepas patógenas aisladas de pozol con serotipo O88:H25. Aunque de la primera no se han dado casos de brote en México, es un patógeno muy importante aislado de alimentos ácidos y fermentados, mientras que la segunda se encuentra en un alimento consumido popularmente en el sureste del país y ambas representan un alto riesgo para la salud.

CAPÍTULO III. OBJETIVOS

3.1 Objetivo General

Establecer si diferentes condiciones de estrés sobre cepas de *Escherichia coli* se relacionan con la expresión de proteínas de membrana externa, que pudieran asociarse con su resistencia al ácido.

3.2 Objetivos Particulares

1. Identificar cambios en el patrón de proteínas de membrana externa (OMPs) de las cepas de *E. coli* O175:H7 y O88:H25 después de haberlas sometido a estrés ácido, térmico y a la combinación de ambos.
2. Conocer mediante el ensayo de Western Blot si las OMPs expresadas como consecuencia del estrés son inmunogénicas y si son similares en las dos cepas de *E. coli* estudiadas.

CAPÍTULO IV. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material biológico, cepas de *Escherichia coli*

La cepa de *E. coli*, serotipo O157:H7 con FMU 088267 fue proporcionada por el Ceparío del Laboratorio de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM; procedente del CVD (Center Vaccine Development); colección DEC (Whittam 1993).

La cepa con el serotipo O88:H25 FMU 095223 también de *E. coli*, es procedente del pozol con 48h de fermentación (Sainz, 1998).

Las cepas se conservaron a temperatura ambiente en tubos con agar soya tripticaseína y se resembraron cada dos meses.

4.2 Pureza de las cepas

Para verificar la pureza de las cepas, se sembraron en agar sangre y agar Mc Conkey; el primero es un medio que está destinado para el aislamiento, cultivo y determinación de diversos microorganismos, sobre todo patógenos exigentes, ya que su abundante forma nutritiva ofrece condiciones óptimas de crecimiento para todos los microorganismos presentes. El segundo es un agar selectivo para el aislamiento de *Salmonella*, *Shigella* y bacterias coliformes, a partir de heces, orina, alimentos, aguas residuales. El fundamento de su utilización consiste en que las sales biliares y el cristal violeta inhiben considerablemente la flora Gram positiva y, la lactosa, junto con el indicador de pH rojo neutro sirven para la comprobación de la fermentación de dicho azúcar, así las colonias lactosa negativo son incoloras y las lactosa positivo son rojas con un halo turbio provocado por la precipitación de los ácidos biliares debido al descenso del pH. Con esto, se sabe que las colonias de *Escherichia coli* que son lactosa positivo deberán ser rojas y así fueron identificadas.

4.3 Confirmación de la identidad de las cepas

Esta fue realizada por el método automatizado de Vitek (bioMérieux Vitek, Hazelwood, MO). Se suspendió el cultivo en solución salina 0.45% y se ajustó a 0.5 de la escala de Mc Farland. El método de Vitek cuenta con un sistema de vacío para inocular una placa con las diferentes pruebas bioquímicas, esta es leída por el aparato durante su incubación y posteriormente los resultados se comparan con la base de datos del equipo para identificar el microorganismo.

4.4 Identificación serológica

4.4.1 Antígeno somático O y flagelar H

Una vez identificadas las cepas se realizó la serotipificación según el procedimiento utilizado en el laboratorio de Salud Pública de la UNAM. Las colonias aisladas de cada cultivo se sembraron en agar soya tripticaseína (TSA) para ser resuspendidas en solución salina fisiológica con formalina al 0.6%, después de crecer a 37°C durante 18 horas. Posteriormente se calentaron a una temperatura de 105-110°C durante una hora. De cada cultivo se tomaron 50 µL y se colocaron en una microplaca de 96 pozos. A cada pozo se le agregaron 50 µL de cada uno de los 175 antisueros (SERUNAM) contra los diferentes antígenos somáticos de *E. coli*. Las placas se incubaron a 50°C durante 24 horas y se leyó la aglutinación correspondiente.

Para el caso de los antígenos flagelares se creció la bacteria en medio semisólido con tubo de Craig y se dejó hasta que la bacteria migró a la superficie. De este cultivo se tomó un inóculo y se sembró en caldo biotripton, que se incubó a 37°C durante 2 horas. De ahí se tomaron 50 µL y se pusieron a reaccionar con cada uno de los 56 sueros contra los respectivos antígenos flagelares. Se incubaron a 50°C durante dos horas y se observó la reacción.

4.5 Condiciones de estrés (Figura 1)

La cepas se sembraron en TSA y se incubaron a 37°C durante 18 h, para posteriormente tomar una asada y preparar un *precultivo* de la cepa en 10 mL de TSB. Este se dejó incubar durante 6 h a 37°C con agitación suave, 100 rpm (Model G25, Incubator Shaker, New Brunswick, Scientific Co., Edison, New Jersey). De ahí se tomaron 600 μ L, que se sembraron en 50 mL de TSB y se incubó a 37°C durante 15 h. Este es el *cultivo nocturno* que fue sometido a diferentes tipos de estrés: un **choque térmico subletal** en baño de agua durante 10 minutos a 48°C, después del cual se centrifugó a 8000 rpm, durante 30 min (Sorval RC5Bplus) para obtener el paquete celular. Este fue resuspendido en 10 mL de TSB y se sembró en 390 mL del mismo medio. Se incubó durante 3 ó 6 horas a 37°C con agitación suave, 100 rpm (Model G25, Incubator Shaker). **Estrés ácido pH a 2.5**, el cultivo nocturno se centrifugó a 8000 rpm, 30 min (Sorval RC5Bplus) y el paquete celular se resuspendió en 10 mL de TSB. Este se sembró en 390 mL de TSB acidificado a pH 2.5 con HCl y se incubó a 37°C durante 3 ó 6 horas con agitación suave, 100 rpm (Model G25, Incubator Shaker). **Choque térmico subletal (48°C, 10min) + estrés ácido (pH2.5)**, para esta condición, primero se sometió al estrés térmico, como se explicó antes y posteriormente se centrifugó a 8000 rpm, 30 min (Centrífuga Sorval RC5Bplus) para obtener el paquete celular. Este se resuspendió en 10 mL de TSB y se sembró en 390 mL del mismo medio acidificado a pH 2.5 con HCl que se incubó durante 3 ó 6 horas a 37°C con agitación suave, 100 rpm (Model G25, Incubator Shaker). Por último se preparó un **control**, que no fue sometido a estrés, pero del cual también se obtuvo el paquete celular mediante centrifugación y se sembró en 390 mL de TSB y posteriormente se incubó durante 3 ó 6 horas a 37°C.

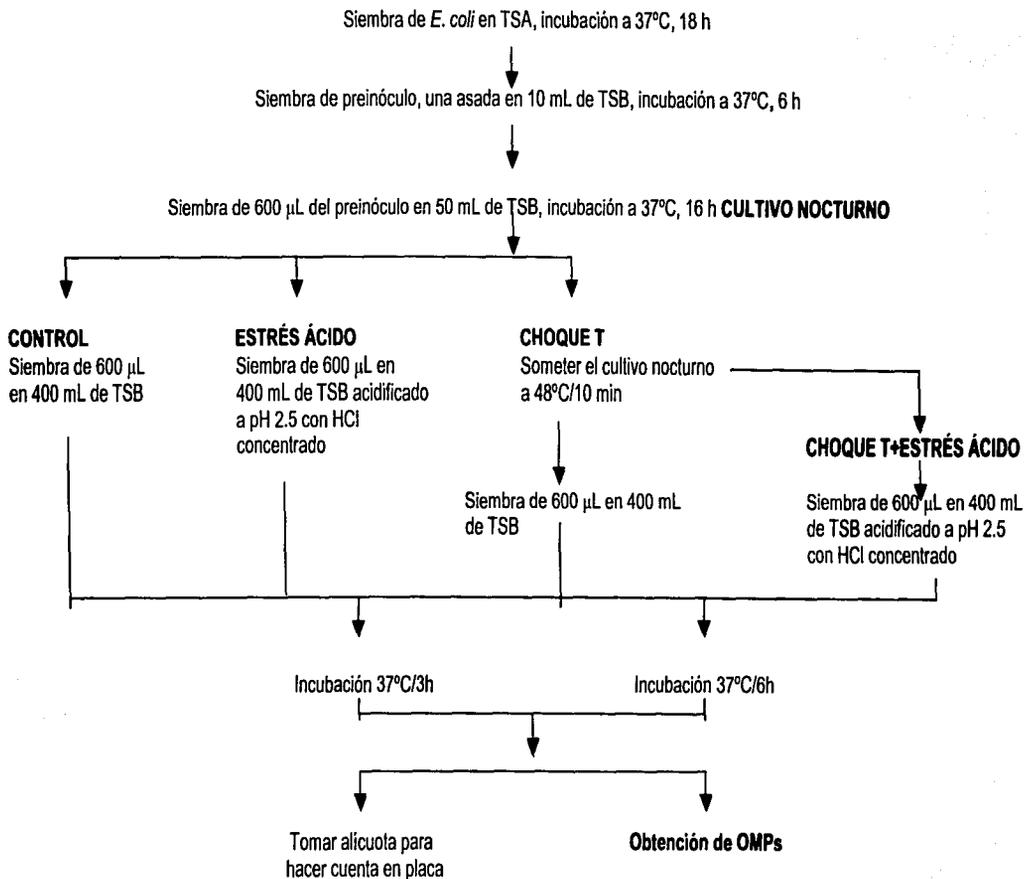


Figura 1. Procedimiento en el cual se indican las condiciones de estrés a las que fueron sometidas las cepas de *E. coli*.

4.6 Supervivencia de las cepas

Para determinar la supervivencia de las cepas, se realizaron cuentas en placa inoculando por duplicado en placas con agar soya tripticasina, 100 μL de las diluciones apropiadas en soluci3n salina 0.15N, se extendi3 el in3culo con varilla de vidrio y se incub3 a 37°C durante 18 a 24 h. Posterior a ese tiempo, se cuantificaron las ufc/mL. Esto se hizo con los cultivos de cada una de las etapas del ensayo: precultivo, cultivo nocturno y de las incubaciones a las 3 y 6 horas de las condiciones de estr3s anteriormente mencionadas.

Para cada una de las condiciones de estr3s y el control, se realizaron cuentas en placa del precultivo, al t_0 (reci3n inoculado) y despu3 de haber transcurrido las 6 h de incubaci3n (t_6); del cultivo nocturno t_0 (reci3n inoculado) y t_{15} (despu3 de 15 h de incubaci3n); inmediatamente despu3 del estr3s; despu3 de la inoculaci3n del paquete celular en los 390 mL de TSB t_0 ; y posterior a las 3 y 6 h de incubaci3n.

4.7 Obtenci3n de las prote3nas de membrana externa (OMPs)

El proceso para la obtenci3n de prote3nas de membrana externa (OMPs), se realiz3 con la cosecha de c3lulas de 400 mL de cultivo despu3 de haber sido sometidas a estr3s. Los cultivos se centrifugaron a 8000 rpm (Sorval RC5Bplus) durante 30 minutos para obtener los paquetes bacterianos, que fueron resuspendidos en 2 mL de Hepes 10 mM pH de 7.4.

Los paquetes celulares se sonicaron en el equipo "vibra cell" Fisher, aplicando pulsos de 30 segundos (50 watts, 20% salida), en ba3o de hielo para evitar el sobrecalentamiento y la desnaturalizaci3n de las prote3nas. Los restos celulares se sedimentaron por centrifugaci3n a 12500 rpm durante 10 min a 4°C (Centrífuga Sorval RC5Bplus). Del sobrenadante se obtuvieron las membranas por ultracentrifugaci3n a 20000 rpm, 30 min a 4°C (Centrífuga Sorval M120Ex), siendo

luego solubilizadas en 400 μ L del detergente Sarcosyl al 1% en Hepes pH 7.4. Esta mezcla se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, con agitación suave. Posteriormente se ultracentrifugó (20000 rpm, 30 min 4°C) y se lavó con 400 μ L de Hepes pH 7.4 para obtener los sedimentos finales que contienen los extractos de proteínas de membrana externa, los cuales se distribuyeron en alícuotas y se mantuvieron congelados a -75°C (Figura 2).

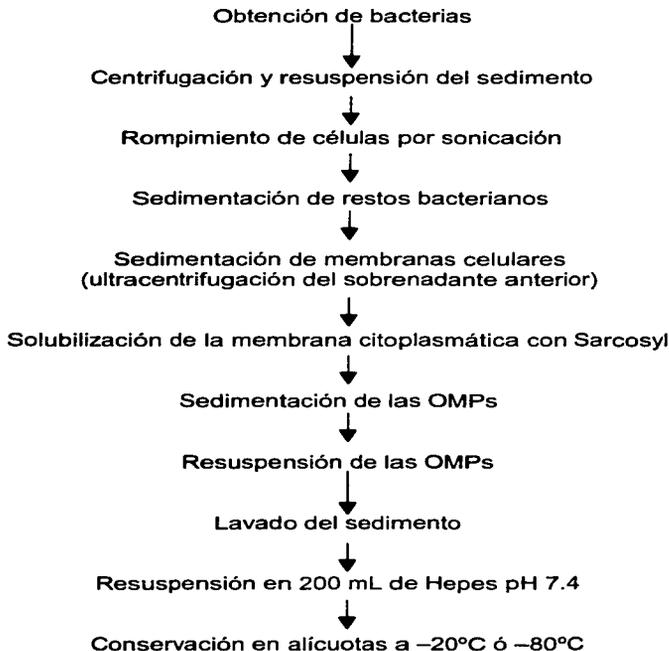


Figura 2. Procedimiento para la obtención de proteínas de membrana externa (OMPs)

4.7.1 Cuantificación de proteína

Se colocaron 20 μ L de la dilución apropiada de cada muestra en el orden correspondiente en una placa de Elisa y en cada pozo se agregaron 150 μ L de reactivo de Bradford, con el cual se dejó reaccionar 5 min a temperatura ambiente y posteriormente se leyó la placa a 570 nm en el equipo Microelisa autoreader (MR 580, Adynatech Product). Se preparó una curva patrón con BSA (1mg/mL) de 0 a 200 μ g/mL.

4.8 Electroforesis de proteínas

La separación de las proteínas obtenidas se hizo por electroforesis en geles de poliacrilamida al 15%, en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE). Las preparaciones se corrieron en la cámara Mini-Protean II de Bio-Rad.

Las muestras se prepararon ajustando la concentración de proteína que se tuvo en cada caso. Posteriormente se calentaron 5 minutos en agua hirviendo y se colocaron en los pozos del gel. La electroforesis se corrió a 100 volts, 200 watts y 200 miliamperes y una vez que pasó al gel de separación, se subió el voltaje a 200. Se usaron marcadores de proteínas de bajo peso molecular de Bio-Rad para la estimación del peso y posición de las bandas encontradas (Prestained Standards: 161-0305 Prestained SDS-PAGE Standards, low range y 161-0318 Prestained SDS-PAGE Standards, broad range).

Los geles se tiñeron con plata. Primero se fijaron con una solución de etanol: ácido acético (3:1) durante más de 3 horas, después se lavaron dos veces con etanol al 10%, durante 10 min y luego con agua desionizada 3 veces durante 10 min. Posteriormente se dejaron en solución del granjero durante 1 h y se lavaron con agua 3 veces durante 10 min (hasta dejar los geles incoloros nuevamente). Se tiñeron con nitrato de plata 0.1% durante 30 min y se lavaron con

agua 20 seg para poder revelar con carbonato de sodio al 2.5% en formaldehído al 0.02% durante un lapso de 5 a 10 min, en seguida se lavó con ácido acético al 1% 5 min y después con agua 3 veces 10 min, para aclarar con solución de granjero y por último lavarlos con agua varias veces y poder pasarlos a una solución de conservación (carbonato de sodio 0.03% y glicerol 3%).

4.9 Western Blot

Se llevó a cabo una electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes. La concentración del gel de separación fue del 15% y de 1.5 mm de grueso, esto es porque en cada pozo se colocaron 10 µg de proteína. Las condiciones en las que se corrió el gel fueron iguales a las explicadas en el procedimiento anterior.

Posteriormente se hizo la transferencia húmeda, para la cual, la cámara Mini-Protean II de Bio-Rad, se llenó con buffer de transferencia, se cortaron los trozos de la membrana de nitrocelulosa del tamaño de los geles y se humedecieron en el buffer. Después se colocaron sobre el gel y todas las partes se fueron humedeciendo. Primero se colocó la esponja sobre el soporte, después un papel filtro siguiendo con el gel, el cual se colocó de manera que los marcadores de peso molecular quedaron del lado derecho, luego se colocó la membrana de nitrocelulosa y encima otro papel filtro, una esponja y se cerró la rejilla de soporte. Las dos rejillas se colocaron en la cámara teniendo cuidado de ubicarlas de acuerdo a la carga. Posteriormente, se corrió a 500 volts, 200 miliamperes y 200 watts durante 3 h.

Después de transcurridas las tres horas, se sacaron las membranas y se pusieron en leche descremada (Svelty en polvo) al 5% en PBS con el objeto de bloquear los espacios libres. Seguido de esto, se lavaron 3 veces 5 min con PBS-Tween al 0.1% con agitación y se colocó el primer anticuerpo, dejando incubar

toda la noche a 4°C con agitación. En seguida, se lavaron nuevamente las membranas con PBS-Tween 0.1% 3 veces durante 5 min para poder adicionar el segundo anticuerpo, con el cual se dejó incubar 1 h a temperatura ambiente en agitación. Por último se volvieron a lavar las membranas con PBS-Tween 0.1% 3 veces, 5 min el último de ellos se hizo sólo con PBS para eliminar el detergente.

Del primer anticuerpo, obtenido del suero humano de una paciente con una infección subclínica por *Escherichia coli* O157:H7, se hizo una dilución 1:50 y del segundo, que fue un anti IgG humano marcado con peroxidasa, se hizo una dilución 1:5000, ambas diluciones se hicieron en leche descremada al 5% en PBS.

Posteriormente se revelaron las membranas con quimioluminiscencia. Para lo cual fueron expuestas a una mezcla de los reactivos de luminiscencia (3.5 mL de luminol y 3.5 mL de reactivo oxidante, No. de catálogo NEL105, NEN™ Life Science Products), durante unos minutos. Se quitó el exceso de líquidos de las membranas y fueron colocadas sobre un chasis para placas radiográficas. En un cuarto oscuro se expusieron las superficies de las membranas a las placas radiográficas (KODAK Bio Max film) durante unos segundos, de tal manera que la luz emitida por los reactivos de luminiscencia velan las placas permitiendo observar la reacción proteína – anticuerpo.

Se enjuagaron nuevamente las membranas con PBS-Tween 2 veces 5 min y también con TB otros 5 min para después poder exponerlas a una mezcla de 30 mg de 4-cloro-1-naphtol que fueron disueltos en 10 mL de metanol. A esto se adicionaron 40 mL de TB y 16.5 µL de H₂O₂. Las membranas se dejaron en esa solución durante aproximadamente 10 min para que se lleve a cabo la reacción y comience a observarse color en las bandas. La reacción se paró con agua de la llave antes de que el fondo comenzara a obscurecerse.

La comparación de los perfiles electroforéticos de cada condición y cada cepa se hizo analizando los pesos moleculares de las bandas por computadora, mediante un programa que analiza la imagen del gel y reporta los pesos moleculares detectados para cada banda (Documentador de imágenes, Kodak 1D3, Scientific Imaging Systems, Serial B7-111748-7B1911-231311). Se decidió dar un rango del $\pm 2\%$, así las bandas que tuvieran pesos moleculares dentro del rango de la proteína observada, fueron consideradas proteínas semejantes.

CAPÍTULO V. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Identificación de las cepas

Para determinar la pureza e identidad de las bacterias en estudio, se realizó la identificación bioquímica y serológica. Los resultados confirmaron que estas corresponden a las cepas de *Escherichia coli* con serotipos O157:H7 y O88:H25.

5.2 Capacidad de sobrevivencia a diferentes condiciones de estrés

Para determinar el número de bacterias (UFC) con los que se estaba trabajando, se realizaron dos cultivos subsecuentes en el mismo medio antes de someter a las bacterias al estrés correspondiente. Los datos obtenidos mostraron que, en general, la concentración de microorganismos fue constante en los preinóculos y sólo hasta después de la incubación posterior al estrés (3 y 6 horas, cuadro 1), fue cuando se presentaron cambios. Con la cepa testigo, las cuentas de UFC no se modificaron durante los distintos tiempos de incubación, al respecto consideramos que probablemente se deba a un error metodológico. Una de las situaciones posibles es que la cantidad inoculada en el tiempo cero (después del cultivo nocturno), fue menor a la indicada y por lo mismo después de 3 h de incubación se observa lo que parece una disminución en la cuenta.

El tratamiento con choque térmico ocasionó disminución en una unidad logarítmica (Cuadro 1), en el crecimiento de la cepa O157:H7 observándose las mismas cuentas a las 3 y 6 horas. Al someter las mismas bacterias a estrés ácido, se observó una disminución en la concentración de microorganismos de tres ciclos logarítmicos a las 3 horas. El efecto a las 6 h fue de inhibición total del crecimiento. Lo anterior podría estar relacionado con la propiedad conocida como "estado viable no cultivable" ya que no se detectó sobrevivencia, pero sí síntesis de proteínas. Esta condición permite que los microorganismos mantengan

funciones vitales; sin embargo, cambian su morfología y pierden la capacidad de crecer en medios comunes (Castro, 2001).

La combinación de choque térmico más estrés ácido al que fueron sometidas las bacterias, originó que no hubiese desarrollo de bacterias viables en ninguno de los tiempos de ensayo (3 y 6 horas). Nuevamente se considera la aparición del estado viable no cultivable que permite a las bacterias sobrevivir, pero no desarrollarse de manera visible.

Cuadro 1. UFC/mL de la cepa de *E. coli* O157:H7 en las diferentes condiciones de ensayo y bajo diferentes tratamientos de estrés.

	Precultivo		Cultivo Nocturno		Tiempo cero	3 h incubación	6 h incubación
	t ₀	t ₆	t ₀	t ₆			
Control	1.3x10 ⁷	6.7x10 ⁹	6x10 ⁶	5x10 ⁹	1.4x10 ⁸	4x10 ⁷	1.4x10 ⁸
CHT	3x10 ⁷	6x10 ⁹	3x10 ⁷	5x10 ⁹	5x10 ⁹ *	1.4x10 ⁸	3.3x10 ⁸
					5x10 ⁸ **		
EA	6x10 ⁷	7x10 ⁹	3x10 ⁷	5x10 ⁹	7x10 ⁸	6x10 ⁵	----
T + A	5x10 ⁷	7x10 ⁹	2x10 ⁷	7x10 ⁹	3x10 ⁹ *	----	----
					6x10 ⁸ **		

CHT, choque térmico; EA, estrés ácido; T + A, choque térmico más estrés ácido.

*Antes del choque térmico

**Después del choque térmico

---- No se observaron colonias

Con la cepa O88:H25, los resultados de las unidades formadoras de colonias en cada tiempo de ensayo fueron muy semejantes a los reportados para la cepa O157:H7 (Cuadro 2).

Cuadro 2. UFC/mL de la cepa de *E. coli* O88:H25 en las diferentes condiciones de ensayo y bajo diferentes tratamientos de estrés.

	Precultivo		Cultivo Nocturno		Tiempo cero	3 h incubación	6 h incubación
	t ₀	t ₆	t ₀	t ₆			
Control	2x10 ⁷	1x10 ¹⁰	1.3x10 ⁷	2.5x10 ⁹	1x10 ⁸	1x10 ⁷	2x10 ⁸
CHT	4x10 ⁶	2x10 ⁹	3.4x10 ⁷	7.8x10 ⁹	5.4x10 ^{9*}	1x10 ⁹	1x10 ⁹
					8.1x10 ^{8**}		
EA	1x10 ⁷	2x10 ⁹	5x10 ⁶	5x10 ⁹	1.3x10 ⁸	5x10 ⁵	----
T + A	1x10 ⁷	2x10 ⁹	1x10 ⁷	3.5x10 ⁹	1.5x10 ^{9*}	----	----
					2x10 ^{8**}		

CHT, choque térmico; EA, estrés ácido; T + A, choque térmico más estrés ácido.

*Antes del choque térmico

**Después del choque térmico

---- No se observaron colonias

5.3 SDS-PAGE e inmunoelectrotransferencia proteínas de membrana externa

Se analizaron los perfiles electroforéticos de las proteínas de membrana externa obtenidas en cada una de las condiciones de estrés. Estos se compararon con los perfiles de las OMPs obtenidas con las cepas no tratadas. El análisis mostró la presencia de bandas específicas para cada tipo de estrés, así como algunas que son similares entre los diferentes tratamientos. Lo observado indica que dependiendo del tipo de estrés se induce la regulación en la expresión de diferentes genes, como lo pueden ser aquéllos que codifican para la expresión de proteínas de choque térmico, o de otros mecanismos encargados de la protección de las células (Booth, 2001).

El análisis de los perfiles electroforéticos en el ensayo de 3 horas de incubación, después de haber sometido a la cepa O157:H7 a los diferentes tipos de estrés, mostró pocas diferencias con respecto a las que presentó el control, sin

tratar (Figura 1). Sin embargo, se observaron algunas proteínas, que parecen ser sintetizadas específicamente para cada situación de estrés, (cuadro3).

Después del choque térmico se observó la expresión de dos proteínas con pesos moleculares de 72,960₍₁₎ y 43,208₍₂₎ Da. Con el estrés ácido se sintetizó una proteína de bajo peso molecular (14,370₍₅₎ Da). Como respuesta a la combinación de ambos tratamientos se sintetizaron otras proteínas con peso molecular de 74,090₍₃₎ y 48,286₍₄₎ Da.

Resulta relevante indicar que el estrés térmico aunado al estrés ácido (T+A) es una condición en la que pareciera ser que las bacterias responden de modo diferente, ya que el perfil electroforético mostró no sólo la síntesis de nuevas proteínas sino también la desaparición de algunas con respecto a las del control. Dos proteínas con peso molecular de 50,309₍₆₎ y 28,452₍₇₎ Da no se observaron después de aplicar el estrés. Aunque pudiera pensarse que la combinación de ambos tipos de estrés dispararía en la bacteria mecanismos de defensa en los cuales se sintetizan más proteínas para proteger contra las dos condiciones, al parecer sólo dos proteínas (3 y 4) son específicas para esta condición.

La presencia de dos o más proteínas con el mismo peso molecular en los diferentes tratamientos no asegura que se trate de la misma. Para corroborar la identidad de las proteínas se realizó su caracterización por medio del ensayo de Western blot. Se considera que las proteínas que sean identificadas por el anticuerpo presentan identidad inmunogénica.

Las proteínas identificadas por inmunotransferencia tienen gran relevancia ya que probablemente cumplen un papel específico en la sobrevivencia de las bacterias sometidas a estrés. Para sobrevivir la bacteria requiere de la síntesis de proteínas que le confieran la capacidad para resistir los cambios de pH, temperatura, etc., que se presentan durante su paso por el organismo antes de llegar a su órgano blanco.

El análisis por inmunoelectrotransferencia de las proteínas de membrana externa de *E. coli* O157:H7 mostró que el anticuerpo reaccionó con la proteína de 74,090₍₃₎ Da (Figura 2), inducida por el estrés térmico más ácido (T+A) y con la de 43,208₍₂₎ Da, inducida por el choque térmico (CHT). El suero empleado reaccionó además con una proteína de 39,525₍₈₎ Da que fue identificada en todas las condiciones. El hecho de que estas proteínas sean reconocidas por los anticuerpos, abre la posibilidad de su empleo como inmunógenos, que pudieran ser utilizados para diagnóstico o vacunas. Se requiere hacer la purificación y secuencia de los aminoácidos de las proteínas para determinar su función en la bacteria, así como su posible asociación en la respuesta a estrés.

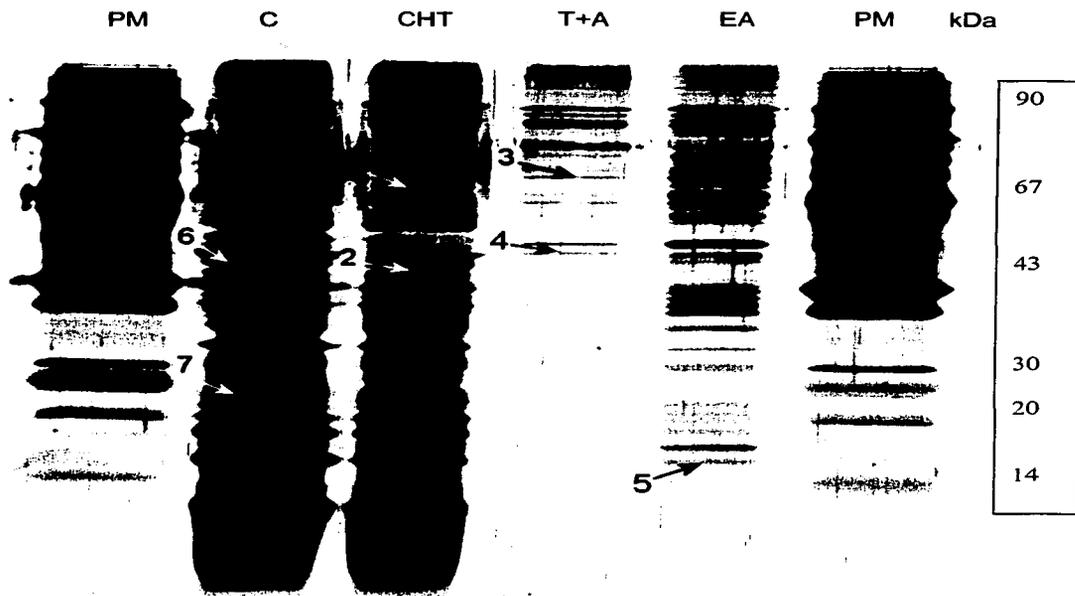


Figura 1. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. *E. coli* O157:H7 sometida a situaciones de estrés con 3horas de incubación. PM, marcadores de peso molecular; C, control; CHT, choque térmico; T+A, choque térmico más estrés ácido; EA, estrés ácido.

1-5, OMPs expresadas después de aplicar estrés; **6 y 7,** OMPs expresadas por el control y que no fueron detectadas después de aplicar estrés.

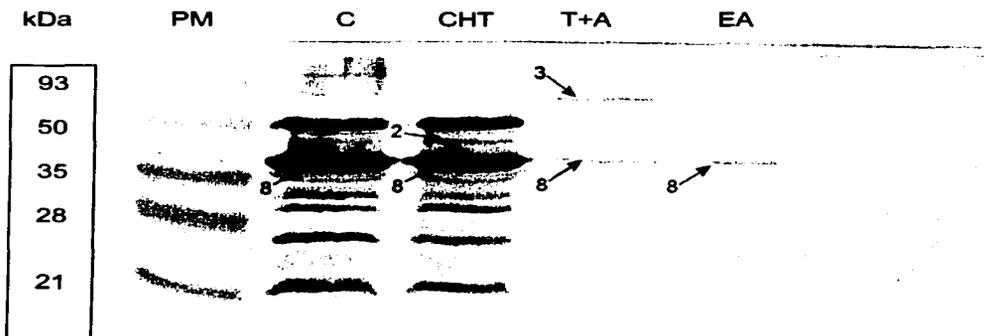


Figura 2. Western Blot de las OMPs obtenidas para los diferentes tipos de estrés después de 3h de incubación *E. coli* O157:H7. PM, marcadores de peso molecular; C, control; CHT, choque térmico; T+A, choque térmico más estrés ácido; EA, estrés ácido. 2 y 3, OMPs que reaccionaron con el suero de manera específica para el estrés térmico y térmico más ácido, respectivamente; 8, OMP identificada en todos los casos.

Después de 6 h de incubación posteriores al tratamiento estresante, se observó que el choque térmico induce la síntesis de tres proteínas (Figuras 3 y 4, cuadro 4), una de las cuales se observó desde las tres horas de incubación (43,208₍₂₎ Da). De las otras dos, la proteína con peso molecular de 27,451₍₉₎ Da se observó en SDS-PAGE, pero no fue reconocida por los anticuerpos. La segunda con un peso molecular de 18,752₍₁₀₎ Da aunque reaccionó con el anticuerpo no se observó en SDS-PAGE. Esta última observación puede estar relacionada con una expresión pobre de la proteína, sin embargo, por el hecho de que el inmunoblot es más sensible permite detectar la proteína aunque su concentración sea baja.

Con el estrés térmico+ácido, se observó la expresión de dos nuevas proteínas, las cuales fueron identificadas por el suero. El con peso molecular de estas fue de 64,978₍₁₁₎ y 44, 750₍₁₂₎ Da. Nuevamente sólo una de ellas (64,978 Da) se observó en el gel.

El estrés ácido mostró cambios en el perfil con respecto a lo observado a las 3 horas, en una proteína con peso molecular de 78,158₍₁₃₎ Da la cual también se expresa al aplicar el estrés térmico+ácido.

Se sabe que al entrar en fase estacionaria las bacterias sintetizan proteínas de estrés, el hecho de dar un tratamiento estresante antes de llegar a la fase estacionaria, podría dar origen a la expresión de proteínas con dichas características (Rees y col., 1995). Estudios previos muestran que a las 6 h la bacteria se encuentra en fase estacionaria (Cueto, 2001), esta puede ser la razón por la que se observaron proteínas similares en el control a las 6 h de incubación y a las 3 h después del estrés.

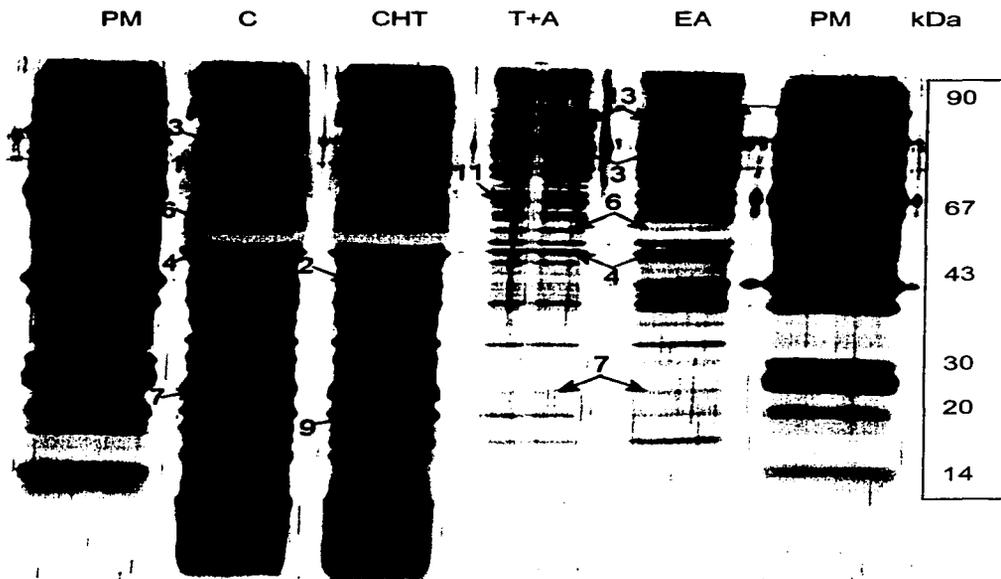


Figura 3. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. *E. coli* O157:H7 sometida a situaciones de estrés con 6h de incubación. PM, marcadores de peso molecular; C, control; CHT, choque térmico; T+A, choque térmico más estrés ácido; EA, estrés ácido.

2, 9 11 y 13: OMPs expresadas de manera específica para los diferentes tipos de estrés.

1, 3 y 4: OMPs expresadas por el control después de 6 h de incubación.

6 y 7: OMPs detectadas para el control y después de someter a las bacterias a estrés térmico más ácido.

TESIS CON
FALLA LE ORIGEN

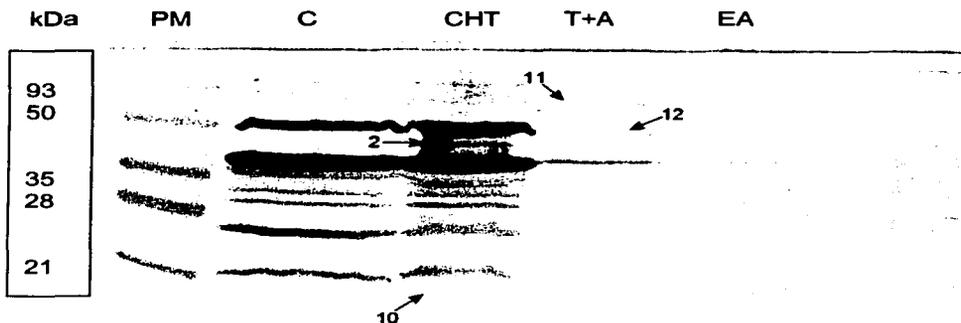


Figura 4. Western Blot de las OMPs obtenidas para los diferentes tipos de estrés después de 6h de incubación *E. coli* O157:H7. PM, marcadores de peso molecular; C, control; CHT, choque térmico; T+A, choque térmico más estrés ácido; EA, estrés ácido.

2 y 10: OMPs identificadas por el anticuerpo para CHT
11 y 12: OMPs identificadas por el anticuerpo para T+A.

TESIS CON
 FOLIA DE ORIGEN

Para evaluar si la expresión de proteínas asociada a diferentes tipos de estrés es un evento específico de *E. coli* O157:H7 o una situación común en bacterias adaptadas para sobrevivir en ambientes ácidos. Para esto se seleccionó la cepa de *E. coli* O88:H25, aislada del pozol (Sainz y col., 2001), dado que en ensayos previos mostró su capacidad de sobrevivencia en medio ácido (Cueto, 2001).

Con respecto a la expresión de OMPs de la cepa de *E. coli* O88:H25 después del choque térmico incubada durante 3 horas, se observó la expresión de dos proteínas (Cuadro 3), una de peso molecular de 132,134₍₁₄₎ Da y otra de 58,556₍₁₅₎ Da, que no se detectaron en la cepa O157:H7 (Figura 5). Sin embargo, cuando el análisis se realizó después de 6 horas de incubación, se observó en el perfil de SDS-PAGE (Figura 7) una proteína de 22,241₍₁₆₎ Da y otra de 43,208₍₂₎ Da. El ensayo de western blot, reveló que ambas proteínas (2 y 16) (Cuadro 4), son reconocidas por el anticuerpo (Figura8), y que la de mayor peso (43,208.3 Da) es producida por las dos cepas estudiadas (O157:H7 – O88:H25).

En los ensayos de la cepa O88:H25, también se obtuvieron las proteínas de membrana externa para el estrés ácido y para el estrés térmico aunado ácido; sin embargo, el efecto disminuyó de manera importante la masa bacteriana ocasionando que la concentración de proteínas obtenida fuera tan poca que no se logró detectar.

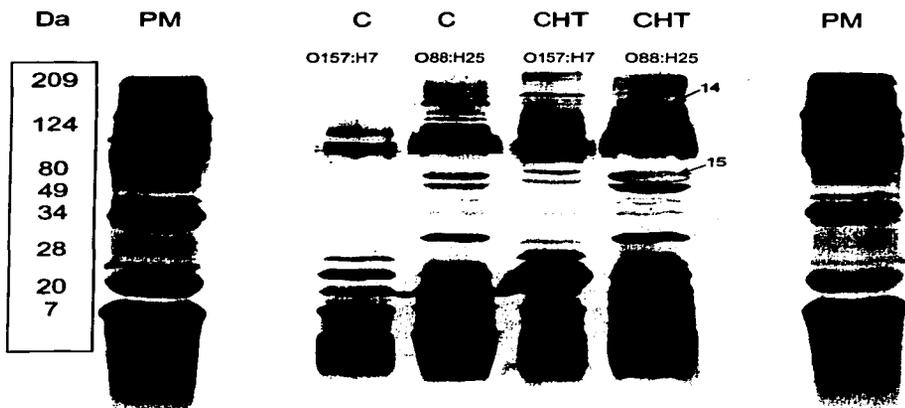


Figura 5. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. Control y choque térmico de las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 y O88:H25, posterior a 3h de incubación. Concentración 2.03µg/mL. PM, marcadores de peso molecular; C_{O157:H7} y CHT_{O157:H7} control y choque térmico de la cepa de *E. coli* O157:H7; C_{O88:H25} y CHT_{O88:H25} control y choque térmico de la cepa de *E. coli* O88:H25.
14 y 15: OMPs expresadas sólo por *E. coli* O88:H25

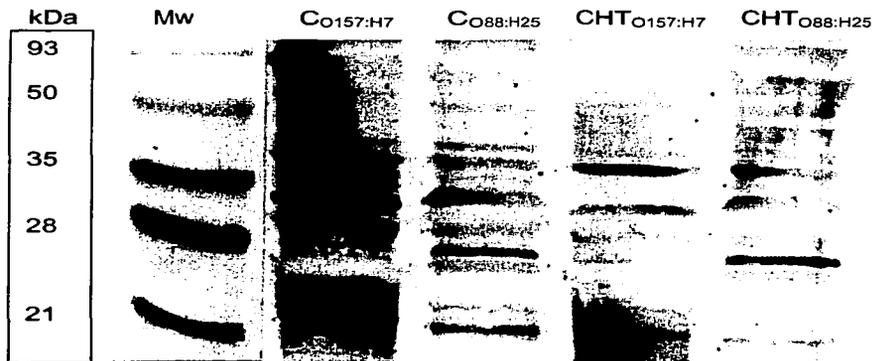


Figura 6. Western Blot de las OMPs obtenidas para el control y choque térmico de las cepas O157:H7 y O88:H25 de *Escherichia coli*, a las 3h de incubación. Mw, marcadores de peso molecular; C_{O157:H7} y CHT_{O157:H7} control y choque térmico de la cepa de *E. coli* O157:H7; C_{O88:H25} y CHT_{O88:H25} control y choque térmico de la cepa de *E. coli* O88:H25.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

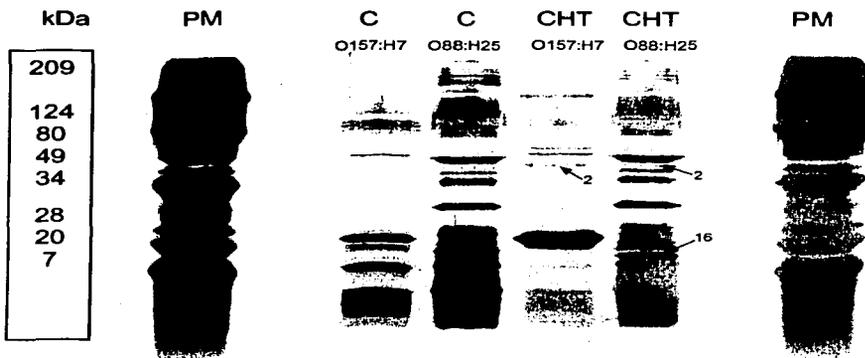


Figura 7. Electroforesis en gel de poliacrilamida al 15%. Control y choque térmico de las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 y O88:H25, posterior a 6h de incubación. Concentración 2.03µg/mL. PM, marcadores de peso molecular; C_{O157:H7} y CHT_{O157:H7} control y choque térmico de la cepa de *E. coli* O157:H7; C_{O88:H25} y CHT_{O88:H25} control y choque térmico de la cepa de *E. coli* O88:H25. **2:** OMP expresada por ambas cepas **16:** OMP expresada sólo por *E. coli* O88:H25

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

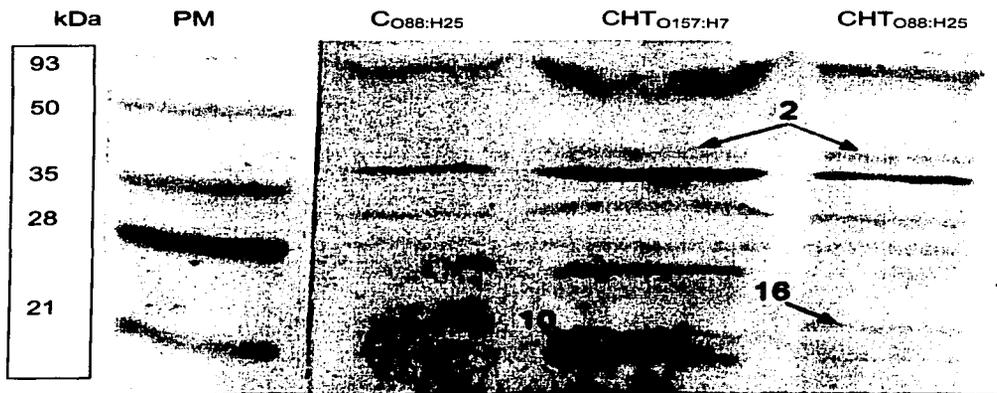


Figura 8. Western Blot de las OMPs obtenidas para el control y choque térmico de las cepas O157:H7 y O88:H25 de *Escherichia coli*, a las 6h de incubación. PM, marcadores de peso molecular; C_{O157:H7} y CHT_{O157:H7} control y choque térmico de la cepa de *E. coli* O157:H7; C_{O88:H25} y CHT_{O88:H25} control y choque térmico de la cepa de *E. coli* O88:H25.

2: OMP identificada por el anticuerpo para ambas cepas

10 y 16: OMPs identificadas por el anticuerpo para las cepas de *E. coli* O157:H7 y O88:H25 respectivamente.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuadro 3. Pesos moleculares de las OMPs expresadas después de someter a las cepas de *E. coli* (O157:H7 y O88:H25) a diferentes tipos de estrés. Con 3 h de incubación.

Estrés	PM (Da) de OMPs identificadas en SDS-PAGE de O157:H7	PM (Da) de OMPs identificadas en Western blot de O157:H7	PM (Da) de OMPs identificadas en SDS-PAGE de O88:H25	PM (Da) de OMPs identificadas en Western blot de O88:H25
CHT	1.- 72,960 2.- 43,208	2.- 43,208	14.- 132,134 15.- 58,556	
T+A	3.- 74,090 4.- 48,286	3.- 74,090		
EA	5.-14,370			

CHT, choque térmico; T+A, choque térmico más estrés ácido; EA, estrés ácido.

Cuadro 4. Pesos moleculares de las OMPs expresadas después de someter a las cepas de *E. coli* (O157:H7 y O88:H25) a diferentes tipos de estrés. Con 6 h de incubación.

Estrés	PM (Da) de OMPs identificadas en SDS-PAGE de O157:H7	PM (Da) de OMPs identificadas en Western blot de O157:H7	PM (Da) de OMPs identificadas en SDS-PAGE de O88:H25	PM (Da) de OMPs identificadas en Western blot de O88:H25
CHT	9.- 27,451 2.- 43,208	2.- 43,208 12.- 18,752	2.- 43,208 16.- 22,241	2.- 43,208 16.- 22,241
T+A	11.- 64,978 13.- 78,158	11.- 64,978 12.- 44,750		
EA	13.-78,158			

CHT, choque térmico; T+A, choque térmico más estrés ácido; EA, estrés ácido.

Los resultados obtenidos indican claramente un comportamiento diferente de ambas cepas ante el estrés, el cual varía dependiendo del tiempo de incubación. Este hecho plantea la regulación en la expresión de genes asociado a las condiciones ambientales, situación importante para la sobrevivencia de la bacteria.

Por otro lado es importante observar que estos cambios se dan durante la infección en el hospedero, lo cual se demuestra por la reacción de algunas proteínas con el suero. Esto indica que la bacteria presenta períodos de adaptación durante el proceso infeccioso, los cuales pudieran estar relacionados con las manifestaciones clínicas del paciente.

Wang y Doyle (1998), al estudiar la influencia que tiene el choque térmico sobre el incremento en la tolerancia al ácido de la cepa de *Escherichia coli* O157:H7, observaron la presencia de dos proteínas de membrana externa de bajo peso molecular (22 y 15 kDa) sintetizadas por la bacteria. Su expresión fue detectada inmediatamente después del choque térmico (48°C durante 10 min). La secuencia de la parte amino terminal de la proteína reportó que la proteína de membrana externa de 22 kDa es componente de una alquil hidroperóxido reductasa, que probablemente se encarga del transporte de protones. Por otro lado la proteína de 15 kDa tal vez esté implicada en la reparación del DNA cuando ha sufrido daño oxidativo. Cueto (2001) reportó que al someter a choque térmico las cepas de *Escherichia coli* O157:H7 y O88:H25 (aislada del pozol), sintetizaron una proteína de membrana externa de bajo peso molecular (de entre 19 y 22 kDa) similar a una de las reportadas por Wang y Doyle.

Lo anterior coincide con lo observado en este trabajo, ya que la cepa de *E. coli* O157:H7 sintetizó una proteína de membrana externa de 18,752 Da y la aislada del pozol (O88:H25), una de 22,245 Da. El no haber encontrado la proteína de más bajo peso molecular (15 kDa) en la cepa O157:H7 puede estar relacionado con que la cepa O157:H7 utilizada era una clona diferente.

Los resultados muestran que aunque hay concordancia en la expresión de algunas proteínas, existen otras que son diferentes lo que plantea la existencia de mecanismos de respuesta convergentes así como otros diferentes.

Un aspecto de mayor importancia es relacionar la secuencia de las proteínas identificadas para saber la función que cumplen en la sobrevivencia de las bacterias cuando se encuentran ante situaciones de estrés. Cabe mencionar que algunas de las proteínas de membrana externa reportadas en este trabajo, probablemente tengan la función de proteínas chaperonas, ya que la acidificación del ambiente afecta la actividad de proteínas asociadas a la superficie de la célula (superficie exterior de la membrana citoplasmática, periplasma, membrana exterior, pared celular). Se ha reportado que una de las funciones de estas proteínas es evitar la aglutinación de proteínas como consecuencia de un pH ácido. Esto es importante para que sigan manteniendo su función biológica (Booth y col., 2002). Lo anterior ocurre también durante el estrés térmico, ya que hay proteínas que se desnaturalizan debido a la temperatura alta, entonces existen sistemas de protección que son inducidos para proteger proteínas dañadas (Yura y col, 2000).

Otras de las proteínas encontradas podrían formar parte de los sistemas que tiene la bacteria para alcalinizar el periplasma, por lo que pudieran estar encargadas del transporte de protones fuera de la membrana (Wang y Doyle, 1998).

CAPÍTULO VI. CONCLUSIONES

El presente trabajo se realizó con el fin de profundizar en el conocimiento sobre la expresión de proteínas de membrana externa sintetizadas por *Escherichia coli* O157:H7 y O88:H25 como respuesta a diferentes tipos de estrés. Resulta de interés práctico estudiarlas, debido a que los tratamientos ácidos y/o térmicos de mediana intensidad, así como el desarrollo de resistencia o tolerancia de los microorganismos presentes en estas condiciones en los alimentos fermentados, representan un peligro potencial para la seguridad alimentaria.

Las dos cepas sobrevivieron a las condiciones de estrés térmico y ácido, siendo la sobrevivencia mayor cuando se aplicó el choque térmico antes del ácido. Como respuesta a las situaciones de estrés las bacterias sintetizaron proteínas de membrana externa.

Tanto *E. coli* O157:H7 como O88:H25 expresaron OMPs comunes y otras diferentes así como específicas en respuesta a cada tipo de estrés a los que fueron sometidas. Después de un tiempo de incubación mayor (6 h), algunas proteínas también fueron expresadas por la cepa control, esto puede estar relacionado con la fase de crecimiento ya que cuando las bacterias alcanzan la fase estacionaria sintetizan proteínas de estrés.

El análisis por Western blot con el anticuerpo perteneciente a una persona que estuvo en contacto con *E. coli* O157:H7 permitió detectar las proteínas de membrana externa que se inducen en situaciones naturales como lo es el proceso infeccioso, así como detectar qué proteínas son producidas por ambas cepas.

Una proteína de 43,208 Da correspondiente al choque térmico, fue la única producida por las dos cepas estudiadas. Esta observación permite suponer que cada una de estas cepas usa mecanismos diferentes para sobrevivir a condiciones de estrés.

CAPÍTULO VII. RECOMENDACIONES

Obtener anticuerpos de las proteínas correspondientes para cada tipo de estrés y cada cepa con el objeto de identificar estas mismas en otras bacterias, utilizándolo como un método de detección.

Secuenciar las fracciones proteínicas con identidad inmunogénica, encontradas tanto en la cepa de *E. coli* O157:H7 como en la O88:H25. Ya que por sus características podría determinarse su función en la protección de las células sometidas a diferentes tipos de estrés.

COPIA NO SALE
DE LA BIBLIOTECA

CAPÍTULO VIII. REFERENCIAS

Bearson S., Bearson B., y Foster J W. 1997 Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiology Letters. 147: 173 – 180.

Booth I. R., Cash P., y O'Byrne C. 2002 Sensing and adapting to acid stress. Antonie van Leeuwenhoek, 81: 33 – 42.

Booth I. R. 1999 The regulation of intracellular pH in bacteria. En: Bacterial responses to pH. Editores: Derek J. Chadwick, Gail Gardew. Novartis Foundation Symposium 221, John Wiley & Sons Ltd, West Sussex, England, pp. 19-37.

Bowra B. J. Y Dilworth M. J. 1981 Motility and chemotaxis towards sugars in *Rhizobium leguminosarum*. J Gen Microbiol, 126:231-235.

Brown J.I., Ross T., McMeekin, TA & Nichols PD. 1997 Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. Int. J. Food Microbiol, 37: 163-173.

Castro R. J. 2001 Adhesión e inducción del estado viable no cultivable de *V. cholerae* 01 sobre el exoesqueleto de camarón y jaiba. Tesis de Doctorado en Ciencias de los Alimentos. Universidad Autónoma de Querétaro, Fac. Química. pp. 27 – 29.

Cruz S. Y Ulloa M. 1973 Alimentos fermentados de maíz consumidos en México y otros países latinoamericanos. Revista de la Sociedad Mexicana de Historia Natural. 24:423 – 457.

Cueto C. 2001 Estudio de la resistencia a valores bajos de pH de cepas patógenas de *Escherichia coli* aisladas de pozol. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM, México, D.F.

Doyle P. M., Zhao T., Meng J., y Zhao S. 1997. *Escherichia coli* O157:H7. En: Food microbiology, fundamentals and frontiers. (Ed.) Doyle P. M., Beuchat R. L., y Montville J. T. ASM Press, pp. 171 – 191.

Foster J W. T Hall H K. 1999 Adaptive acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 172: 771 – 778.

Gajiwala K- S. y Burley S. K. 1999. HDEA, a periplasmic protein that supports acid resistanse in pathogenic enteric bacteria. *J. Mol. Biol.* 295: 605 – 612.

Glenn AR y Dilworth MJ, 1999 Problems of adverse pH and bacterial strategies to combat it. En: *Bacterial responses to pH*. Editores: Derek J. Chadwick, Gail Gardew. Novartis Foundation Symposium 221, John Willey & Sons Ltd, West Sussex, England, pp. 4-14.

Hengge-Aronis, R. 1993 Survival of hunger and stress: the role of rpoS in early stationary phase gene regulation. *Cell* 72:165 – 168.

Hickey E W., y Hirshfield I N., 1990 Low pH induced effects on patterns of protein synthesis and on internal pH in *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *Applied and Environmental Microbiology*. 56: 1038 – 1045.

Lin J, Smith P M, Chapin K, Baik S H, Bennett N G y Foster W J. 1996 Mechanisms of acid resistance in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Applied and environmental microbiology*, Sept., 62: 3094-3100.

Lin J., Frey J., Slonzewski J L., Foster W J. 1995 Comparative analysis of extreme acid survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. 177:4097 – 4104.

Madigan M. T., Martinko J. M. y Parker J. 1997 Cell Biology; Prokaryotic Diversity: Bacteria. En: *Brock Biology of microorganisms*. Prentice Hall, Octava Edición, New Jersey. pp. 75 y 710.

McGowan C.C., Necheva A., Thompson S.A., Cover T.L. y Blaser M. J. 1998 Acid-induced expression of an LPS-associated gene in *Helicobacter pylori*. *Mol. Microbiol.* 30: 19 – 31.

McLennan N. y Masters M. GroE is vital for cell-wall synthesis. 1998. *Nature* 392:139.

Nikaido H., Vaara M., 1985 Molecular basis of bacterial outer membrane permeability. *American Society for Microbiology.* 49:1 – 32.

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

Price B. S., Cheng M. C., Kaspar W. C., Wright C. J., DeGraves J. F., Penfound A. T., Castanie-Cornet P. M., y Foster W. J. 2000 Role of *rpoS* in acid resistance and fecal shedding of *Escherichia coli* O157:H7. *Applied and Environmental Microbiology.* 66: 632 – 637.

Rees E. D., Dodd E. R., Gibson T. P., Booth R. I., y Stewart S. A. B. 1995 The significance of bacteria in stationary phase to food microbiology. *International Journal of Food Microbiology.* 28: 263 – 275.

Rowbury R. J. Y Goodson M. 1993. PhoE porin of *Escherichia coli* and phosphate reversal of acid damage and killing and of acid induction of the CadA gene product. *J. Appl. Bacteriol.* 74: 652 – 661.

Sainz T., Wacher C., Espinoza J., Centuri3n D., Navarro A., Molina J., Inzunza A., Cravioto A., Eslava C. 2001 Survival and characterization of *Escherichia coli* strains in a typical Mexican acid-fermented food. *International Journal of Food Microbiology*. 71: 169 – 176.

Sainz T. 1998 Estudios sobre la presencia y sobrevivencia de enterobacterias pat3genas en el pozol. Tesis Maestría en Ciencias Bioquímicas, UNAM, México, D. F.

Salyers A. Y Whitt D. 1994. Bacterial pathogenesis, a molecular approach. ASM Press. Cap. 16, pp. 190-204.

Sato M., Machida K., Arikado E., Saito H., Kakegawa T., Kobayashi H. 2000. Expression of outer membrane proteins in *Escherichia coli* growing at acid pH. *Applied and Environmental Microbiology*. 66: 943 – 947.

Strom A. R. Y Kaasen I. 1993 Trehalose metabolism in *Escherichia coli*: stress protection and stress regulation of gene expression. *Mol. Microbiol.* 8: 205 – 210.

Ulloa M. y Herrera T. 1976-1982 Estado actual sobre el conocimiento sobre la microbiología de bebidas fermentadas indígenas de México: pozol, tesgüino, pulque, colonche y tepache. *Anales del Instituto de Biología, UNAM*, 47 – 57. Serie Botánica, 145 – 163.

Ulrich Zügel, Stefan H.E. Kaufmann. 1999 Role of heat shock proteins in protection from pathogenesis of infectious diseases. *Clinical Microbiology Reviews*, Enero, Vol. 2, No.1.

Wacher Rodarte, M C. 1995 Estudios sobre la microbiología del pozol. Tesis de Doctorado. Doctorado en Ciencias Químicas (Alimentos). UNAM.

Wacher C. 1999 El Pozol, Cuadernos de Nutrición, 22(3), 125-157.

Wang G. y Doyle M P. 1998 Heat shock response enhances acid tolerance of *Escherichia coli* O157:H7. Letters in Applied Microbiology. 26:31 – 34.

Waterman S. R. y Small PLC 1996. Identification of sigma(s)-dependent genes associated whit the stationary phase acid-resistance phenotype of *Shigella flexneri*. Molec. Microbiol. 21: 925 – 940.

White D. 2000 How bacteria respond to environmental stress. En: The physiology and biochemistry of prokaryotes. Segunda Edición, Oxford University Press, pp. 534 – 546.

Xu H. S., Roberts N., Singleton F. L., Atwell R. W., Grimes D. J., y Colwell R. R. 1982 Survival and viability of nonculturable *E. Coli* and *Vibrio cholerae* in the esturine and marine environment. Microb. Ecol. 8: 313 – 323.

Yura T., Kanemori M. y Morita T. M. 2000 The heat shok response: Regulation and function. En: Bacterial Stress Responses. (Ed.) Storz G. y Hengge-Aronis R. ASM Press, Washington, D.C., pp. 3 – 18.