



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

ACTIVIDAD DEL PROMOTOR DE LOS GENES *otsBA* EN DIFERENTES
CONDICIONES DE ESTRÉS EN *ACINETOBACTER BAUMANNI*

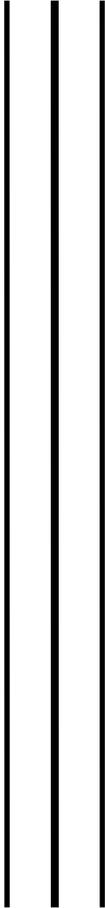
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

BIÓLOGO

P R E S E N T A:

EDGAR ADAIR ISLAS RODRIGUEZ



DIRECTOR DE TESIS:

DRA. LAURA CAMARENA MEJÍA 2013



Universidad Nacional
Autónoma de México



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.

1. Datos del alumno

Islas

Rodríguez

Edgar Adair

55 63 90 15

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

305107024

2. Datos del Tutor

Dra.

Rosa Laura

Camarena

Mejía

3. Datos sinodal 1

Dra.

María del Carmen del Socorro

Gómez

Eichelmann

4. Datos sinodal 2

Dra.

Claudia Andrea

Segal

Kischinevzky

5. Datos sinodal 3

Dra.

Laura

Kawasaki

Watanabe

6. Datos sinodal 4

Dra.

Clelia

Domenzain

Reyna

7. Datos del trabajo escrito

Actividad del promotor de los genes

otsBA en diferentes condiciones de estrés
en *Acinetobacter baumannii*

41p.

2013

Agradecimientos

Quisiera dar las gracias a:

Una excelente tutora y persona, la Dra. Laura, por haber creído en mí y darme la oportunidad de realizar mi proyecto de tesis en su laboratorio, por sus enseñanzas, paciencia y atenciones.

Al Dr. Sebastián y Clelia por ayudarme a ver las cosas en mi proyecto de tesis desde otra perspectiva, por tener la paciencia de discutir conmigo los experimentos y su disposición a resolver dudas.

A la Dra. Claudia por haber hecho de Biotecnología una de mis mejores clases en la carrera, por sus enseñanzas y por ser una excelente persona.

A mis compañeros, Ana Laura, Iván, Mauricio y Jorge por hacer más grata mi estancia en el laboratorio.

A mi amiga y compañera Diana por compartir su lugar del laboratorio conmigo, por sus dulces y post-its con caritas que me hacían reír.

A Gaby y Laurita, mi segunda mamá y hermana, por escucharme, darme su consejo y su apoyo incondicional en los momentos más difíciles durante mi estancia en el laboratorio, por responder mis preguntas tontas de los protocolos una y otra vez, por todo ese tiempo de calidad, por las risas y apapachos.

Al Dr. Luis por enseñarme el valor del trabajo duro, por sus enseñanzas y mis pasteles de cumpleaños.

A mis amigos de la carrera desde el principio hasta el final, Dany, Naty, Gaby y Pau, por todas nuestras tonterías y experiencias a lo largo de la carrera, por las fiestas, las risas, el apoyo; no imagino la carrera sin alguno de ustedes, son parte importante de mi, gracias por cinco años de amistad.

A los amigos que fui encontrando en diferentes grupos, gracias por permitirme ser parte de ustedes, estoy muy orgulloso de haber compartido clases con personas que yo sé el día de mañana harán grandes cosas y podre decir... es mi amigo (a) y tomamos clases juntos, gracias: Luis Fernando, Xanat, Adriana Calahorra, Alejandrin, Esther, Chu, Tomy, Valeria, Adriana Rodríguez, Valerie, Monse, Natalia, Andrea, Cristhian, Isaí, Manuel, Paulina, Camila, Daniel, Lucia, Nora, Mucha lucha y Goofy.

A mis químicos favoritos, por toooooodas las cosas vividas, los quiero mucho Bubu, Dano Davo, Jairotso, Mike, Nefillo (aunque no sea químico jaja) y Rodriberto.

A los buenos amigos que nunca se van por más que pase el tiempo, Alito, Ika, Vichito, Mau, Marianita y Adrian , gracias por no olvidar la amistad que tenemos.

A los ocho años que tenemos de que nuestros caminos se cruzaron, todos y cada unos de los recuerdos que tengo contigo están en mi corazón..... ¿Cómo te llamas amiga? así empezó y en todo este tiempo no creo que haya alguien que conozca y me conozca mejor que tú, nunca te vayas de mi vida. Little scare.

A mi mamá por ser un ejemplo de fortaleza, por compartir todas mis victorias y derrotas en la vida, por tu apoyo incondicional. Gracias mamá te quiero mucho

A mi papá por sus consejos y apoyo moral en los momentos difíciles de la vida. Gracias papa te quiero.

A mi abuelita por cuidarme desde chico y hacer de mí una persona responsable, sensata y con ganas de ser alguien en la vida.

A mi hermanita hermosa por apapacharme tanto y aunque tenemos poco tiempo de conocernos te quiero mucho Ale.

A todos y cada uno de ustedes.... gracias

Índice	
Introducción	1
<i>Acinetobacter baumannii</i>	1
Tipos de estreses abióticos.....	2
La trehalosa y su biosíntesis	6
Mecanismos de protección de la trehalosa	9
Aplicaciones biotecnológicas de la trehalosa.....	11
Hipótesis	13
Objetivos	13
Material y métodos	14
Cepas bacterianas y plásmidos.....	14
Medios de cultivo	14
Soluciones.....	14
Construcción del plásmido pMP_otsBA	15
Condiciones de crecimiento	16

Estrés por etanol.....	16
Estrés osmótico por NaCl.....	17
Estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno	17
Extracción de la enzima β -galactosidasa	18
Ensayo enzimático de la actividad de la enzima β -galactosidasa	18
Inmunodetección de proteína carbonilada	19
Resultados y discusión.....	21
Cinética de crecimiento de la cepa silvestre de <i>A. baumannii</i> en presencia de etanol.....	21
Construcción del plásmido pMP_otsBA	23
Expresión de la fusión transcripcional <i>otsBp-lacZ</i> en presencia de etanol	25
Expresión de la fusión transcripcional <i>otsBp-lacZ</i> en presencia de NaCl.....	27
Expresión de la fusión transcripcional <i>otsBp-lacZ</i> en presencia de H ₂ O ₂	30
Inmunodetección para proteína carbonilada.....	32
Conclusiones y perspectivas	34
Referencias.....	35

Introducción

Acinetobacter baumannii

Acinetobacter baumannii es una bacteria Gram-negativa, aerobia estricta, no motil, no formadora de esporas, perteneciente a las Proteobacterias, clase γ -proteobacteria, orden Pseudomonadales, familia Moraxellaceae^{1,2} (Fig. 1). Los miembros de este grupo son metabólicamente versátiles, pueden catabolizar un importante número de compuestos tales como alcoholes alifáticos, algunos aminoácidos, ácidos carboxílicos y grasos, hidrocarburos ramificados, compuestos aromáticos y n-hexadecanos³.



Fig. 1. Micrografía electrónica de *Acinetobacter baumannii*. Mag 13331x. CDC's Public Health Image Library Image #6498, Autor Janice Carr 2004.

A. baumannii es un importante patógeno oportunista que afecta a grupos de personas vulnerables, particularmente a pacientes afectados por quemaduras severas y pacientes inmunosuprimidos⁴. Entre los aislados hospitalarios de estas bacterias, suelen encontrarse cepas que presentan resistencia a múltiples antibióticos como aminopenicilinas, ureidopenicilinas, cefalosporinas, cloranfenicol y tetraciclina^{5,6}; solamente ciertos agentes terapéuticos dan resultado contra algunas cepas del organismo^{7,8}.

Las personas que adquirieron infecciones debido a esta bacteria, presentan una amplia gama de manifestaciones clínicas tales como neumonía, infecciones de tracto urinario, bacteriemia y meningitis⁸⁻¹².

Ha sido reportado que los lipolisacáridos^{13,14}, una proteína de membrana extracelular denominada OmpA^{15,16}, el pili, y dos sideróforos (que median la entrada de hierro (Fe) a la célula)¹⁷⁻¹⁹ son elementos fundamentales para que esta bacteria pueda colonizar eficientemente al ser humano. Sin embargo, es probable que otros elementos se encuentren involucrados.

Tipos de estreses abióticos

a) Estrés calórico

El estrés calórico es la causa de la desnaturalización de las proteínas celulares por efecto de un incremento en la temperatura del medio, provocando la pérdida en la función de éstas.

La respuesta celular generada por el estrés calórico provoca la expresión de muchas proteínas llamadas proteínas de choque térmico²⁰. Esta respuesta no está limitada a los cambios de temperatura y es una forma general de responder al estrés, ya sea de tipo osmótico, por presencia de etanol, metales pesados, contaminantes o interacciones con las células hospederas²¹⁻²⁵. Dentro de las proteínas de choque térmico, se encuentran chaperonas y proteasas, que están involucradas en la reparación o degradación de las proteínas dañadas durante el estrés.

En muchas especies de bacterias se ha observado que estas proteínas juegan un papel importante en la patogénesis²⁶⁻³². Las proteínas de choque térmico son también importantes durante un estrés nutricional, por ejemplo en la fase estacionaria³³.

b) Estrés oxidativo

Los microorganismos aeróbicos utilizan el oxígeno molecular (O₂) al realizar la respiración u oxidación de nutrientes para obtener energía. Los productos reactivos del

oxígeno como los radicales aniónicos (O^-), peróxido de hidrógeno (H_2O_2), y los altamente reactivos, radicales hidroxilo ($*OH$), son generados continuamente en células aeróbicas en crecimiento.

Los blancos biológicos de estas especies reactivas de oxígeno son el DNA, el RNA, las proteínas y los lípidos. Mucho del daño causado proviene de los radicales $*OH$ generados por el H_2O_2 vía la reacción de Fenton, la cual requiere hierro (Fe II) [o cualquier otro metal divalente, tal como el Cobre (Cu II)] y una fuente de equivalentes reductores (probablemente el NADH) para regenerar el metal. Los radicales libres pueden atacar directamente a los ácidos grasos polinsaturados en membranas e iniciar la peroxidación de los lípidos. Un primer efecto de la peroxidación de lípidos es que decrece la fluidez en la membrana, alterando sus propiedades y de las proteínas transmembranales. Este daño actúa como un amplificador porque se forman más radicales debido a que los ácidos grasos polinsaturados son degradados a una variedad de productos. Algunos de ellos, tales como los aldehídos, son altamente reactivos y pueden dañar otras moléculas, como proteínas^{34,35}.

A diferencia de los radicales libres, los aldehídos poseen mayor longevidad y pueden difundirse del sitio de origen, alcanzar y atacar blancos que se encuentran distantes del sitio inicial donde ocurrió el evento de oxidación, actuando como “segundos mensajeros tóxicos”³⁶.

Con respecto a la oxidación de proteínas, se han documentado distintos tipos de daño^{37,38}, incluyendo la oxidación de los grupos sulfhidrilo, aducción de los residuos de aminoácidos cerca del sitio de unión al metal, reacción con aldehídos, modificación de grupos prostéticos o grupos metálicos, acoplamiento proteína-proteína y fragmentación de péptidos.

Metodológicamente la carbonilación de proteínas es un tipo de oxidación irreversible que puede promoverse por especies reactivas de oxígeno. Usualmente se refiere al proceso por el cual se forman cetonas y aldehídos que pueden reaccionar con el

2,4-dinitrofenilhidrazina (DNPH) para formar hidrazonas. La oxidación directa de los residuos laterales de lisina, arginina, prolina y treonina (entre otros aminoácidos), en la reacción de “carbonilación primaria de proteínas” produce proteínas que pueden ser detectadas por el DNPH ³⁹⁻⁴¹.

Todas estas modificaciones afectan negativamente a la célula, ya que ocasionan una pérdida en la función de la membrana celular y proteínas; además de que pueden bloquear la replicación del DNA o provocar mutaciones.

Los sistemas de protección contra la oxidación se dividen en tres grupos: 1) prevención de la generación de especies de oxígeno altamente reactivas; 2) cadena terminal de radicales libres y desintoxicación de radicales libres por enzimas; 3) elementos de reparación. Además, la unión a iones metálicos de transición específicos y proteínas inespecíficas como ferritina, transferina, albúmina y otros, son importantes para la protección contra radicales ⁴².

Los antioxidantes de bajo peso molecular como el α -tocoferol (vitamina E), el ácido ascórbico (vitamina C), y el ácido úrico, actúan principalmente deteniendo la cadena de propagación de los radicales libres ⁴³.

El glutatión atrapa radicales hidroxilo, oxígeno atómico y además es sustrato de algunas enzimas, regenerando vitaminas E y C. ^{42,43}.

c) Estrés por desecación

La capacidad de los microorganismos para sobrevivir a la desecación depende de su habilidad para responder: a la radiación ultravioleta, a las especies reactivas de oxígeno, a la presencia de ciertos solutos y en ocasiones a las temperaturas extremas ⁴⁴⁻⁴⁸. La desecación puede diferenciarse en tres etapas principales: secado, almacenamiento y

rehidratación. Estas etapas pueden ser abordadas desde distintos puntos de vista, es decir, por la severidad y velocidad tanto del secado como de la rehidratación, así como de la duración del almacenamiento. Las consecuencias del secado son, entre otras: la acumulación de sales y el estrés hiperosmótico. Además, cuando cierta cantidad de agua se ha recuperado, la reactivación del metabolismo puede ser impedida debido al daño generado durante la desecación. Asimismo, la acumulación de daño durante el almacenamiento puede llevar a la muerte celular, ya que en estas condiciones los organismos no se encuentran metabólicamente activos y eso los hace incapaces de reparar cualquier lesión⁵¹. Algunos de los daños provocados en esta condición, se pueden comparar con el daño inducido por la radiación ultravioleta y las especies reactivas de oxígeno⁴⁹⁻⁵⁰. Finalmente durante la rehidratación, el estrés hiposmótico y la aparición de especies reactivas de oxígeno afectan la supervivencia⁵².

d) Estrés osmótico

Los cambios en la presión osmótica extracelular pueden provocar flujos rápidos en el agua, concentrando o diluyendo al citoplasma de las células, alterando su estructura y función. Las células responden al estrés osmótico ajustando la distribución de algunos solutos a través de la membrana plasmática⁵³⁻⁵⁷. Cuando se incrementa la presión osmótica extracelular, la célula acumula solutos para prevenir la deshidratación del citoplasma; en forma contraria, la célula libera solutos para prevenir la lisis a consecuencia del decremento en la presión osmótica extracelular. Las bacterias usan cationes de potasio (K^+), aniones orgánicos como el glutamato o compuestos orgánicos zwitteriónicos como solutos osmoreguladores. Los solutos orgánicos que se acumulan bajo condiciones de estrés osmótico sin alterar las funciones celulares, son llamados osmolitos⁵⁸ o solutos compatibles⁵⁹. Se ha observado que la acumulación del glutamato es la respuesta inicial para contender ante un aumento en la osmolaridad. También se pueden activar otros mecanismos osmorreguladores, pero en general, se prefiere la acumulación de osmolitos orgánicos⁵⁹. Los osmolitos provocan una completa rehidratación citoplásmica mientras favorecen las estructuras nativas e interacciones de las macromoléculas⁵⁹⁻⁶¹.

La Trehalosa y su biosíntesis

En el ambiente natural, los microorganismos se encuentran en constante interacción unos con otros. Muchas de estas interacciones son antagónicas, uno de los mejores ejemplos son los antibióticos producidos por un microorganismo para inhibir el crecimiento del otro, pero también existen interacciones de tipo positivo⁶².

Se encontró que *Saccharomyces cerevisiae* estimula el crecimiento de especies patógenas de bacterias para humanos como *A. baumannii* y *Acinetobacter haemolyticus*; la molécula responsable de éste fenómeno es el etanol. Se ha demostrado que en bajas concentraciones (1%-1.2%), el etanol no solo promueve el crecimiento sino que también aumenta la resistencia al estrés por sal. Además, en presencia de etanol, *A. baumannii* muestra una mayor patogenicidad en ensayos realizados con *Caenorhabditis elegans*⁶³. Para entender mejor las bases de éste fenómeno se realizó una caracterización del transcriptoma de *A. baumannii* cultivada en medio rico en presencia y ausencia de etanol al 1.2%. Como resultado de este ensayo se identificaron setenta genes en los que la expresión se vio aumentada en presencia de etanol y se concluyó que el incremento en la virulencia de *A. baumannii* es debido a un aumento en la capacidad metabólica⁶⁴.

Al analizar el transcriptoma de *A. baumannii* expuesto a etanol al 3% durante 20', se observó la inducción de varios genes relacionados con la respuesta al estrés y se encontró la sobreexpresión del operón *otsBA* que es responsable de la síntesis de trehalosa (resultados del laboratorio no publicados).

La trehalosa es un disacárido no reductor, muy estable, formado por un enlace glucosídico α,α -1 entre dos α -glucosas; este compuesto se encuentra presente en muchos organismos, incluyendo bacterias, levaduras, insectos y algunas plantas⁶⁵ (Fig. 2). Inicialmente fue considerado como un reservorio de glucosa y/o como parte de algunos componentes celulares¹⁰. En algunos organismos se piensa que actúa como fuente de energía durante ciertas etapas del desarrollo, como lo es la germinación temprana de las esporas^{66,67}. En el caso de las *mycobacterias*, la trehalosa puede ser integrada a los lípidos y ser utilizada como componente estructural^{67,68}. En gran variedad de insectos, la trehalosa es una fuente de energía para poder volar, es probable que sea una

adaptación específica del vuelo ^{69,70}. Algunos organismos que sobreviven a bajas temperaturas lo hacen en presencia de glicerol o utilizando moléculas que actúan como anticongelantes naturales, tal es el caso de la trehalosa^{68,71}. Asahina y Tanno (1964), descubrieron que en el estado larval, la mosca sierra puede sobrevivir a temperaturas de -40°C, ya que poseen gran cantidad de trehalosa pero no de glicerol⁷². En distintas cepas de levaduras, la acumulación de trehalosa está relacionada con la resistencia a estrés por calor y desecación⁷³. *Selaginella lepidophylla* llamada “la planta de la resurrección” contiene cerca del 12.5 % de su peso seco de trehalosa y 1.5% de sacarosa, esta planta puede ser totalmente secada y al rehidratarla, regresa a su actividad normal⁷⁴. Los embriones de artemia entran en latencia acumulando cerca del 15% de su peso seco en trehalosa. Se piensa que la trehalosa funciona como estabilizador durante el periodo de dormancia y como fuente de energía al terminar éste periodo⁷⁵. Altas concentraciones de trehalosa han sido asociadas también con la resistencia de los nemátodos al estrés por desecación, se sabe que la presencia de este disacárido es un factor de protección contra el calor y el estrés osmótico^{76,77}.

Leslie, et al. (1995), demostraron que la presencia de trehalosa y/o de sacarosa ayudaron a mantener un alto porcentaje de viabilidad tras rehidratar dos especies de bacterias sujetas a desecación y posterior congelación ⁷⁸. Sin embargo, las muestras con trehalosa tuvieron aproximadamente un 15% mayor viabilidad en comparación con las de sacarosa. Posteriormente las muestras fueron expuestas a la luz y aire, y se observó que las muestras que contenían trehalosa mostraron un porcentaje significativamente mayor de sobrevivencia mientras que las de sacarosa no mostraron beneficios.

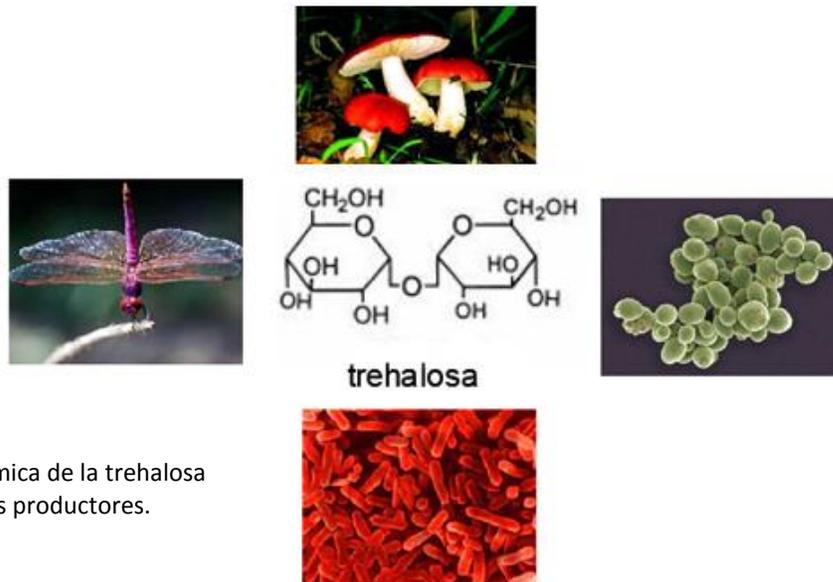


Fig. 2 Estructura química de la trehalosa y algunos organismos productores.

Biosíntesis de la trehalosa

En *Escherichia coli* y en *Rhizobium leguminosarum* bv. *Trifolii*, el operón *otsBA*, de aproximadamente 2,300 pb, es el responsable de la biosíntesis de la trehalosa. Este locus codifica para la enzima trehalosa 6-fosfato sintasa TPS (*otsA*), la cual cataliza la síntesis de trehalosa-6-fosfato a partir de UDP-glucosa y glucosa 6-fosfato, y para la trehalosa 6-fosfato fosfatasa TPP (*otsB*), que cataliza la formación de la trehalosa^{79,80} (Fig. 3).

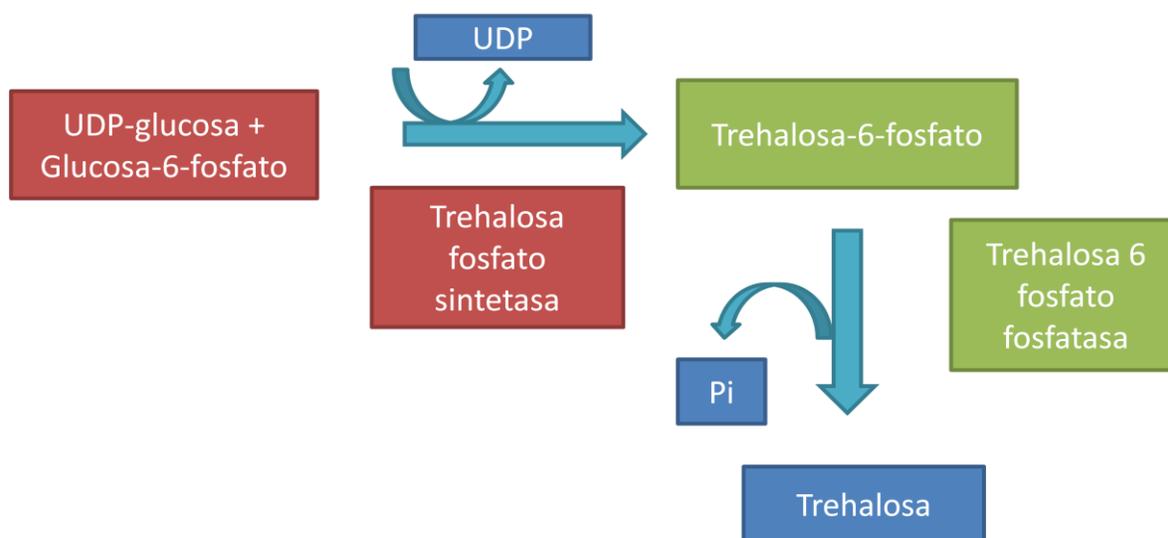


Fig. 3. Biosíntesis de la trehalosa

Mecanismos de protección de la trehalosa

Los mecanismos mediante los cuales la trehalosa protege a las biomoléculas pueden dividirse en tres categorías a saber: reemplazo de agua, transformación de cristal y estabilidad química (Fig. 4)⁸¹. Estos tres mecanismos no son mutuamente excluyentes y juntos contribuyen al efecto de estabilización mediado por la trehalosa.

La teoría de reemplazo de agua propone que todas las macromoléculas biológicas están normalmente estabilizadas por el agua que forma puentes de hidrógeno alrededor de las moléculas. La trehalosa parece tener una gran flexibilidad en el enlace glicosídico comparada con otros disacáridos. Esta propiedad permite a la trehalosa interactuar con grupos polares irregulares en las macromoléculas⁸¹.

La teoría de transformación de cristal propone que azúcares en solución pueden transformar o mantener en estado de cristal líquido las membranas celulares en lugar de cristalizar. A diferencia de otros azúcares, la trehalosa forma un cristal no higroscópico, el cual es estable a altas temperaturas así como al ser completamente desecado⁸². Se piensa que en dicho estado, la trehalosa debe envolver a las biomoléculas de tal modo que les permita retomar su estructura nativa y función después de rehidratarlas^{81,82,83}. La habilidad de alternar entre las formas dihidratada y anhídrida en cristal es también única de la trehalosa, y para ello debe controlar eficientemente la actividad del agua en matrices complejas.

Bajo un estrés abiótico, las proteínas mantienen una mejor actividad enzimática en presencia de trehalosa, ya que ésta reemplaza el agua formando una especie de cápsula alrededor de la proteína, protegiendo así su estructura y actividad⁸⁴. La interacción por puentes de hidrógeno entre ambas moléculas es debida a los grupos polares de la proteína y los hidroxilos del azúcar⁸⁵.

La capacidad de la trehalosa para proteger a las membranas durante la deshidratación radica en que interactúa con estas, favoreciendo la permanencia del

estado fluido de los lípidos, evitando así la fusión, la separación de fases y su rompimiento⁸⁶.

Las evidencias sugieren que la trehalosa retarda la transición de líquido a gel mediante el reemplazo de las moléculas de agua por las de trehalosa, manteniendo a las membranas en forma de cristal líquido.

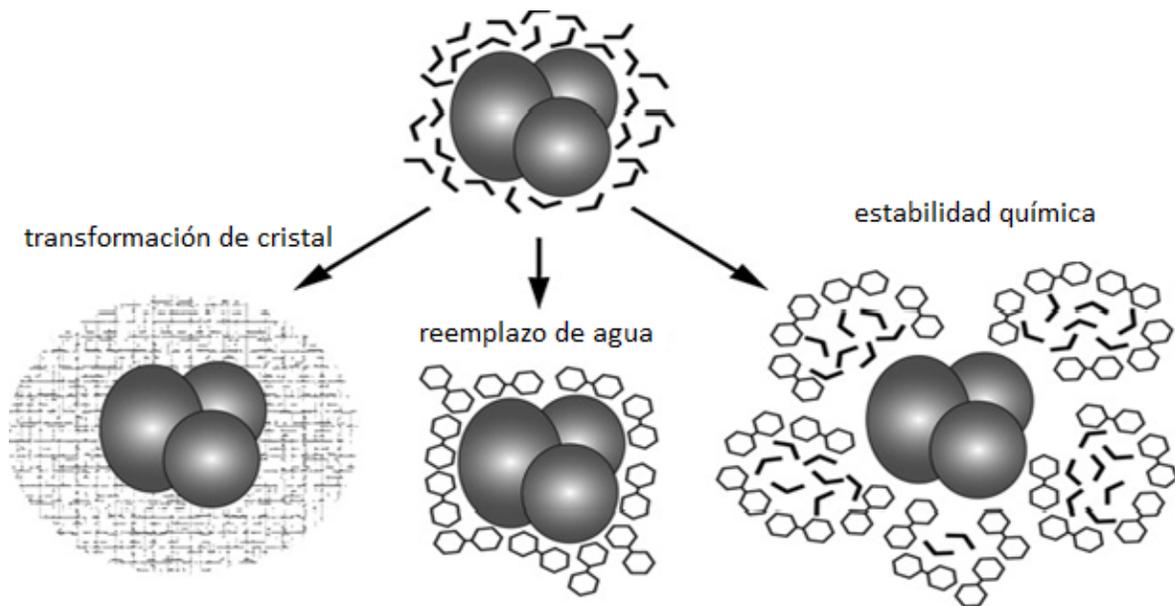


Fig. 4. Tres teorías propuestas de cómo es que la trehalosa protege a las proteínas del daño⁸⁷.

Aplicaciones biotecnológicas para la trehalosa

Las propiedades químicas de la trehalosa la convierten en un importante producto biotecnológico con diversas aplicaciones, los usos más comunes de éste disacárido son:

- Proteger la actividad enzimática. La trehalosa puede ser utilizada para almacenar a temperatura ambiente enzimas termolábiles como: la DNA polimerasa, las enzimas de restricción y la DNA ligasa⁸⁸.
- Estabilizar y proteger de moléculas complejas. Moléculas inestables como los anticuerpos pueden ser rehidratados a una temperatura de 37°C en presencia del disacárido, manteniendo su actividad por varios meses de almacenaje⁸⁹.
- Aditivo alimenticio. La trehalosa puede ser utilizada en alimentos secos y procesados tales como las frutas y vegetales, con la finalidad de preservar sus aromas y propiedades organolépticas, además de contar con la ventaja de no ser tóxica y formar parte de la dieta humana, ya que se encuentra presente en champiñones, vino, pan y miel⁹⁰.
- Preservar tejidos y órganos. Células y tejidos pueden ser preservados por meses en presencia de trehalosa, aún estando secos o congelados.^{91,92}.
- Marcador de selección en la producción de plantas transgénicas. El gen AtTPS1 en *Arabidopsis thaliana* codifica para la enzima TPS1, que confiere insensibilidad a la presencia de glucosa extracelular. La sobre-expresión del gen AtTPS1 permite que las semillas germinen en presencia de 6% glucosa, mientras que las semillas silvestres muestran una tasa de germinación muy reducida en dichas condiciones⁹³. Dado que la germinación y la diferenciación de las plantas silvestres es inhibida por glucosa, este gen puede ser utilizado como un marcador de selección durante el proceso de transformación en plantas, usando glucosa como agente selectivo⁹⁴.
- Aplicaciones médicas potenciales. Ha sido reportado que la trehalosa reduce síntomas de enfermedades como la enfermedad de Huntington y la osteoporosis.

En uno de estos estudios, el consumo de trehalosa disminuyó la osteoporosis en ratas hembras a las cuales se les removieron los ovarios⁹⁵.

Hipótesis

El estrés provocado por etanol es la mezcla de diferentes tipos de estrés, todos ellos asociados a la falta o pérdida de la biodisponibilidad del agua en la célula, estos tipos de estrés tienen como consecuencia la sobreexpresión de distintos genes entre los cuales se encuentra el operon *otsBA*.

Objetivo General

- Determinar la actividad del promotor de los genes *otsBA* en diferentes condiciones de estrés

Objetivos particulares

- a) Estrés por etanol al 3%
 - b) Estrés por NaCl al 2.5%
 - c) Estrés oxidativo: peróxido de hidrógeno 5 mM y 10 mM
- Evaluar la presencia de proteínas oxidadas generadas por etanol al 3%

Material y métodos

Cepas bacterianas

Acinetobacter baumannii ATCC17978 y *Escherichia coli* K-12 TOP10.

Medios de cultivo

Luria- Bertani (LB)

- Contiene 1% de bacto triptona 1% de cloruro de sodio (NaCl) y 0.5% de extracto de levadura. En caso de prepararse en medio sólido se agregan 1.5% de agar. Se esteriliza por autoclave, si se desea almacenar se guarda a 4°C.

YPD

- Contiene 1% de extracto de levadura, 2% de bacto peptona y 2% de glucosa. En caso de prepararse en medio sólido se agregan 1.5% de agar. Se esteriliza por autoclave, si se desea almacenar se guarda a 4°C.

Soluciones

Buffer Z

- Contiene 0.85% de Na_2HPO_4 , 0.55% de NaH_2PO_4 , 0.075% de KCl, 0.0246 % de MgSO_4 , 0.27 % de β mercaptoetanol, pH 7.2.

Buffer de paro

- Na_2CO_3 al 10.6%

Buffer de corrida de proteínas

- Contiene 1.44% de glicina, 0.3% de Tris Base, 0.1% de SDS, pH 8.3

Buffer de transferencia

- Contiene 0.032% de Na₂CO₃, 0.084% de NaHCO₃, 20% de metanol, pH 9.8

Buffer TBST

- Contiene 0.24 % de Tris Base, 0.8% de NaCl y 0.1 % de Tween-20, pH 7.5

Construcción del plásmido pMP_otsBA

Con el propósito de clonar la región regulatoria del operón *otsBA*, se extrajo el DNA cromosómico de *A. baumannii* ATCC17978 y se amplificó por PCR el fragmento del promotor que regula la expresión del operón *otsBA* con un tamaño de 459 pb. Para ello, se utilizaron los oligos abot sp1 de 34 bases, que contiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción PstI y abot sp2 de 29 bases con un sitio de restricción para la enzima EcoRI (la secuencia de oligos se muestra en la tabla 1). Se purificó el fragmento de PCR mediante un gel de agarosa, se clonó en el vector pCR2.1-TOPO (Invitrogen) como intermediario para después clonarlo en el vector pMP220⁹⁶; el plásmido pMP220 lleva la región codificadora río arriba del gen *lacZ* el cual codifica para la enzima (β -galactosidasa), sin embargo, carece de una región promotora y por ello al introducirlo a una cepa bacteriana se detecta un nivel muy bajo de actividad enzimática. La clonación del promotor *otsBA* río arriba de *lacZ* en el plásmido pMP_otsBA permitió medir la actividad del promotor *otsBA* en diferentes condiciones de estrés por medio de la determinación de las actividades enzimáticas de la β -gal.

Tabla 1. Oligonucleótidos

Nombre	Secuencia	
Abot sp1	5'-CACTGCAGTCATTGGGTGTAACAAAATATGTATC-3'	PstI
Abot sp2	5'-CGGAATTCCCAACCTGTAATCAATAAAA3'-	EcoR1

Condiciones de crecimiento

A. baumannii se cultivó en medio LB o YPD a 30°C. La cepa de *A. baumannii* ATCC17978 transformada con el plásmido pMP_otsBA, se creció en medio LB o YPD suplementado con Tetraciclina a una concentración de 10 µg/ml.

Para iniciar los experimentos, la cepa de *A. baumannii* que lleva el plásmido pMP_otsBA se sembró en una caja de medio LB con tetraciclina (Tc) y X-gal. El X-gal es un sustrato de la enzima β-galactosidasa; al encontrarse presente esta enzima, el X-gal es hidrolizado y se obtiene una coloración azul en las colonias de bacterias. Después de 24 h de incubación, fue seleccionada una colonia de color azul marino y fue cultivada toda la noche en 10 mL de medio YPD Tc a 30°C y 250 rpm.

Estrés por Etanol

Se inocularon dos matraces de medio YPD Tc con 150 µL del cultivo de toda la noche de la cepa de *A. baumannii* que lleva pMP_otsBA. Los cultivos fueron incubados a 30°C a 250 rpm. Al alcanzar la fase exponencial (aprox DO₆₀₀ de 1.2), uno de los cultivos fue adicionado con etanol (concentración final, 3%), y se prosiguió con la incubación, tomando muestras a los tiempos 0', 25', 45', 75' y 125', las cuales fueron utilizadas para

medir la densidad óptica (DO_{600}) y determinar las actividades enzimáticas. El ensayo se realizó por duplicado y fue repetido en medio LB Tc bajo las mismas condiciones.

Estrés osmótico por NaCl

Se inocularon dos matraces de medio YPD Tc con 150 μ L del cultivo de toda la noche de *A. baumannii* que lleva el plásmido pMP_otsBA. Los cultivos fueron incubados a 30°C a 250 rpm. Al llegar a la fase exponencial, a uno de los dos matraces se le agregó YPD con NaCl al 25% hasta alcanzar una concentración final de 2.5% ; se prosiguió la incubación tomando muestras a los tiempos 0', 25', 45', 75' y 125' las cuales fueron utilizadas para medir la densidad óptica (DO_{600}) y las actividades enzimáticas.

Estrés oxidativo por peróxido de hidrógeno

Se inocularon tres matraces de medio YPD Tc con 150 μ L del cultivo de toda la noche de *A. baumannii* con el plásmido pMP_otsBA. Los matraces fueron incubados a 30°C a 250 rpm. Al alcanzar la fase exponencial, a dos matraces se les agregó peróxido de hidrógeno (H_2O_2) para alcanzar las concentraciones de 5mM y 10mM. Posteriormente, se incubaron durante 30' a 30°C y 250 rpm, después se midieron las densidades ópticas, se tomaron muestras de 1 mL, que fueron utilizadas para realizar las actividades enzimáticas y además se hicieron diluciones de 10^{-1} a 10^{-6} de cada una de las concentraciones de H_2O_2 ; las diluciones fueron plaqueadas en cajas de LB. Las diluciones 10^{-5} y 10^{-6} , se incubaron a 37°C para determinar cuentas viables.

Extracción de la enzima de β -galactosidasa

Se tomaron 0.5 mL de las muestras obtenidos a los diferentes tiempos después del estímulo y se les agregó 0.5 mL de buffer Z, 2 gotas de cloroformo y una gota de SDS al 0.1%, fueron mezclados vigorosamente (vortex) y puestos en hielo.

Ensayo de la actividad enzimática β -galactosidasa

Para determinar la actividad de β -galactosidasa colorimétrica, se utiliza el compuesto orto-nitrofenil- β -D-galactopiranosido (ONPG), que es un sustrato artificial e incoloro de la enzima, el cual al ser hidrolizado a ONP vira a un color amarillo, éste cambio puede ser determinado con precisión a una DO_{420} .

A tubos de ensayo se les agregó 700 μ L de buffer Z, 200 μ L de ONPG (4mg/ml) y al final 100 μ L de la extracción descrita anteriormente. Las reacciones fueron incubadas a 37°C durante 10 y 15 minutos, pasado este tiempo la reacción fue detenida con 500 μ L de Na_2CO_3 (10.6%). La absorbancia de las muestras fue determinada a una DO_{420nm} . Se utilizó la siguiente fórmula con los valores obtenidos para determinar la actividad enzimática en unidades Miller.

t = tiempo

F = factor de dilución

$$\frac{1000 * DO_{600nm}}{F * t * DO_{420nm}}$$

Inmunoidentificación de proteínas carboniladas

Para determinar si había proteínas oxidadas por el estímulo de etanol, se realizó el siguiente protocolo.

Se crecieron tres cultivos de *A. baumannii* en medio YPD, inoculados con 150µL de un cultivo de toda la noche, al llegar estos a la fase exponencial a cada uno se le dio un tratamiento diferente: con etanol, peróxido de hidrógeno como control positivo y sin estímulo como control negativo. Se tomaron muestras de 1.5 mL a los tiempos 0' y 20', éstas fueron centrifugadas y los paquetes celulares lavados una vez con TE 10 mM, resuspendidos en 200 µL de esta misma solución, para después sonicar, centrifugar y cuantificar la proteína por el método de Bradford.

Se utilizó el kit OxyBlot de la compañía Millipore, el cual tiene como función detectar grupos carbonilos en las cadenas laterales de las proteínas que hayan sido producidos por reacciones de oxidación. Los grupos carbonilo son derivatizados a 2, 4-dinitrofenilhidrazona (DNP-hidrazona) por la 2, 4- dinitrofenilhidrazina (DNHP). Las proteínas derivatizadas son separadas mediante una electroforesis en gel de poliacrilamida y transferidas a una membrana de nitrocelulosa para ser incubadas con el anticuerpo primario de conejo anti-DNP y después con el anticuerpo secundario dirigido contra la cadena pesada del anticuerpo primario. En este caso, el anticuerpo secundario se encuentra acoplado a la peroxidasa de rábano. La membrana es tratada con reactivos quimioluminiscentes (luminol y un amplificador). En esta incubación, el luminol es oxidado mediante la acción de la peroxidasa y convertido a una forma inestable (3-aminophthalato activado) que emite luz al decaer los electrones.

Se tomó la cantidad suficiente de muestra para tener 4.3µg de proteína, se le agregaron 5µL de SDS 12%, 10µL de DNHP 1x y se incubó a 15 min, posteriormente se añadieron 7.5µL de solución neutralizante (se observó un cambio de color de amarillo a naranja-rosado) y 3µL de buffer de carga 2x.

Se preparó un gel de acrilamida al 12%, donde se cargaron y separaron 21 μL de las muestras derivatizadas, seis en total, más un marcador de peso molecular.

Se puso a transferir del gel de acrilamida a una membrana de nitrocelulosa durante 1h, después la membrana fue bloqueada con TBST 5% de leche durante toda la noche en agitación constante a temperatura ambiente. Al día siguiente, se realizaron tres lavados a la membrana, cada uno de 10 minutos con 10ml de TBST, luego en el mismo volumen de TBST se hizo una dilución para que el anticuerpo primario quedara 1:150 (66 μL) y se dejó incubando por 2 h; se volvió a lavar como ya se mencionó y se adicionó el anticuerpo secundario 1:300 (33 μL) durante 2 h y nuevamente se lavó.

Se agregaron 0.5ml de la solución B y 0.5 ml de la solución A del kit sobre la membrana que fue colocada entre dos acetatos, 5 min después se expuso a un papel fotográfico a diferentes tiempos 5 min, 15 min y 30 min, para después ser revelado.

Resultados y Discusión.

Cinética de crecimiento de la cepa silvestre de *A. baumannii* en presencia de etanol.

Para observar si existía algún defecto en el crecimiento de *A. baumannii* en presencia de etanol al 3%, se creció la cepa silvestre en medio YPD o LB hasta la fase exponencial. Al alcanzar una DO_{600} de 1.5, se añadió etanol al 3%. En paralelo, un cultivo similar al anterior, fue incubado sin etanol. Se procedió a tomar muestras de los cultivos a diferentes tiempos a partir del estímulo y se determinó la $D.O_{600}$.

Se observó que el etanol al 3% ejerce un efecto negativo sobre el crecimiento (Fig. 5 y 6). En particular, en el medio YPD se observa una ligera reducción en la $D.O_{600}$, a los 75 min después de haber añadido el etanol. Dicha reducción se vuelve más aparente al min. 120 (Fig. 5).

En el caso de los cultivos en medio LB, se observó una ligera disminución de la $D.O_{600}$ 25 min después de haber añadido el etanol. Como se puede observar en la figura 2, dicha diferencia, con respecto al cultivo sin etanol, se mantiene durante el resto del ensayo.

A partir de estos resultados, podemos suponer que la reducción en el crecimiento provocada por el etanol al 3%, puede estar dada por un desvío en la energía de las células para tratar de contender con el efecto del etanol al 3%, o también a que las células fueron lisadas por el alcohol. Sin embargo, a los tiempos 25 y 45 min, en medio YPD, no parece haber diferencias significativas entre los cultivos incubados sin y con etanol. Es factible que la respuesta celular para contender ante este estrés sea lo suficientemente robusta para no afectar el crecimiento en medio YPD a estos tiempos.

Cabe mencionar que también se llevó a cabo la determinación de la cuenta viable de los cultivos. Sin embargo, no fue posible estandarizar la cuenta viable en ausencia de etanol. Hemos atribuido este resultado a la facilidad con la cual las células de *A. baumannii* suelen aglutinarse o agruparse (tal y como se observa en la Fig. 1 de la sección de introducción).

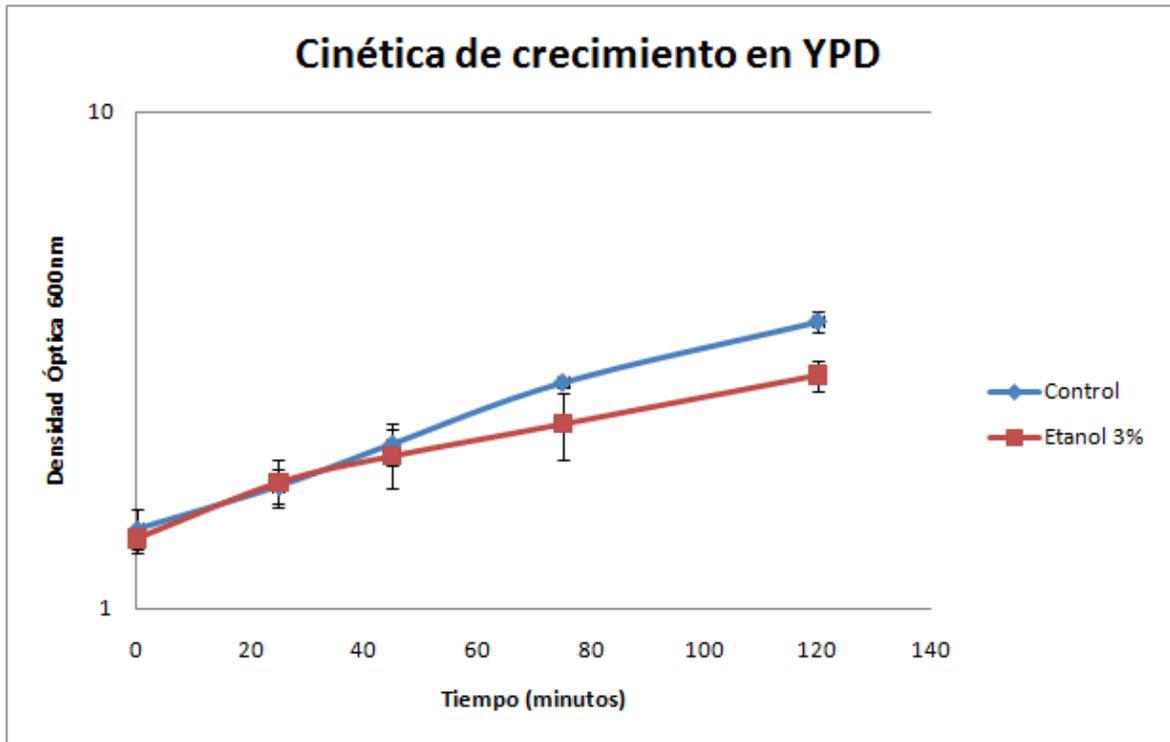


Fig. 5. Cinética de crecimiento de *A. baumannii* en presencia (cuadrados) o ausencia (rombos) de etanol (3%) en medio YPD.

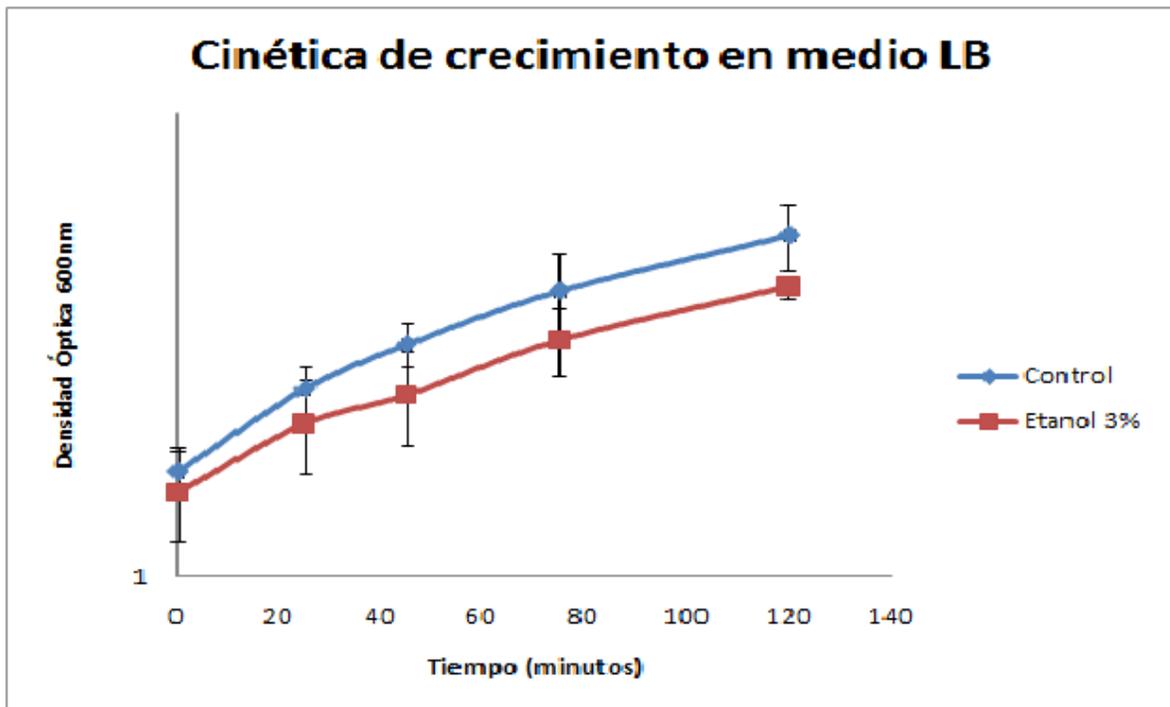


Fig. 6. Cinética de crecimiento de *A. baumannii* en presencia (cuadrados) o ausencia (rombos) de etanol (3%) en medio LB.

Como fue mencionado en la introducción, en un estudio en el que se caracterizó el perfil transcripcional de *A. baumannii* en presencia de etanol se observó la inducción de los genes *otsBA* en respuesta a la presencia de etanol al 3% durante 20 min (datos no publicados). Con el fin de confirmar los resultados de dicho experimento pero utilizando una metodología alternativa, se procedió a fusionar la región regulatoria del operón *otsBA* río arriba del gen reportero *lacZ*.

Los genes *otsBA* en el genoma de *A. baumannii* probablemente forman un operón ya que el codón de paro de *otsB* se localiza 13 nucleótidos dentro del marco de lectura correspondiente a *otsA*. Por esta razón consideramos que la región río arriba de *otsB* debe de contener el promotor correspondiente al operón.

Se procedió entonces a clonar la región ubicada río arriba de *otsB*, en el plásmido pMP220. En este plásmido es posible llevar a cabo fusiones transcripcionales con el gen *lacZ*, ya que la secuencia de *lacZ* presente en el plásmido carece de señales de inicio de la transcripción.

Construcción del plásmido pMP_otsBA

Con el propósito de clonar la región regulatoria del operón *otsBA* se extrajo el DNA cromosomal de *A. baumannii* ATCC17978 y se amplificó por PCR la región río arriba del marco de lectura abierto de *otsB*. Se utilizaron los oligonucleótidos abot sp1 que contiene un sitio de reconocimiento para la enzima de restricción PstI y abot sp2 con un sitio de restricción para la enzima EcoRI (ver Material y métodos para detalles adicionales). Abot sp1 reconoce la secuencia nucleotídica localizada 65 pb río abajo de la metionina iniciadora de *OtsB*, mientras que abot sp2 reconoce una secuencia localizada 394 pb río arriba. El producto de la reacción de amplificación (459 pb), se purificó y fue clonado en el vector pCR2.1-TOPO como intermediario para después clonarlo en el vector pMP220 (Fig. 7).

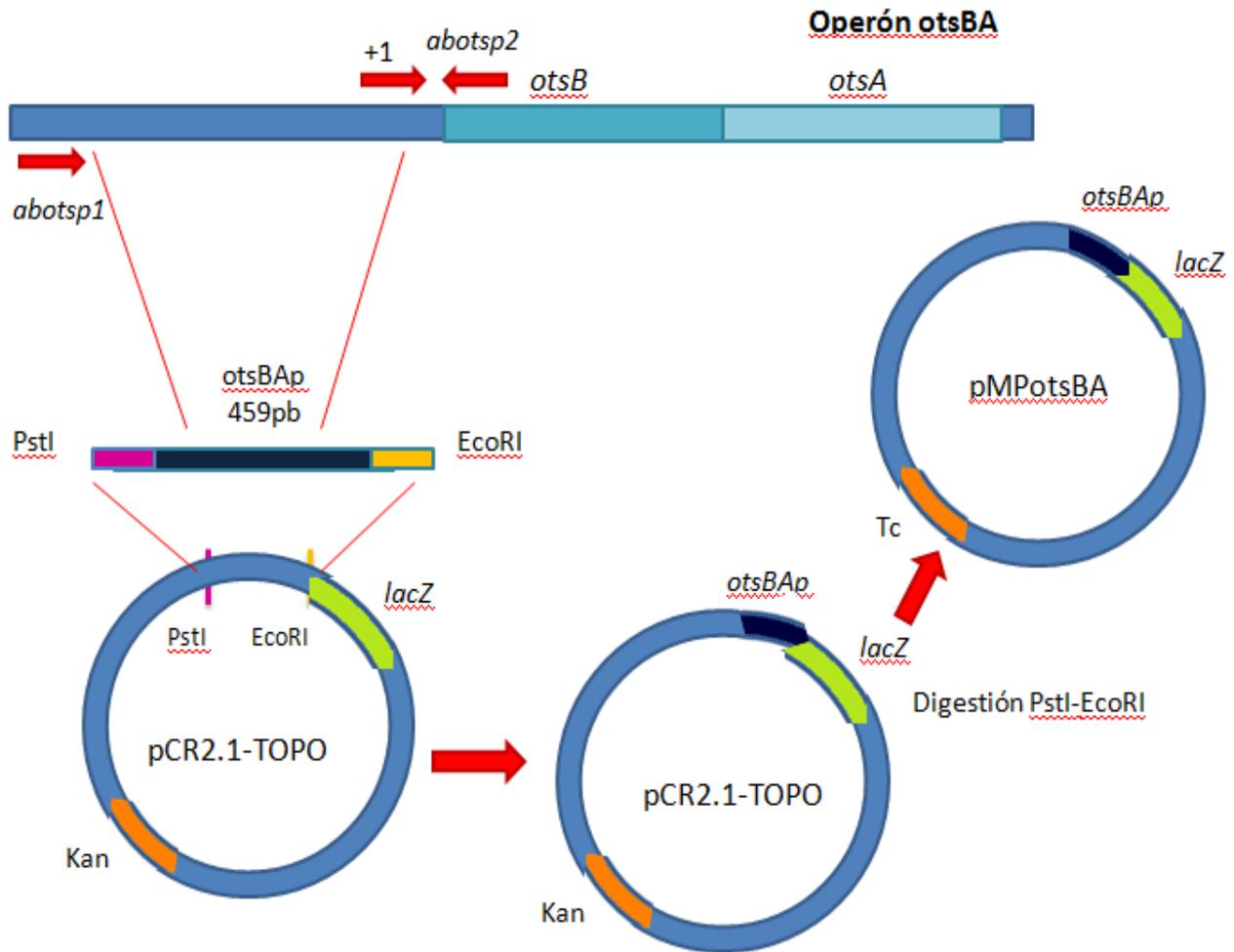


Fig. 7. Clonación de la región reguladora de operón *otsBA* en el plásmido pMP220.

Expresión de la fusión transcripcional *otsBp-lacZ* en presencia de etanol.

Con el fin de determinar si el etanol al 3% era capaz de inducir la actividad en el promotor presente en el plásmido pMP_otsBA, se procedió a transformar la cepa silvestre de *A. baumannii* con el plásmido pMP_otsBA. Se seleccionó una colonia resistente a Tc, la cual mostró una coloración azul en presencia de X-gal. Esta cepa fue utilizada para determinar la cantidad de β -galactosidasa producida en presencia y en ausencia de etanol al 3%.

En la figura 8, se muestran las actividades de β -galactosidasa obtenidas a partir de cultivos crecidos a diferentes tiempos después de añadir etanol al 3%. Se puede observar que en presencia de etanol, la actividad de β -galactosidasa aumenta desde el minuto 25 al compararla con la actividad presente en las células sin etanol, el aumento varía dependiendo del tiempo, siendo de un 92% a los 25min, 117% a los 45 min y 78% a los 75 min. Con base a estos resultados, podemos concluir que sí existe un aumento en la actividad del promotor *otsBA* debido al estímulo por etanol al 3%. No obstante también se observa que la actividad de β -galactosidasa también aumenta con el tiempo, en los cultivos que no contienen etanol aunque en menor medida. A partir de este resultado podemos inferir que la expresión del operón *otsBA* ocurre constantemente durante el crecimiento de *A. baumannii* y se ve fuertemente incrementada por la presencia de etanol al 3%.

En el caso del medio LB, se observó que en presencia de etanol, la actividad de β -galactosidasa presentó aumento de un 25% a partir de los 25 min de incubación en presencia del estímulo y en la actividad del promotor de *otsBA*, este se hizo más marcado a los tiempos 45 min con un aumento del 49% y 75 min con un 67% (Fig. 9).

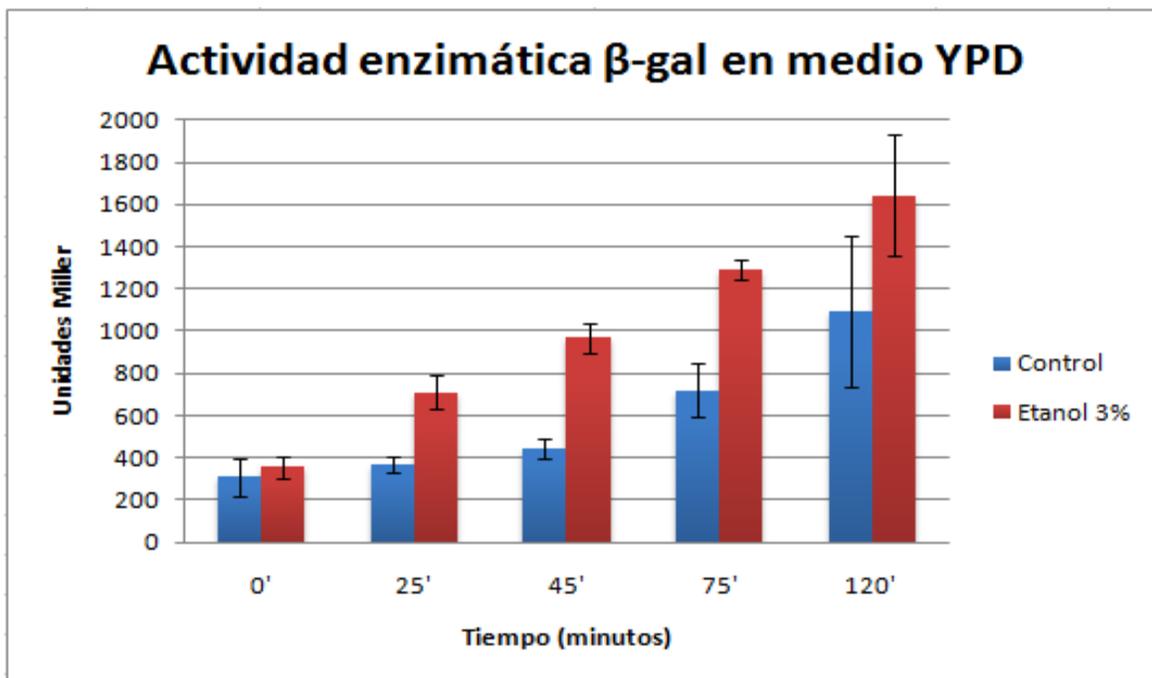


Fig. 8. Actividad de β -galactosidasa de la cepa *A. baumannii*/pMP_otsBA, crecida en medio YPD en ausencia (azul) o presencia (rojo) de etanol al 3%. El etanol fue añadido al tiempo 0, y se tomaron muestras a los tiempos indicados en el figura.

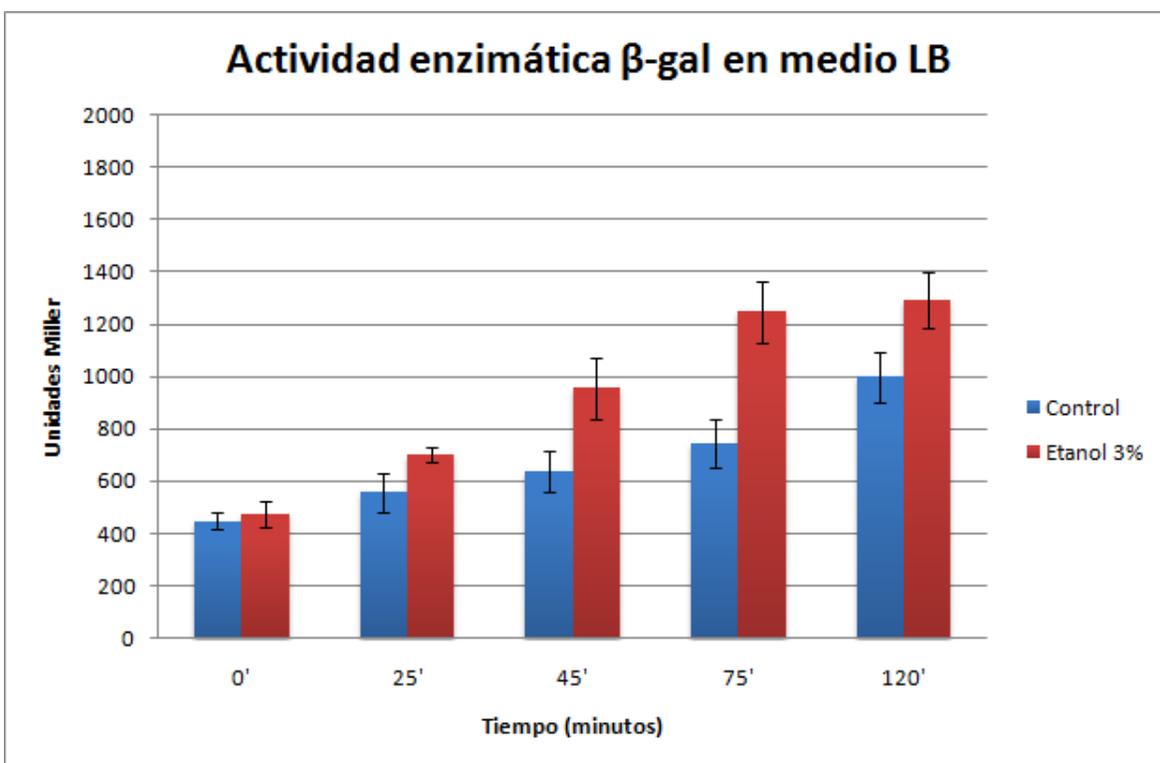


Fig. 9. Actividad de β -galactosidasa de la cepa *A. baumannii*/pMP_otsBA, crecida en medio LB en ausencia (azul) o presencia (rojo) de etanol al 3%. El etanol fue añadido al tiempo 0, y se tomaron muestras a los tiempos indicados en el figura.

Parece no haber una relación entre la expresión del operon *otsBA* en presencia de etanol y la composición del medio de cultivo como se muestra en la fig. 10, descartando así la posibilidad de que en medio YPD el cual contiene dextrosa, esta última se utilice como sustrato para la síntesis de trehalosa.

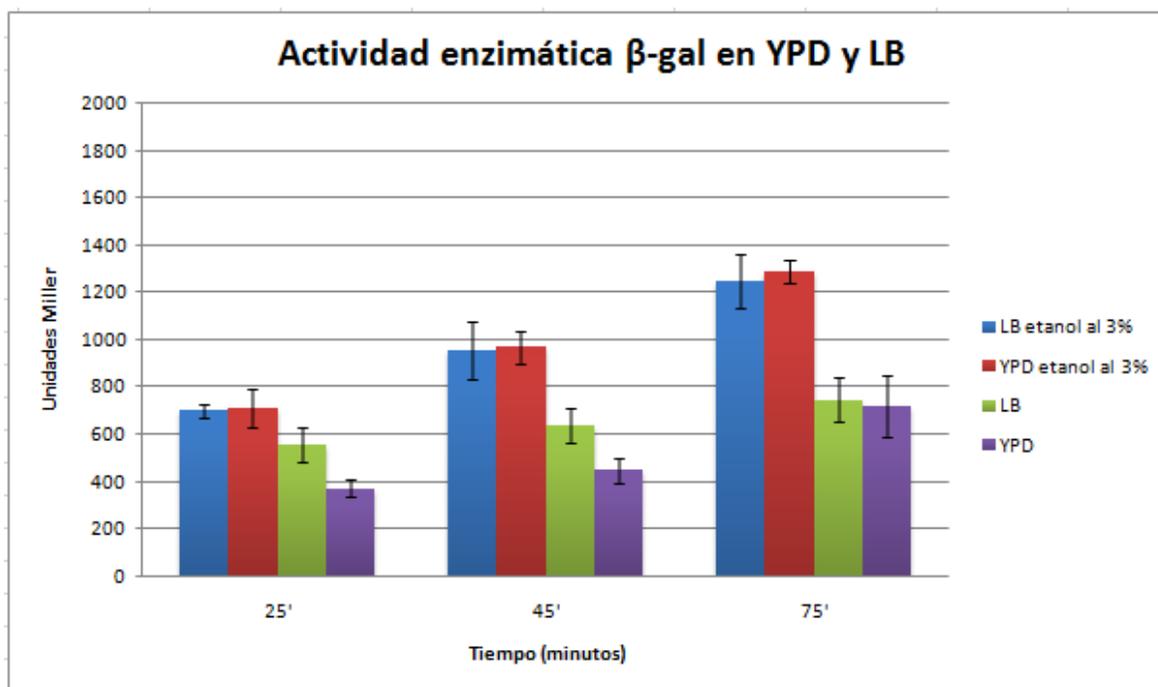


Fig. 10. Actividad de β-galactosidasa de la cepa *A. baumannii*/pMP_otsBA, crecida en medio LB en presencia de etanol (azul) y ausencia (verde) y en medio YPD en presencia de etanol (rojo) y ausencia (morado). Comparativa de las actividades enzimáticas en ambos medios de cultivo tomando solo tiempos con desviaciones estándar significativas.

Expresión de la fusión transcripcional *otsBp-lacZ* en presencia de NaCl.

Ha sido reportado que durante el estrés osmótico y durante la fase estacionaria de crecimiento ocurre la síntesis de trehalosa⁹⁷. Nos planteamos determinar si en *A. baumannii*, la exposición a 2.5% NaCl promueve la expresión del operón *otsBA*.

Para observar si existía alguna diferencia en el crecimiento del cultivo provocada por la inclusión de NaCl al 2.5%, tomamos muestras del cultivo a diferentes tiempos a partir del estímulo y medimos la D.O.₆₀₀. (Fig. 11). Se encontró que a partir de los 75 min post estímulo existe un ligero decremento en el crecimiento del cultivo con NaCl al 2.5%

(Fig. 11). Al igual que en el caso de los experimentos realizados en presencia de etanol, esta reducción en el crecimiento podría deberse a un desvío de la energía de las células para tratar de contrarrestar el efecto del NaCl 2.5%. Sin embargo, dadas las desviaciones estándar, las diferencias no son significativas, y que la presencia del NaCl no afecta el crecimiento.

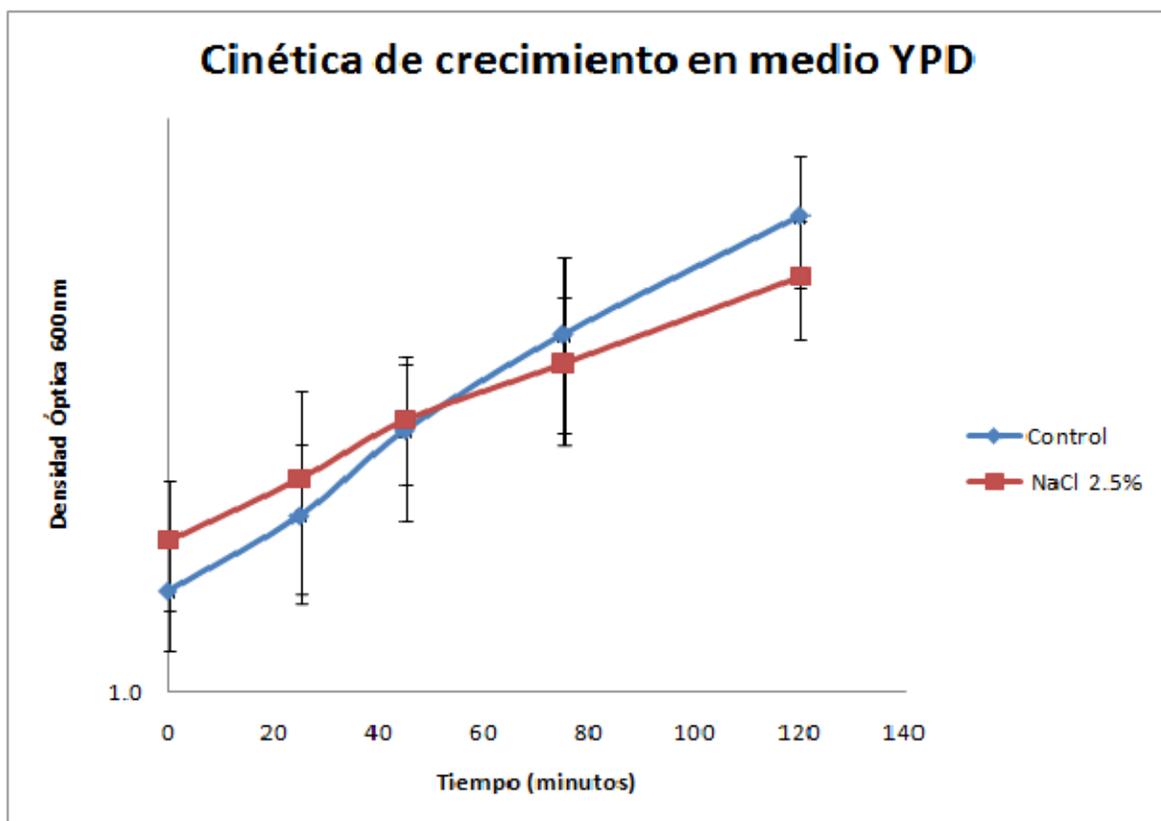


Fig. 11. Cinética de crecimiento de *A. baumannii* en ausencia (rombos) y presencia (cuadros) de NaCl 2.5%, en medio YPD.

Se procedió a determinar la actividad de β -galactosidasa de la cepa de *A. baumannii* que lleva el plásmido pMP_otsBA, en ausencia y en presencia de NaCl. Como se puede observar en la figura 12, la presencia de NaCl provocó un moderado incremento en la cantidad de β -galactosidasa de un 60% a los 25 min, 74% a los 45 min y 63% a los 75min. Este resultado sugiere que el estrés osmótico también contribuye a estimular la transcripción del operón *otsBA*.

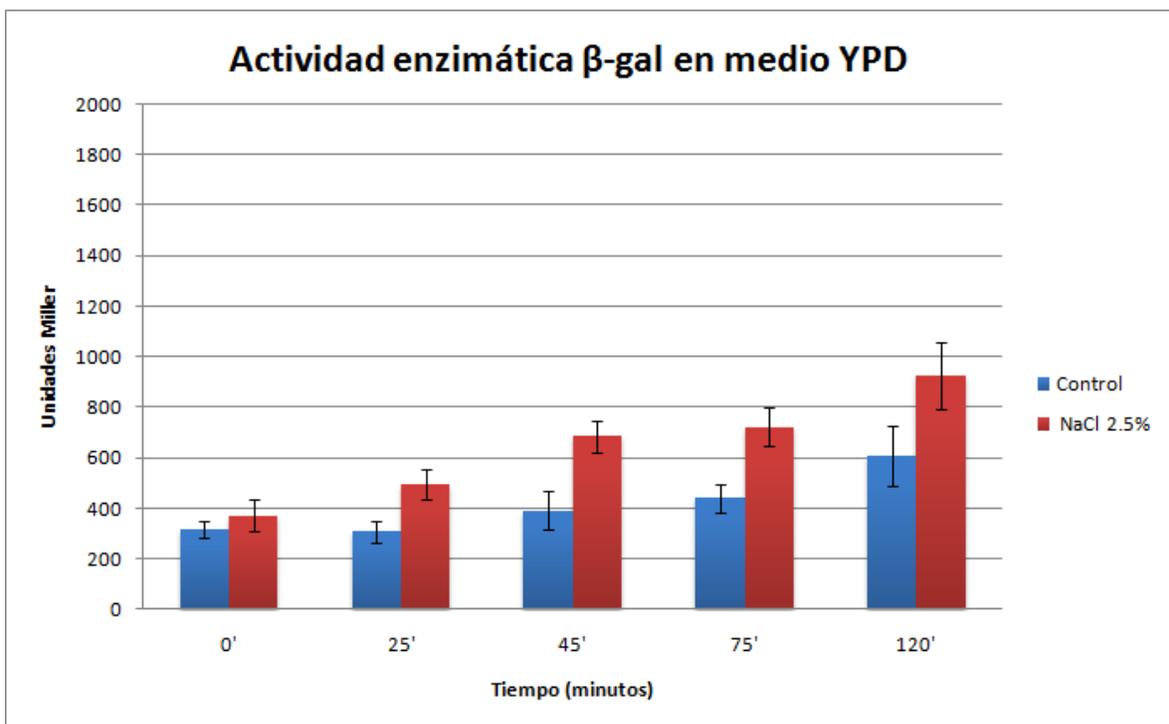


Fig. 12. Actividad enzimática de β -galactosidasa en ausencia (azul) y en presencia (rojo) de NaCl 2.5%, en medio YPD.

Sin duda alguna se observó que el etanol al 3% incrementa los niveles de actividad en el promotor *otsBA* pero la pregunta: ¿A qué tipo de estrés se debe éste incremento?, puede contestarse de varias formas. Una posibilidad es que este compuesto podría actuar como un osmolito que al desequilibrar la concentración del medio extracelular provoque un flujo de agua del interior hacia el exterior de la célula por ósmosis; por eso realizamos un experimento donde utilizamos NaCl al 2.5% para provocar un estrés osmótico y ver si este tipo de estrés era capaz de inducir la actividad del promotor *otsBA*. Los resultados de las pruebas de estrés osmótico por NaCl 2.5% muestran que, al igual que en el caso del etanol, existe un incremento en la actividad del promotor *otsBA*, esto significa que la hipótesis acerca del etanol actuando como osmolito pudiera ser correcta ya que también el NaCl 2.5% es capaz de promover la actividad de éste promotor aunque en menor medida que el etanol.

Otra explicación de por qué el etanol al 3% induce la actividad del promotor *otsBA* podría deberse a que el grupo alcohol genera radicales libres en la célula poniéndola ante un estrés de tipo oxidativo. Esta hipótesis explicaría también el por qué el gen que codifica para la catalasa es otro de los genes que incrementan su transcripción con etanol al 3% (resultados del laboratorio no publicados). Con el fin de evaluar esta posibilidad, se realizó un experimento con peróxido de hidrógeno en dos concentraciones y se evaluó la actividad del promotor *otsBA* utilizando el plásmido pMP_*otsBA*.

En las pruebas realizadas con peróxido de hidrógeno con diferentes concentraciones (5 y 10 mM durante 20 min), se encontró que no hubo un incremento en la actividad debida al promotor *otsBA* en comparación con el control (Fig. 13), esto podría deberse a que la concentración del peróxido no fue lo suficientemente alta como para poder provocar un estrés oxidativo, o a que el tiempo en el cual se tomó la muestra no fue el adecuado, ya que el efecto del peróxido pudo haber sido inmediato y posteriormente pudo haber disminuido la intensidad de la respuesta (asumiendo que la respuesta ante el estímulo presenta un punto máximo a partir del cual disminuye).

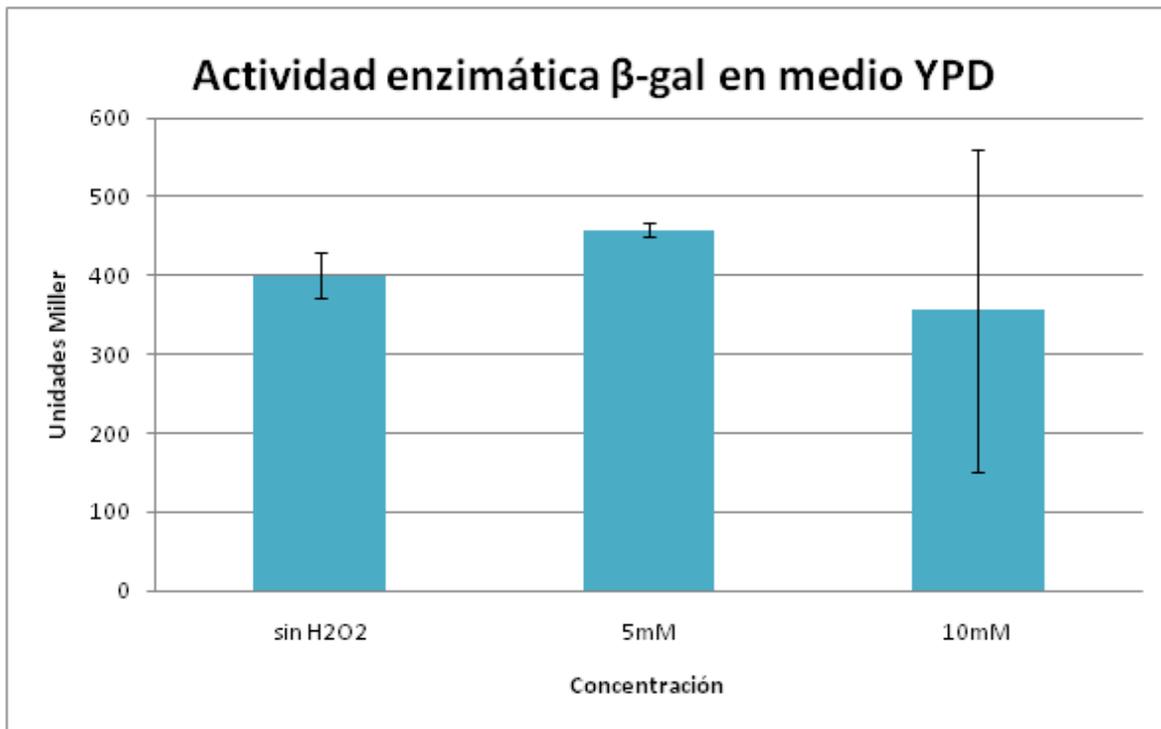


Fig. 13. Actividad de β-galactosidasa de la cepa *A. baumannii*/pMP_otsBA, en ausencia o presencia de 5 y 10 mM peróxido de hidrógeno.

Para descartar la posibilidad de que las células se estuvieran lisando por efecto del peróxido de hidrogeno, se llevó a cabo la determinación del número de células viables después de 20 min de exposición al peróxido de hidrógeno. En las cajas sembradas se halló que el número de colonias por tratamiento era muy similar entre 0 y 5 mM (tabla 2), lo que ayudó a descartar la hipótesis de que en presencia de peróxido de hidrógeno el promotor *otsBA* si pudiera ser inducido, pero que dado el número de células lisadas por el estímulo, este efecto no fuera detectable.

Tabla.2 Cuentas viables en diferentes concentraciones de peróxido de hidrógeno.

Concentración de H ₂ O ₂	ufc/mL
Sin H ₂ O ₂	5.16x10 ⁸
5mM H ₂ O ₂	4.56x10 ⁸
10 mM H ₂ O ₂	2.6x10 ⁷

Inmunodetección de la proteína carbonilada

A pesar de que los resultados anteriores indican que el peróxido de hidrógeno no induce la expresión del operón *otsBA*, aún es posible que el etanol al 3% induzca otro tipo de estrés oxidativo, que por un lado incrementa la síntesis de la catalasa y por el otro la síntesis de la trahalosa. Con el fin de explorar esta posibilidad, se llevó a cabo un ensayo de Western blot, para determinar la presencia de proteínas carboniladas generadas por etanol al 3% durante 25 min.

En la inmunodetección realizada con el kit OxyBlot de la compañía Millipore, encontramos que en presencia de etanol al 3%, es posible detectar proteínas de alto peso molecular que reaccionaron con los anticuerpos (Fig. 14), esto quiere decir que el etanol sí es capaz de provocar la acumulación de proteínas carboniladas, en contraste con el peróxido de hidrógeno, en donde no se observa una reacción con el anticuerpo y esto puede ser por lo previamente explicado de que es necesario una mayor dosis de peróxido de hidrógeno o el tiempo al cual se tomó la muestra, las proteínas carboniladas ya se encontraban degradadas.

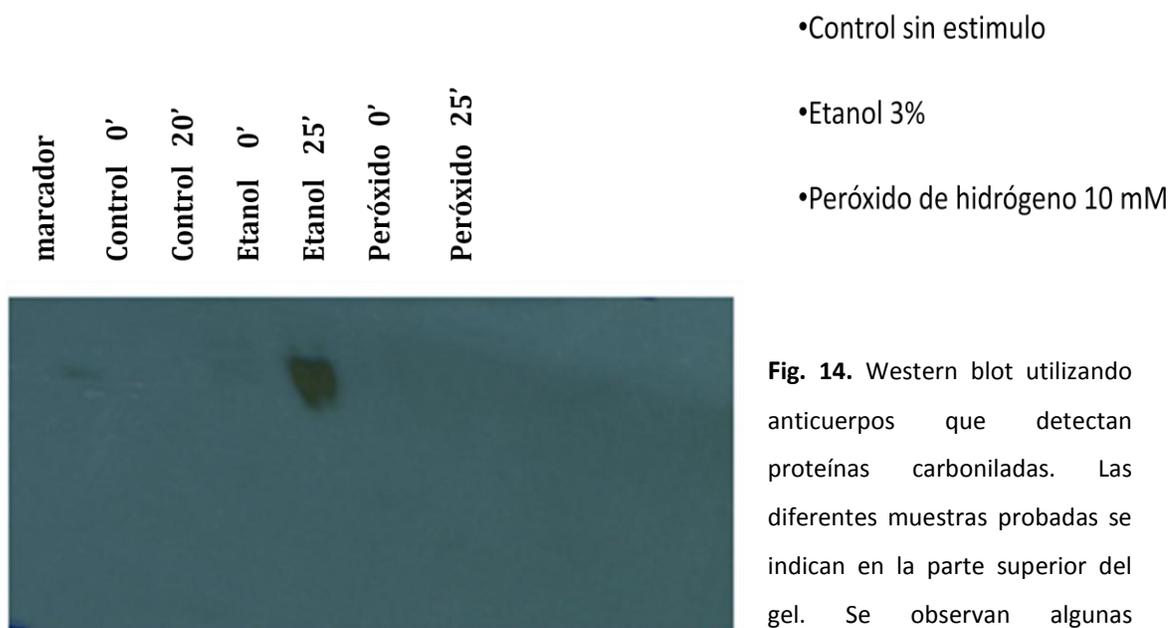


Fig. 14. Western blot utilizando anticuerpos que detectan proteínas carboniladas. Las diferentes muestras probadas se indican en la parte superior del gel. Se observan algunas

proteínas de alto peso molecular que corresponden al carril donde fue cargada la muestra con el estímulo de etanol tras haber transcurrido 25 min.

A partir de los resultados obtenidos en este trabajo, podemos postular que el etanol al 3% provoca la inducción del operón *otsBA* debido al estrés osmótico y oxidativo que este metabolito genera.

En artículos previamente citados en la introducción, se menciona que la síntesis de trehalosa también es inducida mediante el estrés por desecación y el estrés térmico. En este sentido, el alcohol como agente químico desnaturaliza proteínas y deshidrata a las células, entrando en ellas y desplazando el agua, haciendo imposible para estas continuar con su metabolismo. Asimismo, en muchos de los casos en que se ha reportado un aumento en la síntesis de trehalosa, ésta se relaciona con la falta de agua, ya sea en el estrés osmótico donde ésta sale de la célula para tratar de equilibrar la concentración de un medio extracelular saturado, estrés por desecación donde no hay agua, o durante el estrés térmico, por altas temperaturas donde el agua puede evaporarse o a bajas temperaturas donde ésta se cristaliza y deja de encontrarse biodisponible para que las células la utilicen. En conjunto, estos hechos parecen apuntar a que la inducción de los genes *otsBA* ocurre cuando la célula percibe escasez de agua.

Conclusiones

El etanol al 3% incrementa la actividad del promotor de los genes *otsBA*

El NaCl al 2.5 % incrementa la actividad del promotor de los genes *ostBA*

El etanol al 3% parece provocar la acumulación de proteínas carboniladas

Perspectivas

Determinar la cantidad intracelular de las proteínas trehalosa 6-fosfato sintetasa y trehalosa 6-fosfato fosfatasa presente en las diferentes condiciones de estrés aquí tratadas.

Determinar la cantidad de trehalosa intracelular presente para las diferentes condiciones de estrés aquí tratadas.

Referencias

1. Baumann P, Doudoroff M, Stanier RY (1968) A study of the Moraxella group. II. Oxidative-negative species (genus *Acinetobacter*). J Bacteriol 95: 1520–1541.
2. Bergogne-Bérezin, E., and K. J. Towner (1996). *Acinetobacter* spp. as nosocomial pathogens: microbiological, clinical and epidemiological features. Clin. Microbiol. Rev. 9:148–165.
3. Juni E (1978) Genetics and physiology of *Acinetobacter*. Annu Rev Microbiol 32:349–371.
4. Chastre, J. (2003). Infections due to *Acinetobacter baumannii* in the ICU. Semin. Respir. Crit. Care Med. 24:69–78.
5. Hujer KM, Hujer AM, Hulten EA, Bajaksouzian S, Adams JM, et al. (2006) Analysis of antibiotic resistance genes in multidrug-resistant *Acinetobacter* sp. isolates from military and civilian patients treated at the Walter Reed Army Medical Center. Antimicrob Agents Chemother 50: 4114–4123.
6. Tien HC, Battad A, Bryce EA, Fuller J, Mulvey M, et al. (2007). Multi-drug resistant *Acinetobacter* infections in critically injured Canadian forces soldiers. BMC Infect Dis 7: 95.
7. Coelho, J. M., N. Woodford, J. Turton, and D. M. Livermore. (2004). Multiresistant *Acinetobacter* in the UK: how big a threat? J. Hosp. Infect. 58: 167–169.
8. Van Looveren, M., H. Goossens, and the ARPAC Steering Group. (2004). Antimicrobial resistance of *Acinetobacter* spp. in Europe. Clin. Microbiol. Infect. 10:684–704.
9. Fagon JY, Chastre J, Domart Y, Trouillet JL, Gibert C (1996) Mortality due to ventilator-associated pneumonia or colonization with *Pseudomonas* or *Acinetobacter* species: assessment by quantitative culture of samples obtained by a protected specimen brush. Clin Infect Dis 23: 538–542.
10. Metan G, Alp E, Aygen B, Sumerkan B (2007) *Acinetobacter baumannii* meningitis in post-neurosurgical patients: clinical outcome and impact of carbapenem resistance. J Antimicrob Chemother 60: 197–199.
11. Wisplinghoff H, Bischoff T, Tallent SM, Seifert H, Wenzel RP, et al. (2004) Nosocomial bloodstream infections in US hospitals: analysis of 24,179 cases from a prospective nationwide surveillance study. Clin Infect Dis 39: 309–317.
12. Seifert H, Strate A, Pulverer G (1995) Nosocomial bacteremia due to *Acinetobacter baumannii*. Clinical features, epidemiology, and predictors of mortality. Medicine (Baltimore) 74: 340–349.
13. Knapp S, Wieland CW, Florquin S, Pantophlet R, Dijkshoorn L, et al. (2006) Differential roles of CD14 and toll-like receptors 4 and 2 in murine *Acinetobacter pneumonia*. Am J Respir Crit Care Med 173: 122–129.

14. Erridge C, Moncayo-Nieto OL, Morgan R, Young M, Poxton IR (2007) *Acinetobacter baumannii* lipopolysaccharides are potent stimulators of human monocyte activation via Toll-like receptor 4 signalling. *J Med Microbiol* 56
15. Choi CH, Lee EY, Lee YC, Park TI, Kim HJ, et al. (2005) Outer membrane protein 38 of *Acinetobacter baumannii* localizes to the mitochondria and induces apoptosis of epithelial cells. *Cell Microbiol* 7: 1127–1138.
16. Choi CH, Hyun SH, Lee JY, Lee JS, Lee YS, et al. (2008) *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A targets the nucleus and induces cytotoxicity. *Cell Microbiol* 10: 309–319.
17. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA (2003) Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology* 149: 3473–3484.
18. Zimble DL, Penwell WF, Gaddy JA, Menke SM, Tomaras AP, et al. (2009) Iron acquisition functions expressed by the human pathogen *Acinetobacter baumannii*. *Biometals* 22: 23–32.
19. Dorsey CW, Tomaras AP, Connerly PL, Tolmasky ME, Crosa JH, et al. (2004) The siderophore-mediated iron acquisition systems of *Acinetobacter baumannii* ATCC 19606 and *Vibrio anguillarum* 775 are structurally and functionally related. *Microbiology* 150: 3657–3667.
20. Neidhardt F, VanBogelen RA (1987) Heat shock response. In: *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium.*, vol. 2 (Neidhardt, F. C., Ingraham, J. L., K.B.Low, Magasanik, B., Schaechter, M. and Umberger, E., eds.), pp. 1334-1345, American Society of Microbiology, Washington, D.C.
21. Blom A, Harder W, Matin A (1992) Unique and overlapping pollutant stress proteins of *Escherichia coli*. *Appl Env Microbiol* 58:331-334
22. Hecker M, Schumann W, Volker U (1996) Heat-shock and general stress response in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol* 19:417-428
23. Muffler A, Barth M, Marschall C, Hengge Aronis R (1997) Heat-shock regulation of sigmaS turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigmaS and sigma32 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:445-452
24. Van bogelen R, Kelley PM, Neidhardt F (1987) Differential induction of heat-shock, SOS and oxidation stress regulons and accumulation of nucleotides in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 169:26-32
25. Van Dyk TK, Reed TR, Vollmer AC, LaRossa RA (1995) Synergistic induction of the heat-shock response in *Escherichia coli* by simultaneous treatment with chemical inducers. *J Bacteriol* 177:6001-6004
26. Bohne J, Sokolovic Z, Goebel W (1994) Transcriptional regulation of *prfA* and PrfA-regulated virulence genes in *Listeria monocytogenes*. *Mol Microbiol* 11:1141- 1150

27. Brunham RC, Peeling RW (1994) *Chlamydia trachomatis* antigens: role in immunity and pathogenesis. *Infect Agents Dis* 3:218-233
28. Karunasagar I, Lampidis R, Goebel W, Kreft J (1997) Complementation of *Listeria seeligeri* with the *plcA-prfA* genes from *L. monocytogenes* activates transcription of seeligerolysin and leads to bacterial escape from the phagosome of infected mammalian cells. *FEMS Microbiol Lett* 146:303-310
29. Kaufmann SH (1992) Heat-shock proteins in health and disease. *Int J Clin Lab Res* 21:221-226
30. Lathigra RB, Butcher PD, Garbe TR, Young DB (1991) Heat-shock proteins as virulence factors of pathogens. *Curr Top Microbiol Immunol* 167:125-143
31. McKay DB, Lu CY (1991) Listeriolysin as a virulence factor in *Listeria monocytogenes* infection of neonatal mice and murine decidual tissue. *Infect Immun* 59:4286-4290
32. Schurr MJ, Deretic V (1997) Microbial pathogenesis in cystic fibrosis: co-ordinate regulation of heat-shock response and conversion to mucoidy in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mol Microbiol* 24:411-420
33. Muffler A, Barth M, Marschall C, Hengge Aronis R (1997) Heat-shock regulation of sigmaS turnover: a role for DnaK and relationship between stress responses mediated by sigmaS and sigma32 in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 179:445-452
34. Cabiscol E, Tamarit J, Ros J (2000) Oxidative stress in bacteria and protein damage by reactive oxygen species. *INTERNATL MICROBIOL* 3:3-8
35. Humpries KM, Sweda LI (1998) Selective inactivation of α -ketoglutarate dehydrogenase: reaction of lipoic acid with 4-hydroxy-2-nonenal. *Biochemistry* 37:15835-15841
36. Esterbauer H, Schaur RJ, Zollner H (1991) Chemistry and biochemistry of 4 hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes. *Free Rad. Biol Med* 11:81-128
37. Inactivation of key metabolic enzymes by mixed function oxidation reactions: possible implication in protein turnover and ageing. *Proc Natl Acad Sci USA* 80:1521-1525
38. Stadtman ER (1990) Metal ion-catalyzed oxidation of proteins: biochemical mechanism and biological consequences. *Free Rad Biol Med* 9:315-325
39. Butterfield DA, and Stadtman ER. Protein oxidation processes in aging brain. In: *Advances in Cell Aging and Gerontology*. vol 2, edited by Timiras PS and Bittar EE. Greenwich, CT: JAI Press, 1997, pp. 161-191.
40. Levine RL. Carbonyl modified proteins in cellular regulation, aging, and disease. *Free Radic Biol Med* 32: 790-796, 2002.
41. Stadtman ER and Levine RL. Protein oxidation. *Ann NY Acad Sci* 899: 191-208, 2000.

42. Sies, H. (1993) *Eur. J. Biochem*, 215, 213-219.
43. Halliwell, B., and Gutteridge, J. M. C. (1989) *Free Radicals in Biology and Medicine*, Clarendon Press, Oxford.
44. Billi, D., and M. Potts. 2002. Life and death of dried prokaryotes. *Res. Microbiol.* 153:7-12.
45. Billi, D., and M. Potts. 2000. Life without water: responses of prokaryotes to desiccation, p. 181-192. *In* K. B. Storey and J. M. Storey (ed.), *Environmental stressors and gene responses*. Elsevier Science BV, Amsterdam, The Netherlands.
46. Deaker, R., R. J. Roughley, and I. R. Kennedy. 2004. Legume seed inoculation technology—a review. *Soil Biol. Biochem.* 36:1275-1288.
47. Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58:755-805
48. Welsh, D. T. 2000. Ecological significance of compatible solute accumulation by microorganisms: from single cells to global climate. *FEMS Microbiol. Rev.* 24:263-290.
49. Mattimore, V., and J. R. Battista. 1996. Radioresistance of *Deinococcus radiodurans*: functions necessary to survive ionizing radiation are also necessary to survive prolonged desiccation. *J. Bacteriol.* 178:633-637.
50. Shirkey, B., D. P. Kovarcik, D. J. Wright, G. Wilmoth, T. F. Prickett, R. F. Helm, E. M. Gregory, and M. Potts. 2000. Active Fe-containing superoxide dismutase and abundant SodF mRNA in *Nostoc commune* (cyanobacteria) after years of desiccation. *J. Bacteriol.* 182:189-197.
51. Potts, M. 1994. Desiccation tolerance of prokaryotes. *Microbiol. Rev.* 58:755-805.
52. Stead, D., and S. F. Park. 2000. Roles of Fe superoxide dismutase and catalase in resistance of *Campylobacter coli* to freeze-thaw stress. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:3110-3112.
53. C.W. Bourque, Central mechanisms of osmosensation and systemic osmoregulation, *Nat. Rev. Neurosci.* 9 (2008) 519–531.
54. M.B. Burg, J.D. Ferraris, Intracellular organic osmolytes: function and regulation, *J. Biol. Chem.* 283 (2008) 7309–7313.
55. K.P. Choe, K. Strange, Molecular and genetic characterization of osmosensing and signal transduction in the nematode *Caenorhabditis elegans*, *FEBS J.* 274 (2007) 5782–5789.
56. S. Hohmann, Osmotic stress signaling and osmoadaptation in yeasts, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66 (2002) 300–372.
57. F. Lang, Mechanisms and significance of cell volume regulation, *J. Am. Coll. Nutr.* 6 (2007) 613S–623S.

58. D.W. Bolen, Protein stabilization by naturally occurring osmolytes, *Meth. Mol. Biol.* 168 (2001) 17–36.
59. K. Altendorf, I.R. Booth, J.D. Gralla, J.-C. Greie, A.Z. Rosenthal, J.M. Wood, Module 5.4.5 Osmotic Stress, in: A. Böck, R. Curtiss III, J.B. Kaper, P.D. Karp, F.C. Neidhardt, T. Nyström, J.M. Schlauch, C.L. Squires (Eds.), American Society for Microbiology, 2009.
60. M.T. Record Jr., E.S. Courtenay, D.S. Cayley, H.J. Guttman, Responses of *E. coli* to osmotic stress: large changes in amounts of cytoplasmic solutes and water, *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998) 143–148.
61. M.T. Record Jr., E.S. Courtenay, S. Cayley, H.J. Guttman, Biophysical compensation mechanisms buffering *E. coli* protein-nucleic acid interactions against changing environments, *Trends Biochem. Sci.* 23 (1998) 190–194.
62. Nurmikko, V. 1956. Biochemical factors affecting symbiosis among bacteria. *Experientia* 12:245–249.
63. Smith MG, Des Etages SG, Snyder M (2004) Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Mol Cell Biol* 24: 3874–3884.
64. Laura Camarena, Vincent Bruno, Ghia Euskirchen Sebastian Poggio, Michael Snyder (2010) Molecular Mechanisms of Ethanol-Induced Pathogenesis Revealed by RNA-Sequencing. *PLOS pathogens*
65. Elbein AD, Pan YT, Pastuszak I, Carroll D (2003) New insights on trehalose: a multifunctional molecule. *Glycobiology* 13:17R–27R
66. Sussman, B.T. Lingappa Role of trehalose in ascospores of *Neurospora tetrasperma*. *Science*, 130 (1959), p. 1343
67. Elbein, M. Mitchell, Levels of glycogen and trehalose in *Mycobacterium smegmatis* and the purification and properties of the glycogen synthetase *Journal of Bacteriology*, 113 (1973), pp. 863–873.
68. Elbein. The metabolism of α,α -trehalose R.S. Tipson, D. Horton (Eds.), *Advances in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry*, vol. 30, Academic Press, New York (1974), pp. 227–256.
69. Wyatt, G.F. Kalf. The chemistry of insect hemolymph. II. Trehalose and other carbohydrates *Journal of General Physiology*, 40 (1957), pp. 833–847
70. Clegg, D.R. Evans The physiology of blood trehalose and its function during flight in the blowfly *Journal of Experimental Biology*, 38 (1961), pp. 771–792
71. Crowe, J.F. Carpenter, L.M. Crowe, T.J. Anchordoguy Are freezing and dehydration similar stress vectors? A comparison of modes of interaction of stabilizing solutes with biomolecules. *Cryobiology*, 27 (1990), pp. 219–231

72. Asahina, K.S. Tanno A large amount of trehalose in a frost-resistant insect Nature, 204 (1964), p. 1222
73. Van Dijck, D. Colavizza, P. Smet, J.M. Thevelein Differential importance of trehalose in stress resistance in fermenting and nonfermenting *Saccharomyces cerevisiae* cells Applied Environmental Microbiology, 61 (1995), pp. 109–115
74. Adams, R.P., Kendall, E., Kartha, K.K., 1990. Comparison of free sugars in growing and desiccated plants of *Selaginella lepidophylla*. Biochemical Systematics and Ecology 18, 107–110.
75. Clegg The origin of trehalose and its significance during the formation of encysted dormant embryos of *Artemia salina* Comparative Biochemistry and Physiology, 14 (1965), pp. 135–143
76. C. Womersley, L. Smith Anhydrobiosis in nematodes. I. The role of glycerol, myo-inositol and trehalose during dessication Comparative Biochemical Physiology, 70B (1981), pp. 579–586
77. Y.M. Newman, S.G. Ring, C. Colaco The role of trehalose and other carbohydrates in biopreservation Biotechnology and Genetic Engineering Reviews, 11 (1993), pp. 263–294
78. Leslie, E. Israeli, B. Lighthart, J.H. Crowe, L.M. Crowe Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying Applied Environmental Microbiology, 61 (1995), pp. 3592–3597
79. McIntyre HJ, Davies H, Hore TA, Miller SH, Dufour JP, Ronson CW (2007) Trehalose biosynthesis in *Rhizobium leguminosarum* bv. *trifolii* and its role in desiccation tolerance. Appl Environ Microbiol 73:3984–3992
80. Kaasen J, McDougall J, Strøm AR. Analysis of the otsBA operon for osmoregulatory trehalose synthesis in *Escherichia coli* and homology of the OtsA and OtsB proteins to the yeast trehalose-6-phosphate synthase/phosphatase complex Gene. 1994 Jul 22;145(1):9-15.
81. Colaço, B. Roser Trehalose — a multifunctional additive for food preservation M. Mathlouthi (Ed.), Food Packaging and Preservation, Blackie Professional, London (1995), pp. 123–140
82. Crowe, L.M. Crowe Preservation of mammalian cells —learning nature’s tricks Nature Biotechnology, 18 (2000), pp. 145–147
83. Franks Freeze drying from empiricism to predictability Cryoletters, 11 (1990), pp. 93–110
84. Lins D.R., Trehalose–Protein Interaction in Aqueous Solution, proteins 55-177
85. Elbein, A. D. ; PAN, Y, T.; PASTUSZAK 2003. New insights on trehalose a multifunctional molecule Glycobiology 13. 17R-27R.

86. Crowe, J.H. et al. 2001. The trehalose myth revisited: introduction to a symposium on stabilization of cells in the dry state. *Cryobiology* 43: 89-105.
87. Po-Lin Chiua y Deborah F. Kelly. The use of trehalose in the preparation of specimens for molecular electron microscopy. *Micron*, December 2011, Pages 762–772
88. Colaço, C.; Sen, S.; Thangavelu, M.; Pinder, S.; Roser, B. Extraordinary stability of enzymes dried in trehalose: Simplified molecular biology. *Biotechnology* 1992, 10, 1007-1111.
89. Roser, B.; Colaço, C. A sweeter way to fresh food. *New Sci.* 1993, 138, 25-28.
90. Kidd, G.; Devorak, J. Trehalose is a sweet target for agbiotech. *Biotechnology* 1994, 12, 1328-1329.
91. Eroglu, A.; Russo, M.J.; Biegansky, R.; Fowler, A.; Cheley, S.; Bayley, H.; Toner, M. Intracellular trehalose improves the survival of cryopreserved mammalian cells. *Nat. Biotechnol.* 2000, 18, 163-167.
92. Guo, N.; Puhlev, I.; Brown, D.R.; Mansbridge, J.; Levine, F. Trehalose expression confers desiccation tolerance on human cells. *Nat. Biotech.* 2000, 18, 168-171.
93. Avonce, N.; Leyman, B.; Mascorro Gallardo, J.O.; van Dijck, P.; Thevelein, J.; Iturriaga, G. The *Arabidopsis* trehalose-6-P synthase *AtTPS1* gene is a regulator of glucose, abscisic acid, and stress signaling. *Plant Physiol.* 2004, 136, 3649-3659. *Int. J. Mol. Sci.* 2009, 10, 3806
94. Leyman, B.; Avonce, N.; Ramon, M.; van Dijck, P.; Iturriaga, G.; Thevelein, J.M. Trehalose-6-phosphate synthase as an intrinsic selection marker for plant transformation. *J. Biotechnol.* 2006, 121, 309-317.
95. Higashiyama, T. Novel functions and applications of trehalose. *Pure Appl. Chem.* 2002, 74, 1263-1269.
96. Spaink HP, Okker RJH, Wijffelman CA, Pees E, Lugtenberg BJJ Promoters in the nodulation region of the *Rhizobium leguminosarum* symbiotic plasmid pRL1J1. *Plant Mol Biol* 9: 27–39.
97. Charlemagne-Gilles Hounsa E. Vincent Brandt, J. Thevelein, S. Hohmann, B. A. Prior Role of trehalose in survival of *Saccharomyces cerevisiae* under osmotic stress *Microbiology* (1998), 144, 671-680.