

00322
119



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

“ESTUDIO DEL EFECTO ANTIBACTERIANO Y ANTIADHERENTE DE EXTRACTOS DE GERANIUM SP.”

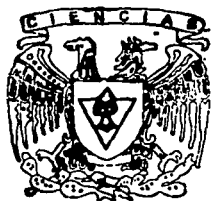
T E S I S

PARA OBTENER EL TITULO DE:
BIOLOGO

PRESENTA
EZEQUIEL MENDOZA JÄNSCH

DIRECTOR DE TESIS:

DR. MANUEL JIMENEZ ESTRADA



FACULTAD DE CIENCIAS
UNAM



2003
FACULTAD DE CIENCIAS
SECCION LICENCIATURA

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



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.



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

NOMBRE: Ezequiel Mendoza

Jansch
FECHA: 18 de Noviembre 2003

FIRMA: [Firma]

DRA. MARÍA DE LOURDES ESTEVA PERALTA
Jefa de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
Presente

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Comunicamos a Usted que hemos revisado el trabajo escrito: "Estudio del efecto antibacteriano y antiadherente de extractos de *Geranium Sp.*"

realizado por Ezequiel Mendoza Jansch con número de cuenta 09527013-7
quién cubrió los créditos de la carrera de Biología
Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis
Propietario

Dr. Manuel Jiménez Estrada

Propietario

Dra. Ma. de los Angeles Sánchez Contreras

Propietario

M. en C. Carlos A. Eslava Campos

Suplente

M. en C. Simón Sánchez García

Suplente

Dr. en C. Jorge Mateo Villaseca Flores

[Firmas manuscritas de los miembros del Consejo Departamental de Biología]

Consejo Departamental de Biología

[Firma]
M. C. Juan Manuel Rodríguez Chávez

FACULTAD DE CIENCIAS



UNIDAD DE ENSEÑANZA
DE BIOLOGÍA

Agradecimientos

Primero quiero agradecer a mi familia (Almendra y Egan) por su apoyo, amor y comprensión, durante la realización de este trabajo. Los amo.

A mis papás por el apoyo que me han dado durante todos mis estudios. Los quiero mucho.

A mis hermanos y familia de Almendra.

Al los Doctores que me han apoyado y enseñado mucho durante la realización del presente trabajo, Dr. Manuel Jiménez Estrada, Dr. Carlos A. Eslava Campos y Dra. Ma. de los Ángeles Sánchez Contreras.

Al Dr. José Molina López por enseñarme a manejar las células HEP-2 y enseñarme el ensayo de adherencia.

Al Lucio Lazada Pérez y Nelly Diego, del Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias, UNAM, por su ayuda en la identificación de los ejemplares de Herbario.

A la Dra. Gilda Ortiz por su amable ayuda en el MEXU.

A todo el laboratorio 2-10 del Instituto de Química y al laboratorio 35 de la Unidad de Investigación y Posgrado de la Facultad de Medicina, UNAM.

Al CONACYT por su apoyo por medio del proyecto 38608 – M con el Título: “Obtención y caracterización de compuestos con actividad antiadherente y antimicrobiana de extractos acuosos de plantas medicinales empleadas para curar la diarrea”.

Índice General

-Resumen	1
-Introducción	3
-Breve historia de la etnobotánica en México	4
-Las plantas y la diarrea	8
-El género <i>Geranium</i>	9
-Usos de los Geranios	11
- Tipos de Diarreas	13
- Importancia de la diarrea en el mundo	14
- Importancia de la diarrea en México	15
- Patógenos causantes de diarrea	16
- <i>Escherichia coli</i> bacteria del yin – yang	18
- Adherencia	21
- <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC)	21
- <i>E. coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	23
- <i>E. coli</i> enteroagregativa (EAEC)	25
- <i>E. coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	27
- <i>E. coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	28
- <i>E. coli</i> que adhiere difusamente (DAEC)	30
-Importancia de <i>Escherichia coli</i> como patógeno causante de la diarrea en México	32
- Planteamiento del problema	35
-Justificación	37
-Objetivo general	39
-Objetivos específicos	39

-Hipótesis.....	39
-Material y método.....	40
-Material vegetal.....	40
-Preparación de extractos.....	40
-Infusión.....	40
-Extracto Acetona/Agua y Etanol/Agua.....	41
-Inhibición de la adherencia.....	41
-Preparación de extractos para adherencia.....	44
-Preparación de inóculo bacteriano.....	44
-Preparación de Células HEP-2.....	46
-Ensayo de adherencia.....	46
-Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC).....	49
-Pruebas estadísticas de χ^2 y t de Student.....	49
-Imágenes.....	50
-Resultados.....	51
-Material vegetal.....	51
-Infusiones y extractos.....	52
-Adherencia.....	52
-Inhibición de la adherencia.....	54
-Análisis estadísticos.....	59
-Prueba de χ^2	59
-Prueba de t de Student Para UFC.....	60
-Daño celular.....	65
-Análisis de Resultados.....	65
-Conclusión.....	73

-Abreviaciones.....	74
-Apéndice 1.....	74
-Medios	74
- Apéndice 2.....	76
-Soluciones y lavado de material.....	76
-Referencias.....	78

Índice de Tablas

-Cuadro1. Rendimiento final de infusiones y extractos de <i>Geranium</i> sp.	52
-Cuadro2. Efecto de inhibición de la adherencia a células HEp-2 inducido por diferentes extractos	54
-Cuadro3. Valores de P de la prueba de χ^2 comparando las diluciones de los diferentes extractos con el control sin extracto para el patrón localizado	59
-Cuadro4. Valores de P de la prueba de χ^2 comparando las diluciones de los diferentes extractos con el control sin extracto para el patrón agregativo.....	59
-Cuadro5. Valores de P de la prueba de χ^2 comparando las diluciones de los diferentes extractos con el control sin extracto para el patrón difuso.....	60
-Cuadro6. Valores de P para la prueba de t de Student comparando las UFC con mayor concentración de los diferentes extractos con el control sin extracto.....	61
-Cuadro7. Alteraciones observadas en las células HEp-2 con los diferentes extractos.....	65

Índice de Figuras

-Diagrama1. Preparación de ensayo de adherencia.....	42
-Diagrama2. Ensayo de adherencia	43
-Figura1. Disposición de células HEP-2, Bacterias de <i>E. coli</i> y concentración de extracto....	45
-Figura2. Disposición de células HEP-2, Bacterias de <i>E. coli</i> y concentración de extracto....	45
-Figura3. Pozos de los cuáles se tomaron 100 µl para hacer el conteo de UFC	48
-Figura 4a. Adherencia localizada	53
-Figura 4b. Adherencia difusa.....	53
-Figura 4c. Adherencia agregativa.....	53
-Figura 5a. Geranio liofilizado (localizado)	56
-Figura 5b. Geranio evaporado (localizado)	56
-Figura 5c. Geranio evaporado sin filtrar (localizado)	56
-Figura 5d. Geranio EtOH / H ₂ O (localizado)	56
-Figura 5e. Geranio Acetona / H ₂ O (localizado).....	56
-Figura 6a. Geranio liofilizado (agregativo)	57
-Figura 6b. Geranio evaporado (agregativo)	57
-Figura 6c. Geranio evaporado sin filtrar (agregativo)	57
-Figura 6d. Geranio EtOH / H ₂ O (agregativo)	57
-Figura 6e. Geranio Acetona / H ₂ O (agregativo).....	57
-Figura 7a. Geranio liofilizado (difuso).....	58
-Figura 7b. Geranio evaporado (difuso).....	58
-Figura 7c. Geranio evaporado sin filtrar (difuso)	58
-Figura 7d. Geranio EtOH / H ₂ O (difuso)	58
-Figura 7e. Geranio Acetona / H ₂ O (difuso).....	58
-Figura 8a. Control del patrón localizado sin extracto.....	62

-Figura 8b. Extracto dilución 1:10 del geranio liofilizado (localizado).....	62
-Figura 8c. Extracto dilución 1:80 del geranio liofilizado (localizado).....	62
-Figura 8d. Extracto dilución 1:100 del geranio liofilizado (localizado).....	62
-Figura 9a. Control del patrón agregativo sin extracto.....	63
-Figura 9b. Extracto dilución 1:10 del geranio liofilizado (agregativo).....	63
-Figura 9c. Extracto dilución 1:80 del geranio liofilizado (agregativo).....	63
-Figura 9d. Extracto dilución 1:100 del geranio liofilizado (agregativo).....	63
-Figura 10a. Control del patrón difuso sin extracto.....	64
-Figura 10b. Extracto dilución 1:10 del geranio liofilizado (difuso).....	64
-Figura 10c. Extracto dilución 1:80 del geranio liofilizado (difuso).....	64
-Figura 10d. Extracto dilución 1:100 del geranio liofilizado (difuso).....	64
-Figura 11a. Colonia anormal del patrón localizado de <i>E. coli</i> adherida a una célula Hep-2..	67
-Figura 11b.. Célula HEP-2 con una colonia normal del patrón localizado de <i>E. coli</i>	67

PAGINACIÓN DISCONTINUA

Resumen

Escherichia coli (*E. coli*) es uno de los agentes causales de diarrea severa en niños menores de cinco años y adultos mayores de 65. La adherencia al epitelio del intestino, es uno de los primeros eventos que realiza la bacteria para colonizar el tracto digestivo. Se han descrito tres distintos tipos o patrones de adherencia en *E. coli*: localizado (caracterizado por la formación de microcolonias sobre la membrana citoplasmática de las células a las que se adhieren), agregativo (caracterizada por la formación de agregados bacterianos, con una apariencia de ladrillos apilados, que se observan adheridas tanto en células como en la superficie del vidrio de la preparación) y difuso (caracterizada por la adherencia de las bacterias a todo el citoplasma celular sin adherirse al vidrio de la preparación).

Tradicionalmente se han utilizado diferentes plantas para combatir enfermedades como la diarrea, el Geranio (*Geranium seemannii*) es una de las más comunes y su uso se remonta a la era prehispánica. En el presente trabajo se analizó la capacidad para inhibir la adherencia, de 5 extractos acuosos de *G. seemannii* (Geranio EtOH / H₂O, Geranio liofilizado, Geranio Evaporado sin filtrar, Geranio evaporado filtrado y Geranio Acetona / H₂O) sobre cepas de referencia de *E. coli* con patrones localizado, agregativo y difuso. Con el objetivo de determinar si el efecto de inhibición de la adherencia que causan los extractos acuosos de *G. seemannii* sobre cepas de *E. coli* a células HEP-2 está relacionado con un efecto antiadherente específico o es debido a la actividad antimicrobiana de los mismos.

Los resultados obtenidos mostraron que la mayoría de los extractos inhiben la adherencia con patrón localizado, excepto el de Geranio EtOH / H₂O que posee compuestos con actividad antimicrobiana. En el

ensayo con la cepa de patrón agregativo se obtuvo inhibición con los extractos de Geranio EtOH / H₂O, Geranio liofilizado y Geranio Evaporado sin filtrar, pero no se observó efecto con Geranio Evaporado filtrado y Geranio Acetona / H₂O. Con respecto al patrón difuso el Geranio evaporado sin filtrar indujo inhibición importante (80%), con respecto al extracto Acetona / H₂O éste presentó efecto antimicrobiano y el extracto Geranio evaporado filtrado no mostró ningún tipo de actividad.

Los resultados obtenidos muestran que *G. seemanni* posee compuestos que interfieren con la adherencia de *E. coli* y otros con efecto antimicrobiano, en conjunto las diferentes actividades identificadas probablemente contribuyen a mejorar el estado clínico de los pacientes infectados con dicha bacteria.

Introducción

Buscar poderes curativos en las plantas es una práctica muy antigua. Personas de todos los continentes por cientos, si no es que por miles de años, han bebido infusiones de plantas endémicas que datan de épocas prehistóricas. Hay evidencias de que los Neanderthals que vivieron 60, 000 años atrás, usaron plantas como la hollyhock que es usada actualmente en Irak, lo cuál indica que estas plantas siguen siendo utilizadas en la etnomedicina en todo el mundo (Marjorie, M. 1999). Nuestro país no es la excepción ya que existe una gran tradición en el uso de plantas como remedios medicinales tal vez debida a la gran diversidad social y biológica de su población.

México es considerado el tercer país después de Brazil y Colombia con mayor diversidad biológica. Son dos zonas topográficas, la Neotropical con elementos florísticos del cálido trópico, y la Holarctica con elementos florísticos de climas templados y fríos, las que convergen en nuestro país lo cuál amplifica la variedad de los organismos, así como la interacción entre éstos. Aunque la flora vascular no está totalmente explorada, se estima que consiste de por lo menos 21,600 especies. Esta diversidad en la flora Mexicana se puede apreciar considerando la distribución de la riqueza y endemismo por tipos vegetales. Así encontramos que los bosques de coníferas y encino, los cuáles están usualmente asociados con las montañas y las zonas subhúmedas templadas, tiene el mayor número de especies (24%) y el mayor número de endemismos (70%), aunque esta zona sólo cubre un 21% de la superficie total del país. Otros vegetales de importancia son los matorrales desérticos y el bosque tropical deciduo, que tienen aproximadamente 6000 especies y cubren 60 % y 17% de la superficie total del país respectivamente. Además de la diversidad biológica, la cultural es muy importante, así tenemos que 8 millones de personas (alrededor del 7.5% de la población en 1980) hablan una lengua

nativa. De las 120 familias de lenguas que se hablaban en el país en el tiempo de la Conquista, 54 persisten en la actualidad. Un tercer tipo de diversidad, es la etnobotánica, ésta se basa en la interacción de las diversidades biológicas y culturales. A pesar de que sólo una quinta parte de las sociedades Mexicanas ha recaudado una información etnobotánica, nuestro país es reconocido como pivote geográfico en la interacción hombre – planta. Por ejemplo, uno de los tres centros primarios del origen de la agricultura se encuentra en México. Las plantas silvestres y cultivadas de México están reconocidas como la mayor fuente de germoplasma para la explotación mundial. La riqueza de las plantas Medicinales de México se puede estimar del número de especies utilizadas. Desde el primer contacto con los españoles, se han hecho esfuerzos para enlistar las especies de plantas que tienen propiedades curativas. Estos esfuerzos, usando diferentes fuentes y hechos en diferentes escalas, continúan actualmente (Bye, R. 1995).

Breve historia de la Etnobotánica en México

Durante la primera mitad del siglo del periodo colonial, se copilaron tres importantes trabajos en México central. Un primer texto en náhuatl e ilustraciones coloridas por Martín de la Cruz sobre el estudio de plantas y conocido como el Manuscrito de *Badianus*, por Juan Badiano quien lo tradujo al Latín, fue encontrado en la Biblioteca del Vaticano en 1929 y subsecuentemente se publicó. El documento original, realizado en 1552, contiene 263 plantas con sus nombres en náhuatl junto con remedios, animales, piedras y suelos. En análisis actuales de 185 plantas se reconocen 83 plantas a especies, 53 a género y 21 a familia, las cuáles están distribuidas en 61 familias botánicas. Muchos de los conceptos etnobotánicos tienen un origen nativo; por lo cuál, este documento es probablemente el más cercano material de la post conquista que presenta la visión prehispánica de la enfermedad y su cura. En pro de la conversión de los nativos al Catolicismo, Fray Bernardino de Sahagún trabajo de 1558 a 1582 en varios manuscritos que fueron condensados en el *Códice*

Florentino. La técnica de Fray Bernardino a través de la encuesta sistemática y recopilación en la lengua nativa con ilustraciones distinguen su trabajo como el primer y mayor estudio etnográfico del Nuevo Mundo. Algunas secciones fueron traducidas al español para que las autoridades de la Iglesia usaran la información para identificar rituales paganos y plantas del diablo. De los 11 libros que forman parte del código actualmente, el 10 (Las personas) y el 11 (Cosas de la Tierra) listan 724 plantas útiles con nombres nativos. El más importante uso antropocéntrico de las plantas es el curativo. Además de los dos trabajos antes mencionados, se encontró uno representativo de la realeza, Francisco Hernández (el médico del rey Phillip II), quién hizo un estudio sistemático de la flora curativa de la Nueva España como parte de su *Historia Natural de la Nueva España*. Entre 1571 y 1576, viajó por un área mayor que la visitada por Sahagún y caracterizó las propiedades de las plantas Mexicanas utilizando términos Europeos. No obstante que se incluye información autóctona, el documento no refleja de manera importante el conocimiento indígena y el empleo de plantas medicinales durante el periodo temprano de la Colonia. El texto latino se complementó después con ilustraciones y la información se incorporó al trabajo de otros autores. De las 3,076 plantas enlistadas por nombres comunes, sólo 667 se han identificado hasta especie; 249 a género y 98 a familia. Estas tres referencias documentan la importancia de las plantas medicinales durante el periodo temprano de la colonia y, probablemente, reflejan hasta cierto punto su importancia antes del arribo de Hernán Cortés, aunque en las tres referencias se describen muchas de las mismas plantas, los datos etnobotánicos no siempre coinciden. Como parte del interés colonial Español en recopilar y explotar las riquezas de la Nueva España. Un programa sistemático de encuestas conocidas como *Relaciones Geográficas* se contestaron por las autoridades de la Iglesia de la nueva España. Una particular atención se le dio a las plantas medicinales de la región y en especial a los antidotos para los compuestos aplicados a flechas y animales venenosos. En este caso no se han realizado estudios contemporáneos sobre las plantas de estos listados. Basado en el conocimiento acumulado por los misioneros en la Nueva España, Esteyneffer compiló el *Florilegio*

Medicinal como una guía para sus colegas que estaban salvando almas y cuerpos a lo largo de la colonia Española. Un estudio preliminar de esta manual publicado en 1712 menciona 273 plantas. Después, otros libros recopilan datos sobre las plantas utilizadas en la práctica médica en la colonia. Carlos III despierta el interés científico y promueve las ciencias médicas (incluyendo botánica) en la Nueva España formando la base de la Expedición Científica Real (1775 – 1803). La base de la expedición fue El Jardín Botánico Real de México que se estableció en 1788 para promover la experimentación y uso de las Plantas Medicinales de México. Las publicaciones *Flora Mexicana* y *Plantae Novae Hispaniae* estuvieron disponibles hasta 1894, sin embargo, contenían poca información sobre plantas medicinales. En 1801, Juan Navarro juntó toda la información sobre las plantas medicinales de México central, le incorporó ilustraciones a color al recientemente encontrado *Historia Natural ó Jardín Americano*. Después de la liberación del colonialismo y estabilización del país, el gobierno Mexicano patrocinó un trabajo con el propósito de documentar, analizar y promover las plantas medicinales en México. Entre 1888 y 1915 el Instituto Médico Nacional (IMN) publicó los resultados de estos estudios interdisciplinarios en publicaciones como “El Estudio” (4 volúmenes), “Anales del instituto Médico Nacional”(12 volúmenes), 14 monografías y 5 libros. Al mismo tiempo, en los Estados Unidos, el Departamento de Agricultura y el Instituto Smithsonian hacían estudios de campo en plantas medicinales y otras plantas de México. Los adelantos mostrados al respecto del estudio de las plantas en México, originó que Rose se impresionara de tal manera que decidió no presentar toda la información, favoreciendo el trabajo realizado en México tuviera todo el crédito. Desafortunadamente el inicio de la revolución terminó con el programa, con los escasos especímenes que sobrevivieron se creó en 1929, el Instituto de Biología de la Universidad Nacional Autónoma de México. Gran parte de la información generada por el IMN se usó para la formación de la Pharmacopeia Mexicana y en clásico trabajo sobre plantas Medicinales de Maximino Martínez, *Plantas Medicinales de México*, que salió publicado en 1933. Este es considerado la Biblia de las plantas medicinales de México, contiene información de 883 especies y

se divide en tres partes. La primera contiene datos derivados de principios de siglo, mientras las otras dos contienen datos fragmentarios. Por desgracia no hay especímenes con los cuáles se pueda confirmar la identidad botánica. La siguiente compilación, digna de mencionarse, se publicó en 1976 por el Instituto Mexicano sobre el estudio de Plantas Medicinales (IMEPLAM), grupo multidisciplinario de universitarios e instituciones gubernamentales, que promovió la evaluación y uso de las plantas medicinales. El inventario de especies y el resumen de los usos se basa en 35 referencias de documentos históricos, entre ellos los publicados por el IMN y el libro de Martínez. Se recopilaron 2,196 especies de plantas vasculares en 900 géneros y 161 familias. Como parte de una evaluación nacional de los recursos genéticos en México, un listado de plantas medicinales se generó basado en publicaciones, inventarios de estados y Tesis. Este estudio reveló 3,352 especies de plantas vasculares distribuidas en 1,214 géneros y 166 familias en México. En otras palabras, el 15% de la flora mexicana se ha utilizado con un fin curativo. El más reciente esfuerzo para producir un inventario de manera sistemática de las plantas medicinales de México se realizó por el Instituto Nacional Indigenista (INI), en éste se integraron participantes nativos como fuentes bibliográficas y de herbario, el proyecto documentó plantas utilizadas en 35 comunidades rurales. La bibliografía consiste en 2049 referencias de plantas medicinales usadas en México y contiene estudios químicos de 394 especies, estudios químicos y farmacológicos de 280, estudios químicos, farmacológicos y de actividad en 88, estudios químicos, farmacológicos y toxicológicos de 177 y estudios químicos, farmacológicos, toxicológicos y de actividad en otras 69 especies. Combinando estas fuentes, 3103 especies en 183 familias se usan actualmente en México. Basados en las 1000 principales plantas medicinales utilizadas tenemos que 45.2% son hierbas, 28.2% son arbustos, 27.7% son árboles y 5.7% son enredaderas. Estos remedios vegetales crecen en orden de importancia en: bosques tropicales (44.4%), bosque de encino (44.1%), bosque de pino (37.5%), desierto (34.7%) y bosque tropical húmedo (32.5%), aunque no se limitan exclusivamente a éstos (Bye, R. 1995).

Las plantas y la diarrea

En la herbolaria tradicional se considera a la diarrea una enfermedad principalmente "fría". Por esta razón los remedios tomados para tratar la diarrea son plantas o mezclas que contrarrestan el tipo de enfermedad, en este caso son plantas "calientes". Por ejemplo, un inventario de las plantas vendidas en el mercado de Sonora revela el uso principal de 5 plantas "calientes", y el uso de otras plantas suplementarias que se añaden para proveer el balance correcto dependiendo del tipo de diarrea (disentería, con moco, líquida, etc.). Algunas de las plantas reportadas en este trabajo son: *Psidium guajava* (guayaba), *Artemisia mexicana* (estafiate), *Waltheria americana* (tapacola), *Teloxys graveolens* (epazote de zorrillo), *Tagetes erecta* (flor de cempasuchitl), *Hintonia latiflora* (quina), *Satureja oaxacana* (menta verde), *Hedeoma piperitum* (tabaquillo), *Tecoma stans* (tronadora), *Buddleia scordioides* (hierba de perro), *Matricaria recutita* (manzanilla), *Peumus boldus* (boldo), *Krameria secundiflora* (clameria), *Agastache mexicana* (toronjil), *Heterotheca inuloides* (árnica) y *Equisetum myriochaetum* (cola de caballo) (Bye, Robert 1995). Otras plantas comúnmente usadas en la medicina tradicional son: *Byrsonima crassifolia* (nanche), *Larrea tridentata* (gobernadora), *Geranium mexicanum* o *seemanni* (Geranio) y *Psidium guajava* (Guayaba).

Se estima que de las 25,000 especies de plantas vasculares, 5,000 son o han sido usadas como remedios medicinales y, de éstas, 1,024 son empleadas para curar enfermedades del aparato digestivo. Su uso en la mayoría de los casos es empírico, por lo que en ocasiones no se sabe si su resultado es satisfactorio. En los últimos años, se ha venido incrementando el estudio científico de las plantas, con el propósito de conocer sus principios activos y el mecanismo de acción de los mismos (Argueta, V. 1994).

El género *Geranium*

Pertenece a la familia Geraniáceas, es un género de 300 especies y está representado en México y Centro América por 43 especies. Su distribución está confinada a las zonas templadas y zonas frías montañosas del mundo. En México y Centro América, el género *Geranium* ocurre en las zonas templadas de pino – encino o zonas alpinas de las cordilleras. Todas, excepto tres de las 43 especies, son endémicas de la zona. Estas tres especies son *Geranium atropurpureum*, *Geranium wislizeni* y *Geranium carolinianum*, que crecen principalmente al sureste de los Estados Unidos, siendo la última especie de gran distribución. Por mucho, la gran mayoría son locales en su distribución, teniendo representantes de regiones. De las 43 especies, 11 son conocidas sólo por su localidad y otras once procedentes de diferentes estados. De las especies sobrantes, algunas presentan una distribución a lo largo de México o Centro América, y el resto son abundantes en ciertas áreas como la Sierra Madre del noreste de los estados de Durango, Chihuahua, Sinaloa y Sonora (Moore, E. 1943).

Su taxonomía presenta una serie de problemas que se han ido acarreado desde hace mucho tiempo. Históricamente los únicos taxónomos que se interesaron en las especies de *Geranium* de México y Centro América fueron trabajos realizados por Hanks (1907) y Small (1907), y los trabajos de Knuth (1912). Ambos trabajos son insatisfactorios para las especies de México y Centro América. Hanks y Small aparentemente no consultaron todos los materiales de los herbarios de América, por lo que muchas de las descripciones no corresponden a las de los especímenes tipo y los nombres están frecuentemente mal puestos. Hay numerosos errores en la guía taxonómica, así como contradicciones, y las descripciones no son coherentes. Knuth, por otro lado, como es costumbre de los autores del “*Das Pflanzenreich*”, basó su estudio en ejemplares del herbario Europeo, negando las colecciones del continente Americano. Esto dio como resultado una

interpretación inadecuada de las especies mexicanas. También incluyó gran parte del trabajo de Hanks y Small, sin hacer correcciones o comentarios, lo que contribuyó en la preservación de los errores que hasta entonces se habían cometido. Sin embargo, es el trabajo de Knuth y Reiche, en el *Das Pflanzenreich*, el que presenta una mejor descripción del género y fija las bases taxonómicas para las especies más representativas. En este trabajo se agrupan 250 especies en 30 secciones divididas por la duración, hábito, rizoma, foliaje, tamaño de flores, tipo de inflorescencia y distribución geográfica. En 5 de estas secciones se pueden agrupar las especies México y Guatemala que le eran conocidas, estas secciones son: *Sylvatica*, *Caespitosa*, *Incanoidea*, *Striata* y *Mexicana*. Al resto de Centro América se le dio poca importancia. En cuanto a las especies mexicanas se encuentra una gran discordancia en cuanto a lo dispuesto por Knuth (1931). Los caracteres taxonómicos más importantes son el tipo de inflorescencia, hábito, división de las hojas, pubescencia, tamaño, vernación y pubescencia de los pétalos y tamaño del fruto (Moore, E. 1943).

Son hierbas, raramente arbustos, que habitan de preferencia en lugares templados. Las hojas son alternas u opuestas, peciolos con estípulas laterales; flores hermafroditas, actinomorfas, persistentes; corola de 5 pétalos; estambres en 2 series, a veces a la mitad de ellos estaminoides; gineceo con hojas modificadas, con 5 cavidades; el fruto se deshace en 5 frutitos parciales que durante la floración se encuentran soldados al eje floral que es alargado; flores perfectas de cinco pétalos de color rosa pálido a lila. La mayoría son perenes excepto *Geranium carolinianum*. *Geranium seemanni* y *Geranium cruceroense* han sido descritas como anuales, aunque se ha descrito que *G. seemanni* es una de corta vida que crece en diferentes épocas del año, después de un periodo de vegetativo. En el valle de México esta familia se encuentra representada por los géneros: *Geranium* y *Erodium*.

Por lo atractivo de sus flores y follaje los geranios también se cultivan con fines ornamentales. El nombre

geranio deriva de la raíz griega *geranos*, que significa grulla, refiriéndose a la peculiar forma de los frutos que semejan el pico de esa ave, que es común de todos los geranios.

La familia se distribuye en casi todo Europa, Asia y el norte de África, de donde es originaria, y es un componente de casi todo el bosque ya que crece en una gran variedad de suelos. Es una especie bastante adaptable, que se introdujo como ornamental y que se ha extendido en muchas regiones de Norteamérica, hasta convertirse en una hierba invasiva y perjudicial, como en la zona costera de la Columbia Británica. Desde el punto de vista ecológico y ambiental se le considera una amenaza para las reservas forestales y la biodiversidad, ya que desplaza a especies nativas, especialmente herbáceas. Por otra parte, se ha observado que crece bastante bien en suelos con altos índices de contaminación por metales pesados, encontrándose experimentalmente que puede absorber rápidamente cadmio, el cual tiende a acumular en las hojas (Quijano, L. 2003).

Usos de los Geranios

La mayoría de los geranios se usan de forma tradicional para combatir las diarreas. Este género de plantas ha empezado a estudiarse recientemente y ha demostrado tener compuestos de interés farmacológico. Por ejemplo, *Geranium robertianum*, es una planta europea que tiene una larga historia de uso en la medicina popular, con propiedades tan diversas como: astringentes, hemostáticas, diuréticas y cicatrizantes, contra las diarreas ligeras, dolor de muelas, hemorragias nasales, inflamación de las articulaciones, heridas y ulceraciones dérmicas y bucales, conjuntivitis, estomatitis, aftas bucales, faringitis, amigdalitis, dermatitis, eritemas, prurito y vulvovaginitis.

El aceite esencial de *G. robertianum* tiene propiedades analgésicas y antisépticas, y lo constituyen más de 100 componentes, de los cuales al menos 72 están identificados. Entre ellos se encuentran principalmente monoterpenos y 13 flavonoides (Quijano, L. 2003).

Geranium niveum S. Watson es una planta que reporta actividad contra protozoarios como *Giardia lamblia* y *Entamoeba histolytica*. Esta planta crece en los bosques de pino encino de las montañas del este de Chihuahua, México. Es una planta con un amplio uso entre los Tarahumaras que la denominan "makiki". La utilizan como purgante y remedio contra el dolor de los riñones (Calzada, F. *et. al.*, 1999).

Geranium thunbergii Sieb, et. Zucc. (conocida como Gennoschoko en Japón) es una planta que se utiliza en esa región contra la diarrea y como preventivo contra el cáncer. Se reporta una actividad de inhibición de TNF α , con lo cuál podría tener un uso contra el cáncer. El compuesto al cuál se le atribuye esta actividad es la geranina, un tanino muy estudiado (Okabe, S. 2001).

Geranium sanguineum L. es una planta muy utilizada en Bulgaria. Los extractos acuosos y etanolicos se emplean para tratar malestares gastrointestinales, problemas eruptivos de la piel, diversas infecciones así como en procesos inflamatorios. También se demostró que esta planta tiene actividad contra influenza A y B, atribuyendo dicha actividad a un complejo polifenólico compuesto de flavonoides, catequinas, taninos gálicos y ácidos fenólicos (Serkedjieva, J. 1998). En Bulgaria se reconocen 23 especies que comprenden tres subgéneros y 9 secciones. Se reporta el uso de los flavonoides identificados en las diferentes especies, para establecer relaciones filogenéticas entre ellas (Ivancheva, S. 2000). También se ha reportado una actividad contra el virus del Herpes simplex tipo 1 y 2 (HSV-1 y HSV-2). Demostrando que los extractos acuosos de esta planta, que contenían de 29% a 49% de taninos y 0.05% a 1% de flavonoides, tenían actividad *in vitro*

contra HSV-1 y HSV-2, así como en un modelo animal (Serkedjieva, J. 1999).

Geranium caespitosum G. presentó actividad como antibacteriano contra cepas multi resistentes a antimicrobianos de *Staphylococcus aureus* (Stermitz, F. 2003).

Geranium pratense subsp. *finitimum* W., es un Geranio muy utilizado en la medicina tradicional Turca donde recibe el nombre de "Turnagagasi". Las partes aéreas de la planta son utilizadas contra la diarrea, diurético, homeostático, tónico y droga antidiabética. Adicionalmente se estudió la habilidad de algunos flavonoides purificados para atrapar radicales libres (Akdemir, S. 2001). Esta especie también se ha estudiado en Mongolia, donde se observó la influencia de extractos metanólicos sobre la α -amilasa en ratones inhibiendo la enzima en un 43.9% (Kobayashi, K. *et al.*, 2003).

Tipos de Diarreas

La diarrea se define como el incremento en el número de evacuaciones en un lapso de 24 horas; así como la disminución de la consistencia; o la existencia de por lo menos una evacuación con sangre acompañada de disminución de la consistencia (Velázquez, R. 2001). Las causas de las diarreas son muy diversas, pero pueden agruparse en:

- 1.- Exógenas: la causa es extraintestinal: alimentos, toxinas, gérmenes, parásitos, carencia de algunas vitaminas;
- 2.- Orgánicas: se debe a lesiones de la pared intestinal, inflamación, degeneración, tumores;
- 3.- Endógenas: la causa se encuentra en el mismo organismo pero no en el conducto intestinal, como alteraciones gástricas, pancreáticas, hepáticas, endocrinas, circulatorias y nerviosas. Diarrea aguda líquida: Se

define así a aquellos cuadros diarreicos cuya duración es de 7 a 14 días. Es la forma más frecuente de la diarrea en México, alcanzando el 80 %. Diarrea crónica: Es causada por diversos mecanismos, a menudo simultáneos, tanto infecciosos como por intolerancia a nutrientes (azúcares, proteínas), desnutrición, como síndromes de mala absorción intestinal. Disentería: Diarrea con moco, sangre y pus en las heces, descrito desde Hipócrates. Puede acompañarse con dolor durante la defecación y es el resultado de la invasión inflamatoria de la mucosa colónica debida a bacterias y / o acción de citotoxinas (Reyes, L. 2000).

Importancia de la diarrea en el mundo

Las enfermedades diarreicas continúan siendo una de las principales causas de morbilidad y mortalidad en niños de todo el mundo, siendo según la Organización Mundial de la Salud (OMS), la segunda causa de muerte infantil, después de las infecciones respiratorias. De acuerdo a la OMS al año mueren 1.3 millones de niños, lo que representa 12% del total de muertes de niños menores de 5 años en los países en desarrollo. Por otro lado, aunado a lo anterior, las diarreas son la principal causa de desnutrición en niños menores.

Una revisión reciente, realizada con la intención de estimar globalmente el problema de las enfermedades diarreicas, mostró que en niños menores de cinco años la media de la incidencia del padecimiento es de 2.2 a 3 episodios anuales por niño. Según los cálculos de población de 1990, la morbi-mortalidad anual en Asia, África y Latinoamérica se estimó entre 774 y 1000 millones de episodios y de 1.5 a 5.1 millones de muertes, lo cual equivale a que ocurren aproximadamente de 1400 a 1900 episodios diarreicos y de tres a diez muertes por minuto (Velázquez, R. 2001).

Por otro lado, las diarreas de tipo exógeno ó enfermedades transmitidas por alimentos (Foodborne) son,

según la OMS, uno de los problemas más ampliamente distribuidos del mundo contemporáneo. La incidencia del problema de los alimentos contaminados es difícil de estimar, pero la OMS reporta que sólo en el año 2000 murieron 2.1 millones de personas por padecimientos diarreicos, y un gran porcentaje se atribuyen a alimentos contaminados. La mayoría de las enfermedades por alimentos contaminados son esporádicas, y a veces no se reportan, sin embargo, este tipo de enfermedades puede ocasionar brotes masivos. En 1994, un brote de salmonelosis por consumo de helado contaminado afectó a 224,000 personas en los Estados Unidos; en 1988 China se vio afectada por un brote de hepatitis A por consumo de camarones, en este se reportaron 300,000 casos (OMS). En los países industrializados el porcentaje de personas que se enferman por alimentos contaminados es de 30%. Sólo en los Estados Unidos se reportan 76 millones de enfermos por alimentos contaminados, 325000 hospitalizaciones y 5000 muertes cada año (OMS). Este problema acarrea un peso social y económico a las comunidades y a sus sistemas de salud. Se estima que en los Estados Unidos, las enfermedades causadas por los principales patógenos, cuestan hasta 35 billones de dólares anualmente por hospitalización y pérdida de la productividad. Otro ejemplo es la reemergencia del cólera en Perú en 1991 que produjo una pérdida de 500 millones de dólares en exportaciones de pescado y productos (OMS).

Importancia de la diarrea en México

La diarrea es una enfermedad infecciosa que padecen frecuentemente la mayoría de los niños, es la cuarta causa de muerte en los menores de un año y la segunda en los que tienen de uno a cuatro años de edad (IMSS, 2002). En México, diversas encuestas realizadas han estimado una frecuencia anual de dos a cuatro episodios diarreicos por niño en las áreas urbanas y de cuatro a nueve en las rurales. La mortalidad anual por diarrea por cada 100,000 niños menores de cinco años fue de 212.3 en 1984 y disminuyó a 60.4 en 1993. Posteriormente, al inicio de la epidemia de cólera en México, en 1991, ha habido una disminución de 15% en

la notificación del problema, lo cuál se relaciona con las medidas tomadas para el control de la epidemia (Velázquez, R. 2001).

Patógenos causantes de diarrea

En 1972 se detecta el primer agente viral causante de la diarrea denominado virus de Norwalk. Este virus se ha asociado desde entonces a diarrea viral epidémica en adultos y niños mayores. Norwalk es el prototipo de la familia *Caliciviridae*, familia a la que también pertenecen los virus de Snow Mountain y Sapporo. La infección con el virus de Norwalk ocurre con frecuencia y desde edad temprana, aún en los países desarrollados. En México se ha descrito una prevalencia de anticuerpos de tipo IgG del 80% al nacimiento, 31% entre los 6 y los 8 meses, 49% al año y de 80% al final de los dos años. Se transmite por la ruta fecal – oral. En 1973 se describió el Rotavirus humano, que ha sido vinculado a diarrea grave en niños pequeños. La infección por Rotavirus humano tipo “A” es la más común en niños de todo el mundo, y provoca manifestaciones clínicas que varían desde infección asintomática hasta enfermedad diarreica grave. La población afectada es de 4 a 24 meses de edad principalmente. Es un virus altamente infeccioso y se transmite por la vía fecal oral.

Los Astrovirus también se transmiten por la ruta fecal – oral, la enfermedad diarreica suele ser leve y de corta duración, aunque se han descrito casos graves. En México no se tienen datos del papel de los Astrovirus como causa de diarrea en niños hospitalizados.

Los Adenovirus, después de Rotavirus, son los principales agentes virales que causan diarrea grave en niños pequeños hospitalizados. La diarrea y el vómito son los síntomas predominantes y se ha descrito la probabilidad de diarrea prolongada en un tercio de las infecciones. En México no se tienen datos del papel de los Adenovirus como causa de diarrea en niños hospitalizados.

La diarrea ocasionada por parásitos también tiene importancia clínica y epidemiológica. *Giardia lamblia* es un protozoo que presenta las formas de trofozoito o forma vegetativa y la de quiste que es la estructura infectante. Aunque la mayoría de los casos de Giardiasis son asintomáticos, los casos con síntomas se caracterizan por náusea recurrente crónica, dolores abdominales y diarrea. Esta enfermedad prevalece en países con pocas medidas sanitarias y puede ser un peligro para los turistas. *Entamoeba histolytica* es otro protozoo transmitido por alimentos contaminados, el cuadro que ocasiona se conoce como disentería amibiana o amebiasis. Esta enfermedad esta asociada con un sistema de sanidad pobre particularmente en regiones tropicales. Las infecciones son principalmente asintomáticas, pero las personas con infecciones sintomáticas pueden presentar diarrea, dolor abdominal, disentería con moco y puede complicarse en una amebiasis hepática, neumónica e incluso del sistema nervioso central (Lim, D. 1998). Otro protozoos causantes de la diarrea son: *Cryptosporidium*, *Cyclospora*, *Microspora* e *Isospora* (Velázquez, R. 2001).

Existe un gran número de bacterias responsables de causar enfermedades intestinales. Una de ellas es *Salmonella typhi*, agente causal de la fiebre de tifoidea. Esta bacteria entra al humano por ingestión de alimentos ó agua contaminados e invade la mucosa del epitelio ileal, paso que es muy importante en el mecanismo de virulencia, para después colonizar el sistema retículo endotelial (Elsinghorst, E. *et al.*, 1989). *Yersenia enterocolitica* y *Yersenia pseudotuberculosis* causan diarrea invasiva en humanos. Invade preferentemente el tejido ileal, aunque también producen lesiones a lo largo del intestino. La infección con estas cepas esta acompañada frecuentemente de una seria enfermedad sistémica (Small, P. 1987). Otras bacterias causante de diarrea son: *Clostridium difficile*, *Listeria monocytogenes*, *Vibrio cholerae*, *Aeromonas* sp., *Plesiomonas* sp. y *Campylobacter* sp.

Entre las bacterias, *E. coli* es considerada como uno los más importantes agentes asociados con cuadros

diarreicos. Descrita inicialmente por Escherich en 1885 bajo el nombre de *Bacterium coli commune* para indicar la presencia universal del microorganismo en el intestino. Considerado en un principio como un microorganismo no patógeno, fue Escherich quien demostró la presencia de la bacteria en la orina de niñas con infecciones del tracto urinario y sugirió que los organismos alcanzaban la vejiga por la ruta ascendente. Además de infecciones de vías urinarias, esta bacteria causa otras infecciones extraintestinales como es el caso de meningitis, septicemia, infección de heridas e infecciones respiratorias (Eslava, C. *et al.*, 2001). No obstante que inicialmente no se consideraba como un patógeno intestinal, en los últimos 60 años estudios genotípicos y fenotípicos han demostrado que *E. coli* es una de las bacterias más importantes en la etiología de las diarreas (Reyes, L. 2000). El género *Shigella* esta formado por bacterias patógenas que produce disentería bacilar y se incluye en la tribu *Escherichiae*. El microorganismo se caracteriza por invadir las capas superficiales del epitelio del colón, en donde subsecuentemente se multiplica y posteriormente se disemina entre las células. El cuadro clínico que desencadena es una inflamación localizada con dolores abdominales, diarrea, descarga rectal de moco y sangre que converge finalmente en la ulceración del intestino grueso (Venkatesan, M. *et al.*, 1988; Small, P. 1987).

***Escherichia coli* bacteria del yin – yang**

E. coli es un bacilo Gram negativo corto (0.5x4 μ), anaerobio facultativo, no esporulado, provisto de flagelos peritricos y fimbrias, que puede o no presentar cápsula. Su metabolismo se caracteriza porque fermenta la glucosa y otros azúcares con producción de gas. Es una bacteria catalasa positiva, oxidasa negativa y reduce nitratos a nitritos. Pertenece a la tribu *Escherichiae* y al género *Escherichia* y junto con otras bacterias previamente referidas pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Mediante el análisis de sus propiedades metabólicas se han descrito como especies del género: *E. blattae*, *E. coli*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E.*

vulneris (Eslava, C. *et al.*, 2001).

E. coli se ha caracterizado utilizando sus propiedades metabólicas estableciendo biotipos, por el análisis de sus antígenos somáticos (O, 175), capsulares (K) y flagelares (H, 56), utilizando anticuerpos específicos es que se reconocen diferentes serotipos (formula antigénica O:H). También se utilizan los antígenos de fimbrias, la susceptibilidad de bacteriófagos (fagotipos), la producción de bacteriocinas (colicinas) y sus mecanismos de patogenicidad para agruparla (Eslava, C. *et al.*, 2001; Reyes, L. 2000).

La colonización del intestino humano por *E. coli* se inicia en las primeras horas de vida, estableciéndose una relación benéfica ya que la bacteria obtiene nutrientes y un nicho estable y, por otro lado, sintetiza de vitaminas K y B, indispensables para el buen funcionamiento de su hospedero. En condiciones naturales, las cepas de *E. coli* que conforman dicha microbiota no producen ningún daño; sin embargo, en situaciones que favorecen la salida de su hábitat natural o en individuos con trastornos inmunes, la bacteria puede causar enfermedad. En los últimos 60 años se ha demostrado la participación de esta bacteria como patógeno primario, causante de trastornos gastrointestinales. Se ha propuesto la emergencia de *E. coli* que en el proceso evolutivo han sufrido cambios (mutaciones y/o la adquisición de islas de patogenicidad), que les han conferido propiedades de virulencia mediante las cuales pueden causar enfermedad, incluso en individuos sin trastornos inmunes graves (Eslava, C. *et al.*, 2001). Esta evolución y emergencia de nuevas cepas patógenas es un proceso de dos pasos. El primero es la creación de variación genética en la virulencia entre cepas en una población bacteriana por eventos de mutación, transferencia genética lateral o recombinación. Algunas de estas mutaciones se pierden por deriva génica. El segundo paso es en donde domina la selección natural y la nueva cepa virulenta tiene que dispersarse y aumentar su frecuencia en relación con otras menos virulentas. *E. coli* O 157 : H7 ejemplifica este proceso de evolución en dos pasos. La infecciones con esta cepa son del

orden de 20,000 enfermos y 250 muertes principalmente en países como E.U, Argentina, Alemania, Japón, Canadá e Inglaterra. Esta cepa produce colitis hemorrágica que es clínicamente distinta de los otros tipos de diarrea causadas por bacterias enteropatógenas. La adquisición de determinantes de virulencia incluyen islas de patogenicidad que codifican para factores de adherencia intestinal, genes de fagos que codifican para citotoxinas poderosas, así como proteínas de estrés que le confieren resistencia a ácido (Whittam, T. 1998). En México se ha visto que este tipo de cepa se relaciona sólo con diarrea de tipo secretor leve o moderado y no existen reportes de cuadros de colitis hemorrágica o síndrome urémico hemolítico (Eslava, C. *et al.*, 2001).

En los últimos años, el conocimiento sobre *E. coli* causante de diarrea en humanos ha tenido importantes avances, lo que ha dado lugar a que en la actualidad se reconozcan principalmente cinco grupos: *E. coli* enteropatógeno (EPEC), *E. coli* enterohemorrágico (EHEC), *E. coli* enterotoxigénico (ETEC), *E. coli* enteroinvasivo (EIEC) y *E. coli* enteroagregativo (EAEC), identificados tanto por sus mecanismos de patogenicidad como por sus características epidemiológicas y antigénicas (Eslava, C. *et al.*, 2001). Algunos autores reconocen un tipo más de *E. coli* (DAEC) que adhiere difusamente (Polotsky, Y. *et al.*, 1997), aunque hay mucho debate acerca de si puede o no ser causante de diarreas y el hecho de que pueden estar involucradas en infecciones del tracto urinario (Forestier, C. *et al.*, 1996). Otro grupo que también se menciona es el (STEC) o *E. coli* que produce una toxina tipo Shigella, que es igual a EHEC (Law, D. 2000). Por último, se menciona otro grupo el (AECC) para las *E. coli* que causan lesiones de adherencia y destrucción, que reuniría a los grupos EPEC y EHEC antes mencionados como subgrupos (Beutin, L. *et al.*, 2003).

Se ha encontrado que la leche materna es un factor importante en la protección contra infecciones intestinales

y respiratorias infantiles. Estudios epidemiológicos indican que la leche materna protege a los infantes de la mayoría de los patógenos entéricos, incluyendo a *E. coli* diarreogénica. Se han publicado numerosos reportes acerca de la importancia de los anticuerpos contenidos en la leche que protegen contra enfermedades gastrointestinales en humanos y animales. Ensayos de inhibición de la adherencia contra cepas EPEC (patrón localizado) mostraron una actividad positiva atribuida a inmunoglobulinas de tipo A (IgA) que reaccionaban contra la intimina y otras proteínas desconocidas (Manjares, H. *et al.*, 2000). Este es un proceso diferente al que se da con los extractos de plantas, pero es una forma de abordar el mismo problema.

Adherencia

Pasando el estómago, las bacterias viables deben de adherirse a la mucosa del intestino para impedir su desprendimiento por el constante flujo peristáltico. Aún en zonas relativamente estancadas, tales como el colon y el tracto vaginal, el movimiento Browniano puede separar de la superficie tisular a las bacterias que no logran fijarse con firmeza a las células del hospedero (Velasco, R. *et al.*, 2000; Law, D. 2000).

EPEC

E. coli enteropatógena son causantes de diarreas agudas en niños en los países en desarrollo. Otras síntomas son el vómito y fiebre. Los brotes de EPEC en países desarrollados eran comunes en los años 40's y 50's, pero su incidencia ha ido disminuyendo desde entonces. Sin embargo EPEC sigue siendo importante en brotes ocasionales en guarderías y centros pediátricos. EPEC sigue siendo un importante patógeno causa de mortalidad infantil en países en desarrollo, que reportan una mortalidad de 30% en los últimos brotes. La

infección con EPEC se estima que causa la muerte de cien mil niños por año (Vallance, B. *et al.*, 2000). La incidencia de EPEC entre los casos de diarrea en estudios Chile es de 23% (Nataro, J. 1996); en estudios en Brasil es de 30% y 23% (Keller, R. *et al.*, 2002; Scaletsky, I. *et al.*, 2002); en estudios en Argentina del 80% (Ortiz, A. *et al.*, 1992); en estudios en México es aproximadamente del 6% (Reyes, L. 2000); en un estudio en Francia es de 6.5% (Forestier, C. *et al.*, 1996); el rango de aislamiento en Holanda es de 6.5% (Rademaker, C. *et al.*, 1993).

Históricamente se han reconocido, no por la presencia de factores de virulencia específicos, sino por pertenecer a ciertos serotipos O:H. Se conocen dos tipos de EPEC: los EPEC típicos poseen el plásmido EAF (Enterotoxigenic Adherence Factor); y las EPEC atípicas que no poseen el plásmido EAF (Scaletsky, I. *et al.*, 1999; Giammanco, A. *et al.*, 1996; Bouzari, S. *et al.*, 2000). Las cepas EPEC pertenecen a una grupo de bacterias patógenas que inducen un rearrreglo de actina en las células epiteliales resultando en la formación de un pedestal bajo la bacteria adherida (Brendan, K. *et al.*, 1991). Dos regiones del genoma de EPEC codifican para los factores de virulencia involucrados en el establecimiento de una infección. El operón *bfp*, localizado en el plásmido EAF, dirige la producción de la fimbria BFP ("Bundle Forming Pilus"), una fimbria de tipo IV asociada con la adherencia localizada y el fenómeno de autoagregación bacteriana, el cual a su vez esta regulado transcripcionalmente por los genes *per A*, *B* y *C*. Cuando la bacteria hace contacto con la célula eucarionte se activan los genes de LEE ("Locus of Enterocyte effacement") el cual esta organizado en 5 operones (LEE1-LEE5). LEE puede ser dividida en muchas regiones distintas. En un lado se encuentran los genes *EspA*, *EspB* y *EspD*, que codifican para proteínas secretadas requeridas para señales de transducción y la lesión de adherencia y destrucción ("Attaching Effacing lesion"; A/E). En el otro extremo están los genes para un sistema de secreción de tipo III, requerido para la secreción de proteínas incluyendo los productos de *EspA*, *EspB* y *EspD*. Una tercera región, entre las otras ya mencionadas, contiene el gen *eae* que codifica para

la intimina (se reconocen básicamente 4 tipos) una proteína de membrana externa requerida para la adherencia íntima, y *Tir*, que codifica para la proteína Tir (“translocated intimin receptor”) que actúa como receptor de la intimina. Los genes de adherencia se activan cuando EPEC llega al intestino delgado. La proteína EspA forma una estructura tubular (translocon) por donde pasan otras proteínas como EspB, EspD y Tir. En la célula eucariota Tir se fosforila en los residuos de tirosina y se inserta en la membrana de la célula eucariota donde sirve de receptor de la intimina. De esta forma actúa como foco para la acumulación de actina, y se piensa que transmite señales a la célula hospedera que dan lugar a cambios fisiológicos que incluyen liberación de calcio almacenado intracelularmente, activación de enzimas como fosfolipasa C y cambios en el potencial de la membrana. Esto resulta en la destrucción de la membrana y las microvellosidades intestinales ocasionando la hipersecreción de agua y electrolitos. Este cuadro histopatológico es conocido como lesión de adherencia y destrucción (“Attaching Effacing lesion”; A/E). Los genes responsables de esta lesión son *esc*, *sep*, *esp*, *tir* y *eae*, codificados en LEE. LEE está regulado por *per* (“plásmid encoded regulator”), el cual activa la transcripción de un gen de LEE (*ler*) el cual está encargado de activar la transcripción de todos los genes de LEE (Law, D. 2000; Puente, J. 2001; Girón, J. 2001).

Presenta principalmente una adherencia de tipo localizado (**Figura 4 a**, página 53) aunque se han encontrado cepas con un patrón difuso (**Figura 4b**, página 53). En el presente trabajo se estudió la inhibición de la adherencia de estos dos patrones de adherencia.

EHEC

A este tipo de *E. coli* causante de diarrea pertenece el serotipo O157 : H7, que es muy conocido en el ámbito científico tanto como para el público en general. Esta cepa inspiró hasta la creación de un libro llamado

“Toxin” escrito por Robin Cook. Es la cepa de *E. coli* que logro entrar a ese distinguido grupo de enfermedades emergentes.

Esta cepa de *E. coli* (O157:H7) fue descrita por Riley en 1982 después de un brote de colitis hemorrágica (HC por las siglas en inglés) en Estados Unidos. Desde entonces se han dado más brotes de esta cepa a lo largo del mundo siendo uno de los más grandes el de Japón en 1996, el cual afecto a 9000 niños. Este organismo está principalmente asociado con el síndrome de choque urémico (HUS por las siglas en inglés), el cual complica el 10% de las infecciones con esta cepa y que tiene una mortalidad del 2 al 10%. El periodo de incubación es de 3 a 8 días, con una media de 3 a 4 días. En un brote reciente en Escocia murieron 21 personas de 496 que fueron infectadas. El alto rango de mortalidad de *E. coli* O157:H7, la diferencia de otros tipos de *E. coli* como la EPEC, ETEC y EAEC (Law, D. 2000). Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países como Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Argentina, Australia y Alemania entre otros. En México sólo existe el reporte de un aislamiento en un niño con disentería en Yucatán (Reyes, L. 2000).

HUS está caracterizado por una anemia microangiopática y falla renal, que se da principalmente en niños. Se reconocen dos subtipos: el primero es común en niños y esta asociado a un cuadro de diarrea; el segundo es raro en la niñez y no está asociado a un cuadro de diarrea (Chart, H. *et al.*, 1991). Esta cepa causa una disentería aguda con dolores abdominales, sin fiebre, que puede durar una semana. Esta enfermedad se puede complicar a un síndrome hemolítico urémico, colitis hemorrágica, púrpura trombocitopénica y fallo sistémico (OMS; Law, D. 2000).

Los factores de virulencia más importantes de *E. coli* O157:H7 son: producción de toxinas tipo Shigella,

(Stx) más comúnmente Stx2 aunque también puede producir Stx 1; intimina como adhesina; enterohemolisina, una toxina cuya importancia no está esclarecida; proteasa de serina (EspP), las cuáles median su propia secreción a través de la membrana externa y aunque no se entiende su importancia en la patogénesis de *E. coli* O157:H7, se ha observado que puede favorecer la hemorragia por medio de una actividad proteolítica al factor de coagulación V; catalasa peroxidasa, aunque la importancia de esta proteína no se entiende pero podría ayudar a neutralizar oxidantes citotóxicos producidos durante el choque oxidativo de los macrófagos y neutrófilos, con lo cuál contrarresta este ataque del sistema inmune, y podría ayudar a la bacteria a pasar por un estrés térmico; toxina tipo *Clostridium difficile* cuya importancia no se conoce; capacidad para utilizar la hemoglobina; y, sistema de secreción tipo III; presencia de genes LEE que ocasionan una lesión A/E por una ruta diferente que la EPEC, ya que carecen de los genes *per* A-C y el gen LEE sólo es activado en el intestino grueso por *ler* (Law, D. 2000).

EAEC

Nataro y colaboradores propusieron en 1987 una quinta categoría de cepas diarrogénicas de *E. coli* basados en la observación de un tercer patrón de adherencia a células HEp-2 que llamaron agregativa. *E. coli* enteroagregativa (EAEC) deriva su nombre por la forma como se adhiere a células HEp-2 en cultivo. Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con una apariencia de ladrillos apilado ("stacked brick"), observados tanto sobre las células como en la superficie del vidrio de la preparación (Figura 4c, página 53). La frecuencia de este tipo de padecimiento en Brasil es del 55.6% y 20%, con una incidencia del *pet* del 11.1% (Nereida, M. *et al.*, 2000; Scaletsky, I. *et al.*, 2002); en estudios en Francia es del 9% su incidencia (Forestier, C. *et al.*, 1996); en México es del 26% (Reyes, L. 2000); en Argentina es del 20% (Ortiz, A. *et al.*, 1992).

Bhan y colaboradores reportaron en 1989 la asociación de cepas de *E. coli* que presentan el patrón de adherencia agregativa con diarrea persistente en la India. Con relación al comportamiento clínico de EAEC, estas bacterias se han identificado en casos de diarrea persistente y aguda en países en desarrollo, en brotes de diarrea en niños y adultos, y se le ha implicado también en la etiología de la diarrea en pacientes con SIDA (Eslava, C. 2001; Reyes, L. 2000).

El fenotipo de adherencia agregativa esta relacionado con la presencia de un plásmido de 65 MDa. Con respecto al mecanismo de daño ocasionado por la infección por EAEC, se ha propuesto un modelo de tres pasos: en la primero, se considera que se presenta un evento de adherencia inicial a la mucosa intestinal y/o a la capa de moco por medio de fimbrias presentes en la bacteria. Se han descrito dos tipos de fimbrias, AAF/I (Savarino, S. *et al.*, 1992), AAF/II y AAF/III (identificada por Czeczulin, *et al.*), requeridos para la expresión del fenotipo agregativo de adherencia. AAF/I esta codificada por dos regiones de plásmido de DNA separadas por un fragmento de 9 kb. Un fragmento de 12 kb (*aaf*) del plásmido de 60 Mda (responsable del fenotipo agregativo) se ha clonado y una proteína de 14 kDA codificada por *aaf* podría ser una subunidad fimbriar. Anticuerpos contra esta proteína han presentado una actividad de inhibición de la hemaglutinación. AAF/II es genética-, fenotípica- y morfológicamente distinta a AAF/I y se ha reportado que media la adherencia a la mucosa del tejido colónico humano (Vandana, G. *et al.*, 2001). Se presenta gran liberación de moco formando una biopelícula en la cual se envuelven las bacterias. Esta capa de moco facilita la colonización en amplios sectores del intestino, favorece que EAEC se mantenga en el hospedero por más tiempo, lo que conduce probablemente a la persistencia del proceso y origina problemas de absorción. Por último la producción de toxinas y la aparición de una respuesta de tipo inflamatorio da lugar a que se altere la mucosa y se presente la secreción intestinal. Recientemente se identificó que cepas de EAEC aisladas de

niños que murieron a consecuencia de la diarrea inducida por estas bacterias, secretan dos proteínas, Pet (plasmid encoded toxin) y Pic (protein involved in intestinal colonization), de alto peso molecular. Ambas proteínas forman parte de la subfamilia denominada SPATE (serine proteasa autotransporters of Enterobacteriaceae)(Eslava, C. 2001; Law, D. 2000; Polotsky, Y. *et al.*, 1997;).

El patrón de adherencia agregativo de *E. coli* (**Figura 4c**, página 53) es uno de los tres que se trató de inhibir con extractos crudos de *G. seemanni*.

ETEC

Datos epidemiológicos han revelado que en países subdesarrollados EPEC y ETEC son los principales agentes etiológicos que producen diarrea de origen bacteriano en recién nacidos y en infantes respectivamente. Se estima que mundialmente en países subdesarrollados ETEC es responsable de 650 millones de casos y 800 mil muertes por año, en niños menores de 5 años. Las cepas ETEC son causa frecuente de diarrea severa en lactantes en países en desarrollo y el más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrollados.

Las manifestaciones clínicas de la infección por ETEC son diarrea acuosa, náuseas, dolor abdominal y fiebre de bajo grado (García, E. *et al.*, 2000; Reyes, L. 2000).

En 1956, estudios de De Graff y colaboradores observaron la distensión por edema de asas ligadas de intestino de conejos con ultrafiltrados de cultivo de ciertas cepas de *E. coli*, se demostró su capacidad para producir exotoxinas que al interactuar con las células epiteliales de la mucosa intestinal del hospedero

inducían aumento en la secreción de agua y electrolitos. Las cepas ETEC producen dos tipos de toxinas, la primera es una proteína dimérica de alto peso molecular (86,500 Da) similar en estructura química, función y antigenicidad a la toxina producida por *Vibrio cholerae* 01 y por su labilidad al calor (se inactiva a 100 ° C durante 10 minutos) se denomina enterotoxina termo lábil (LT). La LT esta compuesta por una subunidad tóxica A y cinco subunidades B. Las subunidades B se mantienen unidas por enlaces no covalentes, arregladas en forma de anillo sobre la cuál descansa la subunidad A. La toxina se une al receptor específico GM₁ localizado en la membrana celular vía las 5 subunidades B, seguido por la translocación de la subunidad A, a través de la membrana. Una vez en el citosol, la subunidad A activa el complejo adenosilciclase que forman AMPc a partir de ATP y el aumento de AMPc intracelular favorece la salida de agua y electrolitos de la célula, con una consecuente disminución en la absorción de las vellosidades. El incremento en la secreción de líquidos a nivel de lumen intestinal clínicamente se manifiesta como diarrea. La otra familia de enterotoxinas producidas por cepas ETEC son las denominadas termoestables (ST), que como su nombre lo sugiere son resistentes al calentamiento. Estructuralmente son péptidos de bajo peso molecular (1000-6000 Da), no son inmunogénicos, solubles en metanol. El control genético de la producción de LT y ST reside en plásmidos transferibles. La toxina ST es un polipéptido, rico en cisteína que activa la guanidilciclase de las células epiteliales, promoviendo el flujo de agua hacia el lumen intestinal (García, E. *et al.*, 2000; Reyes, L. 2000).

EIEC

E. coli y *Shigella flexneri* causan un estimado de 600,000 muertes en todo el mundo cada año. EIEC se ha implicado en brotes asociados al consumo de alimentos contaminados, de cuadros de enterocolitis en adultos en países industrializados, reportando hasta 1992 3 brotes en los Estados Unidos. El más grande de éstos fue

una epidemia de gastroenteritis afectando por lo menos a 226 personas en 96 brotes a lo largo del país; subsecuentemente se reportó que el brote era debido a una cepa EIEC O124 debido al consumo de Camembert Francés importado. En estudios con disentería en México se encontró EIEC en 4 y 5% de los casos (Reyes, L. 2000); en Tailandia fue del 9% (Taylor, D. *et al.*, 1988).

E. coli enteroinvasiva invade la mucosa intestinal y causa una enfermedad tipo disentería, similar a la causada por *Shigella flexneri*. La más severa manifestación de la infección con estas bacterias es una disentería bacilar, un síndrome caracterizado por evacuaciones pequeñas de sangre y moco. Las investigaciones se han enfocado en los mecanismos y efectos de la invasión bacteriana. La mayoría de las personas infectadas con estas bacterias presentan una diarrea líquida que puede o no continuar con disentería. En brotes con cepas EIEC más del 90% de los pacientes presentan sólo una diarrea líquida sin sangre. La diarrea líquida es difícil de explicar solamente en base de la invasión de las células, lo cuál lleva a la hipótesis que estas bacterias también pueden producir enterotoxinas que promueven la diarrea secretora (Nataro, J. *et al.*, 1995; Hale, T. *et al.*, 1985; Dagberg, B. *et al.*, 1992; Knutton, S. *et al.*, 1984; Reyes, L. 2000; Gordillo, M. *et al.*, 1992).

Posterior a una adherencia superficial y a través de una proteína denominada invasina, la bacteria se internaliza a la célula hospedera donde posteriormente se multiplican; pueden causar muerte celular y acumulación de polimorfonucleados. Este tipo de *E. coli* carga grandes plásmidos, similares a los de *Shigella*, que codifican para propiedades esenciales para la penetración de las bacterias a las células epiteliales del hospedero. Muchas investigaciones han revelado que todos los determinantes de invasión mediados por plásmidos y cromosomas identificados en *Shigella* también se encuentran en EIEC. La pérdida de los plásmidos está acompañada por la pérdida de invasividad. Aparentemente estos plásmidos, que tienen un

rango de 120 a 140 MDa, codifican para una o más enzimas y determinantes de virulencia, los cuales son necesarios para la expresión del fenotipo invasivo. La expresión de estos plásmidos ha demostrado ser suficiente y requerida para que estas bacterias invadan células epiteliales en ensayos *in vitro*. En *Shigella flexneri*, estos genes constituyen el regulón *vir*. Este regulón *vir* incluye los genes de DNA divergentes *ipa* y *mxi-spa*. El gen *ipaBCD* codifican para proteínas inmunodominantes asociadas a la superficie que actúan como adhesinas o invasinas, las cuáles están conservadas en EIEC. Entre las otras actividades atribuidas al gen *ipa* se encuentra una hemolisina (Ipa B) implicada en el escape de la bacteria del fagosoma. Los genes *spa* y *mxi* son la maquinaria especializada para presentar o secretar las proteínas de Ipa. Todo el regulón *vir* esta regulado por dos activadores transcripcionales, los productos de *virB* (*ipaR*) y *virF*, que funcionan en cascada. *Vir R* regula la represión del regulón *vir* en bajas temperaturas (30 °C). Otros factores de virulencia codificados en cromosomas son el gen *kcpA*, cuyo producto es necesario para la diseminación célula – célula; y los productos del *arg-mtl* ligados al locus *iuc*, que codifican para el sistema de sideróforo de aerobactina requerido para la adquisición de hierro dentro de la célula. La disentería bacilar por EIEC es clínicamente indistinguible de la causada por especies de *Shigella*, estudios con voluntarios humanos ponen la dosis de infección por EIEC unos grados de magnitud arriba de los necesitados por especies de *Shigella*. Menos de 500 organismos de *Shigella* se requieren para infectar una persona sana, pero se necesitan 10⁶ organismos de EIEC para infectar una persona. Se ha sugerido que la diferencia en dosis infectiva es debida a que *Shigella* sobrevive mejor al paso por el estómago ácido que EIEC, y que *Shigella* es más eficiente en entrar a las células del colón que EIEC (Hsia, R. *et al.*, 1993).

DAEC

E. coli que presenta una adherencia de tipo difuso (**Figura 4b**, página 53). Algunos ejemplos que ponen este

tipo de adherencia como causante de diarrea son: en estudios en Australia se aisló el patrón difuso en un 36.8% de niños que presentaban diarrea, en los niños mayores de 18 meses este tipo de adherencia si estaba relacionado con la diarrea (Gunzburg, S. *et al.*, 1993); en un estudio en África se estudiaron cepas EPEC causantes de diarrea y se encontró que el 13% de estas cepas EPEC presentaba un patrón de adherencia difuso (Forestier, *et al.*, 1992); en estudios en Guadalajara se aisló el patrón difuso en un 20.8% de pacientes con diarrea y en un 3.1% de serogrupos conocidos como EPEC (Mathewson, J. *et al.*, 1996); en un estudio en México se aisló en un 5% el patrón difuso pero no hubo una relación con la diarrea (Reyes, L. 2000); en un estudio en Argentina se aisló en un 29% de niños con diarrea aguda (Ortiz, A. *et al.*, 1992); en estudios en Brazil se aisló el patrón difuso en un 31% aunque no hubo una relación directa con la diarrea aunque podría ser un patógeno importante en niños mayores de 1 año (Scaletsky, I. *et al.*, 2002); en otro estudio en Brazil se aisló el patrón difuso en un 10% de personas con diarrea pero no hubo relación con la diarrea (Scaletsky, I. *et al.*, 1999); en estudios en Francia se aisló en un 30.7% por ensayos de adherencia el patrón difuso, y 13.7% por medio de hibridización de F1845, aunque no hubo una relación con significativa con la diarrea, pero las F1845 positivas tenían una asociación significativa con una pasada infección del tracto urinario, se establece que DAEC puede ser un patógeno importante en edades mayores de 2 años (Forestier, C. *et al.*, 1996); en un estudio en Italia se aisló el patrón difuso en un 25.8% de los casos de niños con diarrea aunque en este estudio no hubo una asociación significativa con la enfermedad (Morelli, R. *et al.*, 1988)

El patrón de adherencia difuso se reportó primero en cepas de *E. coli* que presentaban serotipos EPEC. Esas cepas tenían factores de adherencia codificados en plásmidos y no producían hemaglutininas. El factor de adherencia de una de estas cepas resulto ser una proteína de 10 kDa extra membranal codificada en un plásmido a la cuál se llamó: adhesina no fimbriar envuelta en la adherencia difuso o AIDA- I, por las siglas en inglés. Se reporto otro tipo de patrón difuso de cepas causante de diarrea que no eran de serotipos EPEC y

que eran negativas a los factores de virulencia de las 5 categorías diarrogénicas de *E. coli* (ETEC, EIEC, EHEC, EPEC y EAEC). A este tipo de cepas de *E. coli* se les puso el nombre de DAEC (por las siglas en inglés) ó *E. coli* que adhiere con patrón difuso. En una de estas cepas el determinante para una adhesina (fimbria F1845) se encontró dentro del cromosoma. Es una fimbria de la familia Dr que reconoce el antígeno del grupo sanguíneo Dr (a) como receptor. Esta familia incluye a miembros de *E. coli* uropatógenas tales como las adhesinas no fimbriales I y III, adhesinas no fimbriales Afa y la hemaglutinina Dr. Se ha demostrado que la adhesina Afa esta asociada a cepas EPEC (Keller, R. *et al.*, 2002). Las cepas DAEC que son positivas a pruebas de DNA de F1845 adhieren sólo a las células pero no al vidrio del ensayo y producen hemaglutinina resistente a D – manosa detectada con eritrocitos humanos. Estudios con voluntarios humanos usando cepas positivas para DNA F1845 han fallado en demostrar alguna patogenicidad, por lo cuál su importancia en la diarrea no ha sido esclarecida. Se han reportado otras cepas de DAEC que fueron negativas para los ensayos de DNA de F1845 y AIDA, en estas cepas los genes para la adherencia difusa se encontraron en plásmidos de resistencia a antibióticos conjugados (Yamamoto, T. *et al.*, 1996).

El patrón de adherencia difuso de *E. coli* (Figura 4b, página 53) se trató de inhibir por medio de extractos crudos de *G. seemanni*.

Importancia de *Escherichia coli* como patógeno causante de la diarrea en México

E. coli es uno de los patógenos más comúnmente aislado en casos de diarreas. Pero identificar si es parte de la microbiota intestinal o patógeno es un problema. Uno de los grandes problemas para evaluar el verdadero impacto de *E. coli* que causan diarrea en el mundo y en México ha sido el hecho de que no se cuentan con técnicas de diagnóstico rápidas y baratas. Desafortunadamente, las técnicas bioquímicas tradicionales del

laboratorio microbiológico permiten identificar a estos grupos de *E. coli*. Inicialmente en los años 70 algunas de estas cepas fueron identificadas utilizando la técnica de asas ligada de conejo (para el caso de toxinas), que como es obvio esta técnica sólo permite identificar un número muy limitado de muestras y no permite diferenciar de cual grupo de *E. coli* se trata. Posteriormente vinieron ensayos en células, o inmunológicos, los cuales son muy caros. Actualmente se utilizan técnicas de biología molecular dando lugar a una búsqueda más exhaustiva de la presencia de estas cepas en brotes o casos de diarrea, pero aún estas técnicas moleculares como el "colony blot" son laboriosas y costosas. Las enfermedades diarreicas en México continúan siendo de gran importancia en la Salud Pública Nacional, son la segunda causa de morbilidad, reportándose más de 4600 millones de casos en 1999. Por Lo tanto es de suma importancia evaluar y conocer el porcentaje de éstas enfermedades que son producidas por las *E. coli* que causan diarrea (García, T. 2001).

Sin embargo, existen evidencias epidemiológicas que incriminan a los diferentes serogrupos de *E. coli* como agentes responsables de la patogénesis de la diarrea, observándose una tasa muy alta de morbilidad infantil en diferentes regiones del mundo, principalmente en países en desarrollo. En México, en estudios con niños menores de cinco años con un cuadro clínico de diarrea, se reporta como el patrón más frecuentemente aislado al agregativo, observándose en niños con diarrea aguda con y sin sangre. La adherencia difusa se observó en niños con diarrea aguda en quienes se identificó otro patógeno (Rotavirus, Adenovirus, *Salmonella* y *Shigella*), por lo cuál se puede señalar que cepas que presentan este tipo de adherencia no tienen una importancia clínica en la patogénesis de la diarrea. El grupo de *E. coli* que presenta adherencia localizada, se asocio principalmente a casos de diarrea aguda sin sangre, en otras palabras cepas EPEC. Se reporto que el 86% de las cepas que presentan adherencia correspondiente a los patrones localizado y agregativo, se han relacionado en otros estudios de niños con cuadros de diarrea. Se ha demostrado que ETEC tiene una alta frecuencia (18-22%) como agente causal de la diarrea (Reyes, L. 2000).

En otros reportes de frecuencia de aislamiento de *E. coli* se ha reportado para las ETEC un 28% en condiciones endémicas y 65% en condiciones de brote; para las EIEC en un 11% en condiciones endémicas y 0.8 en condiciones de brote; para las EPEC en condiciones endémicas en un 6 % y en condiciones de brote en un 0.7%; para las EHEC en un 5% en condiciones endémicas y 0.08% en condiciones de brote; para las no patogénicas en un 50% en condiciones endémicas y 33% en condiciones de brote (Flisser, A. *et al.*, 2002).

En otro estudio de 1997 a 1999 se recibieron 12658 cepas de *E. coli* aisladas de cuadros de diarreas. Se encontró que el 58% de estas eran cepas patógenas de *E. coli*. El 37% de las cepas fueron ETEC siendo así, el grupo más importante capaz de producir diarrea, principalmente en niños menores de dos años de edad. De EIEC la frecuencia fue de 10%, y de EPEC de 7%. La frecuencia de EHEC fue la más baja encontrándola sólo en un 4% de los casos. La alta frecuencia de ETEC en niños menores de dos años, puede estar asociada al hecho de que es en esta edad cuando los niños dejan de ser amamantados. El grupo EIEC que da un cuadro clínico semejante al *Shigella* sp., no causó diarrea con moco y sangre como se esperaba. El grupo EPEC se encontró también en niños menores de 2 años principalmente. En cuanto a las EHEC ninguna era O157:H7 y la diarrea que causó no se presentó con sangre ni era asociada a HUS (síndrome urémico hemolítico) (Rodríguez, G. *et al.*, 2001).

Planteamiento del problema

En México existe, en la práctica, un sistema plural o mixto de la atención a la salud en el que coexisten la medicina profesional, la tradicional y la doméstica o casera. Para amplios sectores de la sociedad mexicana, y en particular los indígenas, la medicina tradicional constituye el principal o único recurso para la atención a la salud; para otros, mucho más numerosos, la medicina tradicional es una alternativa complementaria a la medicina profesional (Sepúlveda, J. 1994). La terapia antibacterial presenta métodos alternativos, particularmente la aplicación de extractos acuosos de plantas medicinales, los cuales se han usado en el tratamiento de diarreas infecciosas. Sin embargo, los mecanismos de acción de dichas plantas todavía no han sido esclarecidos (Turi, M. *et al.*, 1997). Las especies del Geranio han sido usadas en todo el mundo por diferentes culturas contra malestares estomacales y diarreas.

Con esto en mente se han hecho muchos estudios tratando de caracterizar los compuestos activos así como los mecanismos de acción de estos sobre los microorganismos causantes del padecimiento. Muchos de estos han sido enfocados a la búsqueda de antimicrobianos o sustancias bacteriostáticas, pero al no encontrar estos tipos de compuestos en las plantas o tener un efecto mínimo, se planteó buscar otro tipo de actividad que pudiera utilizarse para combatir a los microorganismos causantes de las diarreas. Así se estudia la inhibición de la adherencia por extractos de plantas, siendo uno de los primeros estudios los de Vázquez, S. (2001) y Rodríguez, R. (2001).

Algunos estudios sobre la inhibición de la adherencia se han basado en antimicrobianos conocidos en dosis no letales. En estos estudios se reporta una inhibición de la adherencia debido a: 1) una disminución en la

producción de fimbrias; 2) cambios en la composición de las proteínas de la membrana externa; y 3) cambios en las propiedades eléctricas e hidrofóbicas de la superficie de *E. coli* (Desnottes, J. *et al.*, 1989;1992;1994).

En cuanto a extractos naturales se han enfocado en las lectinas de plantas y frutas, las cuáles han dado algunos resultados positivos en extractos de calabaza, chayote, naranja, ciruela, papaya, marrubio, salvia, manzanilla y ruda, sobre *E. coli* O157:H7 (Coutiño Rodríguez, R. 2001).

Justificación

Hay un uso extendido de las plantas como remedio para curar las diarrea en nuestro país, este conocimiento tradicional ha sido usado desde hace mucho tiempo y ha sido pasado de generación en generación. No se tienen muchos datos acerca de los principios activos que puedan tener estas plantas y lo que puedan aportar a la ciencia en cuanto a alternativas farmacológicas y de uso en terapias contra estos padecimientos. Poco a poco han ido aumentando los estudios para elucidar los compuestos activos de las plantas y se han encontrado compuestos que han sido evaluados para combatir enfermedades como las diarreas o hasta el HIV. Las diarreas afectan principalmente a los niños menores de 5 años y toman la vida de 6849 niños al día y 2.5 millones al año, y aunque hay el conocimiento y las terapias para curar estas enfermedades, su incidencia ha ido aumentando durante los últimos años. Por otro lado, la aparición de cepas más virulentas o resistentes a antimicrobianos en las últimas décadas hace necesaria la búsqueda de nuevas formas de combatirlas, por lo que las plantas han sido la opción. Son muchos los factores responsables de la aparición de estas enfermedades emergentes (como *E. coli* O157:H7), los cuáles van desde cambios ecológicos debidos al desarrollo de la agricultura y economía, así como anomalías climáticas, cambios demográficos, el comercio y viajes, tecnología e industria, adaptación y cambios de las bacterias (Morse, S. 1995). Problemas como el calentamiento global contribuyen a expandir la incidencia y distribución de muchos desórdenes médicos (Epstein, P. 2000). La adherencia es uno de los pasos determinantes en el proceso infectivo de las bacterias (Deitsch, K. *et al.*, 1997) y su inhibición podría ser una alternativa muy importante en la cura de las diarreas y otras enfermedades. En los últimos años se han estudiado los efectos de extractos de plantas, así como de dosis no letales de antimicrobianos conocidos y cambios de osmoralidad por sales, sobre la adherencia de las bacterias a células, observando en algunos casos una gran inhibición. Algunos de los compuestos que se piensa tienen este tipo de actividad son lectinas, carbohidratos y pequeños péptidos. Estos

compuestos se encuentran en extractos acuosos de las plantas y podrían estar envueltos, junto con compuestos con actividad antimicrobiana moderada, en la inhibición de las bacterias a las células y por consiguiente, una mejoría del padecimiento al ingerir las plantas que los poseen.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar si los extractos acuosos de *Geranium seemanni* (Geranio) inhiben la adherencia de cepas de *E. coli* a células HEp- 2 por un efecto específico antiadherente ó por actividad antimicrobiana.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Obtener extractos acuosos crudos de *Geranium seemanni* (Extracto H₂O , Etanol / H₂O y Acetona / H₂O).
- 2.- Eliminar el agua y solvente de los extractos para evaluar su actividad antiadherente y / ó antimicrobiana.
- 3.- Estandarizar la técnica de adherencia
- 4.- Evaluar con los diferentes extractos su actividad de inhibición de la adherencia de los patrones difuso, localizado y agregativo, de *E. coli* a células HEp-2
- 5.- Analizar si el efecto de inhibición de la adherencia esta relacionado con actividad antimicrobiana de los extractos.

HIPÓTESIS

Los extractos acuosos de *Geranium seemanni* (Geranio) tienen compuestos con actividad antiadherente así como antimicrobiana sobre *E. coli*, lo que apoya su uso como remedio tradicional para la cura y el manejo de las diarreas.

MATERIAL Y MÉTODO

Material vegetal

Se hicieron tres salidas de campo para conseguir material fresco de *Geranium seemanni* y *Larrea tridentata* (especia que también se iba a estudiar). Para delinear las coordenadas geográficas de las posibles colectas se utilizó un geoposicionador (GPS) marca SUMMIT e-trex. Los ejemplares de *Larrea tridentata* (gobernadora) se colocaron en bolsas de plástico y se transportaron al Instituto de Química en donde se secaron al ambiente por una semana para finalmente guardarla en una caja. Se recolectaron dos ejemplares de herbario.

Con respecto al *Geranium seemanni* se trabajo con ejemplares obtenidos en colectas anteriores del laboratorio 2 –10 de Instituto de Química.

Preparación de extractos acuosos

Infusión

Se hicieron dos lotes de infusiones, una que se liofilizó y otra que se evaporó a temperatura ambiente en la campana durante 10 días. La preparación de ambos lotes se realizo de la siguiente manera. En un vaso de precipitados de 500 ml se calentaron 250 ml de agua destilada, al estar en ebullición se retiró del fuego y se agregaron 25 g de planta.seca, se tapo el vaso con papel aluminio y se dejó reposar por una hora y media. Después la infusión se filtro por un embudo con una gasa y se recolectó en un matraz. Un lote se puso a evaporar en la campana o extractor durante 10 días, cuidando que no se contaminara con hongos. Para disminuir el riesgo de contaminación se le agregaba todos los días 2 ml de Diclorometano (CH_2Cl). El

extracto sólido que quedó se colectó en un matraz previamente pesado cubierto con aluminio. Se determinó el peso del extracto obtenido, se tapó el matraz con parafilm y se guardó en refrigeración (4°C) hasta su uso.

El segundo lote, después de haber sido filtrado, se guardó en refrigeración (4°C). Al día siguiente se prepararon fracciones de 15 ml en matraces de bola. El extracto se congeló con acetona y hielo seco para liofilizar. El extracto liofilizado se colocó en un matraz cubierto en aluminio y previamente pesado. Se determinó el peso del extracto y se guardó en refrigeración (4°C).

Extracto Acetona / Agua y Etanol / Agua

Los extractos de Acetona / Agua (H₂O) y Etanol (EtOH) / Agua se hicieron de la siguiente manera. Se pesaron dos lotes de 50 g de *Geranium seemanni*. para cada extracto. Se pusieron a macerar en 500 ml del solvente. Para el caso del extracto de Acetona / Agua se preparó una mezcla de 250 ml de acetona y 250 ml de agua. Para el caso de Etanol / Agua se preparó una mezcla de 150 ml de Etanol con 350 ml de Agua. Cada extracto se maceró dos veces. Después de cada macerado el extracto se filtro y se puso a evaporar en la campana por 10 días. Al final el extracto sólido se obtuvo por raspado y se puso en un matraz envuelto en aluminio y previamente pesado. Se determinó el peso de cada extracto, se taparon los matraces con parafilm y se guardaron a temperatura ambiente.

Inhibición de la adherencia

Se realizó el ensayo de adherencia a células HEP-2; utilizando el método propuesto por Cravioto y cols. (1979) con algunas modificaciones (**Diagramas 1 y 2**).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

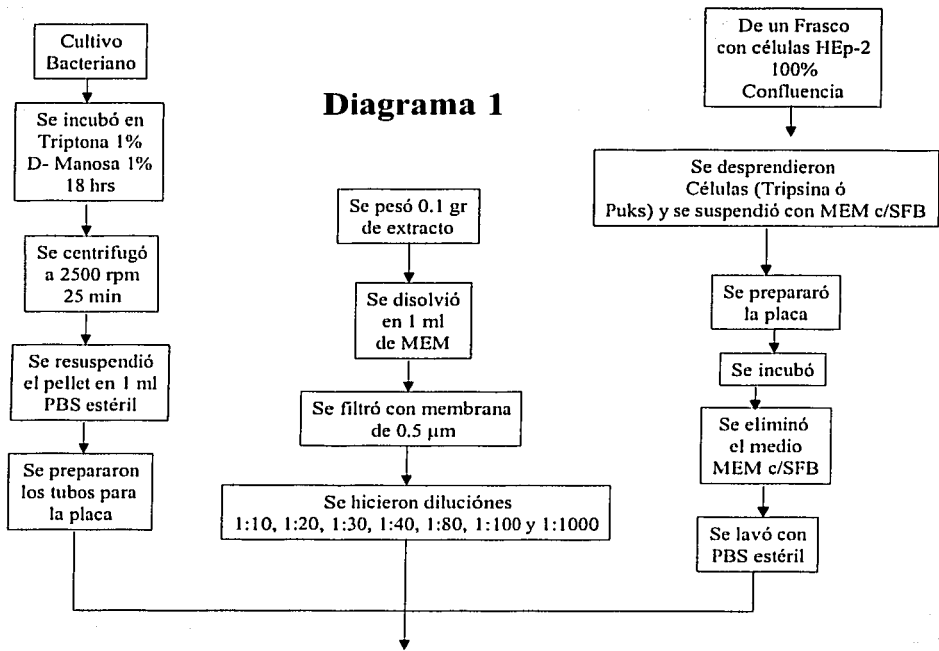


Diagrama 1. Preparación de ensayo de adherencia

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

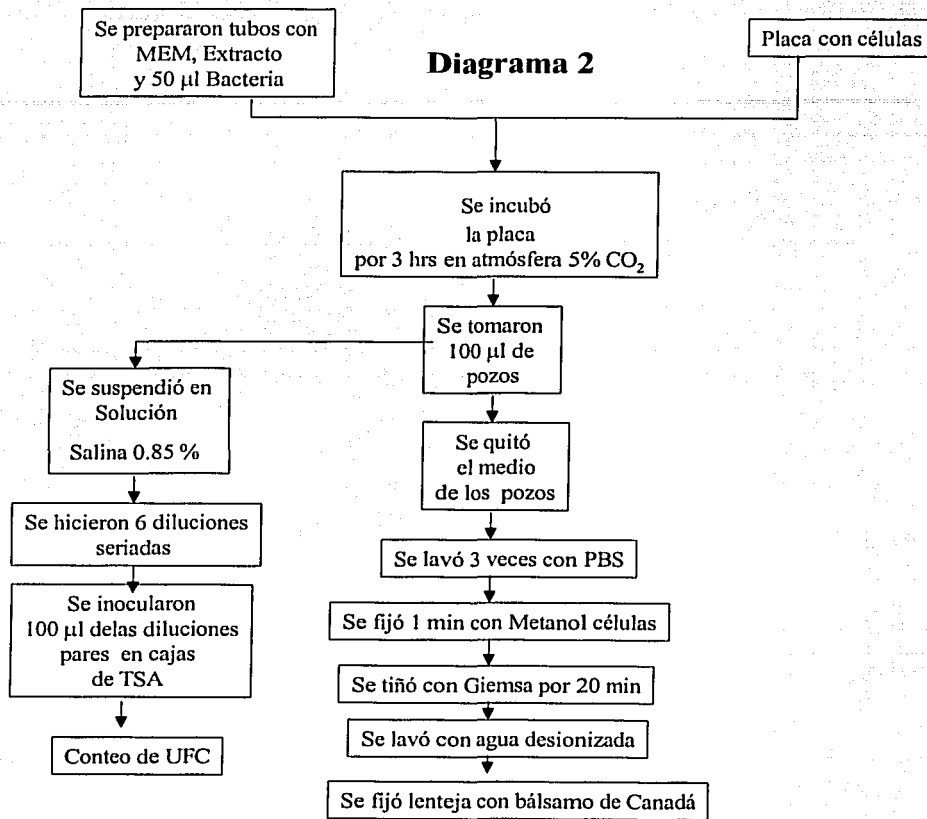


Diagrama 2. Ensayo de adherencia

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Preparación de extracto para adherencia

Se pesó 0.1 g del extracto a probar en un tubo eppendorf, se le agregó 1 ml de Medio Mínimo Esencial (MEM) (**Apéndice 1**) sin Suero Fetal Bovino (SFB) para diluir y se filtró por una membrana Fluoropore estéril (Millipore FHLPO1300), con un poro de 0.45 μm y 13 mm de diámetro. El filtrado se colectó en tubo eppendorf estéril para obtener la dilución 1:10, posteriormente en condiciones de esterilidad se hicieron las siguientes diluciones con MEM: 1:20, 1:40, 1:80, 1:100 y 1:1000.

Preparación de inóculo bacteriano

Se inoculó una cepa control de cada patrón de adherencia (cepa con adherencia agregativa O42 con clave FMU 9201, cepa con adherencia difusa con clave FMU 99112 y cepa con adherencia localizada con clave FMU 89302) de *E. coli* durante 18 horas a 37^o C, en agitación (150 rpm) en tubos con 3 ml de caldo Triptona al 1 % (**Apéndice 1**) con D-manosa al 1 % (**Apéndice 1**). El cultivo obtenido se centrifugó 25 minutos a 2500 rpm, se eliminó el sobrenadante y el botón bacteriano se resuspendió en 1 ml de amortiguador de fosfatos (PBS) (**Apéndice 2**). Se preparó un tubo estéril por cada pozo de la placa en los cuáles se agregaron 50 μl del inóculo bacteriano (excepto los controles celulares), 850, 950 y 1000 μl de MEM sin SFB (dependiendo del pozo) y 100 μl del extracto (excepto controles celulares y bacterianos). La forma en la que se preparó los inóculos bacterianos se esquematizan en las **Figuras 1 y 2**.

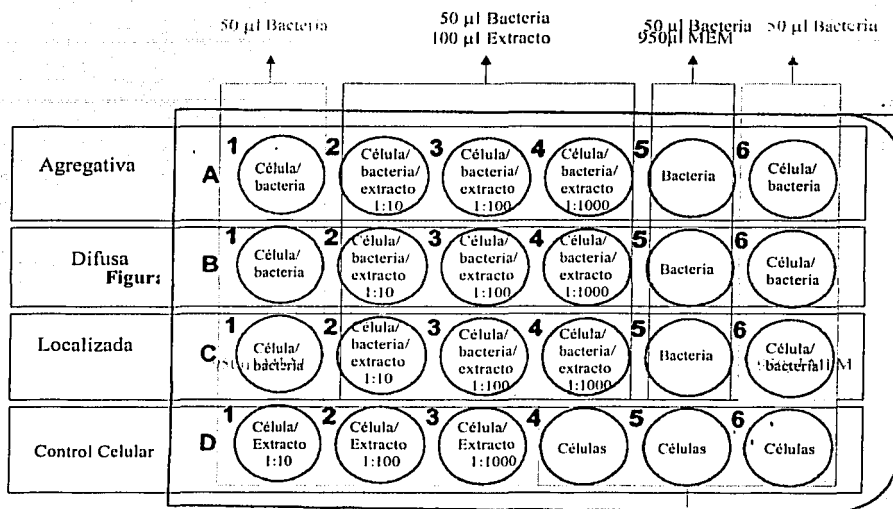


Figura 1

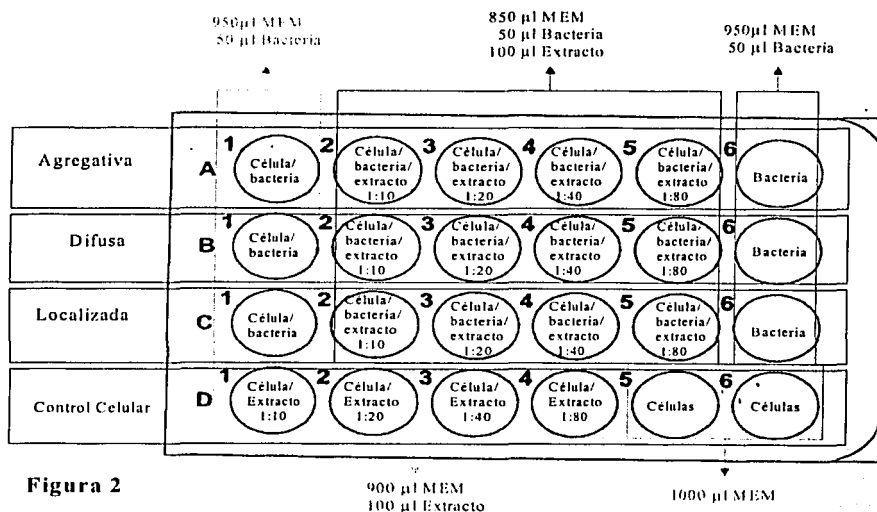


Figura 2

Figura 1. Disposición de células HEp-2, Bacterias de *E. coli* y concentración de extracto

Figura 2. Disposición de células HEp-2, Bacterias de *E. coli* y concentración de extracto

Preparación de Células HEP-2

Las células HEP-2 de una botella para crecimiento celular de 250 ml con 100% de confluencia (cantidad de células) se lavaron con 2 ml de solución de PUKS o Tripsina (**Apéndice 2**) desechando el sobrenadante por el lado contrario de la monocapa. Se agregaron otros 2 ml de la solución de PUKS o Tripsina y se incubó por 3-5 minutos, hasta que la monocapa celular se puso turbia. Las células se resuspendieron en 25 ml de MEM. Previamente se había preparó una placa de propileno de 24 pozos colocando una lenteja (cubreobjetos redondo estéril) en cada pozo a excepción de los pozos en los que no se iban a crecer las células (**Figuras 1 y 2**). Se agregó 1 ml de células resuspendidas a cada pozo que contenía la lenteja. A los pozos donde no se crecieron las células no se les agregó nada. La placa se incubó a 37 °C en atmósfera de CO₂ 5% y 85 % de humedad durante 24 horas para obtener una monocapa de 90 al 95 % de confluencia. Antes de inocular las cepas de *E. coli* se retiró de cada pozo con células el medio con una pipeta Pasteur y se lavó tres veces con PBS estéril para quitar los residuos de medio y antibiótico.

Ensayo de adherencia

Se agregó a los pozos previamente lavados con PBS el inóculo bacteriano con el extracto a probar (**Diagrama 2**). Las placas se incubaron por 3 horas a 37 °C en una atmósfera de 5 % de CO₂, después de este periodo, de los pozos 2A, 2B, 2C , 5A, 5B, 5C y 6A (**Figura 3**) se tomaron 100 µl en condiciones de esterilidad. Para visualizar el efecto de los extractos se descartó de cada pozo el resto del medio de cultivo y se lavó tres veces con 1 ml de PBS, con la finalidad de quitar las bacterias no adheridas a las células. La

preparación se fijó con 1 ml de metanol por 1 minuto, posteriormente se adicionó 1 ml de colorante de Giemsa dejando teñir durante 20 minutos; cada pozo se lavó nuevamente tres veces con 1 ml de agua desionizada para eliminar el exceso de colorante.

Las lentes teñidas se pasaron 30 seg. en cada una de las siguientes soluciones: Acetona 1; acetona 2; acetona / xileno (vol / vol), xileno 1; xileno 2 para deshidratar las células.

Para observar al microscopio las lentes se colocaron en un portaobjetos previamente marcado con la clave del experimento, la preparación se fijó con bálsamo de Canadá, colocando la lenteja con la monocapa celular hacia abajo, las preparaciones una vez secas se observaron con el objetivo de inmersión.

De cada experimento se hicieron 2 repeticiones, para tener al final 4 placas por cada extracto. Se analizaron 10 campos por cada preparación, se contó el número de células colonizadas (que tuvieran bacterias adheridas) para determinar el porcentaje de células infectada. Se comparó el número de células infectadas del control contra el de los extractos y se hicieron pruebas de χ^2 para evaluar la significancia de los resultados. También se anotaron los cambios o daños que se observaron en la células de cada una de las muestras.

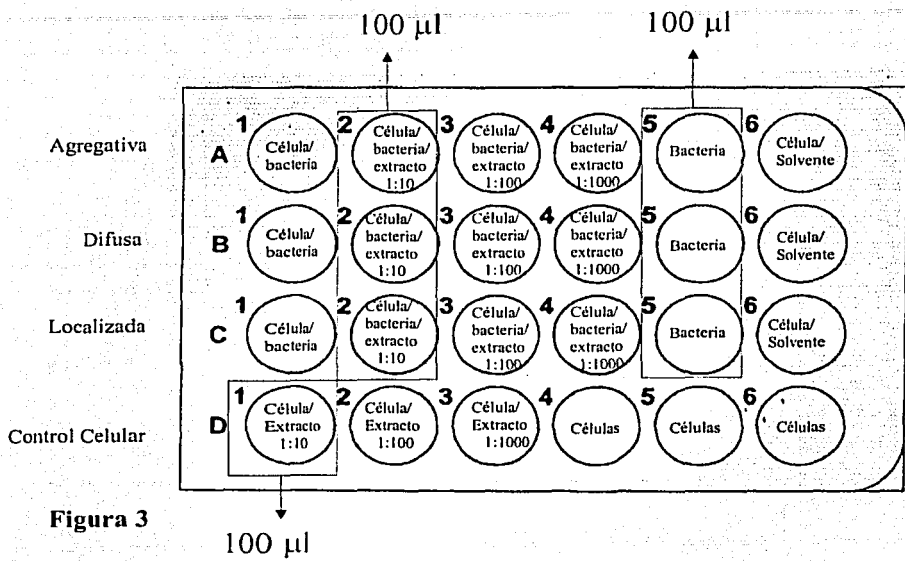


Figura 3

Figura 3. Pozos de los cuáles se tomaron 100 µl para hacer el conteo de UFC.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Cuantificación de unidades formadoras de colonias (UFC)

Se hicieron 6 diluciones seriadas en solución salina (0.85 %), con los 100 µl tomados de cada uno de los pozos. Se inocularon 100 µl de las diluciones pares en cajas de TSA y se sembraron por estría cerrada. Se incubaron por 18 horas y se contaron las UFC.

Pruebas estadísticas χ^2 y t de Student

La prueba de χ^2 se hizo analizando los porcentajes obtenidos de células colonizadas por matrices de Excel para cada uno de los diferentes extractos. Después se corrió el programa de χ^2 de Excel tomando los porcentajes capturados comparándolos con los porcentajes de los controles para cada extracto. Se usó 1 grado de libertad para el análisis estadístico.

La prueba de t de Student se realizó comparando el número de UFC sin extracto contra el número de UFC con extracto. La Prueba de "t" de Student se realizó en Excel con una cola debido a que los datos que se esperaban eran inferiores a los del control, es decir tenían una dirección. Los estadísticos con dos colas se hacen cuando los datos no tienen una dirección establecida. Por último se tomó en cuenta el tipo de estadísticos con datos pareados y un grado de libertad debido a que era el que mejor se ajustaba a las condiciones del ensayo. En el caso de los 100 µl tomados del pozo D1, sólo se hizo una dilución y se inoculó una caja petri con TSA con asa cerrada para descartar la posibilidad de contaminación por el extracto.

Imágenes

Se tomaron imágenes (100x) de los diferentes ensayos con cada uno de los extractos en un microscopio de luz (Leika DMLS conectado a una cámara Leika DC 300) y se capturaron en el programa QWin versión 1, posteriormente se editaron en el programa Adobe Photoshop 4.0. (**Figuras 4 a-c, 8 a- d, 9 a- d, 10 a – d y 11 a,b**).

RESULTADOS

Material vegetal

Se hizo una investigación en el MEXU para conocer posibles lugares para la colecta de *Larrea tridentata* (especie que se pretendía estudiar) y *Geranium seemanni*. Se buscaron lugares de colecta que no estuvieran muy lejos del D.F. Así se planeó una salida a Hidalgo para coleccionar las dos plantas en el mes de noviembre del 2002. En la salida a Hidalgo sólo se obtuvo material vegetal de *Larrea tridentata* (Gobernadora). Esta se colectó el 30 de noviembre del 2002 en el municipio de Ixmiquilpan Hidalgo., cerca del kilómetro 29.5 de la carretera de Actopan a Ixmiquilpan. Se colectaron dos ejemplares de herbario con coordenadas geográficas N20°25.299' WO 99°07.983' y N20°25.296' WO 99°08.025', el primero que presentaba botones de flores, y el segundo sin estos. Se tomaron datos de colecta de cada uno de los ejemplares y una foto del ejemplar con botones antes de ser colectado. Los ejemplares de herbario fueron identificados por el Biólogo Lucio Lazada Pérez en el laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias. Los ejemplares se incluyeron en el MEXU con los números de catálogo 1062592 y 1062593 de la sala Opuntia.

Se realizaron dos salidas al estado de Morelos para coleccionar el *Geranium seemanni*, sin embargo no se localizó la planta por la época en la cuál se realizó la colecta. Por tal motivo se trabajó con ejemplares de *Geranium seemanni* existentes en el Instituto de Química. Se realizó la identificación de estos ejemplares en el herbario de la Facultad de Ciencias, donde Lucio Lazada Pérez y Nelly Diego la identificaron como una planta de la familia Geraniaceae, posiblemente *Geranium seemanni* aunque no se pudo confirmar. Por lo anterior la identificación se dejó hasta coleccionar la planta en su siguiente ciclo de floración de agosto a septiembre. Posteriormente se obtuvo un ejemplar y material vegetal en agosto del 2003 y se identificó

positivamente como *Geranium seemanni* en el Laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias, UNAM, por Lucio Laza Pérez.

Infusiones y extractos

El mayor rendimiento de los extractos obtenidos se observó en Acetona / H₂O y Etanol / H₂O (34.193 g y 27.4025 g respectivamente). En las infusiones el rendimiento fue de 10 a 15 veces menor, lo anterior probablemente debido a que la cantidad de planta y agua fueron la mitad de las utilizadas en los extractos y sólo se maceró una sola ocasión (**Cuadro 1**).

Producto	Gramos
Geranio Liofilizado	1.2878
Geranio Evaporado	2.886
Geranio Acetona / H₂O	34.193
Geranio Etanol / H₂O	27.4025

Adherencia

La estandarización del ensayo de adherencia se realizó con las cepas de referencia, dado que no se obtuvieron resultados satisfactorios se probaron diferentes clonas hasta que se obtuvieron los controles adecuados. De la cepa con adherencia localizada (FMU 89302) se purificaron diferentes colonias y se escogió la que dio un patrón óptimo y repetible (**Figura 4 a**). Para el patrón difuso se seleccionó la cepa con número FMU 99112 (**Figura 4 b**) y del patrón agregativo la cepa O42 con número FMU 9201 (**Figura 4 c**). Con estas cepas se hicieron 4 ensayos de adherencia para estandarizar la técnica y ver que los patrones de adherencia fueran reproducibles.

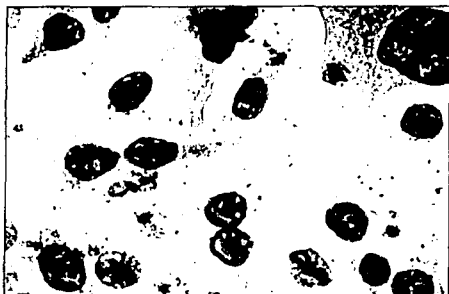


Figura 4a. Adherencia localizada



Figura 4b. Adherencia difusa

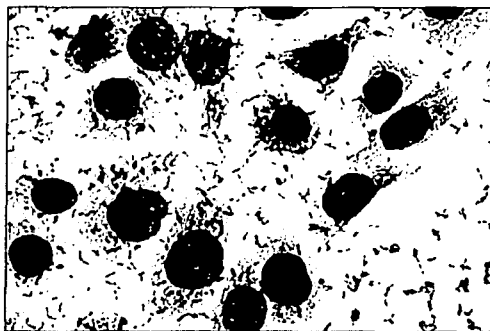


Figura 4c. Adherencia agregativa

Figura 4 a. Adherencia localizada a células HEp-2 con la cepa FMU 89302.

Figura 4 b. Adherencia difusa a células HEp-2 con la cepa FMU 99112.

Figura 4 c. Adherencia agregativa a células HEp-2 con la cepa FMU 9201

Inhibición de la adherencia

La inhibición de la adherencia a células Hep-2 de las diferentes cepas seleccionadas se realizó con cada uno de los extractos obtenidos (**Cuadro 2**).

Cuadro 2. Efecto de inhibición de la adherencia a células HEP-2 inducido por diferentes extractos			
Extracto	Inhibición de los patrones de Adherencia		
	Localizado	Agregativo	Difuso
Geranio Liofilizado	+	+	+
Geranio Evaporado filtrado	+	-	-
Geranio Evaporado sin filtrar	+	+	+
Geranio EtOH / H ₂ O	- (A)	+	+
Geranio Acetona / H ₂ O	+	-	- (A)

*Se tomo como inhibición positiva (+) de la adherencia una $p < 0.05$ en la prueba de χ^2 en la concentración más alta del extracto.
(A) Se observó un efecto antimicrobiano en el extracto con la prueba de t de Student.

En este se observa que el extracto de Geranio liofilizado y el Geranio evaporado sin filtrar tienen un efecto inespecífico, ya que inhiben los tres patrones de adherencia. Por otro lado, el Geranio evaporado filtrado y Geranio Acetona / H₂O mostraron un efecto específico de inhibición sobre el patrón de adherencia localizado. Con respecto al Geranio EtOH / H₂O resulta interesante observar que mostró un efecto de inhibición en los patrones agregativo y difuso, además de una actividad antimicrobiana contra la cepa localizada.

Realizando un análisis cuantitativo se encontró que la inhibición de la adherencia con patrón localizado los porcentajes de células colonizadas mostraron casi un 0% con los extractos de Geranio Liofilizado, Geranio Evaporado sin filtrar, Geranio Acetona / H₂O y Geranio EtOH / H₂O (**Figuras 5 A, C, D y E**); y

aproximadamente 25 % con el extracto Geranio Evaporado Filtrado (**Figura 5 B**). La inhibición mostró una relación dosis respuesta con la mayoría de los extractos, con excepción del Geranio EtOH / H₂O (**Figura 5D**).

Adherencia a células HEp-2 de una cepa control de *E. coli* con patrón localizado. Se realizaron diluciones seriadas del extracto y se determinó el porcentaje de células con bacterias adheridas.

En el ensayo de inhibición de la adherencia del patrón agregativo se observó sólo un pequeño número de células colonizadas (5%) con el extracto Geranio EtOH / H₂O (**Figura 6 D**). Con Geranio Evaporado sin filtrar y con Geranio Liofilizado se observó 60 y 45% de células sin bacterias respectivamente (**Figura 6 C y 6 A**). Nuevamente se observó un efecto dosis respuesta, con mayor efecto en las concentraciones más altas y con nulo en las muestras más diluidas. Con respecto a los extractos Geranio Evaporado y Geranio Acetona / H₂O, estos no mostraron ningún efecto de inhibición sobre la adherencia del patrón agregativo. Resulta interesante observar que con los extractos Acetona / H₂O y EtOH / H₂O el patrón se observándose las bacterias dispersas.

En el patrón de adherencia difuso los porcentajes de células colonizadas fueron aproximadamente del 20% con el extracto Geranio Evaporado sin filtrar (**Figura 7C**), 40% con el extracto Geranio Acetona / H₂O (**Figura 7E**), 60% con el extracto Geranio EtOH / H₂O (**Figura 7D**) y 70% con el extracto Geranio Liofilizado (**Figura 7A**). El comportamiento nuevamente es de dosis respuesta. El efecto del extracto actúa solo con las concentraciones más altas y llega a ser negativo con el más diluido. El extracto de Geranio Evaporado no mostró actividad de inhibición con la muestra más concentrada (**Figura 7B**).

Figura 5 a

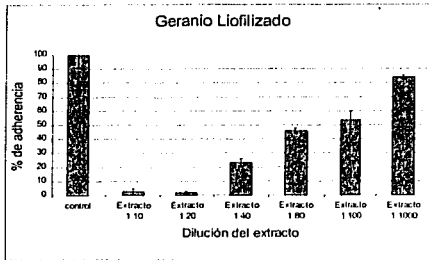


Figura 5 b

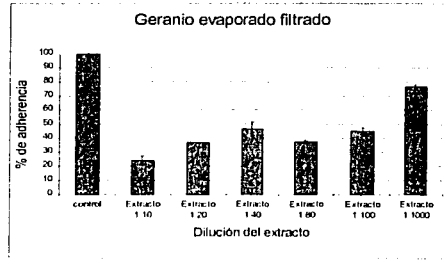


Figura 5 c

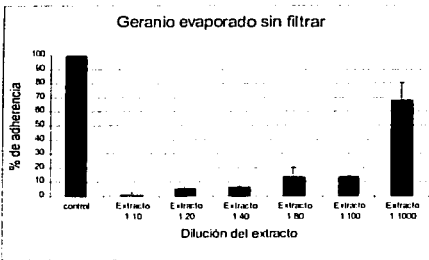


Figura 5 d

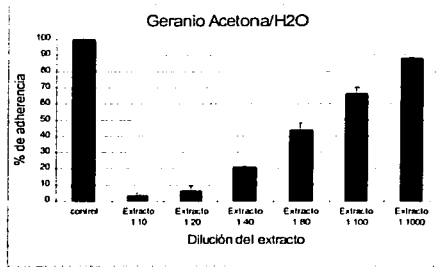
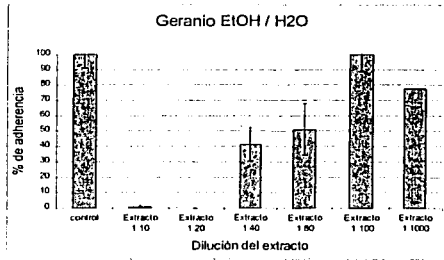


Figura 5 e

Figuras 5 a,b,c,d y e. Gráficas en las que se muestra el porcentaje de células HEP-2 colonizadas por el patrón localizado con los diferentes extractos y diluciones de *G. seemanni*.

Figura 6 a

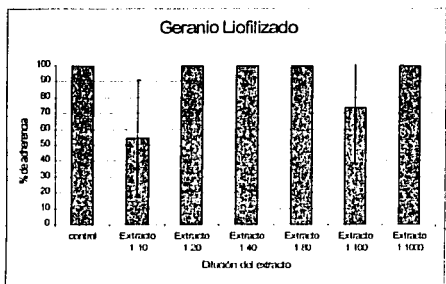


Figura 6

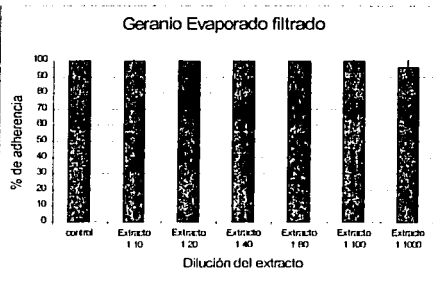


Figura 6 c



Figura 6 d

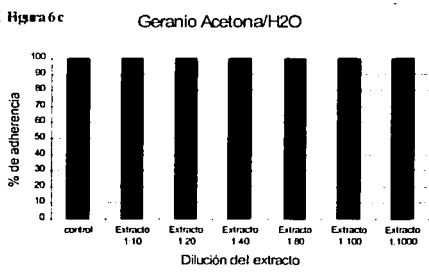
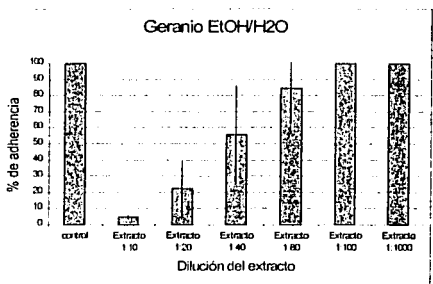


Figura 6 d

Figuras 6 a,b,c,d y e. Gráficas en las que se muestra el porcentaje de células HEP-2 colonizadas por el patrón agregativo con los diferentes extractos de *G. seemanni*.

Figura 7 a

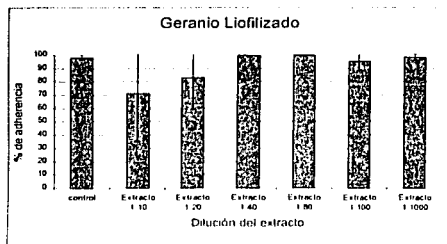


Figura 7 b

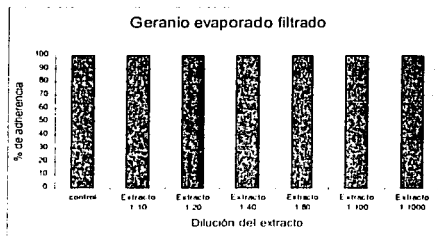


Figura 7 c

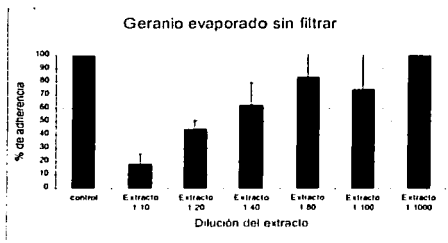


Figura 7 d

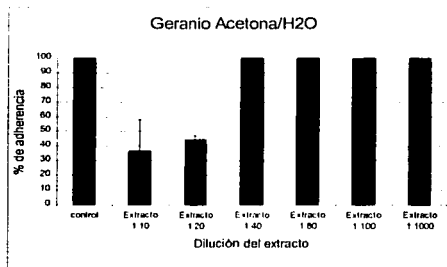
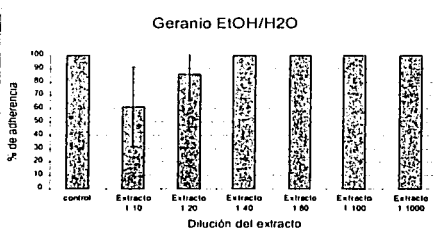


Figura 7 e

Figuras 6 a,b,c,d y e. Gráficas en las que se muestra el porcentaje de células HEP-2 colonizadas por el patrón difuso con los diferentes extractos de *G. seemannii*.

Análisis estadístico

Prueba de χ^2

Al evaluar la significancia del efecto inhibitorio de los diferentes extractos se observó en la adherencia localizada $p < 0.05$ con todos los extractos, excepto el de Acetona / H₂O en la dilución 1:1000 (**Cuadro 3**).

Cuadro 3. Valores de P de la prueba de χ^2 comparando las diluciones de los diferentes extractos con el control sin extracto para el patrón localizado

	Geranio liofilizado	Geranio evaporado filtrado	Geranio evaporado sin filtrar	Geranio EtOH / H ₂ O	Geranio Acetona / H ₂ O
Extracto 1:10	9.4885×10^{-37}	1.07597×10^{-80}	7.65029×10^{-40}	5.29707×10^{-42}	1.59258×10^{-32}
Extracto 1:20	1.09725×10^{-23}	6.9483×10^{-9}	3.61183×10^{-29}	9.8504×10^{-25}	3.23316×10^{-13}
Extracto 1:40	4.81191×10^{-16}	5.98×10^{-21}	1.11515×10^{-28}	2.87051×10^{-11}	1.43867×10^{-10}
Extracto 1:80	7.67331×10^{-10}	9.44155×10^{-9}	7.09615×10^{-24}	1.82475×10^{-9}	1.94767×10^{-5}
Extracto 1:100	1.63297×10^{-8}	2.13279×10^{-7}	8.5474×10^{-23}	0.016659178	0.033231568
Extracto 1:1000	0.003573172	0.006228532	1.62306×10^{-3}	0.004307809	0.674139184

En el caso del patrón agregativo se observaron valores de $p < 0.05$ para las primeras diluciones de los extractos Geranio Liofilizado, Geranio Evaporado sin filtrar y Geranio EtOH / H₂O (**Cuadro 4**). Sin embargo, los extractos Geranio evaporado Filtrado y Geranio Acetona / H₂O no dieron resultados significativos de inhibición ($p > 0.05$ o igual a 1).

Cuadro 4. Valores de P de la prueba de χ^2 comparando las diluciones de los diferentes extractos con el control sin extracto para el patrón agregativo

	Geranio liofilizado	Geranio evaporado filtrado	Geranio evaporado sin filtrar	Geranio EtOH / H ₂ O	Geranio Acetona / H ₂ O
Extracto 1:10	2.57583×10^{-20}	0.868720297	4.98846×10^{-41}	6.19924×10^{-80}	1
Extracto 1:20	1	1	0.00020592	9.26485×10^{-29}	1
Extracto 1:40	1	1	1	9.90785×10^{-13}	1
Extracto 1:80	1	1	1	0.002256712	1
Extracto 1:100	5.31502×10^{-7}	0.724132541	1	1	1
Extracto 1:1000	1	0.480261304	1	1	1

Para el patrón difuso se observaron valores de $p < 0.05$ para las primeras diluciones de los extractos Geranio Liofilizado, Geranio Evaporado sin filtrar, Geranio Acetona / H₂O y Geranio EtOH / H₂O (**Cuadro 5**). El extracto Geranio evaporado filtrado fue el único que no mostró diferencias significativas ($p = 1$).

Cuadro 5. Valores de P de la prueba de χ^2 comparando las diluciones de los diferentes extractos con el control sin extracto para el patrón difuso

	Geranio liofilizado	Geranio evaporado filtrado	Geranio evaporado sin filtrar	Geranio EtOH / H ₂ O	Geranio Acetona / H ₂ O
Extracto 1:10	7.36993×10^{-15}	1	2.87553×10^{-57}	3.09771×10^{-18}	1.37328×10^{-28}
Extracto 1:20	0.000828196	1	5.24555×10^{-14}	0.005259458	2.39602×10^{-19}
Extracto 1:40	1	1	4.5572×10^{-10}	1	1
Extracto 1:80	1	1	2.5277×10^{-6}	1	1
Extracto 1:100	0.343275884	1	8.98862×10^{-11}	1	1
Extracto 1:1000	0.766443832	1	1	1	1

Prueba t de student para UFC

Al evaluar el efecto de los extractos sobre las cuentas de UFC con la concentración más alta de los diferentes extractos, comparado contra el control sin extracto por medio de una prueba de "t" de Student se observaron valores de $p < 0.05$ para el extracto Geranio EtOH / H₂O con el patrón localizado y con el extracto Geranio Acetona / H₂O con el patrón Difuso (**Cuadro 6**).

Cuadro 6. Valores de P para la prueba de t de student comparando las UFC con mayor concentración de los diferentes extractos con el control sin extracto			
	Diferentes patrones de adherencia de <i>Escherichia coli</i>		
Extracto	Agregativo	Localizado	Difuso
Geranio EtOH/H₂O	0.229270015	0.012725611	0.204832765
Geranio evaporado s/f	0.081227078	0.067193095	0.116875061
Geranio Evaporado filtrado	0.464776713	0.052568457	0.05117237
Geranio Acetona/H₂O	0.296816495	0.492598779	0.045167235
Geranio liofilizado	0.359187911	0.431206525	0.097735692

El análisis de las imágenes obtenidas en la observación con el microscopio se muestran los patrones típicos localizado, agregativo y difuso (**Figuras 8a, 9a y 10a**). Al tratar las células con el geranio liofilizado se observa como con el extracto más concentrado el efecto de adherencia localizada y agregativa se inhiben prácticamente en el 100% (**Figuras 8b y 9b**) determinado lo anterior por la ausencia de bacterias. Sin embargo, en el caso de la adherencia difusa la inhibición es parcial (**Figura 10 b**), ya que aunque disminuye el número de bacterias aún se aprecia una cantidad importante de estas. A una mayor dilución del extracto se observa que el efecto de inhibición se hace negativo en los tres patrones de adherencia (**Figuras 8, 9 y 10 c,d**).

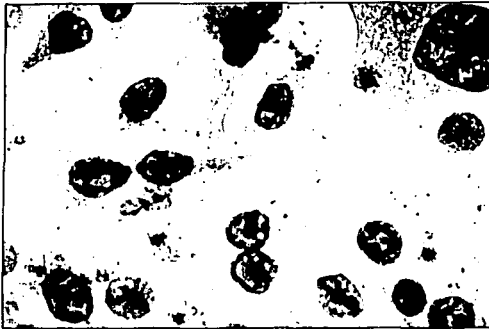


Figura 8a. Control del patrón localizado sin extracto.

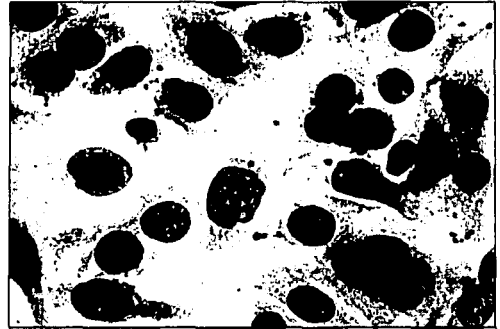


Figura 8b. Extracto dilución 1:10 del Geranio liofilizado.

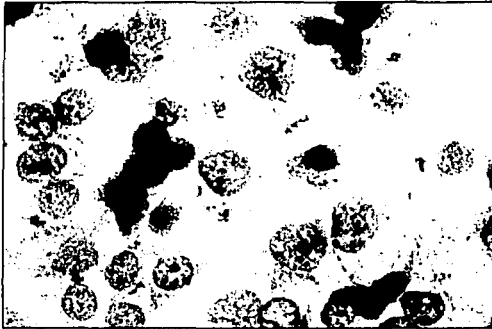


Figura 8c. Extracto dilución 1:80 del Geranio liofilizado.

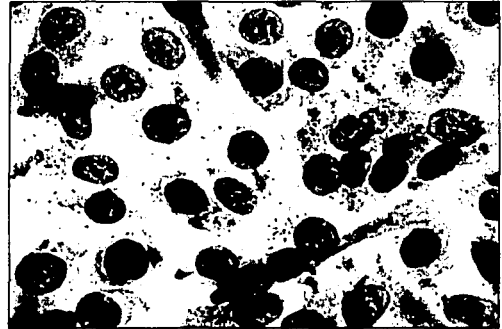


Figura 8d. Extracto dilución 1:1000 del Geranio liofilizado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

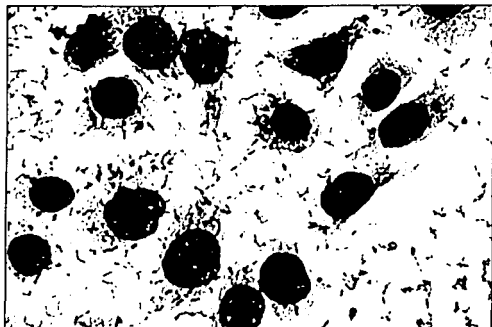


Figura 9a. Control del patrón agregativo

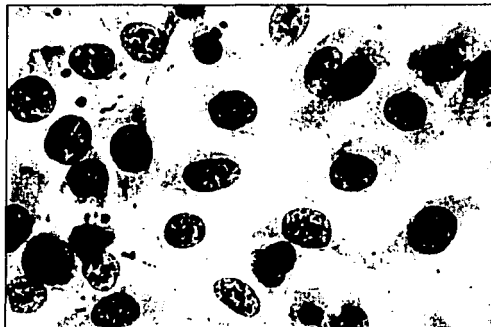


Figura 9b. Extracto dilución 1:10 del Geranio liofilizado.

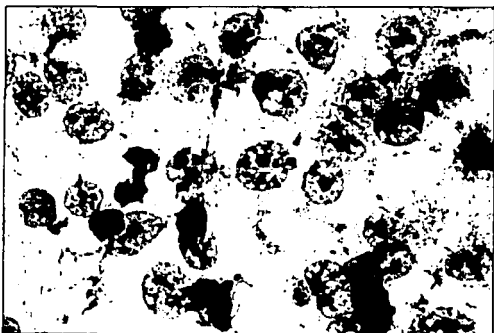


Figura 9c. Extracto dilución 1:80 del Geranio liofilizado.

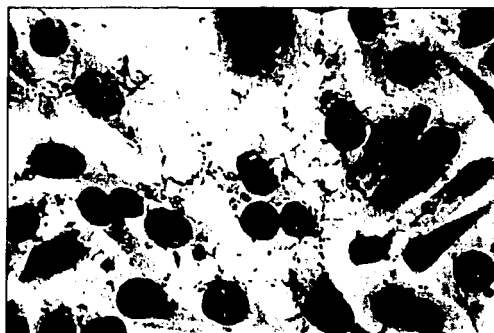


Figura 9d. Extracto dilución 1:1000 del Geranio liofilizado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Figura 10a. Control del patrón difuso sin extracto.

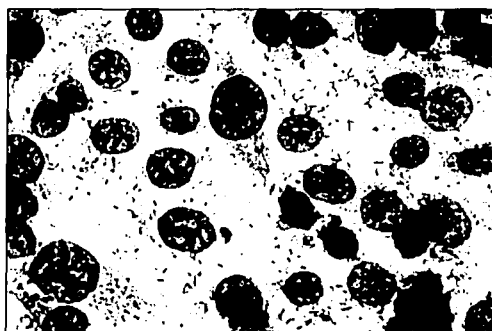


Figura 10b. Extracto dilución 1:10 del Geranio liofilizado.

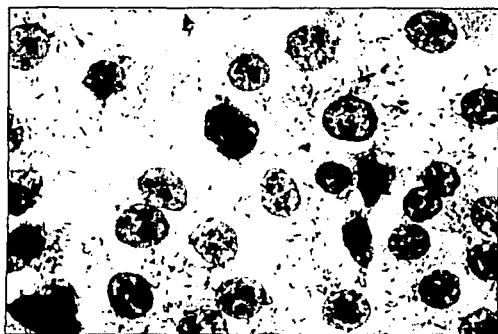


Figura 10c. Extracto dilución 1:80 del Geranio liofilizado.

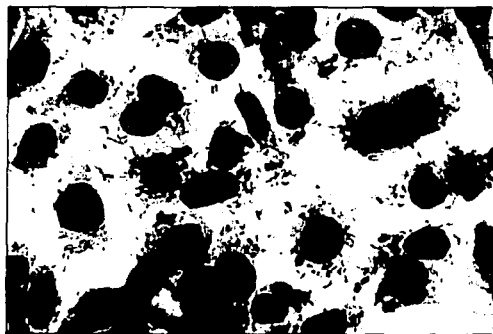


Figura 10d. Extracto dilución 1:1000 del Geranio liofilizado.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Daño Celular

A demás de la actividad de inhibición de la adherencia algunos extractos causaron un efecto de daño sobre las células HEP-2. Algunos de los cambios observados en las células HEP-2 fueron la formación de vacuolas, aumento del tamaño del núcleo e incluso desprendimiento celular (**Cuadro 7**).

Cuadro 7. Alteraciones observadas en las células HEP-2 con los diferentes extractos	
Extracto	Alteraciones observados en células HEP-2
Geranio EtOH / H₂O	Células con pequeñas vacuolas, núcleos muy teñidos y grandes
Geranio evaporado s/f	Se observó alargamiento del citoplasma celular y lisis en las concentraciones más altas, y en las más bajas formación de pequeñas vacuolas
Geranio Evaporado filtrado	Se observaron pequeñas vacuolas en las concentraciones más altas
Geranio Acetona / H₂O	Desprendimiento celular, en algunos casos lisis de citoplasma en concentraciones altas, células muy vacuolizadas
Geranio liofilizado	Se observaron pequeñas vacuolas en las concentraciones más altas y en algunos casos el núcleo se vio más teñido y grande

ANÁLISIS DE RESULTADOS

El 29 de agosto del presente año se hizo una salida de campo con el objetivo de coleccionar material fresco del geranio y coleccionar un ejemplar de herbario. Se coleccionó un ejemplar cerca de la carretera a Oaxtepec Km 28-30, en el municipio de Santa Ana Tlacotenco de Milpa Alta. Este ejemplar presentaba flor y fruto y fue identificado por Lucio Lazada Pérez en el laboratorio de Plantas Vasculares de la Facultad de Ciencias como *Geranium seemanni* (Peyritsch). Se metió el ejemplar al MEXU aunque queda pendiente el número de catálogo. Cabe destacar que hay serios problemas taxonómicos en el género, principalmente debido a una mala aplicación del nombre *Geranium mexicanum*. Esto ha dado lugar a que durante muchos años se haya

usado el nombre de *Geranium mexicanum* en un sentido amplio, englobando a muchas especies de geranios. Se estudió el efecto de cuatro extractos de *G. seemanni* (**Cuadro 1**) sobre la adherencia de cepas control de los diferentes patrones de adherencia (localizado, agregativo y difuso) de *E. coli* a células HEp-2 así como su posible actividad antimicrobiana. Los resultados mostraron un efecto de inhibición con una curva dosis respuesta y comportamientos diferentes para cada patrón de adherencia con los diferentes extractos. La cepa de *E. coli* con patrón de adherencia localizada fue más sensible a los diferentes extractos de *G. seemanni* mostrando una inhibición de hasta un 90% con las concentraciones más altas (**Figuras 5 A, B, C, D y E; Cuadro 2**). Esta inhibición se observa en la mayoría de los extractos probados y presenta diferencias significativas en todos los extractos y diluciones (**Cuadro 2 y 3**) excepto con el extracto de Geranio Acetona / H₂O en la dilución más alta (1:1000), en donde no se observan diferencias significativas comparando con el control. En el caso de Geranio EtOH / H₂O hay diferencias significativas en cuando a las UFC (**Cuadro 2 y 6**), lo cuál indica que la disminución de colonias adheridas, en este caso particular, podría deberse a un efecto antimicrobiano. Es con este extracto (Geranio EtOH / H₂O) donde se observa un cambio morfológico de *E. coli*, siendo más anchas y largas las bacterias observadas, lo cuál originó que se vieran en diluciones mayores, colonias de un mayor tamaño y número de bacterias formando las colonias (**Figura 11a y 11b**). Este cambio morfológico podría explicarse por el efecto antimicrobiano del extracto sobre las bacterias de *E. coli*.



Figura 11a.



Figura 11b.

Figura 11a Colonia anormal del patrón localizado de *E. coli* adherida a una célula HEp-2.

Figura 11b Célula HEp-2 con una colonia normal del patrón localizado de *E. coli*.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

La cepa de *E. coli* con adherencia agregativa fue menos sensible a los extractos de *G. seemanni* presentando inhibición de la adherencia sólo con tres extractos (**Figuras 6 A, C y D; Cuadro 2**). El extracto con mayor inhibición de la adherencia fue el de Geranio EtOH / H₂O, el cuál presentó una inhibición del 90 % con la concentración más alta (**Figura 6 D**) y mantiene diferencias significativas hasta la dilución 1:80 (**Cuadro 4**). Los demás extractos que tienen una inhibición de la adherencia significativos son Geranio liofilizado (**Figura 6 A**) y Geranio Evaporado sin filtrar (**Figura 6 C**) en donde se observa una disminución de la adherencia sólo con las concentraciones más altas (**Cuadro 4**). En el caso de los extractos Geranio Evaporado filtrado y Geranio Acetona / H₂O (**Figura 6 B y Figura 6 E; Cuadro 2 y 4**) no se observa ningún efecto de inhibición de la adherencia. Cabe destacar que lo que se contaban eran células infectadas y en este caso había un considerable disminución del número de bacterias infectando a una célula, lo cuál no se ve reflejado en el número de células infectadas. No hubo ningún extracto con diferencias significativas en cuanto a las UFC (**Cuadro 6**), por lo que en este caso no hubo ningún efecto antimicrobiano. Se observó en las diluciones bajas a intermedias, un cambio del patrón de adherencia, es decir que el patrón se parecía más a un difuso que un agregativo, lo cuál es muy interesante debido al poco conocimiento que hay en relación a los factores que hacen que *E. coli* se adhiera de manera agregativa. Esto podría sugerir un efecto sobre las fimbrias o genes involucrados en el tipo de adherencia.

El patrón de adherencia difuso de *E. coli* fue inhibido sólo con tres extractos (**Cuadro 2**). El extracto con mayor inhibición de la adherencia fue el de Geranio evaporado sin filtrar, que tiene una inhibición de la adherencia de hasta un 80 % (**Figura 7 C**) en la concentración más alta. Este extracto es el que mantiene por más diluciones diferencias significativas comparando las diluciones de extracto con el control (**Cuadro 5**).

Los otros extractos que tienen una inhibición de la adherencia son Geranio liofilizado y Geranio EtOH / H₂O (Figura 7 A y D; Cuadro 2), los cuáles presentan una inhibición de la adherencia en las concentraciones más altas (Cuadro 5). En el caso del Geranio evaporado filtrado (Figura 7 B; Cuadro 2) no se observa ningún efecto de inhibición en el porcentaje de células infectadas, aunque al igual que el patrón agregativo, el número de bacterias infectando una célula disminuyó. Por último, el extracto Acetona / H₂O presentó diferencias significativas en cuanto a la prueba t que se hizo con el número de UFC (Cuadro 6) por lo que el efecto de disminución de células infectadas observado (Figura 7 E) es debido a un efecto antibacteriano y no de inhibición de la adherencia.

En el Cuadro 2 se observa que al filtrar el Geranio Evaporado se pierde la actividad de inhibición de la adherencia en los patrones agregativo y difuso. Este efecto podría deberse a: 1) que el extracto no estaba estéril y pudieron haber otros organismos que afectaron la adherencia de las bacterias, sin embargo no se observó crecimiento de otros organismos al crecer muestras de los pozos con extracto, por lo que se puede descartar esta opción; b) al pasar el extracto por la membrana de 0.45 µm para esterilizarlo se quedaron los compuestos que no pasaron por el poro y que eran los que tenían la actividad inhibitoria. Esto sugiere que los compuestos con actividad antiadherente sobre los patrones agregativo y difuso del extracto Evaporado filtrado, son compuestos de un alto peso molecular.

En el Cuadro 2 también se observa que la mayoría de los extractos son inespecíficos ya que afectan la inhibición de los tres patrones de adherencia como Geranio Liofilizado, Geranio EtOH / H₂O y Geranio Evaporado sin filtrar, aunque el extracto Geranio EtOH / H₂O presentó un efecto antimicrobiano específico sobre el patrón localizado. Los únicos extractos que presentaron una inhibición específica, fueron Geranio Evaporado Filtrado y Geranio Acetona / H₂O, presentando una inhibición específica del patrón localizado, y

es este último extracto, el Geranio Acetona / H₂O, el que también presentó un efecto antimicrobiano sobre el patrón difuso.

Son pocos los estudios de inhibición de la adherencia con extractos naturales y en ninguno se han utilizando los tres patrones de adherencia. En algunos casos se reporta a las lectinas de los plantas o frutas, como los principios bioactivos involucrados en la inhibición de la adherencia de las bacterias a las células, ya que las lectinas bacterianas están involucradas en la adherencia y lectinas externas (de frutas o plantas) compiten por el sitio de reconocimiento (Coutiño Rodríguez, R. 2001). En dicho estudio se probaron diferentes plantas y frutas y se observó que inducen inhibición de la adherencia de *E. coli* a células HeLa. Las lectinas y polipéptidos también pueden inhibir el crecimiento bacteriano por la formación de canales en la membrana microbiana (Marjorie, M. 1999). Algunos polipéptidos, como las thioninas, son tóxicas para levaduras y bacterias Gram negativas y Gram positivas. Las lectinas son moléculas más grandes y están involucradas en la inhibición de la proliferación viral (HIV, citomegalovirus) probablemente por medio de la inhibición de la interacción viral con compuestos de células del hospedero (Marjorie, M. 1999). Este podría ser una forma por la cuál *G. seemanni* inhibiera la adherencia o propiciara el efecto antimicrobiano, ya que el método de extracción podría favorecer la presencia de estos compuestos.

En otros estudios se han probado cantidades no letales de antimicrobianos en la inhibición de la adherencia, algunos de los antimicrobianos que se han estudiado son: pefloxacina, cefixime, lomefloxacina, brodimoprim, gentamicina, penicillina y trimethoprim-sulfamethoxazole (Desnottes, J. *et al.*, 1989; 1992; 1994; Ravizzola, G. *et al.*, 1993; Loubeyre, C. 1992; Braga, P. *et al.*, 2002; Baskin, H. *et al.*, 1991). En estos estudios se reporta una inhibición de la adherencia debido a: 1) una disminución en la producción de fimbrias; 2) cambios en la composición de las proteínas de la membrana externa; y 3) cambios en las

propiedades eléctricas e hidrofóbicas de la superficie de *E. coli*. Estos tipos de compuestos, como quinolonas y fluroquinolonas, así como taninos y antioxidantes, tiene propiedades tóxicas para *E. coli*. El Geranio presentó en algunos casos un efecto antimicrobiano (extracto EtOH / H₂O con el patrón Localizado y extracto Acetona/H₂O con el Difuso), por lo que tal vez en los demás el efecto de inhibición de la adherencia pueda deberse a un efecto de antimicrobiano en dosis no letales. Es bien sabido que las plantas del género *Geraniaceae* presentan taninos y antioxidantes que han demostrado diferentes actividades (Kyoko, K. *et al.*, 2003; Serkedjieva, J. *et al.*, 1998; 1999; Zeliha, A. 2001; Frank, R. *et al.*, 2003; Okabe, S. *et al.*, 2001; Calzada, F. *et al.*, 1999). Ensayos con FeCl₃ y los extractos de Geranio utilizados mostraron la presencia de Taninos que podrían estar envueltos en un efecto antimicrobiano en bajas concentraciones. Los taninos también podrían estar involucrados en las alteraciones observadas en las células. Se ha reportado su acción antimicrobiana relacionada a su habilidad para inactivar adhesinas bacterianas, enzimas, proteínas de transporte de la envoltura celular y en bajas concentraciones modificar la morfología bacteriana pegándose a las adhesinas expuestas, a los polipéptidos y enzimas relacionadas con la membrana (Marjorie, M 1999). Por lo cuál también podrían estar relacionados con los cambios de morfología observados en el patrón localizado dando lugar a las colonias anormalmente grandes de las diluciones intermedias.

Si bien es cierto que el Geranio tiene Taninos que pueden estar actuando como antimicrobianos en dosis no letal sobre *E. coli* teniendo un efecto inhibición de la adherencia, estos pueden estar actuando de manera sinérgica con otros compuestos del extracto. Por el método de extracción se tienen diferentes compuestos polares que podrían actuar bloqueando los receptores celulares (como carbohidratos), ó bien regulando genes involucrados en la adherencia en un proceso de "quórum sensing" (pequeños péptidos). Algunos de los compuestos que podrían extraerse con agua son: Antocianinas, almidón, taninos, saponinas, terpenoides, polipéptidos y lectinas. El etanol favorece la extracción de taninos, polifenoles, poliacetilenos, flavonoides,

terpenoides, esteroides y alcaloides. La acetona favorece la extracción de flavonoides (Marjorie, M. 1999). Se requieren más estudios para saber que moléculas están actuando en la inhibición de la adherencia y como es que actúan. Por lo cual se planea continuar con el trabajo tratando de caracterizar y purificar la / ó las sustancias activas que podrían estar envueltas en la inhibición de la adherencia de *E. coli* a células HEP-2, ó compuestos que presenten una actividad antimicrobiana sobre *E. coli*.

CONCLUSIÓN

El presente trabajo muestra datos importantes de inhibición de la adherencia y actividad antimicrobiana en cepas de *E. coli* con los tres patrones de adherencia a células HEP-2, inducidos por diferentes extractos de *G. seemanni*.

La adherencia del patrón localizado es inhibida con todos los extractos, excepto el de Geranio EtOH / H₂O con el cuál se obtuvo un efecto antibacteriano. La adherencia del patrón agregativo es inhibida por el Geranio Liofilizado, Geranio Evaporado sin filtrar y Geranio EtOH / H₂O, presentando una mayor inhibición con el último extracto. Los demás extractos no presentaron actividad. La adherencia del patrón difuso es inhibida por Geranio Liofilizado, geranio EtOH / H₂O y Geranio evaporado sin filtrar, presentando una mayor inhibición con este último. El Geranio Acetona / H₂O tiene un efecto antibacteriano con este último patrón.

Se observó que el extracto Geranio Evaporado sin filtrar fue específico para el patrón localizado, y el extracto Acetona / H₂O fue otro extracto muy específico presentando un efecto de inhibición de la adherencia con el patrón localizado, un efecto antimicrobiano con el patrón difuso y ningún efecto con el agregativo.

Se requieren más estudios con respecto a la purificación de los compuestos activos involucrados en la inhibición y efecto antimicrobiano de los extractos de *G. seemanni* sobre *E. coli*, sin embargo, los resultados obtenidos confirman que el uso de las infusiones puede ayudar a combatir la diarrea ocasionada por *E. coli* y que su uso como remedio tradicional si tiene un beneficio. Se requieren pruebas con cepas clínicas de *E. coli* para evaluar si los extractos de *G. seemanni* tienen el mismo efecto observado en el presente trabajo.

Abreviaciones

MEM Medio Mínimo Esencial de Eagle
PBS Buffer de Fosfatos
SFB Suero Fetal de Bovino
TSA Soya Tripsina Agar
UFC Unidades Formadoras de Colonias

APÉNDICE 1

Medios

Solución D- Manosa al 10%

Diluir 10 g de D- Manosa en 100 ml de agua destilada
Esterilizar por filtración con membrana de 0.22
Se guarda a 4 ° C

Triptona al 1 %

Diluir 1 g de Triptona en 100 ml de agua destilada
Distribuir 3 ml en tubos de 13 x 100 con rosca
Tapar los tubos y esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C
Se guarda a 4 ° C

Agar MacCONKEY

Disolver 40 g de agar en 1 L de agua destilada
Calentar y dejar hervir por un minuto
Esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos
Vaciar aproximadamente 20 ml en cajas petri en condiciones de esterilidad
Esperar a que gelifique
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C
Se guarda a 4 ° C

Agar Sangre

Diluir 40 g de base agar sangre en 1 L de agua destilada
Calentar y dejar hervir por un minuto
Esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos
Colocar en baño maría a 45 ° C
Agregar en condiciones de esterilidad 50 ml de sangre de carnero desfibrinada

Vaciar aproximadamente 20 ml en cajas petri en condiciones de esterilidad
Esperar a que gelifiquen
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C
Se guarda a 4 ° C

Agar de Soya Trypticaseina (TSA)

Disolver 17 g de digerido pancreático de tripsina en 1 L de agua destilada
Disolver 3 gr de digerido enzimático de soya en 1 L de agua destilada
Disolver 2.5 g de Dextrosa en 1 L de agua destilada
Disolver 5 g de Cloruro de Sodio en 1 L de agua destilada
Disolver 2.5 g de Fosfato Dipotásico en 1 L de agua destilada
Calentar y dejar hervir por 1 minuto
Esterilizar a 121 ° C durante 15 minutos
Vaciar aproximadamente 20 ml en cajas petri en condiciones de esterilidad
Esperar a que gelifiquen
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C
Se guarda a 4 ° C

*En caso de hacer tubos de 13 x 100 con rosca:
Se agregan 3 ml a cada tubo antes de esterilizar
Se ponen los tubos de tal forma que estén inclinados
Esperar a que gelifiquen
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h a 37 ° C
Se guarda a 4 ° C

Medio mínimo Esencial de Eagle (MEM)

Agregar 100 ml de MEM 10 x a 900 ml de agua desionizada estéril (ó agregar el contenido sólido de un frasco de MEM) en condiciones de esterilidad
Agregar 10 ml de Bicarbonato de Sodio pH 7.4 – 7.6 al 80 %
Agregar 10 ml de HEPES
Agregar 10 ml de L- Glutamina
Agregar 10 ml de una mezcla de antibióticos (Penicilina – Streptomina)
Se filtra toda la mezcla con una membrana de 0.22 µm ayudado por una jeringa de 60 ml
Se recibe el filtrado en frascos previamente tratados y esterilizados
Se tapan y se etiquetan
Se deja a prueba de esterilidad durante 24 h o 48 h a 37 ° C
Se guarda a 4 ° C
Se agrega 10% de SFB en condiciones de esterilidad conforme se vaya utilizando
Después de agregar el SFB se dejar a prueba de esterilidad durante 24 h o 48 h a 37 ° C

Colorante de Giemsa

Se pesa 1 g de colorante de Giemsa
Se agrega a 54 ml de Glicerol en agitación
Se agregan 84 ml de Metanol

Se filtra

Se envasa en un frasco ámbar

FeCl₃ (para tinción de taninos)

Se agregan 4.2 ml de ácido clorhídrico (HCl) a 500 ml de agua

Se agregan 13.5 g de Cloruro Férrico (FeCl₃)

Se filtra y se guarda en una botella ámbar

APÉNDICE 2

Soluciones y lavado de material

PBS

Se agregan 8 g de NaCl a 800 ml de agua destilada en agitación

Se agrega 0.2 g de KCl

Se agrega 1.15 g de Fosfato de Sodio Dibásico

Se agrega 0.2 g de Fosfato de Potasio Monobásico

Se ajusta a pH de 7.2

Se afora a 1000 ml

Se pone en frascos y se esteriliza

Solución de PUKS

Se agregan 8 g de NaCl en 1 L de agua desionizada estéril en condiciones de esterilidad

Se agregan 0.4 g de KCl

Se agrega 0.35 g de NaHCO₃

Se agrega 0.336 g de EDTA

Se filtra todo con una membrana de 0.22 μ m y se envasa en frascos estériles previamente tratados

Se dejar a prueba de esterilidad durante 24 h o 48 h a 37 ° C

Solución Salina 0.85 %

Se diluyen 8.5 g de NaCl en 1 L de agua destilada

Se pone en tubos cónicos de 100 ml

Se esteriliza a 121 ° C durante 15 minutos

Se guarda a 4 ° C

Lavado de material de vidrio para cultivo celular (nuevo)

Se enjuaga de 3 a 5 veces el material con agua desionizada.

Se seca a 120 ° C durante 1 hora.

Se esteriliza a 120 ° C en calor húmedo por 30 minutos.

Lavado de material de Vidrio para cultivo celular (usado)

Se enjuaga con agua corriente el material sucio.

Se enjuaga de 3 a 5 veces con agua desionizada.

Se sumerge en hipoclorito de sodio al 10 % por 24 horas.

Se enjuaga con agua corriente y se pasa a una solución de ácido clorhídrico al 2 % por 24 horas.

Se enjuaga 10 veces con agua desionizada.

Se seca a 100 ° C durante 1 hora.

Se envuelve y se esteriliza a 120 ° C (calor húmedo) durante 30 minutos.

REFERENCIAS

- 1.- Argueta, V. (1994). Atlas de la medicina tradicional Mexicana. Vol: I, II y III. Instituto Nacional Indigenista
- 2.- Akdemir, Z (2001). Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochemistry*, 56,189-193
- 3.- Beutin, L.; Marchés, O.; Bettelheim, K.; Gleier, K.; Zimmermann, S.; Schmidt, H. y Oswald, E. (2003). HEp-2 Cell Adherence, Actin Aggregation, and Intimin Types of Attaching and Effacing *Escherichia coli* Strains Isolated from Healthy Infants in Germany and Australia. *Infect Immun.* 2003 Jul;71(7):3995-4002.
- 4.- Bouzari, S.; Jafari, M.; Shokouhi, F.; Parsi, M. y Jafari, A. (2000). Virulence-related DNA sequences and adherence patterns in strains of enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiology Letters*, 185, 89-93
- 5.- Braga, P.; Piatti, G. y Regio, S.(2002). Sub-inhibitory concentrations of brodimoprim inhibit adhesion of *E. coli* to human uroepithelial cells. *Journal of Chemotherapy*, 14, págs. 161-165
- 6.- Brendan, K.; DeVinney, R.; Stein, M.; Reinscheid, D.; Frey, E.; y Finlay, B. (1991). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) Transfers Its Receptor for Intimate Adherence into Mammalian Cells. *Science*.254(5032):710-3.
- 7.- Bye, R.; Linares, E. y Estrada, E. (1995). Biological diversity of medicinal plants in México. *Phytochemistry of medicinal plants*, Vol. 29, Chapter 4, págs. 61-85
- 8.- Calzada, F.; Rojas, C.; Meckes, M.; Rivera, R.; Bye, R. Y Mata, R. (1999). Geranins A and B, New Antiprotozoal A – Type Proanthocyanidins from *Geranium niveum*. *Journal of natural Products*, Vol. 62, págs. 705-709
- 9.- Chart, H.; Smith, H.; Scotland, S.; Rowe, B.; Milford, D. y Taylor, C. (1991). Serological identification of *Escherichia coli* O157:H7 infection in haemolytic uremic syndrome. *The Lancet*, Vol. 337, págs. 138-140
- 10.- Coutiño-Rodríguez, R.; Colar, E.; Pérez, M.; Giles, H. y Aguilar, A. (2001). Lectins in fruits having gastrointestinal activity: their participation in the hemagglutinating property of *Escherichia coli* O157:H7. *Archives of Medical Research* 32, págs. 251-257
- 11.- Dagberg, B. Y Uhlin, B. (1992). Regulation of virulence associated plasmid genes in enteroinvasive *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*. Vol. 174, No. 23, págs. 7606-7612
- 12.- Deitsch, K.; Moxon, E. y Wellems, T. (1997). Shared themes of antigenic variation and virulence in bacterial, protozoal, and fungal infections. *Microbiol molecular biology Rev.*, 61(3), 281-293
- 13.- Desnottes, J.; Diallo, N.; Loubeyre, C. y Moreau, N. (1989). Effect of pefloxacin on microorganism: host cell interaction. *Presse Med.* 18 págs. 1572-1575
- 14.- Desnottes, J.; Le Roy, D. y Diallo, N. (1992). Effect of subminimal inhibitory concentrations of

pefloxacina on the piliation and adherence of *Escherichia coli*. *Infectology Immunology*, 60, págs. 2297- 2304

15.- Desnottes, J.; Diallo, N. y Loubeyre, C. (1994). Effect of sub – inhibitory concentrations of cefixime on the morphology, hemagglutination and adhesiveness of urinary strains of *Escherichia coli*. *New Microbiology*, 17, págs. 211-216

16.- Elsinghorst, E.; Baron, L. y Kopecko, D. (1989). Penetration of human intestinal epithelial cells by *Salmonella*: Molecular cloning and expression of *Salmonella typhi* invasion determinants in *Escherichia coli*. *Microbiology*, Vol. 86, págs 5173-5177

17.- Eslava, C.; Torres, J.; Echaniz, G.; Parra, N.; Molina, J.; Conde, C. y Zamilpa, L. (2001). *Escherichia coli*. PAC Infecto – 2, Programa de actualización continúa en infectología, Tomo 4, Unidad 7, págs. 408-412

18.- Eslava, Carlos (2000). *Escherichia coli* enteroagregativa patógeno emergente. Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología. Vol. 43 : suplemento 1, número M1.S3, página 50

19.- Flisser, A.; Villa, A.; Campos, C.; Domínguez, F.; García, B.; Suárez, R.; Servín, A.; Monroy, I.; Lozano, H.; Cogco, L.; Angeles, G.; Martínez, I.; Virgen, S.; Campuzano, R.; Campos, S.; Bracho, C.; Díaz, A.; Rosa, J.; Magos, C.; Gutiérrez, A. y Correa, D. (2002). Infectious Diseases in Mexico. A survey from 1995-2000. *Archives of medical Research*, 33, págs. 343-350

20.- Forestier, C.; Darfeuille-Michaud, A.; Wasch, E.; Rich, C.; Petat, E.; Denis, F. y Joly, B. (1992). Adhesive properties of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated from infants with acute diarrhea in Africa. *J Infect Dis.* 166(6):1295-1310.

21.- Forestier, C.; Darfeuille-Michaud, A.; Wasch, E.; Rich, C.; Petat, E.; Denis, F. y Joly, B. (1996). Enteroadherent *Escherichia coli* and Diarrhea in Children: a Prospective Case-Control Study. *Journal of clinical Microbiology*, Vol. 34, No. 12, p. 2897–2903

22.- García, Teresa Estrada (2000). Las *Escherichia coli* que causan diarrea en humanos y su diagnóstico molecular. Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología. Vol. 43 : suplemento 1, número de resumen J1.S1, página 176

23.- Giammanco, A.; Maggio, M.; Giammanco, G.; Morrelli, R.; Minelli, F.; Scheutz, F. y Caprioli, A. (1996). Characteristics of *Escherichia coli* Strains Belonging to Enteropathogenic *E. coli* Serogroups Isolated in Italy from Children with Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 34, No. 3, p. 689–694

24.- Girón, Jorge A. (2000). *E. coli* enteropatógeno. Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología. Vol. 43 : suplemento 1, número de resumen M1.S3, página 49

25.- Gordillo, M.; Revé, G.; Pappas, J.; Methewson, J.; Dupont, H. y Murria, B. (1992). Molecular characterization of strains of enteroinvasive *Escherichia coli* O143, including isolates from a large outbreak in Houston, Texas. *Journal of clinical microbiology*. Vol. 30, No. 4, págs. 889-893

26.- Gunzburg, S.; Chang, B.; Elliott, S.; Burke, V. y Gracey, M. (1993). Diffuse and enteroagregative patterns of adherence of enteric *Escherichia coli* isolated from aboriginal children from the Kimberley region of Western Australia. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis.* 12(2):93-97

- 27.- Hale, T.; Oaks, E. y Formal, S. (1985). Identification and antigenic characterization of virulence associated, plasmid – coded proteins of *Shigella* sp. And Enteroinvasive *Escherichia coli*. Infection and immunity. Vol. 50, No. 3, págs. 620-629
- 28.- Hsia, R.; Small, P. y Bavoil, P. (1993). Characterization of virulence genes of enteroinvasive *Escherichia coli* by TnphoA mutagenesis: Identification of *invX*, a gene required for Entry into HEP-2 Cells. Journal of bacteriology. Vol. 175, No. 15, págs. 4817-4823
- 29.- IMSS (2002). Instituto Mexicano del Seguro Social. Guía para el cuidado de la salud. Niños menores de 10 años.
- 30.- Ivancheva, Stephanie (2000). A chemosystematic study of eleven Geranium species. Biochemical Systematics and Ecology, 28, 255-260
- 31.- Keller, R.; Ordoñez, J.; Oliveira, R.; Trabulsi, L.; Baldwin, T. y Knutton, S. (2002). Afa, a Diffuse Adherence Fibrillar Adhesin Associated with Enteropathogenic *Escherichia coli*. Infection and immunity, Vol. 70, No. 5, p. 2681–2689
- 32.- Klapproth, J.; Donnenberg, M.; Abraham, J.; Mobley, H. y James, S. (1995). Products of enteropathogenic *Escherichia coli* inhibit lymphocyte activation and lymphokine production. Infection and Immunity, Vol. 63, No. 6, págs. 2248-2254
- 33.- Knutton, S. Williams, P.; Lloyd, D.; Candy, D. y McNeish, A. (1984). Ultrastructural study of adherence to and penetration of cultured cells by two invasive *Escherichia coli* strains isolated from infants with enteritis. Infection and immunity. Col. 44, No. 3, págs. 599-608
- 34.- Kobayashi, K.; Baba, E.; Fushiya, S.; Takano, F.; Bathkuu, J.; Dash, T.; Sanchir, C.; y Yoshizaki, F. (2003). Screening of Mongolian Plants for Influence on Amylase Activity in Mouse Plasma and Gastrointestinal Tube. Biol. Pharm. Bull., 26(7) ,1045—1048
- 35.- Kunin, C.; Hua, T.; Guerrant, R. y Bakaletz, L.(1989). Effect of salicylate, bismuth, osmolytes, and tetracycline resistance on expression of fimbriae by *Escherichia coli*. Journal of Infectology, 19, págs. 237-249
- 36.- Kyoko, Kobayashi (2003). Screening of Mongolian Plants for Influence on Amylase Activity in Mouse Plasma and Gastrointestinal Tube. Biol. Pharm. Bull. 26(7) 1045—1048
- 37.- Law, D. (2000). A REVIEW Virulence factors of *Escherichia coli* O157 and other Shiga toxin-producing *E. coli*. Journal of Applied Microbiology, 88, 729 – 745
- 38.- Lim, D. (998).Microbiología. Ed. Mc Graw Hill, Segunda edición, Capítulo 17, págs 497-546.
- 39.- Loubeyre, C.; Desnottes, J. y Moreau, N. (1992). Influence of sub-inhibitory concentrations of antibacterials on the surface properties and adhesion of *Escherichia coli*. Drugs and Experiment Clinic Research, 18, págs. 233-237

- 40.- Manjares, H.; Parra, S.; Berrocal, E.; Ocaña, A. y Cravioto, A. (2000). Antigen Detection in Enteropathogenic *Escherichia coli* Using Secretory Immunoglobulin A Antibodies Isolated from Human Breast Milk. *Infection and immunity*, Vol. 68, No. 9, págs. 5030-5036
- 41.- Marjorie, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, vol. 12, No. 4, págs. 564-582
- 42.- Mathewson, J.; Oberhelman, R.; Dupont, .; Javier de la Cabada, F. y Garibay, E. (1996). Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. *Microbiol Immunol.* 40(2):89-97
- 43.- Moore, E. (1943). A revision of the genus *Geranium* in Mexico and Central América. Contributions from the gray herbarium of Harvard University – No. CXLVI, páginas 1-108
- 44.- Morelli, R.; Baldassarri, L.; Falbo, V.; Donelli, G.; y Caprioli, A.(1988). Detection of enteroadherent *Escherichia coli* associated with diarrhoea in Italy. *Drugs Exp Clin Res.*14(10):629-634
- 45.- Nataro, J.; Seriwatana, J.; Fasano, A.; Maneval, D.; Guers, L. Noriega, F.; Dubovsky, F.; Levina, M. Y Morris, J. (1995). Identification and cloning of novel Plasmid – Encoded enterotoxin of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* strains. *Infection and Immunity.* Vol. 63, No. 12, págs. 4721-4728
- 46.- Nataro, J.; Kaper, J.; Robins-Browne, R.; Prado, V.; Vial, P. y Levine, M. (1996). Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *J Med Microbiol.* 1996 Jun;44(6):438-43.
- 47.- Nereida, M.; Waldir, E.; Vidotto, M.; Linhares, R.; Saridakis, H.; Gomes, T.; Trabulsi, L. y Pelayo, J. (2000). Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. *FEMS Microbiology Letters* 190, págs. 293-298
- 48.- Okabe, S.; Sukanuma, M.; Mayoshi, Y.; Taniguchi, S.; Yoshida, T. y Fujiki, H. (2001). New TNF- α Releasing Inhibitors, Geraniin and Corilagin, in Leaves of *Acer nikoense*, Megusurino-ki. *Biol. Pharm. Bull.* 24(10) 1145—1148
- 49.- Ortiz, A.; Ruttler, M.; Garcia, B.; Balbi, L.; Cruzado, M.; Risler, N. y Castro, C. (1992). Accumulation of actin and adhesion to HEp-2 cells of strains of *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea in Mendoza, Argentina. *J Diarrhoeal Dis Res.* 10(1):31-4.
- 50.- Polotsky, Y.; Nataro, J.; Kotler, D.; Barrett, T. y Orenstein, J. (1997). HEp-2 Cell Adherence Patterns, Serotyping, and DNA Analysis of *Escherichia coli* Isolates from Eight Patients with AIDS and Chronic Diarrhea. *Journal of Clinical Microbiology*, Vol. 35, No. 8, p. 1952–1958
- 51.- Puente, José Luis (2001). *Escherichia coli* enteropatogena, modelo de una cascada reguladora en el control de la virulencia bacteriana. *Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología.* Vol. 43 : suplemento 1, número de resumen M4.S10, página 83
- 52.- Quijano, L. (2003). *Geranium robertianum*. Folium 6 instituto de química, UNAM
- 53.- Rademaker, C.; Fluit, A.; Jansze, M.; Jansen, W.; Glerum, J. y Verhoef, J. (1993). Frequency of

- enterovirulent *Escherichia coli* in diarrhoeal disease in The Netherlands. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 1993 Feb;12(2):93-7.
- 54.- Ravizzola, G.; Longo, M.; Pollara, P.; De Francesco, M. y Pizzi, R.(1993). Effect of subinhibitory concentrations of lomefloxacin on bacterial adherence. Journal of Antimicrobiological Chemotherapy, 31, págs. 37-45
- 55.- Reyes, L. (2000). Fenotipos de adherencia a células HEp-2 de cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea. Tesis de Licenciatura, UNAM
- 56.- Rodríguez, G.; Moreno, A.; Cortés, I.; Tenorio, J. Y Montiel, E. (2001). *Escherichia coli* productora de diarrea en niños. Memorias del congreso XXXII latinoamericano de microbiología. Vol. 43 : suplemento1, número MB, página 389
- 57.- Sachiko, O. (2001). New TNF- α Releasing Inhibitors, Geraniin and Corilagin, in Leaves of *Acer nikoense*, Megusurino-ki. Biol. Pharm. Bull. 24(10) 1145—1148
- 58.- Savarino, S.; Fox, P.; Deng, Y. y Nataro, J. (1992). Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. Mol Microbiol. 6(22):3427-37.
- 59.- Scaletsky, I.; Pedroso, M.; Oliva, C.; Carvalho, R.; Morais, M. y Fagundes-Neto, U. (1999). A Localized Adherence-Like Pattern as a Second Pattern of Adherence of Classic Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 Cells That Is Associated with Infantile Diarrhea. Infection and immunity, Vol. 67, No. 7, p. 3410–3415
- 60.- Scaletsky, I.; Fabbriotti, S.; Silva, S.; Morais, M. y Fagundes-Neto, U. (2002). HEp-2–Adherent *Escherichia coli* Strains Associated with Acute Infantile Diarrhea, São Paulo, Brazil. Emerging Infectious Diseases • Vol. 8, No. 8, págs. 855 -858
- Sepúlveda, J. (1994). Diarreas y cólera. Cuadernos de Salud. Secretaría de Salud. México. 1994.
- 61.- Serkedjieva, J. (1998). In vitro anti-influenza virus activity of a plant preparation from *Geranium sanguineum* L. Antiviral Research, 37, 121–130
- 62.- Serkedjieva, J. (1999). Short communication Antiherpes virus activity of extracts from the medicinal plant *Geranium sanguineum* L. Journal of Ethnopharmacology, 64, 59–68
- 63.- Small, P.; Isberg, R. y Falkow, S. (1987). Comparison of the ability of enteroinvasive *Escherichia coli*, *Salmonella typharium*, *Yersenia pseudotuberculosis*, and *Yersenia enterocolitica* to enter and replicate within HEp- 2 Cells. Infection and immunity, Vol. 55, No. 7, págs. 1674-1679
- 64.- Stermitz, F. (2003). Polyacylated Neohesperidosides From *Geranium caespitosum* : Bacterial Multidrug Resistance Pump Inhibitors. Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 13 (2003)1915 –1918
- 65.- Taylor, D.; Echeverria, P.; Sethabutr, O.; Pitarangsi, C.; Gross, R. y Cross, J. (1988). Clinical and Microbiologic features of *Shigella* and Enteroinvasive *Escherichia coli* infections detected by DNA Hybridization. Journal of clinical microbiology, Vol. 26, No. 7, págs. 1362-1366

- 66.- Turi, M.; Turi, E.; Koljalg, S. y Mikelsaar, M. (1997). Influence of aqueous extracts of medicinal plants on surface hydrophobicity of *Escherichia coli* strains of different origin. *APMIS*. 52; págs 175-177
- 67.- Vallance, B. Y Finley, B. (2000). Colloquium. Exploitation of host cells by enteropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS*. Vol. 97, no.16, págs. 8799-8806
- 68.- Vandana, G.; Ghosh, S.; Sharma, N.; Chakroborti, A.; Majumdar, S. y Ganguly, N. (2001). Characterization of galactose specific adhesion of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Archives of Biochemistry and biophysics*, Vol. 390, No. 1, págs.. 109-118
- 69.- Vázquez, Sandra Alatorre (2001). Actividad antibacteriana de extractos vegetales contra cepas de *Escherichia coli* de origen clínico. Tesis de Licenciatura, enero 2001, Los Reyes Iztacala, UNAM
- 70.- Velasco, R.; Ávalos, J.; Ugalde, S. y López, M. (2000). Principales factores bacterianos que promueven la colonización e invasión de los tejidos humanos. Profesores al día, Educación química, abril 2000, págs. 274-283
- 71.- Velázquez, R.; Valencia, A.; Gutiérrez, G.; Calvillo, M.; Delgado, A.; Rivera, R.; Torres, J. Y Hernández, O. (2001). Importancia de los agentes virales como causa de diarrea grave en los niños menores de cinco años de edad que requieren hospitalización, y factores de riesgo asociados. Múltiples fuentes de la investigación en salud. Proyectos estratégicos del IMSS, Capítulo 7, págs. 133-152
- 72.- Venkatesan, M.; Buysse, J.; Vandendries, E. y Kopecko, D. (1988). Development and testing of invasion- Associated DNA probes for detection of *Shigella* sp. And enteroinvasive *Escherichia coli*. *Journal of clinical microbiology*, Vol. 26, No. 2, págs. 261-266
- 73.- WHO: http://www.cdc.gov/ncidod/dbmd/diseaseinfo/escherichiacoli_a.html
- 74.- Whittam, T. 1998. Rumors of disease in the global village: Outbreak Verification. *Emerging infectious Diseases*. Vol. 6, págs. 97-102
- 75.- Yamamoto, T.; Noriko, W.; Taijin, N.;Toshiki, K.; Oralak, S. Y Echeverría, P. (1996). Characterization of a Novel Hemagglutinin of Diarrhea-Associated *Escherichia coli* That Has Characteristics of Diffusely Adhering *E. coli* and Enteroaggregative *E. coli*. *Infection and immunity*, Vol. 64, No. 9, p. 3694-3702
- 76.- Zeliha, Akdemir, (2001). Polyphenolic compounds from *Geranium pratense* and their free radical scavenging activities. *Phytochemistry*, 56, 189-193