

00346



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS
FACULTAD DE CIENCIAS

PURIFICACION DE UNA PROTEINA DE MEMBRANA
EXTERNA ASOCIADA CON EL PROCESO DE
ADHERENCIA LOCALIZADA, PRODUCIDA POR CEPAS
DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA (EPEC).

TESIS:

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS
(BIOLOGIA CELULAR)**

PRESENTA:

ANGEL TOLENTINO TELLO LOPEZ

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALEJANDRO RAFAEL CRAVIOTO QUINTANA



MEXICO, D. F.

2003

A



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: Tello Lopez

Angel Tolentino

FECHA: 21 de Noviembre 2003

FIRMA: [Firma]

Este trabajo se realizó en el Centro de investigaciones Sobre Enfermedades Infecciosas (CISEI) del Instituto Nacional de Salud Pública en Cuernavaca Morelos, y estuvo bajo la dirección y supervisión del Dr. Alejandro Cravioto del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM.

B

DEDICATORIA

Dedico este Trabajo con mucho cariño a Angélica, Natalia y Rosalinda, mi familia, por su inestimable apoyo e interés manifestado durante el desarrollo, escritura y terminación de este trabajo y en cada uno de los días de nuestras vidas.

AGRADECIMIENTOS

Agradezco profundamente al Dr. Alejandro Cravioto todo el apoyo generoso proporcionado para la realización de este trabajo así como el privilegio de permitirme formar parte de su estupendo grupo de investigación.

A todos mis compañeros del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la UNAM con quienes he compartido el placer de trabajar y aprender haciendo, más que hablando.

A los integrantes del jurado: Dra. Patricia Ramos Morales, Dr. Alejandro Cravioto, M. en C.B. Carlos Alberto Eslava Campos, Dr. Arturo Edgar Zenteno Galindo y Dra. María Del Rosario Morales Espinosa, por sus valiosas observaciones, comentarios y críticas que hicieron posible mejorar la calidad de este trabajo.

**A mis amigos Juan Ruíz Ramos y Horacio Villafán Monrroy
con mucho respeto.**

**A la señora Santa Gonzáles Zúñiga por su apoyo y afecto
de siempre, a José Luis Méndez Sánchez por su apoyo
técnico en la elaboración del escrito de esta tesis, y a
Gabriel Pérez Soto por su apoyo técnico siempre oportuno.**



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

**FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

OFICIO FCIE/DEP/0296/2003

ASUNTO: Asignación de sinodales

DR. ALEJANDRO RAFAEL CRAVIOTO QUINTANA
Presente .

Por este conducto me permito comunicarle que ha sido ratificado(a) como Director(a) de Tesis del(a) alumno(a) BIOL. ANGEL TOLENTINO TELLO LÓPEZ, quién desarrolló el trabajo de tesis titulado: PURIFICACION DE UNA PROTEINA DE MEMBRANA EXTERNA ASOCIADA CON EL PROCESO DE ADHERENCIA LOCALIZADA, PRODUCIDA POR CEPAS DE Escherichia coli ENTEROPATOGENA.

Así mismo, comunico que el Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada en su sesión del 21 de Abril del año en curso ha designado a los siguientes sinodales para dictaminar si el trabajo que ha desarrollado como tesis el(a) alumno(a) antes mencionado(a) tiene los méritos para obtener el grado de MAESTRO(A) EN CIENCIAS (BIOLOGIA CELULAR).

CARGO	GRADO,	NOMBRE COMPLETO
PRESIDENTE	: DRA.	PATRICIA RAMOS MORALES
VOCAL	: DR.	ALEJANDRO RAFAEL CRAVIOTO QUINTANA
SECRETARIO	: M. EN C.B.	CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS
SUPLENTE	: DR. EN 3E. CYCLE	ARTURO EDGAR ZENTENO GALINDO
SUPLENTE	: DRA.	MARIA DEL ROSARIO MORALES ESPINOSA

Sin más por el momento aprovecho la ocasión para enviarles un cordial saludo.

Atentamente,
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, D. F., a 24 de abril de 2003

JEFE DE LA DIVISION

DRA. DENI CLAUDIA RODRIGUEZ VARGAS



DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

DCRVASRVpp8

F

**PURIFICACIÓN DE UNA PROTEINA DE
MEMBRANA EXTERNA ASOCIADA CON EL
PROCESO DE ADHERENCIA LOCALIZADA,
PRODUCIDA POR CEPAS DE *Escherichia*
coli ENTEROPATOGENA (EPEC).**

INDICE

Resumen

1.- Introducción	1
a.- Adherencia	1
b.- Adhesinas de naturaleza polisacáridica.	3
c.- Adhesinas de naturaleza proteica.	4
d.- <i>Escherichia coli</i> como patógeno en humanos	6
e.- Modelo de tres estadios de la patogénesis	9
f.- Adherencia localizada	10
g.- Transducción de señales	12
h.- Fase de adherencia íntima	14
i.- Intimina de EPEC	15
2.- Objetivos	19
a.- Objetivo general	19
b.- Objetivos particulares	19
3.- Material y Métodos	20
a.- Obtención de membrana externa de <i>Escherichia coli</i> .	22
b.- Solubilización de la membrana externa de <i>Escherichia coli</i>	24
c.- Cromatografía de proteínas de membrana externa de <i>Escherichia coli</i> en columna de Sephacryl S200-HR	25
d.- Obtención de anticuerpos anti-Intimina.	30
e.- Electroforesis desnaturizante y reductora en gel de poliacrilamida	30
f.- Isoelectroenfoque desnaturizante de proteínas de	

++

membrana externa, según el método de O'Farrel.	31
g.- Inmunodetección de la intimina con sIgA de calostro humano y con IgG contra la intimina	31
h.- Pruebas de adherencia de EPEC a células HEp-2	32
i.- Ensayo de inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2, por IgG anti intimina.	34
4.- Resultados	35
a.- Cultivos de cepas EPEC en caldo nutritivo	35
b.- Rendimiento de membrana externa de <i>Escherichia coli</i>	35
c.- Inmunodetección de la intimina de membrana de EPEC.	36
d.- Purificación de la intimina mediante solubilización con detergente y elución por cromatografía en columna.	36
e.- Obtención de anticuerpos anti-Intimina.	40
f.- Ensayos de inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2 en cultivo por anticuerpos anti-intimina	41
g.- Secuenciación.	44
h.- Isoelectroenfoco	45
5.- Discusión	51
6.- Conclusiones	60
7.- Bibliografía	61

RESUMEN

PURIFICACIÓN DE UNA PROTEÍNA DE MEMBRANA EXTERNA ASOCIADA CON EL PROCESO DE ADHERENCIA LOCALIZADA, PRODUCIDA POR CEPAS DE *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA (EPEC).

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un microorganismo causante de diarrea en niños menores de un año principalmente en países en vías de desarrollo. Para adherirse a las microvellosidades del intestino delgado, esta bacteria utiliza un conjunto de cuando menos seis proteínas entre las cuales se encuentra la intimina; una proteína de membrana externa con un peso molecular de 94 kDa que desempeña un papel importante en el proceso de adherencia íntima de la bacteria a la célula eucariótica.

A pesar de su importante papel dentro de este proceso; hasta la fecha no se había intentado su purificación mediante métodos puramente bioquímicos para poder estudiarla en su forma purificada. Por esta razón se procedió a realizar el presente trabajo con el objetivo de aislar la intimina empleando un procedimiento de cromatografía líquida de baja presión y posteriormente poder investigar aspectos relacionados con su naturaleza fisicoquímica como su punto isoeléctrico y sus propiedades biológicas en un modelo *in vitro*. Para esto se cultivó la cepa *E.coli* E2348/69 serotipo O126:H6 y sus respectivos controles en caldo nutritivo y se lisaron por pase en prensa French, se concentraron mediante centrifugación diferencial para obtener la membrana externa que luego fue solubilizada en un amortiguador de Tris-HCl 0.01M, pH7.4 que contenía SDS al 0.5 % y se eluyeron en columnas de Sephacryl-S200-HR de cuyos eluatos se concentraron las fracciones con la proteína de 94 kDa pura. Las fracciones de eluato se analizaron mediante electroforesis y una vez que se confirmó la pureza de la banda de interés se envió para su secuenciación mediante el método de MALDI-Tof. Por otro lado se empleó la proteína pura para producir anticuerpos policlonales en conejos. Los anticuerpos obtenidos en esta fase de la investigación se emplearon para

averiguar su capacidad de inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2 en cultivo que se utilizaron como modelo experimental. A la proteína de 94 kDa se le realizó análisis por isoelectroenfoque para obtener datos acerca de su punto isoeléctrico.

Los resultados obtenidos mediante el método de cromatografía de baja presión utilizado en la separación de la proteína de 94 kDa permitió obtener la proteína con un elevado grado de pureza según lo confirmaron las secuencias obtenidas los resultados obtenidos por secuenciación. Las secuencias del extremo amino terminal y del carboxilo terminal obtenidas concordaron exactamente con la secuencia determinada por otros autores para el gen *eae* que codifica a esta proteína. Los anticuerpos policlonales contra la proteína obtenidos en conejo reconocieron una banda principal tanto en extractos totales de membrana así como en las fracciones enriquecidas eluidas de las columnas de separación. Este anticuerpo fue capaz de inhibir la adherencia de las bacterias EPEC a células HEp-2 en cultivo con lo que se demostró su especificidad contra la proteína de 94 kDa. Los resultados del análisis del punto isoeléctrico indicaron que la proteína de 94 kDa contiene 5 isoformas con pI's, cuyos valores estuvieron entre 6.02 a 7.37.

Conclusiones:

- 1.-Se diseñó un protocolo de aislamiento de la intimina utilizando la técnica de cromatografía líquida de baja presión en gel de Sephacryl S-200HR con el cual fue posible obtener esta proteína en forma pura.
- 2.-La secuenciación de la proteína aislada indicó que esta corresponde a la intimina ya que las secuencias parciales obtenidas de las muestras de elución coinciden exactamente con las que se han reportado en la literatura.
- 3.-Según los resultados aquí presentados, la intimina esta constituida por al menos 6 isoformas con los siguientes valores de pI: 6.01, 6.2, 6.25, 6.39, 6.8 y 7.37.
- 4.-Los anticuerpos policlonales anti-intimina inhiben la adherencia de EPEC a las células HEp-2 utilizadas como modelo experimental.

H

**TESIS
CON
FALLA DE
ORIGEN**

INTRODUCCIÓN

ADHERENCIA

La adherencia entre célula y célula es de importancia fundamental en los sistemas biológicos. Desde hace muchos años, el fenómeno de adherencia bacteriana ha recibido gran atención en microbiología médica, no sólo desde el punto de vista biológico básico, sino también por su participación como posible factor en el tratamiento y la prevención de las enfermedades infecciosas. La adherencia bacteriana constituye el evento inicial en el proceso de colonización de los tejidos epiteliales del huésped. Dicho proceso conduce a la formación de verdaderos nichos ecológicos distintivos que ciertamente juegan un papel importante en la fisiología y defensa de las mucosas del huésped (1). De esta manera, los microorganismos que forman parte de la flora normal o aquellos con habilidad para causar enfermedad son capaces de subsistir en medios adversos, lo que representa una ventaja sobre organismos menos capacitados. Normalmente, las superficies mucosas y endoteliales están bañadas constantemente por secreciones (saliva, orina, sangre y moco) que son ricas en sustancias con actividad bactericida que junto con los productos metabólicos y las funciones mecánicas como el estornudo, la tos, el movimiento ciliar, la descamación y la peristalsis, limpian las superficies eliminando así a las posibles bacterias patógenas (1). Es lógico que los organismos de la flora normal, así como los organismos patógenos deben adherirse a las células del huésped para contrarrestar estos mecanismos normales de limpieza.

El fenómeno de la adherencia no es un proceso dañino *per se* pero favorece la interacción de factores de virulencia con sitios blanco en el huésped; por ejemplo, las toxinas producidas por microorganismos patógenos del tracto intestinal pueden interactuar más fácilmente con un receptor cuando existe previamente una interacción entre la bacteria y la superficie de la célula intestinal. Así mismo, los microorganismos capaces de invadir y multiplicarse

dentro de los tejidos, primero deben adherirse a diferentes sitios sobre la célula y posteriormente penetrar al interior de esta utilizando diversos mecanismos.

Las bacterias patógenas no colonizan ni dañan los tejidos del huésped indiscriminadamente. De hecho, existe cierta selectividad por parte de la especie infecciosa hacia el huésped que está relacionada con su edad, o el tipo de tejido, células blanco, etc. Se ha propuesto que esa selectividad está determinada entre otros factores, por el reconocimiento específico de moléculas presentes en la membrana celular eucariótica que actúan como receptores para estructuras estéricamente complementarias de superficies bacterianas con actividad de lectinas llamadas ligandos o adhesinas. Estas lectinas permiten la unión de la bacteria a la célula mediante interacciones hidrofóbicas. Al principio se lleva a cabo una interacción de tipo reversible que culmina en la unión irreversible de las células en contacto. Esta interacción está regida por factores fisicoquímicos que, a su vez, están determinados por la naturaleza química de las membranas celulares en interacción, además de su composición química y de las condiciones fisiológicas del microambiente. Los mecanismos por los cuales las bacterias se unen a células son variados e incluyen interacciones semejantes a las de lectinas y diversos sacáridos, interacciones electrostáticas e hidrofóbicas, puentes de hidrógeno, así como fuerzas de Van der Waals (2).

Ciertas adhesinas desempeñan un papel significativo en infecciones a nivel de las superficies mucosas al comienzo de un proceso patogénico y por ello constituyen factores de virulencia. Su sola presencia en la superficie celular bacteriana no es suficiente para causar enfermedad; se requiere de otros factores responsables del daño en sí. Entre estos factores de virulencia se encuentran el crecimiento, la toxigenicidad, la movilidad, la quimiotaxis, la resistencia a defensas del huésped como anticuerpos bactericidas, el sistema de complemento, la fagocitosis, etc. (1). La naturaleza química de las adhesinas es diversa. Se reconocen adhesinas de composición

polisacarídica, lipídica y proteica; y muchas tienen formas complejas como glicoproteínas o glicolípidos (2).

ADHESINAS DE NATURALEZA POLISACARÍDICA

Las cápsulas de algunos organismos Gram-positivos y Gram-negativos funcionan como adhesinas en la colonización de las mucosas del huésped. El papel de los azúcares en la adherencia de *Streptococcus mutans* como parte de la formación de la placa dental está bien establecido (2). Los lipopolisacáridos (LPS) de las bacterias Gram-negativas parecen conferir también atributos de adherencia a ciertos patógenos. Sin embargo en un buen número de casos, los LPS purificados de varias especies bacterianas bloquean competitivamente la adherencia de cepas virulentas de organismos heterólogos, lo que sugiere una reacción enteramente inespecífica (2,3). El glicocálix elaborado por microorganismos del tracto intestinal fue propuesto por Costerton y Cheng (1981) como un factor de adherencia y colonización del lumen intestinal protegiendo a las microcolonias de la acción de sustancias tales como antibióticos, anticuerpos, bacteriófagos, además de servir como almacén o fuente de nutrientes (4).

Generalmente se ha identificado a la mayoría de los receptores bacterianos localizados en células epiteliales como moléculas de naturaleza polisacarídica y es común que estén presentes como glicolípidos o glicoproteínas en la membrana celular (1). Como ejemplo, el ácido lipoteicoico en *Streptococcus pyogenes* forma puentes covalentes con la proteína M confiriendo hidrofobicidad a la superficie e interactúa con sitios de unión en la fibronectina de tejidos faríngeos (5). La primera indicación de que los azúcares pudieran tener un papel importante en la relación entre las células animales y sus patógenos microbianos surgió en la década de 1940 con el descubrimiento de la unión del virus de la influenza a residuos de ácido siálico en la superficie de eritrocitos. La participación de azúcares en la adherencia de bacterias a las

células se planteó desde 1955 por Collier y Miranda (3) los cuales demostraron que, entre muchos azúcares probados, la D-manosa inhibía la aglutinación de eritrocitos humanos por *Escherichia coli*.

ADHESINAS DE NATURALEZA PROTEICA

En este grupo se reconocen a las fimbrias o pili, proteínas de membrana externa y quizá antígenos flagelares. Las fimbrias o pili son estructuras filamentosas localizadas en la pared celular bacteriana que parecen hebras que sobresalen varios nanómetros de la superficie (6). La composición, dimensión, estabilidad, expresión, antigenicidad y especificidad de las fimbrias es variada. La presencia de adhesinas de morfología fimbriada en *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Neisseria gonorrhoeae* y otras bacterias, se ha asociado con la capacidad de adherencia de estos organismos y su habilidad para colonizar las mucosas del intestino, del tracto urinario, del tracto respiratorio y del tracto genital, respectivamente (1). La participación de fimbrias o pili en la adherencia manosa-específica de *E. coli* y otros bacilos Gram-negativos a superficies celulares fue descrita por primera vez por Duguid y Gillies (6); estos autores demostraron en una serie de estudios la adherencia de enterobacterias productoras de pili a eritrocitos, leucocitos y células epiteliales, encontrando que esta adherencia se inhibía específicamente por D-manosa a bajas concentraciones (6). El tratamiento de células epiteliales con concanavalina A, una lectina que se une a residuos de D-manosa (o D-glucosa) en las superficies celulares, inhibía también la adherencia de organismos que se adherían a residuos de manosa en las células. La especificidad del sitio de combinación de la adhesina con el azúcar pudo determinarse comparando la inhibición de la adherencia con cierto número de compuestos estructuralmente relacionados, de manera similar a como se efectuaron los estudios de sitios de combinación de enzimas, anticuerpos o lectinas (6).

El término hemaglutinina se emplea para denotar a aquellas adhesinas que tienen la propiedad funcional de aglutinar eritrocitos de una o varias especies animales. De hecho, las propiedades adherentes de *E. coli* fueron inicialmente descritas en 1908 por Guyot, quien observó que ciertas cepas de esta especie tenían la capacidad de aglutinar glóbulos rojos de algunas especies animales (6a). En años posteriores esta propiedad se correlacionó con la presencia de fimbrias, sin embargo no todas las fimbrias tienen la capacidad de aglutinar glóbulos rojos.

En algunos organismos Gram-negativos, como *Neisseria gonorrhoeae* y *Vibrio cholerae*, las proteínas de la membrana externa y los antígenos flagelares juegan un papel importante en el establecimiento de infecciones a nivel del tracto genitourinario e intestinal, respectivamente.

Las propiedades funcionales de las adhesinas proveen un medio útil para la identificación de microorganismos patógenos. La hemaglutinación (HA) y la adherencia a células del huésped han resultado invaluable en la búsqueda de adhesinas en bacterias y de sus receptores en células animales. El uso del método de hemaglutinación en presencia o ausencia de D-manosa o sus análogos proporciona una diferencia básica entre aquellas cuya actividad se inhibe ante la presencia de estos azúcares, que se denominan manosa-sensibles (MS) como las fimbrias tipo I de las enterobacterias y aquellas cuya aglutinación no se inhibe ante la presencia de estos azúcares, las cuales se denominan adhesinas manosa-resistentes (MR). El uso de la HA para la identificación de adhesinas no es suficiente para identificar todas las fimbrias producidas por una bacteria ya que muchas cepas de enteropatógenos, como *Escherichia coli*, poseen diversos tipos de adhesinas. Se han utilizado ensayos de adherencia de bacterias a levaduras, a células epiteliales bucales, faríngeas, intestinales, renales, cervicales, líneas celulares como HeLa, CHO, HEp-2, etc. como modelos *in vitro* para medir la capacidad de virulencia de cepas aisladas en casos clínicos (1,6,7,8).

El entendimiento de los mecanismos de adherencia y la definición y caracterización de las adhesinas bacterianas así como de sus posibles receptores en las células eucarióticas, permite el planteamiento de nuevas estrategias en la prevención de infecciones bacterianas. Estas medidas preventivas comprenden:

a.- La utilización de adhesinas purificadas libres de componentes bacterianos con actividad citotóxica, o de receptores y/o sus análogos como inhibidores competitivos de adherencia bacteriana (1,2).

b.- La administración de dosis sub-letales de antibióticos que supriman la formación y expresión de adhesinas bacterianas. Por ejemplo, las concentraciones sub-inhedoras de penicilina que favorecen la secreción de grandes cantidades de ácido lipoteicoico (LTA) de la pared celular de *S. pyogenes* lo que ocasiona una reducción en la hidrofobicidad de la superficie afectando la adherencia de la bacteria a células epiteliales de la mucosa oral. Otros antibióticos como la estreptomina que pueden ocasionar una reducción parcial o total en la expresión de fimbrias y en algunos casos los organelos fimbriales sintetizados son aberrantes en morfología y función (9, 2).

c.- El desarrollo de vacunas elaboradas con componentes no tóxicos purificados de la superficie bacteriana involucrados en la adherencia a las superficies mucosas capaces de inducir una respuesta inmune humoral y celular a nivel local y/o sistémico y por tiempo prolongado. Un ejemplo de esto son las vacunas preparadas con una mezcla de fimbrias K88, 987P, K99 y F41 utilizadas en la protección contra las infecciones provocadas por *E. coli* enterotoxigénica en ganado porcino, bovino u ovino (1,2).

***Escherichia coli* COMO PATOGENO EN HUMANOS**

Escherichia coli pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y es el único representante del género *Escherichia*. Es un bacilo Gram-negativo corto (0.5x4µm), anaerobio facultativo, no esporulado, provisto de flagelos peritricos,

de fimbrias; el cual puede o no presentar cápsula y se le ha subdividido en base a sus características bioquímicas (biotipos), serológicas (serotipificación en base a los antígenos: somáticos O, capsulares K y flagelares H), de antígenos de las fimbrias F1-6, de su susceptibilidad a bacteriófagos (fagotipos), de la producción de colicinas. En base a los mecanismos de patogenicidad de esta especie se han hecho otras subdivisiones (7,10).

Fue Escherich en 1885 quien describió por primera vez a *Escherichia coli*, bajo el nombre de *Bacterium coli commune* para indicar la presencia universal de este organismo en el intestino de individuos sanos (10). A pesar de que inicialmente se le describió como un microorganismo no patógeno, fue Escherich mismo quien demostró la presencia de *E. coli* en la orina de niñas con infecciones del tracto urinario y sugirió que los organismos alcanzaban la vejiga por la ruta ascendente (10,11).

Desde hace varias décadas se ha considerado a *E. coli* como un miembro de la flora normal del intestino del hombre y otros animales.

La colonización del tracto digestivo humano por parte de este microorganismo se lleva a cabo inmediatamente después del nacimiento.

E. coli es la especie predominante entre la flora normal anaeróbica facultativa del intestino y juega un papel importante en el mantenimiento de la fisiología del mismo; por ejemplo, en la asimilación de nutrientes del huésped y como proveedor de vitaminas en algunos animales (10). A pesar de que la mayoría de las cepas de *E. coli* no son patogénicas en el intestino, algunas pueden producir enfermedad por distintos mecanismos (7). Por ello, se reconoce a *E. coli* como causa importante de infección del tracto urinario, en heridas, en casos de peritonitis, meningitis, neumonía y septicemia, cuando su localización es extraintestinal (11).

Aunque en un inicio fue difícil establecer el papel de *E. coli* en la etiología de diarrea en niños, en la actualidad este concepto se acepta ampliamente. Originalmente fue Bray (1945) quien incriminó a *E. coli* como un

enteropatógeno, después de demostrar que una cepa de *E. coli*, antigénicamente diferente, era responsable de causar brotes de diarrea infantil en niños hospitalizados durante el verano (10,11).

Varela et al (1946) en México reportaron el aislamiento de *E. coli* de un caso mortal de diarrea. A mediados de la década de los años 50 se estableció que existían una serie de serogrupos de *E. coli*, involucrados epidemiológicamente como agentes etiológicos importantes de diarrea infantil en diferentes partes del mundo. Neter et al. (1955) utilizaron el término *E. coli* enteropatógena o EPEC para referirse a estos serogrupos. Los serogrupos clásicos de EPEC comprenden los siguientes: O26, O55, O86, O111, O114, O119, O125ac, O126, O128ab, O142 y O158 (Cuadro 1) (13,14). Hasta mediados de los años 70, la agrupación serológica era el único medio de diagnóstico para EPEC; esto, en parte, debido a que los métodos de diagnóstico y los modelos animales no eran los adecuados para estudiar las propiedades patogénicas que favorecían la producción de diarrea y la posibilidad de diferenciar estos organismos de las *E. coli* que constituían parte de la flora normal (7).

Las enfermedades infecciosas intestinales son una causa considerable de morbilidad y mortalidad en niños, principalmente en países en vías de desarrollo entre los que se incluye el nuestro (7,15). Una de las causas importantes del síndrome diarreico en estos países es *E. coli*; de la cual actualmente se reconocen cinco grupos asociados a esta enfermedad:

E. coli enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC). Actualmente estos grupos se distinguen sobre la base de sus características patogénicas, clínicas, epidemiológicas y cada uno está asociado con un grupo de serotipos, dados por la combinación de antígenos somáticos(O) y flagelares (H) (7,10). Cuadro 1

Cuadro 1

Serotipos (O:H) de *Escherichia coli* enteropatógena asociados con infecciones en humanos. Scaletsky et. al. (14) y Gomes et. al. (13)

O26:H ⁻	O111ab:H ⁻	O125ac:H21	O128ab:H7
O26:H11	O111ab:H2	O126:H ⁻	O142:H6
O55:H ⁻	O111ab:H12	O126:H21	O158:H23
O55:H6	O111ab:h21	O127:H ⁻	
O55:H7	O114:H2	O127:H6	
O86:H34	O119:H6	O128ab:H2	

MODELO DE PATOGENESIS POR *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA

Desde los primeros reportes sobre diarreas severas causadas por EPEC se hizo evidente el daño severo producido durante la infección por estas cepas al intestino humano. Estas lesiones se desarrollan en el interior de la célula huésped en la zona de la membrana subyacente al sitio de adherencia de la bacteria y se caracteriza por la elevación de la concentración de calcio intracelular, lo cual conduce a la despolimerización de la actina F del núcleo de las microvellosidades del reborde en cepillo. Con la destrucción de los filamentos de actina, la membrana plasmática sufre una serie de alteraciones físicas que provocan la formación de vesículas que al liberarse propician una zona sin microvellosidades en donde la bacteria entra en contacto íntimo con la célula infectada. Al mismo tiempo que las microvellosidades son destruidas, en el citoplasma por debajo de la bacteria ya adherida ocurre la acumulación de un conjunto de proteínas como la miosina, ezrina, talina y otras moléculas relacionadas que forman una estructura característica de este proceso conocida como pedestal. A estas lesiones se les ha denominado de adherencia y esfacelamiento (A/E).



El proceso que produce esta lesión tiene varios estadios. Para explicar la patogénesis de EPEC Donnenberg y Kaper propusieron en 1992 (16) un modelo que consta de las siguientes fases: 1.- Adherencia localizada, 2.- Transducción de señales y 3.- Adherencia íntima. La secuencia temporal de estos estadios no ha sido establecida con certeza, pero es posible que las tres fases sean concurrentes. Este modelo ha demostrado ser de utilidad pues ha permitido que en él se acomoden de manera adecuada los nuevos hallazgos sobre el entendimiento de la patogénesis de EPEC que se han realizado desde que fue propuesto hasta la fecha.

ADHERENCIA LOCALIZADA

El proceso mediante el cual EPEC se adhiere a células en cultivo y al que actualmente se denomina fenómeno de adherencia localizada (AL), fue descrito originalmente por Cravioto et al. (17). Poco después, Baldini et al. (5) demostraron que la capacidad de una cepa EPEC (E-2348/69) con serotipo (O127:H6) para adherirse a células en cultivo con un patrón localizado, dependía de la presencia de un plásmido de 60 Mda. La pérdida de ese plásmido invariablemente conducía a la pérdida del fenotipo AL; y de manera inversa, la transferencia de este plásmido a una cepa experimental como la HB101, que era no adherente en estado natural, permitía a esta bacteria adherirse a células HEp-2 en cultivo con ese mismo patrón. Debido a estas propiedades, al plásmido de E2348/69 se le denominó EAF por sus siglas en inglés (**Effacing and Attachment Factor**) y de una sección de 1 kb de su estructura se desarrolló una sonda para utilizarla como herramienta de diagnóstico (sonda EAF) (5).

A pesar de la utilidad demostrada por esta sonda en la elucidación de la epidemiología y en el diagnóstico de las infecciones por EPEC, la naturaleza exacta de la adhesina que mediaba esta adherencia permaneció sin ser conocida por varios años.

La identificación de un factor mediador de la adherencia localizada fue descrito por Girón et al. en 1991. Estos autores encontraron fimbrias con un diámetro de 7 nm producidas por cepas EPEC las cuales tendían a agregarse y formar haces, por lo que se les llamó BFP (por sus siglas en inglés Bundle Forming Pilus). Estas fimbrias eran producidas únicamente bajo ciertas condiciones de cultivo de la bacteria; lo cual explicaba en parte porqué muchos investigadores no habían podido identificarlas y caracterizarlas con anterioridad (18).

Un anticuerpo contra BFP preparado en conejos reducía significativamente la adherencia localizada de la cepa EPEC B171 (O111:NM) a células HEp-2. Actualmente se sabe que estas proteínas están directamente involucradas en la unión entre las bacterias durante el proceso de adherencia localizada a células epiteliales lo cual permite que las colonias adherentes se distribuyan con el patrón localizado observado mediante microscopía de luz. No hay pruebas definitivas de que los BFP intervengan directamente en la adherencia de las bacterias a las células epiteliales (18).

La secuencia de la región amino terminal de las proteínas fimbriales purificadas revelan cierta similitud con los pili TCP de *Vibrio cholerae* (18) así como con otros miembros de la familia de fimbrias tipo IV.

Al utilizar una mutante tipo TnphoA de la cepa E-2348/69 que no poseía la propiedad de adherencia localizada, Donnenberg et al. (20) identificaron el gen estructural *bfpA* que codifica para los BFP. Los estudios de genética realizados posteriormente pusieron de manifiesto que se requería un grupo de al menos 13 genes en el plásmido EAF para la expresión y ensamblaje de estas proteínas (21) (22).

Muchos de estos genes codificaban proteínas que compartían cierta similitud con proteínas requeridas para la biogénesis del pilus tipo IV en otros organismos patógenos Gram-negativos tales como *Vibrio cholerae* y *Pseudomonas aeruginosa*, pero algunas proteínas de los BFP no tenían homólogos obvios. Más aún, la expresión y el ensamblado de los BFP requería

de la presencia del elemento regulador global (*per*) de la patogénesis de EPEC, así como un gen cromosómico (*dsbA*) que codifica a una enzima periplásmica que era la responsable de facilitar la formación de enlaces disulfuro durante la producción de estos factores (23).

TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES

La adherencia de EPEC a células epiteliales estimula varias vías de transducción de señales en la célula eucariótica. Los genes bacterianos cuyos productos son responsables de la actividad que causan la lesión A/E se localizan en una isla de patogenicidad cromosómica de 35 kb llamada locus de esfacelamiento de los enterocitos (*lee*). Esta isla de patogenicidad contiene tres grupos principales de genes que codifican un sistema de secreción tipo III, proteínas de secreción y la intimina respectivamente (24).

Las mutaciones en los genes que codifican las proteínas de secreción (*espA*, *espB* y *espD*) o en los genes que codifican para el sistema de secreción tipo III (*sep* y *esc*) tienen la propiedad de abolir los eventos de señalización múltiple en el citoplasma de la célula. Sin embargo, ninguno de esos eventos ha sido provocado artificialmente mediante la adición de sobrenadantes obtenidos de cultivos de EPEC a células epiteliales en cultivo y por ello se considera que la adherencia íntima de la bacteria es un requisito indispensable para que los cambios de señalización puedan ocurrir (25, 26, 27,28). La infección de células epiteliales en cultivo por EPEC induce aumentos en los niveles del calcio intracelular (Ca^{2+}) proveniente de las reservas intracelulares demostrándose que la neutralización por medios fisicoquímicos de esta especie de calcio reduce significativamente la polimerización de la actina y con ello la formación de la lesión E/A (29).

La evidencia experimental indica que el calcio es liberado de reservorios intracelulares sensibles al 1,4,5 inositol trifosfato (IP_3) (33) y algunos investigadores han demostrado que la adherencia de EPEC a células epiteliales en cultivo disparan la liberación de inositol trifosfatos, incluyendo IP_3

e IP₄ en células infectadas. El incremento de la cantidad de inositol trifosfato es consistente con la activación de la enzima fosfolipasa Cy1 por EPEC adherida a células epiteliales (30). Así mismo, dado que el incremento del calcio intracelular puede inhibir la absorción de Na⁺ y Cl⁻ y/o estimular la secreción de cloro en los enterocitos (29), se ha sugerido que el cambio en las concentraciones de (Ca²⁺)_i produce un efecto que contrarresta la respuesta secretoria intestinal contra EPEC.

La adherencia de EPEC a células epiteliales produce como resultado la fosforilación de varias proteínas de la célula huésped en determinados residuos de serina y tirosina. Una de dichas proteínas es la cadena ligera de la miosina (31) y hay evidencias de que durante el proceso se activan dos cinasas: la cinasa de la cadena ligera de la miosina y la cinasa de la proteína cinasa C (PKC) (32).

La activación de la PKC tanto *in vitro* como *in vivo* produce cambios rápidos en la secreción de agua y electrolitos intestinales y la miosina está relacionada con una elevada permeabilidad de las uniones estrechas por lo cual estas dos proteínas han sido propuestas como elementos importantes de los mecanismos cooperativos que refuerzan la diarrea producida por EPEC.

Durante varios años se creyó que la adherencia de EPEC a células HeLa era favorecida por una proteína de 90 kDa que se encontraba ubicada en la membrana de las células epiteliales y que se fosforilaba en determinados residuos de tirosina. Este compuesto se identificó como la proteína de choque térmico denominada hp90. Esta proteína forma parte de la lesión E/A y su distribución está restringida a una área ubicada en la punta de los pedestales precisamente por debajo de la bacteria adherida. Rosenshine et al. han demostrado que la proteína Hp90 actúa como el receptor para la intimina y que durante esta interacción se producen las señales con las que EPEC induce el rearreglo del citoesqueleto de la célula infectada. Recientemente se ha demostrado que la proteína Hp90 es en realidad una proteína bacteriana de secreción y se le ha denominado Tir (por sus siglas en

inglés **Translocated Intimin Receptor**) cuya función es la de actuar como el receptor eucariótico para la íntima durante la fase de adherencia íntima de EPEC a la célula huésped (33) (34).

Los experimentos con células epiteliales T84 y CaCo2 polarizadas han demostrado que la adherencia de EPEC produce una disminución en la resistencia eléctrica trans-epitelial de las monocapas celulares y a pesar que al principio se sugirió que esta caída de la resistencia tenía que ver con una vía intracelular, trabajos posteriores demostraron que lo que estaba involucrado era una vía paracelular que presentaba anomalías en las uniones estrechas intercelulares (35) (36). El amortiguamiento de los incrementos de las concentraciones del calcio intracelular por ejemplo, eliminan completamente los cambios de la resistencia eléctrica (29). Junto con los efectos observados en las células epiteliales, la respuesta de transducción de señales a EPEC incluye también la migración de leucocitos polimorfonucleares (PMNs). Utilizando un sistema *in vivo* en el cual las células intestinales polarizadas T84 son cocultivadas con PMNs, Saykovic et al. (37) demostraron que la adherencia de EPEC a la célula epitelial provocaba que los PMN atravesaran la monocapa epitelial. Esta estimulación de la transmigración también se ha observado en organismos invasivos tales como *Salmonella spp* pero no es común en un organismo que es primordialmente no invasivo como EPEC. La evidencia experimental apoya un modelo en el cual la adherencia de EPEC a las células epiteliales activa al factor de transcripción eucariótico NF-KB, el cual a su vez estimula la expresión de la citocina IL-8, que actúa como quimioatrayente de los PMN (38). Los anticuerpos que neutralizan la IL-8 abaten la actividad quimiotáctica en un 50%, sugiriendo con ello que otros factores quimiotácticos derivados del epitelio también son estimulados por la adherencia de EPEC.

FASE DE ADHERENCIA ÍNTIMA

La adherencia íntima de EPEC a las células epiteliales se lleva a cabo mediante la interacción de un receptor proteico, localizado en la

membrana de la célula epitelial, con la intimina que es una proteína de membrana externa bacteriana con un peso molecular de entre 94 y 97 kDa, codificada por el gen *eae* y cuya identidad fue reportada por Jerse et al. (24,39). El gen *eae* se encuentra en todas las cepas EPEC, EHEC, *Citrobacter rodentium* y *Hafnia alvei* que son capaces de producir la lesión A/E, pero está ausente de cepas de *E.coli* de la flora normal, ETEC y de otras bacterias que no producen esta lesión (70).

INTIMINA DE EPEC

En una investigación realizada en 1979, Cravioto *et al.* (17) informaron que el 80 % de un grupo importante de cepas de serogrupos clásicos de EPEC eran capaces de adherirse a células en cultivo en presencia de D-manosa, por lo que este hallazgo constituyó la primera evidencia de que EPEC utilizaba un factor adhesivo distinto a las fimbrias, y sugirieron que los factores responsables de este tipo de adherencia estaban codificados en un plásmido. En 1985 Levine *et al.* (46) demostraron la presencia de factores que conferían la propiedad de adherencia difusa y localizada de cepas EPEC confirmando que estos factores estaban codificados en un plásmido de 60 MDa.

El papel de la intimina en la diarrea humana fue esclarecido en un estudio realizado por Levine et al. (46) en el cual emplearon la cepa silvestre E-2348/69 que al ser administrada a 11 voluntarios humanos produjo diarrea en 9 de ellos, mientras que en el grupo de 11 voluntarios empleados como control y a quienes al administrar una variante de la misma cepa pero con una mutación isogénica en el gen *eae*, solamente 4 de estos individuos desarrollaron diarrea. Se observó además que en los voluntarios que no desarrollaron diarrea a pesar de haber ingerido la cepa E-2348/69, al examinar los sueros preinfección se encontró que ya poseían anticuerpos contra una proteína de 94 kDa.

Este resultado fue el primer indicio de que el gen *eae* era un componente esencial en la virulencia de la cepa EPEC E-2348/69 pero también

quedó claro que se requerían otros factores adicionales desconocidos en ese momento para que la enfermedad se desarrollara completamente. En 1991, Cravioto *et al.* (47) (48) realizando un análisis de los diversos factores que componen la leche materna de mujeres de una comunidad rural en el estado de Morelos, México encontraron que la IgA de calostro reconocía de manera específica a una proteína de 94 kDa de membrana externa de varias cepas EPEC que presentaban un patrón de adherencia localizada y que habían sido aisladas de brotes diarreicos en infantes en la misma comunidad, el análisis mediante inmunodetección e inmunodifusión radial permitió reconocer que esta proteína era la misma que Levine y colaboradores habían identificado unos años antes. Jerse y Kaper en 1991 mediante la clonación del gen *eae* obtuvieron la secuencia de este (24).

La expresión del gen *eae* en la cepa de *E. coli* K-12 que es naturalmente no adherente, no es suficiente para provocar la adherencia de esta a células epiteliales en cultivo. Sin embargo, cuando estos cultivos son preinfectados con una cepa EPEC mutante en el gen *eae*; estos cultivos pueden ser infectados de manera normal por la cepa K-12 (49).

El trabajo de investigación realizado en los últimos años ha demostrado que esta proteína de 94 kDa, ahora denominada Intimina, se localiza en la membrana externa de EPEC y que es expresada como un producto de 102 kDa que antes de ser exportada a su sitio de ubicación debe ser procesada. Actualmente se tiene un conocimiento relativamente amplio de la naturaleza de la intimina el cual se ha obtenido esencialmente empleando técnicas de biología molecular y genética (20)(24)(39)(40), se sabe por ejemplo que esta proteína tiene una identidad del 31% y una similitud del 50% con la proteína invasina de las diferentes especies de *Yersinia sp* (41). Al comparar la intimina de la cepa EPEC E2348/69 y la cepa EHEC O157:H7 (EDL933) se ha encontrado un sorprendente patrón de conservación de secuencias entre ellas (42) y aunque la identidad global de la proteína es de 83%, existe una divergencia de secuencia que se encuentra distribuida a lo largo de la región

carboxi-terminal. Otro aspecto interesante es que los primeros 704 residuos (75%) de las dos proteínas, empezando por el extremo amino terminal, tienen un 94% de identidad mientras que el resto (25%) solo poseen un 49% de identidad (43).

La región de la intimina en donde su secuencia de aminoácidos posee una mayor divergencia es la del carboxilo terminal, y se ha demostrado que esta porción de la molécula es la que interactúa con el receptor en la membrana eucariótica (44). Recientemente se ha sugerido que las diferentes secuencias de la intimina pueden permitirle a la bacteria emplear diferentes patrones de colonización dentro del intestino. Actualmente se conocen varias intiminas y hasta el momento se ha determinado la secuencia de aminoácidos de cuando menos 9 de ellas correspondientes a EPEC (43), EHEC, *C. rodentium*, *H. alvei* y una cepa de *E. coli* patógena de conejos y cerdos. A las proteínas intiminas de EPEC que infectan a estos organismos se les ha denominado como Int_{EPEC}, Int₀₂₆, Int_{HA}, etc. Los patrones globales de esas secuencias muestran una alta conservación en la región N-terminal con la mayor variabilidad en la región del carboxilo terminal.

Las cepas EPEC con mutaciones en el gen *eae* pierden su capacidad para adherirse de forma íntima, sin embargo son capaces de inducir las señales que provocan en la célula huésped las modificaciones necesarias para que esta forme un receptor funcional al cual la cepa K-12 que expresa la intimina pueda adherirse. Rosenshine *et al.* (50) han presentado evidencias de que el receptor a EPEC es una proteína de membrana con un peso molecular de 90 kDa la cual para ejercer su función de manera adecuada debe estar fosforilada.

Uno de los eventos característicos de transducción de señales que ocurre al adherirse EPEC es la fosforilación del Tir, cuyo origen es bacteriano, que es exportada hasta la membrana citoplasmática de la célula huésped desde el citoplasma de *E. coli* como un componente principal del conjunto de proteínas del sistema de secreción tipo III que este organismo

emplea en el proceso infeccioso. Previamente al proceso de adherencia íntima de EPEC, el Tir se halla en un estado de desfosforilación, sin embargo una vez que ha sido introducido en la membrana eucariótica ocurren un conjunto de reacciones que provocan su fosforilación en el residuo de histidina 478 con lo cual se logra una modificación estructural en esa que lo convierte en una proteína activa capaz de funcionar como un receptor que reconoce específicamente determinados dominios en el extremo carboxilo de la proteína de 94 kDa haciendo posible que se establezca una relación física estrecha entre EPEC y la célula eucariótica huésped provocando la formación de la lesión A/E ya descrita previamente y de los acontecimientos asociados.

Los mismos investigadores han demostrado que la proteína híbrida *int*-280 proteína ligadora de maltosa es capaz de ligarse a la membrana extraída de células epiteliales incubadas previamente con una cepa de EPEC mutante en el gen *eae*, pero es incapaz de ligarse a las membranas de células no incubadas con la misma cepa. Por su parte Frankel *et al.* (51) observaron que la proteína híbrida mencionada anteriormente sí puede ligarse a células que no fueron preincubadas con EPEC apoyando posteriormente la idea de que la intimina se liga a la proteína integrina β , que actúa como receptor para la proteína invasiva en las especies de *Yersinia*. La razón de la discrepancia en estos resultados aún no está aclarada del todo, pero es posible que la intimina sea capaz de reconocer a más de un receptor.

A pesar de que actualmente se conocen diversos aspectos relacionados con la capacidad de adherencia de EPEC y se han descubierto ya varios factores proteicos que están directamente relacionados con el proceso de adherencia a células epiteliales; uno de los aspectos que ha sido postergado, quizá por razones relacionadas con la dificultad inherente a la manipulación de proteínas de membrana, es el que concierne al aislamiento y caracterización bioquímica de la intimina de este microorganismo.

OBJETIVOS

Objetivo General:

Determinar las características bioquímicas, inmunológicas y genéticas de la proteína de 94 kDa de la membrana externa de cepas EPEC conocida como Intimina.

Objetivos Particulares.

1. Desarrollar una metodología de cromatografía líquida de baja presión para purificar la proteína de membrana externa de 94 kDa (Intimina).
2. Producir anticuerpos específicos contra intimina en conejos.
3. Probar el efecto inhibitorio de estos anticuerpos en el proceso de adherencia de cepas EPEC a células HEp-2 en cultivo.
4. Determinar el punto isoeléctrico de la intimina.
5. Obtener datos de secuenciación de la región amino y carboxilo terminal de la intimina.

MATERIAL Y METODOS

La purificación de la intimina de membrana externa se realizó a partir de las siguientes cepas de *Escherichia coli*: la cepa silvestre E-2348/69 con serotipo O127:H6 la cual se ha empleado como representativa del grupo EPEC ya que posee las características de adherencia localizada a células en cultivo y produce una proteína de 94 kDa cuya secuencia ha sido deducida mediante la secuenciación del gen *eae* que la codifica.

Como controles se usaron las cepas mutantes derivadas de la cepa E-2348/69 silvestre denominadas: CVD 206 (Pcvd438) *eae*⁺ que produce intimina y es adherente (control positivo) y la cepa CVD 206 *eae*⁻ que no produce intimina y no es adherente (control negativo). Cuadro 2

Cuadro 2.

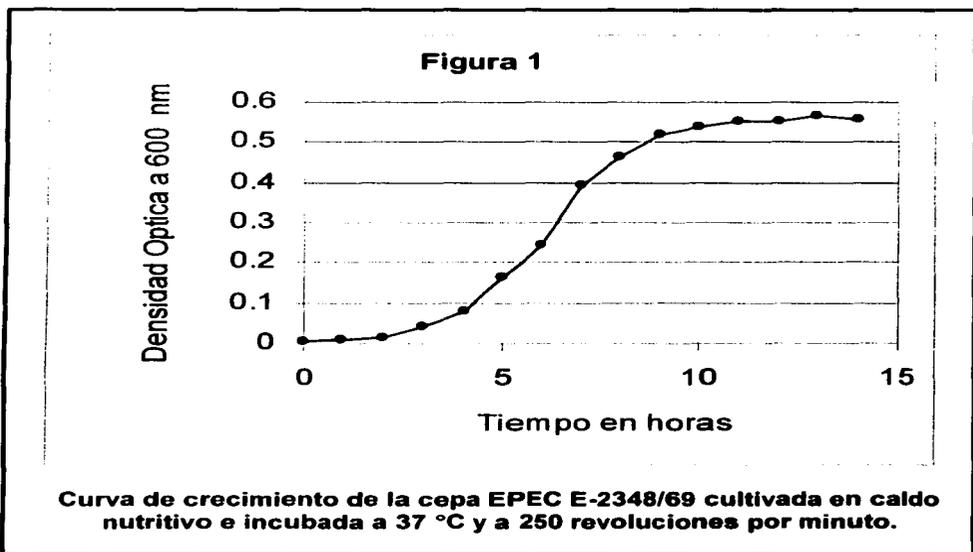
Cepas EPEC empleadas en este estudio y cepas controles

Cepa	Serotipo
E-2348/69 Silvestre	O127:H6
CVD 206 <i>eae</i> ⁻	O127:H6
CVD 206(pCVC438) ⁺	O127:H6
pCVD 438	O127:H6
C51	O111:H2
E-380/69	O114:H2
E-851/71	O142:H6
K-12	N/T
Difusa	O75
Agregativa	O42:

Se emplearon las cepas E-380/69 con serotipo O114:H2 , la cepa C-51 con serotipo O111:H2 y la cepa E851/71 con serotipo O115:H78 también del grupo EPEC que presentan el patrón característico de adherencia

localizada a las células HEp-2 en cultivo empleadas como modelo experimental y sirvieron de comparación tanto en los métodos de aislamiento de la proteína como en las pruebas de adherencia a células HEP-2 y en los procedimientos de inmunodetección de la intimina. Como controles negativos naturales se utilizaron la cepa *E. coli* K-12, una cepa de *E. coli* agregativa y una cepa *E. coli* difusa las cuales en forma natural no expresan la intimina.

Cada una de estas cepas se cultivó a 37°C en matraces de 2 litros con 250 ml de caldo nutritivo (Difco) y con una agitación equivalente a 250 rpm para obtener la curva de crecimiento y determinar el tiempo correspondiente a la fase logarítmica del cultivo durante la cual se cosecharían las bacterias (Fig 1). Antes de realizar el cultivo se determinó en cada cepa su capacidad de adherencia a células HEp-2 en cultivo.

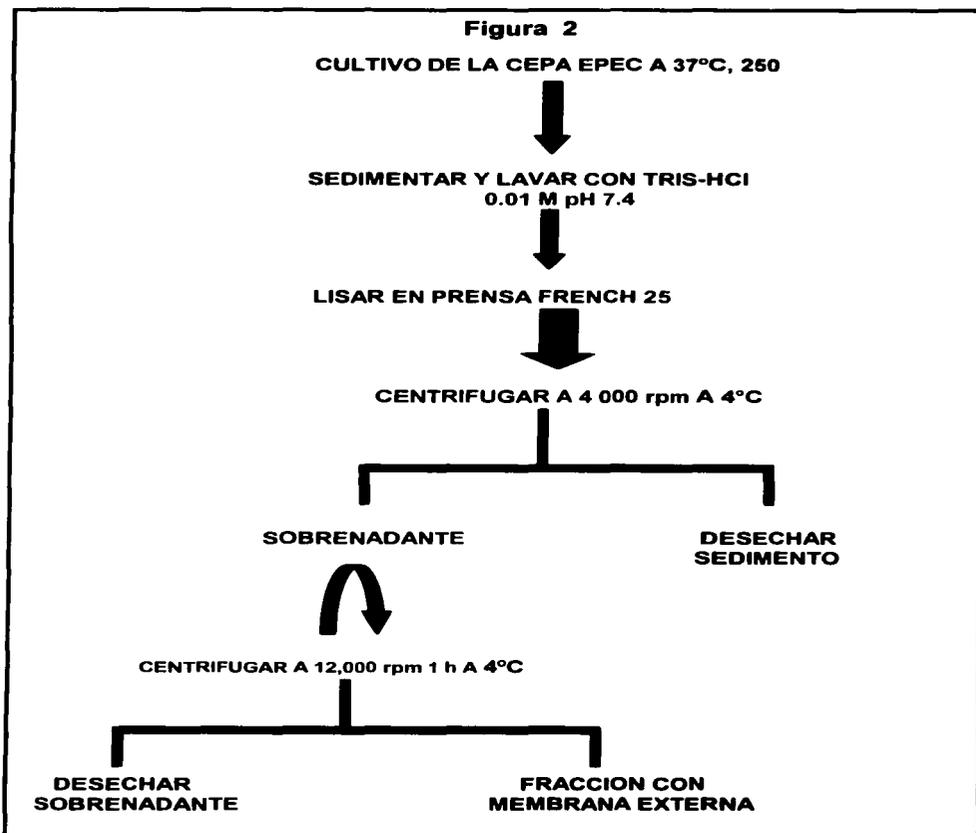


OBTENCION DE MEMBRANA EXTERNA DE *Escherichia coli*

Una vez establecidos el tiempo de inicio y la duración de la fase logarítmica de cada uno de los cultivos; se procedió a efectuar cultivos de 10 litros para obtener una masa bacteriana de la cual se pudiera separar suficiente membrana externa para efectuar todas las técnicas de purificación por solubilización con detergentes y cromatografía de permeación en gel utilizadas en este trabajo.

La obtención de la membrana externa de *E. coli* se realizó como sigue:

Al terminar el tiempo de cultivo, se concentraron las bacterias mediante centrifugación a 6000 rpm en un rotor GSA (Sorvall) a 4°C. El sedimento se resuspendió en 100 ml de amortiguador de Tris-HCl 0.01M, pH 7.4, y se repitió el procedimiento tres veces con el fin de eliminar cualquier residuo sólido. Fig 2.



Las bacterias obtenidas de este proceso se resuspendieron en 100 ml de PBS 0.1 M, pH 7.4 y se lisaron por pase a través de una prensa French por 3 veces a una presión de 25 ton/m².

El extracto total obtenido después del prensado se diluyó a 300 mL con PBS que contenía inhibidores de proteasas a una concentración de 5 µg/mL y se centrifugó a 6 000 rpm a 4°C por 20 minutos para sedimentar y eliminar las bacterias que no habían sido lisadas durante el proceso de prensado.

El sobrenadante obtenido del paso anterior se centrifugó a 14,000 rpm a 4°C durante 90 minutos en un rotor SS-34 (Sorvall) y el sedimento que contenía la membrana externa se resuspendió en 5 mL de PBS después de desechar el sobrenadante. Para eliminar los ácidos nucleicos contaminantes el sedimento resuspendido se incubó durante 1 hora a 37°C con DNAsa y RNAsa a una concentración de 10 µg/ml respectivamente, al cabo de la cual se volvió a centrifugar la suspensión en las mismas condiciones antes mencionadas para separar de la mezcla los productos de la digestión y concentrar la membrana externa. Se determinó posteriormente el contenido proteico de esta suspensión mediante el método de Lowry (52) empleando albúmina sérica bovina como estándar.

SOLUBILIZACION DE LA MEMBRANA EXTERNA DE *Escherichia coli*

Después de haber determinado la concentración de proteínas de la mezcla de membrana externa, se ajustó la concentración de esta a 20 mg/ml por dilución en amortiguador de Tris HCl 0.01 M, pH 7.4 y para eliminar la fracción de membrana plasmática contaminante, se incubó la muestra con lauril sarcosinato de sodio al 1.67% v/v durante 30 minutos a temperatura ambiente y se centrifugó la mezcla a 14 000 rpm por 1 hora a 25°C en un rotor SS-34 (54). Se recuperó el sedimento con la membrana externa, se le determinó nuevamente la concentración de proteínas por el método de Lowry y se ajustó la cantidad de proteínas a 20 mg/ml ahora mediante ultrafiltración en cámara de Amicon con membrana de corte molecular de 10 kDa, se distribuyó en alícuotas de 3.0 mL con 60 mg de proteína cada una y se guardaron en congelación a -80°C hasta su uso.

CROMATOGRAFIA DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA DE *Escherichia coli* EN COLUMNA DE SEPHACRYL S-200 HR

La separación cromatográfica por exclusión por peso molecular se realizó en una columna de Sephacryl S-200 HR (Amersham) de 2.6 cm de diámetro por 90 cm de altura con un volumen total de 477 mL, equilibrada con 1500 mL de solución amortiguadora de Tris-HCl 0.01M, pH 7.4 con dodecil sulfato de sodio al 0.5% (p/v) y β -mercaptoetanol al 0.5% (v/v).

Una alícuota con 2.5 mL de la solución con membrana externa con un contenido de 50 mg de proteína total se diluyó hasta 6.0 mL con amortiguador de elución, Tris-HCl 0.01M, pH 7.4 con dodecil sulfato de sodio al 0.5% (p/v) y β -mercaptoetanol al 0.5% (v/v) y se incubó a temperatura ambiente por 30 minutos para solubilizarla. Mediante ultracentrifugación a 45 000 rpm y a temperatura ambiente se recuperó el sobrenadante con la fracción de membrana externa solubilizada y se desechó la pastilla de sedimento (Fig 3 , 4 y 5).

Figura 3

FRACCION CON MEMBRANA EXTERNA



**INCUBAR CON SARCOSYL 1.7% POR 30'
A TEMPERATURA AMBIENTE**



CENTRIFUGAR A 12 000 rpm 30'

**SOBRENADANTE
CON MEMBRANA CITOPLÁSMICA**

**SEDIMENTO
CON MEMBRANA EXTERNA**



DETERMINAR PROTEÍNAS



**ELECTROFORESIS
SDS PAGE**

Figura 4

**FRACCION CON MEMBRANA EXTERNA SOLUBILIZAR EN
TRIS-HCl 0.01M pH 7.4 0.05 % SDS, 0.05 % MERCAPTOETANOL**



ELUIR EN COLUMNA DE SEPHACRYL-S-200 HR



**ELUIR CON AMORTIGUADOR DE TRIS-HCl 0.01M pH 7.4
0.05% SDS, 0.05 % MERCAPTOETANOL**



**COLECTAR FRACCIONES DE 3.0 ml Y VISUALIZAR LA
PROTEINA DE 94 kDa POR ELECTROFORESIS**



COLECTAR FRACCIONES CON PME 94 kDa



CONCENTRAR Y DIALIZAR

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 5

FRACCION DE PME 94 kDa ELUIDA EN COLUMNA Y CONCENTRADA



COMPROBACION DE PUREZA MEDIANTE ELECTROFORESIS E INMUNODETECCION CON sIgA E ISOELECTROENFOQUE POR METODO DE O'FARRELL



OBTENCION DE ANTICUERPOS POLICLONALES



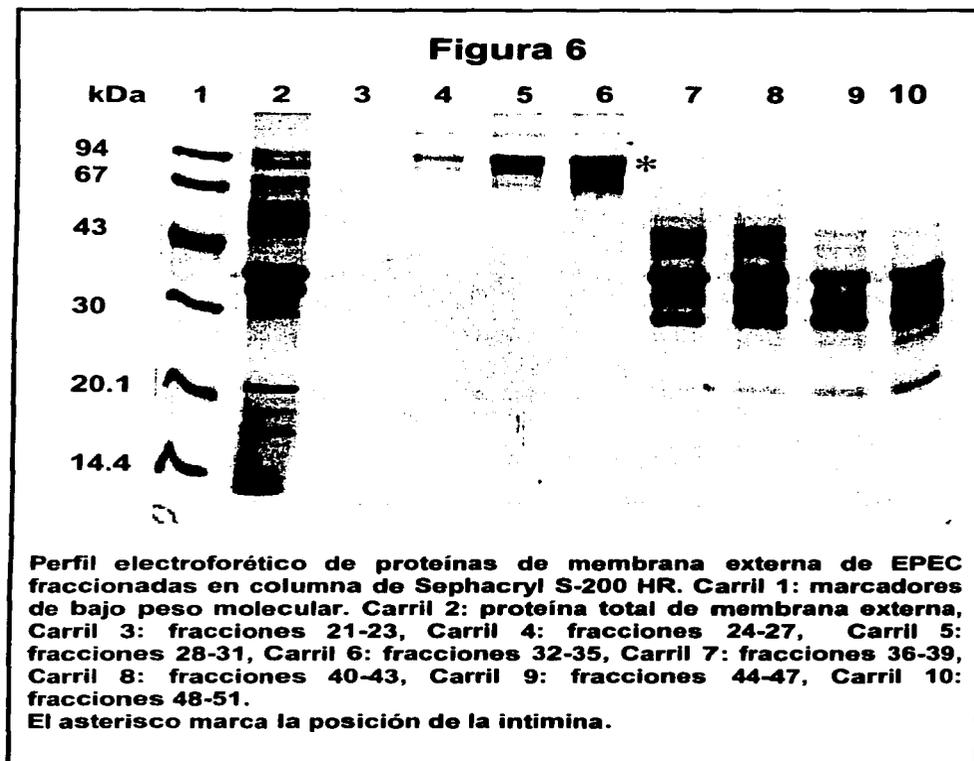
PURIFICAR PME 94kDa MEDIANTE CROMATOGRAFIA DE AFINIDAD



REALIZAR PRUEBAS DE INHIBICION DE LA ADHERENCIA

El sobrenadante recuperado se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa con poro de 0.22 μm , y después se agregó a la columna de Sephacryl en un volumen de 6.0 mL (aproximadamente 1.5 % del volumen total de la columna) y se eluyó a una velocidad de flujo de 20 mL/h; se colectaron fracciones de 3 mL cada una y en conjuntos de 10 fracciones (30 mL) se concentraron hasta un volumen final de 1.0 mL.

Mediante electroforesis desnaturante y reductora en gel de poliacrilamida al 12.5% (53) se efectuó un análisis para determinar el perfil de las proteínas eluidas en cada conjunto de fracciones y para determinar el grado de pureza de la intimina en estas fracciones. Fig 6.



OBTENCIÓN DE ANTICUERPOS anti-INTIMINA

Se preparó una solución de intimina pura diluida a 1.0 mg/ mL (1.5mL) en solución salina isotónica y se agregó 1.5 mL de adyuvante de Freund completo, se emulsificó y se inocularon 1500 μ L en forma subcutánea en 6 sitios (250 μ L) de la zona dorsal de conejos adultos de la raza Nueva Zelanda. Los conejos fueron re-estimulados cada dos semanas con la misma proteína en adyuvante incompleto de Freund (Sigma).

Los conejos se sangraron a blanco y se obtuvo el suero. Las inmunoglobulinas G (Ig G) se precipitaron con sulfato de amonio al 33% por 3 veces consecutivas (55) y luego de obtener el precipitado se dializó la inmunoglobulina en amortiguador de boratos 0.1M y pH 8.3 en bolsa de colodión de corte de 12-14 kDa, a una temperatura de 4°C.

Al finalizar la diálisis, se disolvió la IgG con amortiguador de fosfatos 0.005M pH 8.0 hasta obtener una concentración de 15 mg/ml, se fraccionó en una columna de DEAE-Sephacell (Pharmacia) de 2.6X20 cm (volumen 106 mL), se lavó con 600 mL del mismo amortiguador y se eluyó la IgG con un gradiente de 600 mL de NaCl de 0.0 a 1.0 M pH 8.0. Se colectó la fracción con la IgG (primer pico), se concentró en cámara de ultrafiltración Amicon con membrana de corte de 10 kDa y se determinó el contenido proteico mediante el método de Lowry empleando albúmina sérica de bovino como estándar (52).

ELECTROFORESIS DESNATURALIZANTE Y REDUCTORA EN GEL DE POLIACRILAMIDA

Todas las corridas electroforéticas fueron realizadas en geles de poliacrilamida al 7.5, 10.0, 12.5 y 15.0% empleando para ello el método discontinuo de Laemmli (53).

ISOELECTROENFOQUE DESNATURALIZANTE DE PROTEINAS DE MEMBRANA EXTERNA SEGÚN EL METODO DE O'FARRELL

Se preparó un gel de poliacrilamida al 3% con urea 8.5 M , anfolina de intervalo de pH 3.5-9.5 y/o 4-7 a una concentración de 2%, CHAPS al 2% y/o Nonidet P40 al 2% y se indujo la polimerización con APS al 10 % y TEMED al 100% a temperatura ambiente en tubos de vidrio de 3 mm de diámetro interno por 14 cm de largo. Una vez que la mezcla se polimerizó, se eliminaron los residuos no polimerizados, se cargó la muestra disuelta en amortiguador de solubilización a una concentración de 2 µg de proteína por µL, se agregó a cada tubo un volumen de 25 µL de la mezcla y se realizó el isoelectroenfoque (IEF) a 200 V durante 1 hora, a 500 V durante 4 horas y finalmente se aumentó el voltaje a 800 V y se continuo la corrida 16 horas más. Al finalizar el IEF se extrajeron los geles mediante presión con agua destilada, se marcaron sus extremos positivo y negativo con rojo de metileno y se guardaron a -80°C envueltos en aluminio. Para realizar la electroforesis en segunda dimensión, se equilibraron los geles correspondientes en una solución que contenía SDS al 0.05 %, se colocaron en el gel desnaturalizante y reductor al 12.5% y se corrieron a 150 V (56). El resultado se evaluó mediante tinción con coomassie e inmunodetección con sIgA e IgG anti-intimina.

INMUNODETECCION DE LA INTIMINA CON sIgA DE CALOSTRO HUMANO Y CON IgG Anti-INTIMINA

Los ensayos de inmunodetección de la proteína de 94 kDa de membrana externa de *E. coli* separada mediante cromatografía, se llevaron a cabo empleando el método desarrollado por Towbin et al (57)

PRUEBAS DE ADHERENCIA DE EPEC A CELULAS HEP-2 EN CULTIVO

Para las pruebas de adherencia así como las pruebas de inhibición de la adherencia de EPEC a células de cultivo se utilizó la línea celular HEP-2 que fue cultivada en botellas de cultivo de plástico (NUNC) en Medio Esencial Mínimo de Dulbecco (DMEM) con suero fetal bovino al 10% (v/v) a 37°C y en una atmósfera que contenía una mezcla de aire con CO₂ al 5% (17).

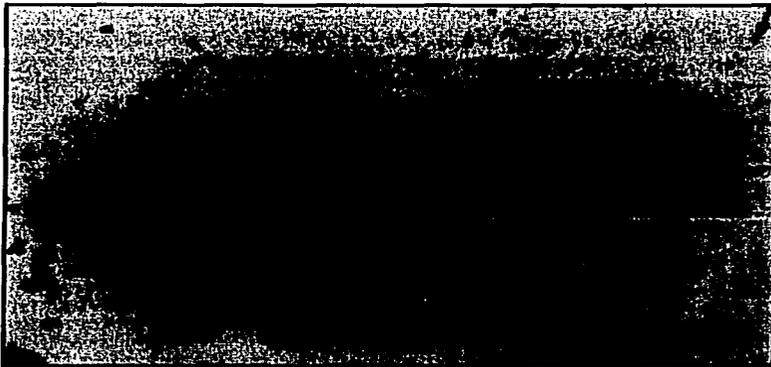
Las células fueron cultivadas hasta que la monocapa celular alcanzó un 75% de confluencia y estuvieron en las condiciones requeridas para efectuar la prueba de adherencia y de inhibición de la adherencia (60).

Las pruebas de adherencia a células HEP-2 en cultivo se realizaron en la presencia de D-manosa al 1% como lo describieron Cravioto *et al.* (17). Esencialmente, las células HEP-2 se cultivaron sobre lentes de vidrio colocadas en los pozos individuales de una placa de 24 pozos con 1 mL de medio mínimo esencial (DMEM) hasta un 75% de confluencia. Cuando esto ocurrió se eliminó el medio de cultivo inicial y se infectaron las células poniendo 1.0 mL de medio DMEM en el cual se había disuelto 50 µl de cultivo bacteriano de *E. coli* (de cada una de las cepas estudiadas) de 18 horas en caldo de triptona al 1 % y se incubaron las placas a 37°C. Al concluir 3 horas de incubación, las células adheridas a las lentes de vidrio fueron lavadas entre 3 y 6 veces con PBS en la placa de cultivo, luego se fijaron las células con metanol absoluto, se tiñeron con colorante de Giemsa y se destiñeron en acetona (100 %), acetona/xilol (1:1), xilol (100 %) durante un minuto en cada una de estas soluciones y se montaron en portaobjetos limpios empleando bálsamo de Canadá como adhesivo, las preparaciones se dejaron secar durante 24 horas y luego fueron examinadas en un microscopio óptico a un aumento de 40X y 100X para evaluar la proporción de colonias de EPEC adheridas de forma localizada sobre cada célula (Fig 7).

Figura 7



Patrón de adherencia localizada de EPEC cepa C-51 (O11:H2) a células HEp-2 en cultivo de 3 horas.



**Patrón de adherencia localizada de la cepa EPEC E-2348/69 (O127:H6) a células HEp-2 en cultivo de 3 horas.
Los círculos indican colonias de bacterias.**

ENSAYO DE INHIBICION DE LA ADHERENCIA DE EPEC A CELULAS HEp-2 POR IgG ANTI PME-94 kDa

Este ensayo se realizó esencialmente igual que los ensayos de inhibición de la adherencia ya descrito y solo se hicieron las modificaciones que se describen a continuación:

Las cepas EPEC en las que se debería determinar el efecto inhibitorio del suero con inmunoglobulinas contra la intimina se incubaron a 37°C por 18 horas en caldo de triptona al 1%. De este caldo de cultivo se tomaron 50 µL y se agregaron a 950 µL de DMEM en el que el suero inmune descomplementado previamente por incubación a 56°C durante 30 minutos ya se había agregado para obtener diluciones finales de 1:50,1:100,1:500,1:1000 y 1:2000. El efecto del suero preinmune se determinó en un ensayo similar en paralelo.

Se usaron como control positivo la cepa *E. coli* 2348/69 silvestre y como control negativo una cepa *E. coli* 2348/69 mutante CVD 206 que no posee la capacidad de producir la intimina por lo que no es adherente, así como las cepas *E. coli* K-12, difusa y agregativa que tampoco son adherentes.

RESULTADOS

CULTIVOS DE CEPAS EPEC EN CALDO NUTRITIVO.

Las bacterias se cultivaron hasta la mitad de la fase logarítmica lo cual equivalió a un lapso de entre 5 y 6 horas de cultivo a partir del momento en que los matraces con el medio de cultivo fueron inoculados con la cepa correspondiente (Fig 1). Por cada litro de cultivo se obtuvo una masa bacteriana húmeda promedio de 1.7 g. Se cultivaron 10 litros de medio con cada una de las cepas empleadas en el estudio.

RENDIMIENTO DE MEMBRANA EXTERNA DE *Escherichia coli*

El procedimiento de lisis bacteriana mediante pase en prensa French tuvo una eficiencia de 97%, lo cual equivalió a que de 17.30 gramos de masa bacteriana húmeda solo 0.53 gramos representaron el desecho de bacterias no lisadas. El rendimiento de membrana externa obtenido con cada una de las cepas cultivadas y prensadas se ilustra en el cuadro 3 en donde se puede observar que el porcentaje proteico correspondiente a la membrana externa de cada cepa está comprendida entre el 11-18% del contenido proteico total del extracto bacteriano. Cuadro 3

Cuadro 3
Rendimiento de proteínas de membrana externa de cepas EPEC empleadas en este estudio

Cepa	Proteína total (mg)	Proteína de membrana externa (PME)	Sobrenadante
E-2348/69	2247.38 (100%)	188.73 (8.4%)	2058.66 (91.6%)
C-51	4197.56 (100%)	880.73 (20.98%)	3316.83 (79.02%)
E-380/69	3316.75 (100%)	614.77 (18.53%)	1995.75 (60.17%)
E851/71	3191.02 (100%)	484.54 (15.28%)	2121.50 (66.48%)
K-12	-	-	-

INMUNODETECCION DE LA INTIMINA DE MEMBRANA DE EPEC

Las proteínas de membrana externa de interés en las distintas cepas EPEC fueron identificadas mediante el uso de sIgA pura obtenida de calostro y leche transicional provenientes de madres que amamantaban a sus hijos. La técnica empleada fue cualitativa y hasta el momento es la única manera en que se ha podido identificar a estas proteínas ya que no existe un anticuerpo tipo IgG contra estas.

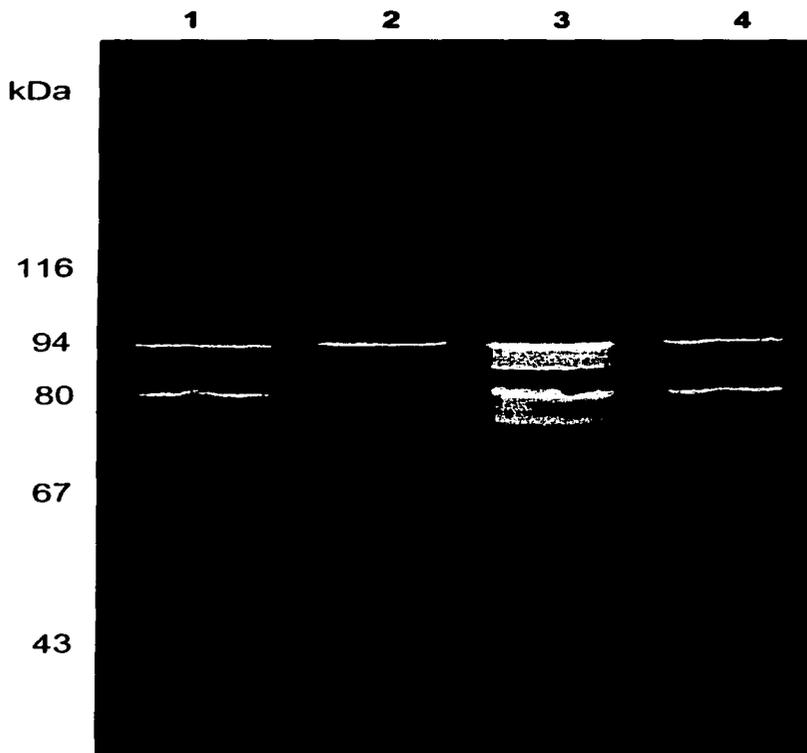
Mediante el uso de sIgA se identificaron 3 bandas polipeptídicas en las hojas de nitrocelulosa cuyos pesos moleculares relativos corresponden a 94, 80 y 68 kDa como puede verse en la figura 8.

La proteína de la banda con un peso molecular relativo (PMR) de 94 kDa corresponde a la proteína Intimina, mientras que las otras dos bandas corresponden a proteínas de membrana externa que también son reconocidas por la sIgA en un grado ligeramente menor que la intimina y no fueron estudiadas en este trabajo.

PURIFICACION DE LA INTIMINA MEDIANTE SOLUBILIZACION CON DODECIL SULFATO DE SODIO Y ELUCION POR CROMATOGRAFIA EN COLUMNA

Con el empleo de la técnica de cromatografía utilizada, se obtuvieron fracciones enriquecidas de la proteína de 94 kDa a partir de las muestras de membrana de la cepa E-2348/69, las cuales fueron recicladas en una columna de Sephacryl S200-HR nueva hasta que la proteína de interés pudo ser colectada en fracciones del eluato que la contenían en forma pura (Figs 9, 10 y 11). De la muestra inicial que contenía aproximadamente 50.0 mg de proteína de membrana externa total, se aislaron 0.670 mg de intimina, lo que representó el 1.34% de la proteína total eluida.

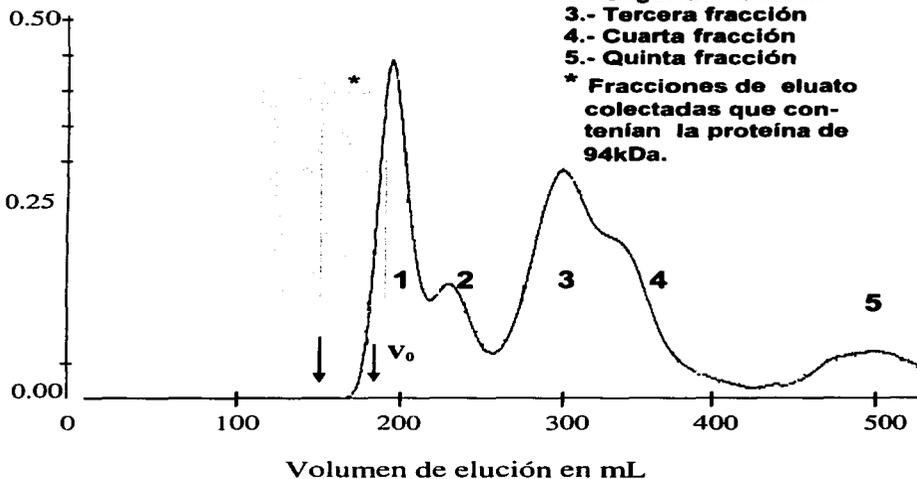
Figura 8



Inmunodetección de proteínas de membrana externa de cuatro cepas de EPEC con sigA de calostro humano. Carril 1: cepa E-2348/69, Carril 2: cepa E-380/69, Carril 3: cepa C-51, Carril 4: cepa E-851/71.

Figura 9

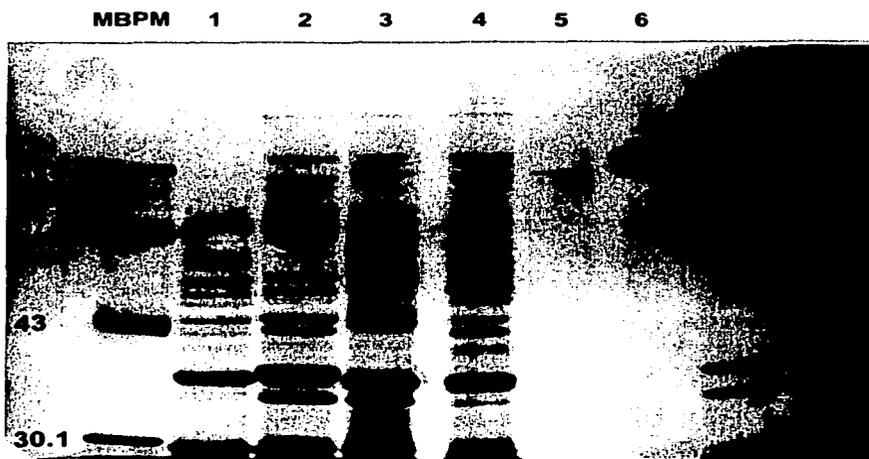
Densidad Óptica
a 280 nm



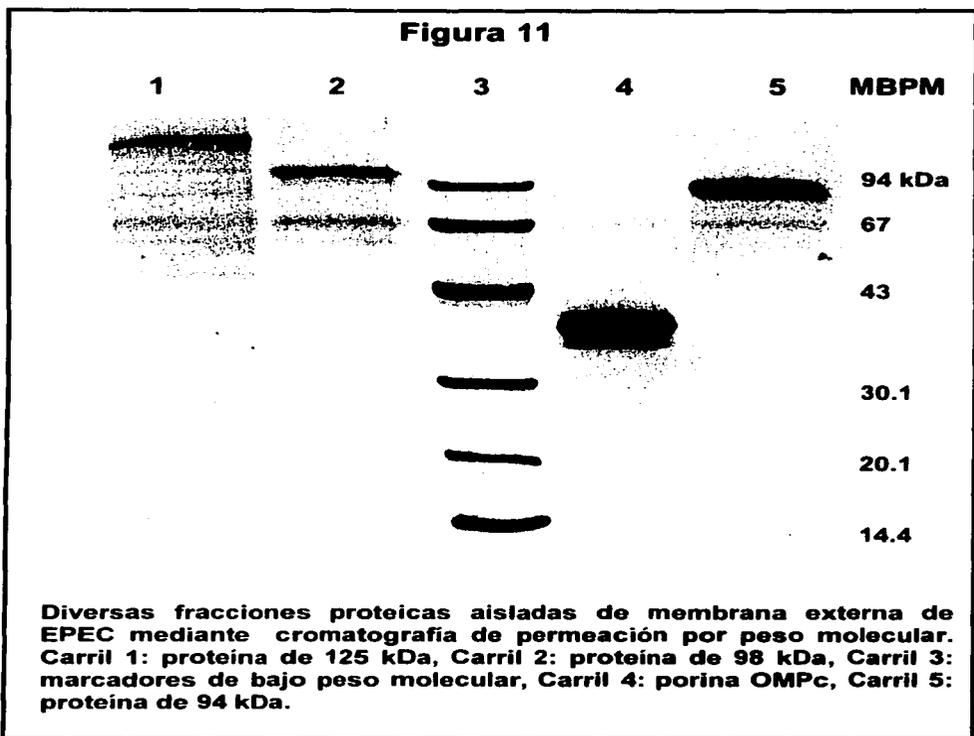
Perfíl de elución de proteínas de membrana externa de EPEC separadas por cromatografía de permeación en Sephacryl S-200HR. La íntima eluyó en el volumen muerto ($V_0= 176$ ml)

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 10



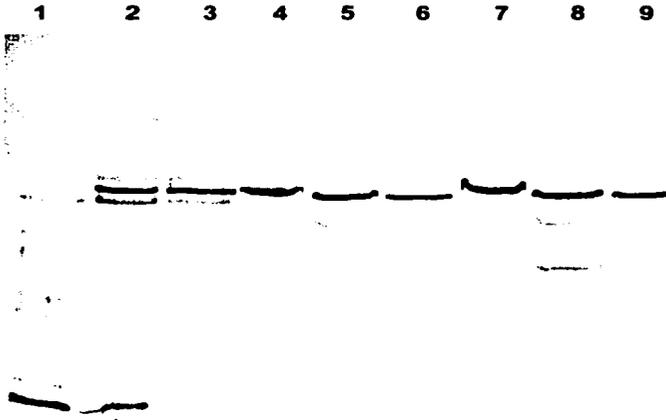
Intimina purificada de la cepa E-2348/69, después de tres eluciones consecutivas en columna de Sephacryl S200-HR. Carril 1: *E. coli* K12, Carril 2: *E. coli* 2348/69, Carril 3: *E. coli* E-380/69, Carril 4: *E. coli* C-51, Carril 5: fracción frontal de la elución de reciclado, Carril 6: fracción de la elución de reciclado con proteína de 94 kDa pura, Carril 7: control de porinas E-2348/69.



OBTENCION DE ANTICUERPOS ANTI-INTIMINA

Con el protocolo de inmunización empleado para la obtención de anticuerpos policlonales contra la intimina en conejos, se obtuvo suero inmune del que se precipitaron las IgGs anti-intimina. Cuando se utilizó este anticuerpo en pruebas de inmunodetección de la intimina, las IgGs reconocieron a esta proteína en extractos totales de membrana externa y en las fracciones del eluato enriquecidas con la proteína de 94 kDa (Fig 12).

Figura 12



Inmunodetección de la intimina de membrana externa de EPEC con el anticuerpo anti-intimina en diferentes muestras. Carril 1: *E. coli* K12, Carriles 2 y 4: *E. coli* E-2348/69, Carril 3: *E. coli* E-380/69 carril 7: *E. coli* C-51, Carriles 5 y 8: *E. coli* E-851/71, Carriles 6 y 9: intimina de *E. coli* E-2348/69 purificada por cromatografía.

ENSAYOS DE INHIBICION DE LA ADHERENCIA DE EPEC A CELULAS HEP-2 EN CULTIVO POR ANTICUERPOS ANTI-INTIMINA

Los anticuerpos IgG contra la intimina obtenidos en conejos tuvieron un efecto inhibitorio de la adherencia de las cepas EPEC a las células HEP-2 en cultivo incubadas durante 3 horas (Figura 13).

Figura 13



CONTROL



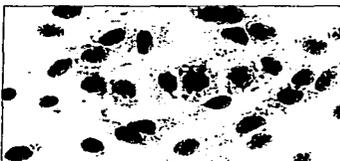
D 1 : 50



D 1 : 500



CONTROL



D 1 : 100

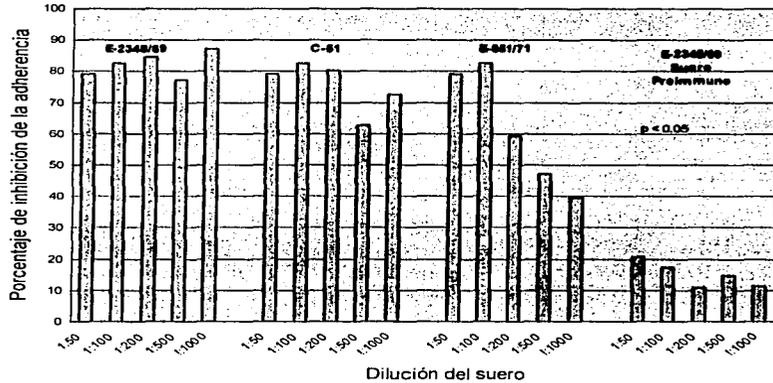


D 1 : 1000

Resultados de las pruebas de inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2 a 3 horas de cultivo empleando anticuerpo anti-intimina a las diluciones indicadas.

La proporción de células infectadas contra células no infectadas se calculó contando el número de células en 200 campos de la preparación a un aumento de 40X. En el cuadro 4 se resumen los resultados obtenidos con esta técnica. El suero preinmune tuvo un efecto visible sobre las células empleadas como control y en la adherencia de las distintas cepas de EPEC empleadas en las pruebas pero según el análisis de proporciones que se realizó no es estadísticamente significativo. (Fig 14).

Figura 14



Porcentajes de inhibición de la adherencia de tres cepas EPEC a células HEP-2 empleando anticuerpo anti-intimina

Se observó una inhibición de 78% de la adherencia de la cepa E-2348/69 al emplear el suero inmune a una dilución 1:50 comparada con una dilución similar del suero preimmune y la inhibición se mantuvo en 78% hasta diluciones 1:1000.

El porcentaje de inhibición que se obtuvo al probar el mismo suero en la cepa C51 y en la cepa E-851/71 fue 78% respectivamente.

La reacción de las proteínas de membrana externa de las distintas cepas empleadas en este estudio, así como la capacidad adherente de las mismas se resumen en el Cuadro 4.

Cuadro 4

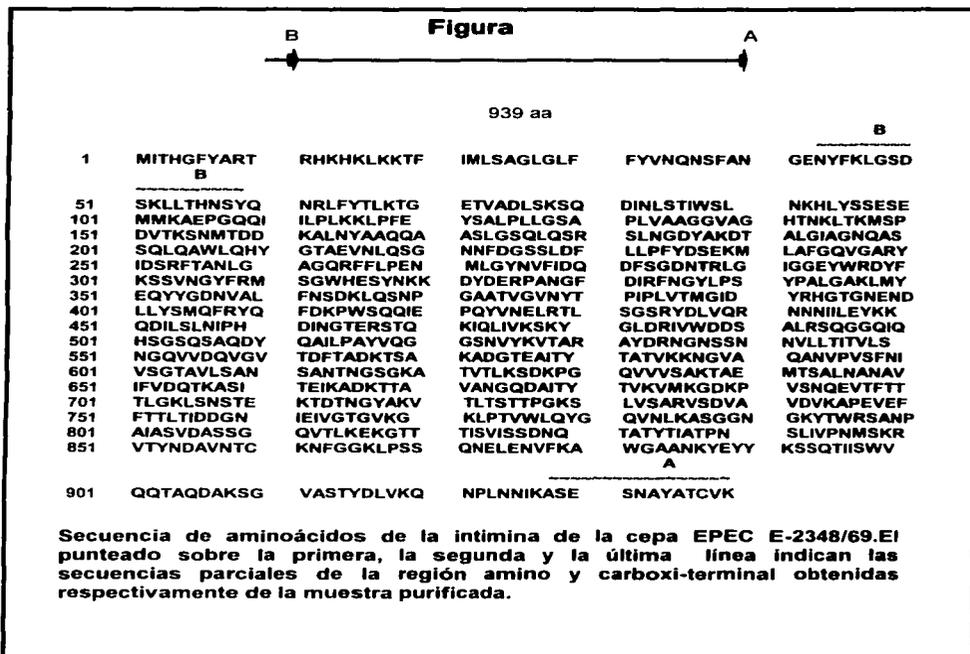
Reactividad de proteínas de membrana externa de EPEC a sigA de calostro humano / leche transicional y al anticuerpo anti-intimina, apareados con su capacidad adherente.

Cepa	Suero anti-p94kDa	sigA de calostro	Adherencia
E-2348/69	+	+	+
CVD 206eae-	-	-	-
CVD206 p(438)eae+	+	+	+
C-51	+	+	+
E-380/69	+	+	+
E-851/71	+	+	+
J933	+	+	+
K-12	-	-	-
Difusa	-	-	-
Agregativa	-	-	-

SECUENCIACION

Los datos de secuenciación de las muestras de proteínas enviadas para este fin se muestran en la figura 15. La primera secuencia obtenida correspondió 18 aminoácidos de la región amino-terminal y los otros 16 correspondieron a la región carboxilo terminal de la intimina según se comparó con la secuencia génica reportada por Jerse y Kaper (24).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



ISOELECTROENFOQUE

Mediante esta técnica se obtuvieron los resultados que se muestran. Con la tinción por coomassie (Figs 16,17 y 18) se detectaron 6 manchas que corresponden a los siguientes puntos isoeléctricos (pI): 6.01, 6.2, 6.24, 6.39, 6.8 y 7.37. Estas manchas tuvieron correspondencia con las que se identificaron en la inmunodetección realizada con slgA de calostro (Fig 19) y con el anticuerpo anti-intimina tipo IgG en conejos (Fig 20)

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

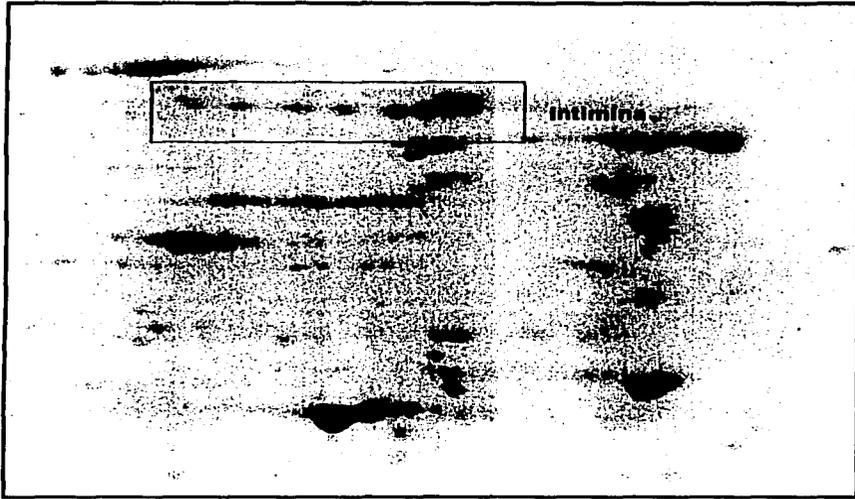
Figura 16



Perfil electroforético bidimensional de proteínas de membrana externa de EPEC resueltas en gradiente de pH de 3.5 a 9.5 según el método de O'Farrell.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 17



**Patrón de bandeo de proteínas de membrana externa de EPEC
resueltas por isoelectroenfoque con anfolina de intervalo de pH de 3.5 a
9.5**

TESIS CON
FOLLA DE ORIGEN

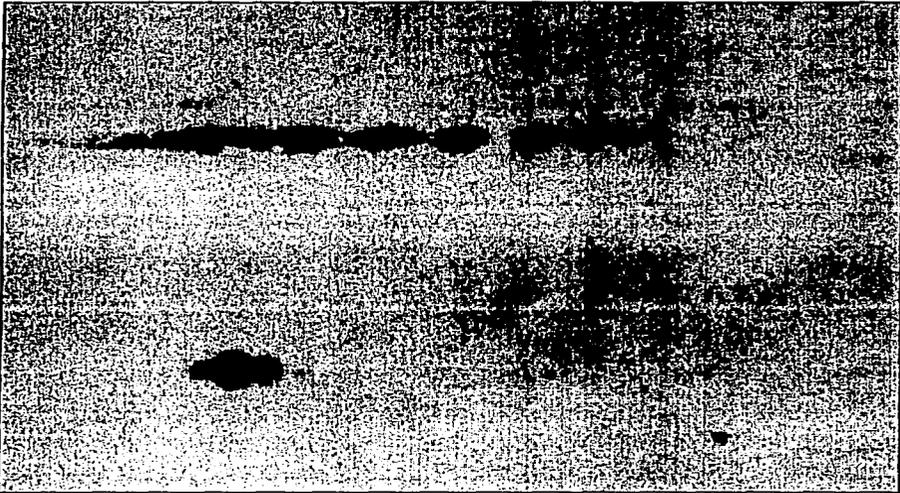
Figura 18



Ampliación de la región correspondiente a la íntima

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

Figura 19



Inmunodetección de la intimina de la cepa EPEC E-2348/69 con sigA de calostro, resuelta mediante isoelectroenfoque en gradiente de pH 5-8

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

Figura 20



Inmunodetección de la intimina con anticuerpo anti-intimina de EPEC cepa E-2348/69 resuelta por isoelectroenfoque en gradiente de pH 5-8.

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**

DISCUSION

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) representa a uno de los cinco grupos principales de microorganismos de esta especie, causantes de enfermedades gastrointestinales en niños menores de un año de edad principalmente en países en vías de desarrollo (7). Las cepas EPEC manifiestan sus propiedades de adherencia a los enterocitos de la mucosa intestinal mediante la producción de diversas moléculas de naturaleza proteica que interactúan en forma compleja y concertada. Este proceso termina con la producción de un daño estructural en los enterocitos que se conoce como lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) que da como resultado clínico la presencia de diarrea (7, 11, 14,16). Se ha identificado a una proteína de membrana externa de EPEC de 94 kDa, denominada intimina, como uno de los compuestos que desempeñan una función importante en el proceso de adherencia de EPEC y que determina una parte esencial del proceso de patogénesis en el que la bacteria se une a las microvellosidades del intestino delgado mostrando un patrón de adherencia localizada (17).

Mediante la utilización de técnicas de biología molecular en la década de 1980, se obtuvieron los conocimientos básicos sobre la intimina, como el hecho de que era codificada por el gen *eae* localizado en el plásmido de 60 Md denominado EAF así como su expresión durante la cual es producida como una pre-intimina con un peso molecular de 107 kDa que posteriormente es procesada por enzimas proteolíticas en el periplasma de EPEC para eliminar el péptido señal antes de que sea insertada en la membrana externa con un peso molecular de 94 kDa (46).

Trabajos previos habían determinado el posible papel de esta proteína en el proceso infeccioso de EPEC (45). Sin embargo, desde el principio la investigación en este campo ha tenido un sesgo notorio hacia la parte genómica, a través de técnicas de biología molecular y se ha prestado poca

atención a la parte proteica de estos factores mediante métodos clásicos de la bioquímica, ya sea porque ello implicaba una estrategia larga y tediosa y un posible resultado pobre debido a la falta de metodología accesible y rápida. El paradigma de los postulados moleculares de Koch planteado por Falkow ha imperado en estos últimos 30 años dando a la biología molecular el papel principal para obtener respuestas a la mayoría de los problemas planteados en este campo, dejando a los métodos bioquímicos en un segundo lugar a pesar de ser la confirmación esencial que requiere cualquier aspecto de patogenicidad bacteriana.

La evidencia experimental ha demostrado que la intimina tiene un papel importante durante el establecimiento de la infección en el intestino delgado. Al principio de la infección, la bacteria establece el contacto primario con la célula epitelial mediante la utilización de haces de fimbrias denominadas BFP que forman una especie de red dentro de la cual se agregan las bacterias en una manera que les permite distribuirse en colonias localizadas sobre la célula huésped, a esta fase le sigue un proceso de acercamiento estrecho de la bacteria con la célula blanco en el cual la intimina es esencial ya que el contacto se establece a través de ella con su receptor (Tir por Translocated intimin receptor) insertado en la membrana de la célula huésped durante la fase previa a través de un conjunto de reacciones en las que están involucradas un grupo de proteínas del sistema de secreción tipo III que EPEC utiliza en su proceso de colonización del intestino (68). La interacción de la intimina con su receptor en la membrana eucariótica da inicio a un conjunto de reacciones que provocan la acreción de la actina y el reclutamiento de otras proteínas del citoesqueleto en el sitio de adherencia de la bacteria lo que origina la lesión característica de adherencia y esfacelamiento A/E (68).

Teniendo en cuenta que la intimina es un elemento primordial para la interacción de las cepas EPEC con las células intestinales del huésped, el estudio de los aspectos de interacción de los componentes de este sistema es algo fundamental. Para tal propósito se ha considerado necesario tener en

forma purificada la Intimina y su receptor Tir, para aclarar aspectos de la naturaleza del fenómeno de adherencia.

Desde 1979 en que se tuvieron las primeras evidencias de que las cepas EPEC utilizaban factores distintos a las fimbrias para su adherencia a la célula huésped, ningún grupo de investigación se había interesado en la purificación de la Intimina por métodos bioquímicos como una estrategia alterna al trabajo de biología molecular.

En el presente trabajo se reporta la purificación de la intimina utilizando un protocolo basado fundamentalmente en trabajos clásicos previos (64-65). Los ensayos para determinar el método de extracción de membrana externa se basaron en las técnicas utilizadas por varios autores en cuyos trabajos está demostrado que la membrana externa se puede obtener en un grado de pureza y cantidad suficiente utilizando Tritón X-100 a concentraciones de entre 0.3 a 1.5%, o Sarcosinato de sodio al 1.67%, ya que solubilizan preferencialmente a la membrana citoplasmática dejando intacta a la membrana externa en solución que puede entonces separarse por centrifugación a 40 000 G. La principal razón de usar esta metodología es que resulta muy económica y fácil en comparación con otros detergentes como el Octyl-glucósido o el Chaps que son costosos y poseen una eficiencia mucho menor (resultados no mostrados).

En este proyecto se consideró la naturaleza de las diversas soluciones utilizadas en la solubilización de proteínas de membrana y en el proceso de análisis de estas mismas proteínas utilizando electroforesis desnaturante y reductora reportadas en la literatura como el método de Laemmli y Lugtenberg (53-64). Aunque esas mezclas de solubilización fueron concebidas para ser usadas exclusivamente en la preparación de muestras para electroforesis; su utilización como amortiguadores de elución durante la cromatografía de las muestras de membrana externa durante el desarrollo de este trabajo demostró su utilidad en un proceso esencialmente distinto, sobre todo en el aspecto relacionado con el monitoreo del contenido de proteína en el

eluato a 280 nanómetros aún con la absorbancia residual provocada por el SDS presente en la mezcla de elución.

Durante la fase de solubilización de la muestra de membrana externa, al eliminar la fracción correspondiente a la membrana interna, se desechan la mayoría de proteínas, particularmente las que poseen pesos moleculares mayores de 100 kDa, lo que permite obtener una fracción que consiste de alrededor de 90% de proteínas mayoritarias entre las cuales se encuentran principalmente las porinas. El 10 % restante consiste de proteínas comúnmente denominadas minoritarias debido a su baja concentración en la membrana externa entre las que se encuentran la intimina y otras proteínas captadoras de iones como hierro y otros nutrientes esenciales. Estos datos permiten estimar que con el método utilizado se pudo separar toda la intimina presente en las muestras de membrana lo cual representaría el 1.34 % del contenido de la muestra de proteína total eluida en cada corrida (0.67 mg de intimina por cada 50 mg de proteína de membrana total). La optimización de este procedimiento de extracción permitirá un mejor rendimiento en el procedimiento de purificación con lo cual será posible la obtención de la intimina, de manera cuantitativa fácil y económica lo que permitirá realizar experimentos adicionales tanto *in vitro* como *in vivo* en estudios de fenómenos como la interacción de la intimina con otros posibles receptores y tener estimaciones cualitativas de lo que ocurre con este tipo de interacción e indagar otros aspectos aun desconocidos en los que la intimina está involucrada.

La secuencia parcial obtenida por maldi-tof en una muestra de 100 picogramos de intimina concordó con la secuencia del gen *eae* determinada por Jerse y Kaper en 1991 para la intimina alfa (24). Estas secuencias parciales no permiten identificar otras características de esta proteína, en especial los diversos tipos de intimina existentes, sin embargo, para el objetivo de este trabajo este ensayo permitió determinar la homología de la proteína obtenida con la intimina.

En 1991 Jerse y Kaper (24) demostraron una asociación entre el gen *eae* y su producto: la intimina. Estos autores al tomar en cuenta la naturaleza de los diversos residuos de aminoácidos de la estructura primaria de la proteína concluyeron que esta era una proteína básica con un valor de punto isoelectrónico (pI) de 9.5. Sin embargo, el punto isoelectrónico estimado según el método de O'Farrell para la proteína aislada en el presente trabajo fue resuelta en seis manchas con valores de 6.01, 6.2, 6.24, 6.39, 6.8 y 7.3 respectivamente, con un promedio de 6.5, un valor de pI que la ubica tres unidades de pH por debajo del valor predicho. Las razones de esta discrepancia probablemente se deben a que la predicción publicada por estos autores se basó en un análisis teórico de los datos de secuencia del gen *eae* y no de información derivada de un análisis por isoelectroenfoque de las proteínas de membrana externa como en el caso de este trabajo en el que la intimina fue resuelta en seis fracciones definidas en gel teñido con azul brillante de coomassie (Fig 17). Estas fracciones fueron identificadas por inmunodetección con sIgA de calostro (Fig 19) y con el anticuerpo tipo IgG anti-intimina (Fig 20) obtenido en conejos.

No está clara la razón por la cual la intimina es resuelta en las manchas que se observan en el isoelectroenfoque. La tinción con el reactivo de Schiff da un resultado negativo lo cual indica que no es una proteína glicosilada (resultados no mostrados) y por ello no existe un componente glicosídico modificable que explique el comportamiento observado. Así mismo, hasta la fecha no se dispone de evidencia experimental que indique que la intimina sufra modificaciones de fosforilación durante su existencia en la bacteria por lo que este argumento carece de bases sólidas para explicar este punto. Por otro lado, durante el procesamiento de la pre-intimina en el cual se elimina el péptido señal se deben producir al menos dos fragmentos: el que corresponde a la intimina propiamente dicha y otro que corresponde al péptido señal con un peso aproximado de 13 kDa. Sin embargo todas las manchas observadas

indican que estas corresponden a componentes de 94 kDa y no a uno de peso molecular menor.

El análisis de la secuencia del gen de todas las intiminas reportadas hasta la fecha indica que existe una gran variabilidad en la región comprendida desde el extremo carboxilo hasta el residuo 280 de cada una de estas; no obstante, cada intimina es expresada como molécula única en su tipo por cada grupo bacteriano que la produce y no como una mezcla en la que estén representados los demás tipos de intimina como para que esta heterogeneidad pudiese ser la explicación del resultado obtenido en este trabajo. Está bien establecido que la cepa EPEC E-2348/69 solo produce la intimina alfa estudiada en este trabajo pero no hay evidencia experimental de que esta proteína sea producida en más isoformas por la misma bacteria. Si este fuera el caso; podría argumentarse que la presencia de varias manchas se deben a microheterogeneidad en la intimina, pero con la información obtenida no puede afirmarse algo concluyente. Es posible que durante el procesamiento de las muestras de proteína para realizar la separación por isoelectroenfoque hayan ocurrido modificaciones de carácter químico como carbamilación y esto haya ocasionado la aparición de manchas con diferentes pI pero con el mismo peso molecular. Una explicación extraña, pero plausible, es que aunque la cepa E-2348/69 está pura, existen variantes que se desarrollan y crecen durante el tiempo de incubación y cada una de ellas produce un tipo particular de la intimina alfa y que corresponden a las que se observan en el bandeado del IEF. Hay que hacer notar que para eliminar esta posibilidad, se realizaron isoelectroenfoces con muestras de membrana externa recientemente extraídas de cultivos bacterianos y de intimina pura recién eluida de la columna de cromatografía usada para la purificación y los resultados fueron similares a los que se muestran en las figuras 17,18,19 y 20.

La otra posibilidad es que la cepa E-2348/69 expresa en realidad varias isoformas de intimina como se puede observar en los perfiles bidimensionales mostrados. Si esta posibilidad es la más probable; la razón de

la existencia de varias isoformas de esta proteína en un microorganismo que establece una relación básicamente de contacto con su huésped, tendría ciertas ventajas ya que poseer un conjunto de proteínas con el mismo peso molecular, pero con diferentes puntos isoeléctricos, haría posible que esta proteína se presentara en varias especies con distinta carga neta lo cual permitiría a la bacteria que las produce, reconocer al ligando principal, o a una variante de este, con una pequeña diferencia de carga, brindándole una mayor probabilidad de encontrar más zonas de contacto sobre la célula huésped y, con ello, una mayor posibilidad de adherencia. Si se toma en cuenta que en la superficie extracelular de la membrana plasmática de la célula huésped se encuentra un gran número de glicoproteínas con diversas funciones, en la que existen varias combinaciones de residuos de carbohidratos que confieren mayor variabilidad a la carga eléctrica de estos compuestos; tendría sentido la existencia de una variación en una molécula tan importante en EPEC. Phillips y Frankel (67) han propuesto que las distintas clases de intimina poseen cierta especificidad para algunos tipos de células en el intestino, los resultados del presente estudio apoyarían esta hipótesis, por lo que deberá ampliarse el estudio en esta área.

Un aspecto más abordado en este trabajo, se refiere a la obtención de anticuerpos contra intimina purificada y su utilización en ensayos de inhibición de la adherencia de EPEC a células HEp-2 en cultivo. Los anticuerpos policlonales obtenidos contra esta proteína purificada se usaron para identificar la intimina en extractos de membrana externa obtenidos de las distintas cepas EPEC y no EPEC empleadas en este estudio. El reconocimiento encontrado fue específico y con la identificación de una banda única que correspondió a la Intimina. Esto fue corroborado tanto al determinar el peso molecular relativo de dicha banda comparándola con marcadores de peso molecular comerciales, como por confirmación de esta banda con sIgA purificada de calostro. Los resultados obtenidos en cada grupo de pruebas coincidieron con los patrones de bandeo lo cual indicó que tanto la sIgA como

la IgG policlonal anti-intimina obtenida en conejos, reconocieron la misma proteína.

Los resultados de inhibición de la adherencia indican que el anticuerpo obtenido contra la intimina purificada tuvo un efecto inhibitorio que alcanzó el 87% de eficiencia para las dos primeras diluciones del suero (1:50,1:100), disminuyendo un 22% en las dos siguientes diluciones con un descenso de aproximadamente 50% en el caso de la dilución final (1:2000) empleada en el ensayo. Estos resultados ponen en claro que los anticuerpos fueron altamente específicos. Los resultados del presente estudio apoyan los de Sherman *et al.* (1991) quienes utilizando anticuerpos generados contra proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* enterohemorrágica O157:H7 (EHEC) entre las que se encontraba la intimina; lograron obtener una inhibición de 17% de la capacidad adherente de esa cepa bacteriana a células HEp-2 en cultivo. La cantidad de proteína obtenida en ese trabajo fue muy pequeña, limitada por la técnica de electroelución utilizada que solo permitió una recuperación escasa de la intimina y posiblemente ello sea la causa de la baja producción de anticuerpos y de la baja tasa de inhibición de la adherencia (61). Aunque la bacteria usada en ese estudio no pertenece al grupo EPEC, la intimina que produce, comparte muchas propiedades con la intimina alfa que se purificó y es reconocida por los anticuerpos obtenidos en este estudio siendo esta la razón por la que los resultados de ese trabajo se emplearon para establecer un contraste respecto al valor funcional de los anticuerpos anti-intimina producidos en este trabajo.

Por otro lado, los anticuerpos anti-intimina no reconocieron a otras proteínas de membrana y en las inmunodetecciones con estos, no se observó tinción de los BFP en la región correspondiente a pesos moleculares de entre 15.5 a 18.5 kDa lo que es una indicación de que en las pruebas de inhibición de la adherencia realizadas, el efecto inhibitorio se debió a un reconocimiento de la intimina en la membrana de la bacteria y no a esos componentes

involucrados en la formación de colonias localizadas durante la infección por EPEC.

Batchelor et al. (1999) obtuvieron un anticuerpo universal anti-Intimina empleando para esto a una proteína híbrida formada por la unión de un fragmento de la proteína unidora de maltosa y el fragmento que corresponde a 280 aminoácidos de la región carboxilo de la intimina de la cepa E-2348/69. Con ese anticuerpo, dichos autores identificaron intiminas de diferentes clones de EPEC, sin embargo no informaron si estos anticuerpos afectaban la capacidad adherente de EPEC a células en cultivo (62).

Hasta la fecha, las pruebas de inhibición de la adherencia de EPEC que se han realizado con el fin de analizar la capacidad inhibitoria de anticuerpos en el proceso infeccioso de EPEC son el trabajo de Sherman *et al.* (61) ya mencionado, Chart *et al.* (63), Cravioto *et al.* (48) y el de Gansheroff *et al.* (66) El trabajo presentado es el primero en el que se ha intentado la purificación de la intimina de EPEC con éxito utilizando una metodología tradicional de cromatografía de baja presión. La existencia de variantes de carga eléctrica de la intimina hace posible el estudio de la interacción huésped parásito utilizando un modelo más sencillo en el que los carbohidratos de la superficie de la membrana plasmática quizá juegan el verdadero papel en este tipo de interacción tanto por su presencia generalizada en la membrana plasmática como por la gran variabilidad en sus estructuras y les confiere un papel importante como moléculas de comunicación, señalización e interacción celular.

CONCLUSIONES

- 1. Se diseñó un protocolo de purificación de la intimina utilizando la técnica de cromatografía de filtración con el cual fue posible obtener esta proteína en forma pura.**
- 2. La secuenciación de la proteína aislada indicó que esta corresponde a la intimina ya que las secuencias parciales obtenidas de las muestras de elución coinciden exactamente con las que se han reportado en la literatura.**
- 3.- Según los resultados aquí presentados, la intimina esta constituida por al menos 6 isoformas con valores de pI comprendidos de 6.01 a 7.3.**
- 4. Los anticuerpos policlonales anti-intimina inhiben la adherencia de EPEC a las células HEp-2 utilizadas como modelo experimental.**

BIBLIOGRAFIA

1. Beachey EH. 1981. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J. Infect. Dis.* 143(3):325-345.
2. Ofek I, Beachey EH. 1980. General concepts and principles of bacterial adherence in animals and man. In: *Bacterial adherence*. E.H. Beachey (ed). Chapman & Hall publish; London. p 3-29.
3. Sharon N, Eshdat E, Silverblatt FJ, Ofek I. 1981. Bacterial adherence to cell surface sugars. In: *Adhesion and microorganism pathogenicity*. Pittman medical, Tunbridge Wells. (Ciba Foundations Symposium 80) p 119-141.
4. Costerton JW, Irvin RT, Cheng KJ. 1981. The bacterial glicocalix in nature and disease. *Ann. Rev. Microbiol.* 35:299-324.
5. Baldini MM, Kaper JB, Levine MM, Candy DCA, Moon HW. 1983. Plasmid mediated adhesion in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Pediatric Bacteriol Nutr.* 2:534-538.
6. Duguid JP, Smith IW, Dempster G, Edmund PM. 1955. Non-flagelar filamentous appendages ("fimbriae") and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J Pathol Bacteriol* 70:335-358.
- 6a. Guyot G. 1908. Über die bakterielle Hämagglutination. *Zentralbl. Bacteriol.* (1 Abt) 47:640-653.

- 7.- Levine MM. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, entero-hemorrhagic and enteroadherent. J Infect Dis. 155:377-389.
- 8.- Thorns CJ, Morris JA. 1985. *In vitro* techniques for the attachment of *Escherichia coli* to epithelial cells. In: The virulence of *Escherichia coli*. M. Sussman (ed). Academic Press, N Y: p. 333-338.
- 9.- Cravioto A, Lince JM, Carrillo J, Cancino G. 1986. Pathogenic ability of *Escherichia coli* strains and diarrheal disease in a cohort of rural infants. (abstract N° 47). In: Program and Abstracts of the 26th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemoterapy. Washington DC. American Society for Microbiology.
- 10.- Sussman M. 1985. *Escherichia coli*, in humans and animal disease. In: The virulence of *Escherichia coli*. M. Sussman (ed). Academic Press, N. Y. p. 7-45.
- 11.- Robins-Browne RM. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. Rev. Infect. Dis. 9:28-53.
- 12.- Varela G, Aguirre A, Carrillo J. 1946. *Escherichia coli* "Gómez" nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. Bol Med. Hosp. Infant. Mex. 3:623-627.
- 13.- Gómez TAT, Vieira MAM, Wachsmuth IK, Blake PA, Trabulsi LR. 1989. Serotype-specific prevalence of *Escherichia coli* strains with EPEC adherence factor genes infants with and without diarrhea in Sao Paulo, Brasil. J. Infect. Dis. 160:131-135

- 14.- Scaletsky ICA, Silva MLM, Toledo MRF, Davis BR, Blake PA, Trabulsi LR. 1985. Correlation between adherence to HeLa cells and serogroups, serotypes, and bioserotypes of *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 49: 528-532.
- 15.- Kumate J, Isibasi A. 1986. Pediatric diarrhea disease: a global perspective. *Pediatr. Infect. Dis.* 5: S21-S28.
- 16.- Sonnenberg MS, Kaper JB. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 60:3953-3961.
- 17.- Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol.* 3:95-99.
- 18.- Girón JA, Ho A.S.Y, Schoolnik GK. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 254:710-713.
- 19.- Girón JA, Ho A.S.Y, Schoolnik GK. 1993. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 175:7391-7403
- 20.- Sonnenberg MS, Calderwood SB, Donohue-Rolfe A, Keusch GT, Kaper JB. 1990. Construction and analysis of *TnphoA* mutants of Enteropathogenic *Escherichia coli* unable to invade HEP-2 cells. *Infect Immun.* 58(6):1565-1571.
- 21.- Giron JA, Sonnenberg MS, Martin WC, Jarvis KG, Kaper JB. 1993. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 168:1037-1041.

- 22.- Sohel I, Puente JL, Murray WJ, Vuopio-Varkila J, Schoolink GK. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pilin gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Mol. Microbiol.* 7(4):563-575.
- 23.- Gómez-Duarte OG, Kaper JB. 1995. A plasmid encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 63(5): 1767-1776.
- 24.- Jerse AE, Kaper JB. 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-Kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect Immun.* 59(12):4302-4309.
- 25.- Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G. 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* 17(8):2166-2176.
- 26.- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky G, Abe A, Finlay BB, McNamara BP, Fantry GT, James SP, Nataro JP, Levine MM, Donnenberg MS. 2000. Role of EspB in Experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* 68(6):3689-3695.
- 27.- Tacket CO, Sztein MB, Losonsky G, Abe A, Finlay BB, McNamara BP, Fantry GT, James SP, Nataro JP, Levine MM, Donnenberg MS. 2000. Role of EspB in Experimental human enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* 68(6):3689-3695.

- 28.- Daniell SJ, Delahay RM, Shaw RK, Hartland EL, Pallen MJ, Booy F, Ebel F, Knutton S, Frankel G. 2001. Coiled-coil domain of enteropathogenic *Escherichia coli* type III secreted protein EspD is involved in EspA filament-mediated cell attachment and hemolysis. *Infect. Immun.* 69(6):4055-4064.
- 29.- Baldwin TJ, Ward W, Aitken A, Knutton S, Williams PH. 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 59:1599-1604.
- 30.- Kenny B, Finlay BB. 1997. Intimin-dependent binding of Enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. *Infect. Immun.* 65(7):2528-2536.
- 31.- Manjarrez-Hernández HA, Amess B, Sellers L, Baldwin TJ, Knutton S, Williams PH, Aitken A. 1991. Purification of a 20 kDa phosphoprotein from epithelial cells and identification as a myosin light chain. Phosphorylation induced by enteropathogenic *Escherichia coli* and phorbol ester. *FEBS Lett.* 292:121-127.
- 32.- Crane JK, Oh JS. 1997. Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 65(8):3277-3285.
- 33.- Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD, Finlay BB. 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J.* 15(11):2613-2624.

- 34.- Gauthier A, de Grado M, Finlay BB. 2000. Mechanical fractionation reveals structural requirements for enteropathogenic *Escherichia coli* Tir insertion into host membranes. *Infect. Immun.* 68(7):4344-4348.
- 35.- Agace WW, Patarroyo M, Svensson M, Carlemalm E, Svanborg C. 1995. *Escherichia coli* induces transuroepithelial neutrophil migration by an intercellular adhesion molecule-1-dependent mechanism. *Infect. Immun.* 63(10):4054-4062.
- 36.- Cantey JR, Moseley SL. 1991. HeLa cell adherence, actin aggregation and invasion by nonenteropathogenic *Escherichia coli* possessing the *eae* gene. *Infect. Immun.* 59(11):3924-3929.
- 37.- Savkovic SD, Koustoris A, Hecht G. 1996. Attachment of a noninvasive enteric pathogen. Enteropathogenic *Escherichia coli*, to cultured human intestinal epithelial monolayers induces transmigration of neutrophils. *Infect. Immun.* 64:4480-4487
- 38.- Savkovic SD, Koustoris A, Hecht G. 1997. Activation of NF- κ B in intestinal epithelial cells by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC). *Am. J. Physiol.* 273:C1160-C11167
- 39.- Jerse AE, Gicquelais KG, Kaper JB. 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 59(11):3869-3875.
- 40.- Donnenberg MS, Yu J, Kaper JB. 1993. A second chromosomal gene necessary for Intimate Attachment of Enteropathogenic *Escherichia coli* to epithelial cells. *J. Bacteriol.* 175(15):4670-4680.

- 41.- Lee VT, Anderson DM, Schneewind O. 1998. Targeting of Yersinia Yop proteins into the cytosol of HeLa cells: one-step translocation of Yop-E across bacterial and eucaryotic membranes is dependent on SycE chaperone. *Mol. Microbiol.* 28(3):593-601.
- 42.- Whittman TS, Wolfe ML, Wachsmuth IK, Orskov F, Orskov I, Wilson RA. 1993. Clonal relationships among *Escherichia coli* strains that cause haemorrhagic colitis and infantile diarrhea. *Infect Immun.* 61:1619-1629.
- 43.- McGraw EA, Li J, Selander RK, Whittam TS. 1999. Molecular evolution and mosaic structure of α , β , and δ Intimins of pathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* 16(1):12-22.
- 44.- Goosney DL, DeVinney R, Pfuetzner RA, Frey EA, Strynadka NC, Finlay B. 2000. Enteropathogenic *Escherichia coli* translocated intimin receptor, Tir, interacts directly with α -actinin. *Curr. Biol.* 10:735-738.
- 45.- Levine MM, Rennels MB, Daya V, Hughes TP. 1980. Hemmagglutination and colonization factors in enterotoxigenic and enteropathogenic *Escherichia coli* that cause diarrhea. *J Infect Dis.* 141:733-737.
- 46.- Levine MM, Nataro JP, Karch H, Baldini MM, Kaper JB, Black RE, Clements ML, O'Brien AD. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid encoding an enteroadhesiveness factor. *J. Infect. Dis.* 152:550-559.
- 47.- Cravioto A, Tello A, Navarro A, Ruiz J, Villafán H, Uribe F, Eslava C. 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet.* 337:262-264.

- 48.- Cravioto A, Tello A, Villafán H, Ruiz J, del Vedovo S, Neeser JR. 1991. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis.* 163:1247-1255.
- 49.- Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl. Acad. Sci USA* 87:7839-7843.
- 50.- Rosenshine I, Ruschkowski S, Stein M, Reinscheid DJ, Mills SD, Finlay BB. 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signals to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO J.* 15(11):2613-2624.
- 51.- Frankel G, Lider O, HersHKoviz R, Mould AP, Kachalsky SG, Candy DCA, Cahalon L, Humphries MJ, Dougan G. 1996. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to β 1 integrins. *J. Biolog. Chemist.* 271(34):20359-20364.
- 52.- Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J. Biol. Chem* 193:265-275.
- 53.- Laemli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 227:680-685.
- 54.- Achtman M, Mercer A, Kusecek B, Pohl A, Heuzenroeder M, Aaronson W, Sutton A, Silver RP. 1983. Six widespread bacterial clones among *Escherichia coli* K1 isolates. *Infect Immun* 39(1):315-335.

- 55.- Heide K. and Schwick H.G. 1978. Salt fractionation of immunoglobulins. In Handbook of experimental Immunology. Volume I Immunochemistry. Third edition, 7.1-7.11
- 56.- O'Farrell PH. 1975. High resolution two dimensional electrophoresis of proteins. J Biol Chem. 250:4007-4021.
- 57.- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrilamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. 76(9):4350-4354.
- 58.- Scheidtmann K.H., Reinartz S, Schlebusch H. 1997. Immunological detection of proteins of known sequence. In Protein structure. A practical approach. Second edition 59-88.
- 59.- Edman P, Begg G. 1967. A protein sequenator. Eur. J. Biochem. 1:80-91.
- 60.- Comunicación personal
- 61.- Sherman P, Cockerill III F, Soni R, Brunton J. 1991. Outer membranes are competitive inhibitors of *Escherichia coli* O157:H7 adherence to epithelial cells. Infect Immun 59(3):890-899.
- 62.- Batchelor M, Knutton S, Caprioli A, Huter V, Zaniak M, Dougan G, Frankel G. 1999. Development of a universal Intimin antiserum and PCR primers. J Clin Microbiol 37(12):3822-3827.

- 63.- Chart H, Scotland SM, Willshaw GA, Rowe B. 1988. HEp-2 adhesion and the expression of a 94 kDa outer-membrane protein by strains of *Escherichia coli* belonging to enteropathogenic serogroups. *J Gen Microbiol* 134:1315-1321.
- 64.- Lugtenberg B, Meijers J, Peters R, Hoek P van, Alphen L. 1975. Electrophoretic resolution of the "Major outer membrane protein" of *Escherichia coli* K12 into four bands. *FEBS Letters* 58(1):254-258.
- 65.- Hindennach I, Henning U. 1975. The Major Proteins of the *Escherichia coli* outer cell envelope membrane. *Eur J. Biochem* 59:207-213.
- 66.- Gansheroff LJ, Wachtel MR, O'Brien AD. 1999. Decreased adherence of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* to HEp-2 cells in the presence of antibodies that recognize the C-terminal region of Intimin. *Infect Immun* 67(12):6409-6417.
- 67.- Phillips A D, Frankel G. 2001. Intimin-mediated tissue specificity in enteropathogenic *Escherichia coli* interaction with human organ cultures. *J. Infect. Dis.* 181: 1496-1500.
- 68.- Clarke SC, Haigh RD, Freestone PPE, Williams PH. 2003. Virulence of Enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev* 16(3):365-378.