



# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

EL HIERRO, FACTOR REGULADOR DE LA EXPRESIÓN DE PROTEÍNAS EN *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA.

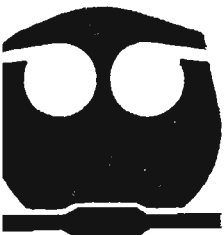
T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA

P R E S E N T A :

LAURA GUADALUPE VALDEZ PÉREZ



MEXICO, D. F.

2005.



EXAMENES PROFESIONALES FACULTAD DE QUÍMICA

m. 346877



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.

**Jurado asignado :**

**Presidente** Prof. MA. DEL CARMEN CORTES DECUIR

**Vocal** Prof. MA. DEL PILAR GRANADA MACIAS

**Secretario** Prof. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS

**1er. Suplente** Prof. EDUARDO BONILLA ESPINOSA

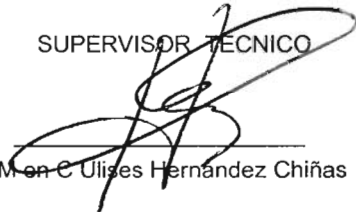
**2do. Suplente** Prof. LUCIANO HERNANDEZ GOMEZ

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina UNAM.

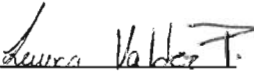
ASESOR DEL TEMA

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Carlos A. Eslava Campos

SUPERVISOR TÉCNICO

  
\_\_\_\_\_  
Mon C. Ulises Hernández Chiñas

SUSTENTANTE

  
\_\_\_\_\_  
Laura G. Valdez Pérez

## AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Carlos A. Eslava Campos por su asesoramiento en la realización de este trabajo. Por ser un buen maestro, de quién adquirí conocimientos que contribuyeron en gran medida a mi formación profesional. Así como por transmitirme su entusiasmo, paciencia y confianza en la investigación.

Al M. en C. Ulises Hernandez Chiñas por su apoyo y confianza en mi trabajo y quién formó parte activa en la realización de esta tesis.

Al Dr. Jorge M. Villaseca, Dra. Sandra Gavilanes y Dr. Angel Manjarrez del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina ,UNAM, quienes con sus conocimientos y experiencia contribuyeron en algún momento en realización de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández del departamento de Bioquímica de la Facultad de medicina, UNAM, por su ayuda en la secuenciación de proteínas.

A las profesoras Ma. Del Carmen Cortés Decuir y Ma. Del Pilar Granada Macias por sus observaciones y sugerencias en la revisión de este trabajo.

## DEDICATORIAS

A mis padres por su apoyo, comprensión y confianza. Por haberme dado las herramientas necesarias para hacer realidad mis sueños y cumplir satisfactoriamente mis metas.

A mis hermanos Rosalba, Karina y Héctor por su cariño y comprensión a lo largo de este camino, que ahora es sólo el comienzo de mi vida profesional.

A Dios por acompañarme a lo largo de mi vida y por permitirme ver realizado este sueño que ha sido producto de mucho trabajo.

A mi gran amiga Fabiola por confiar en mí y echarme porras siempre.

Principalmente lo dedico a mí, porque es el producto de mi constancia, esfuerzo y trabajo. Por que es la realización de una de mis grandes metas y sobre todo porque es ahora cuando empiezo a soñar..

## INDICE

	Página
I. Resumen	1
II. Introducción	3
III. Antecedentes	9
<i>E. coli</i> Enteroagregativa	9
Epidemiología	9
Manifestaciones clínicas	11
Alteraciones Histopatológicas	11
Mecanismos de patogenicidad	11
Papel del hierro en el crecimiento bacteriano	13
Sistemas de captación y transporte de hierro en Enterobacterias	14
Genes para captación y transporte de hierro	15
IV. Planteamiento del problema	18
V. Objetivos	19
VI. Hipótesis	20
VII. Materiales y métodos	21
Cepas	21
Cultivo de cepas en caldo luria (LB) y caldo luria depletado de hierro (LBD)	21

	Cultivo de cepas en caldo LBD suplementado con $\text{FeSO}_4$ (LBSFe)	21
	Curva de crecimiento de la cepa p56	22
	Curva de crecimiento de la cepa O42	22
	Proteínas de membrana externa (OMP's)	23
	Proteínas secretadas al medio	23
	Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)	24
	Inmuno-electrotransferencia (Western blot)	24
	Secuenciación	25
VIII.	Resultados	26
	Crecimiento de las cepas en LBD y LBSFe	26
	SDS-PAGE de proteínas de membrana externa	28
	SDS-PAGE de proteínas secretadas al medio	30
	Inmuno-electrotransferencia (Western blot) de proteínas secretadas	31
	Secuencia N- terminal	32
IX.	Discusión	33
X.	Conclusiones	38
XI.	Referencias	39
Anexo I		43
	Medios de cultivo y soluciones	43

## I. RESUMEN

El hierro es uno de los nutrientes esenciales para que una bacteria permanezca en el hospedero, sin embargo, su disposición está restringida por lo que muchas bacterias patógenas presentan estrategias para su adquisición. *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) está asociada a diarrea de tipo persistente y aguda; presenta genes para la producción de sideroforos, receptores para la captación del grupo hemo, además de una proteína de alto peso molecular secretada al medio llamada Pic (Protein Involved in colonization), la cual se ha asociado con la degradación de hemoglobina y la capacidad para formar un complejo con el grupo hemo. Lo anterior sugiere su participación como uno de los sistemas de captación y transporte del hierro utilizado por la bacteria, lo que reafirmaría la participación de Pic en colonización intestinal. Por lo anterior se consideró importante estudiar la expresión de proteínas de membrana y de las secretadas al medio en la cepa EAEC O42, para evaluar su posible participación en los eventos de supervivencia de la bacteria ante situaciones de disminución del hierro libre. Se utilizaron inicialmente las cepas p56 (HB101pPic) y O42 (O44:H18) ambas productoras de Pic. Las dos cepas se cultivaron en caldo Luria depletado de hierro (LBD) y caldo Luria depletado y suplementado con  $\text{FeSO}_4$  (LBSFe). Los resultados al respecto mostraron que el crecimiento de las cepas se favorecía en el medio de cultivo LBSFe.

Para los ensayos de caracterización de proteínas se utilizó sólo la cepa O42 (aislada de un caso clínico). Esta se creció en condiciones de cultivo óptimas en medio LB y en medio LBSFe. De estos cultivos se obtuvieron las proteínas de membrana externa (OMP's) y las secretadas al medio que se analizaron por SDS-PAGE. Los resultados obtenidos mostraron que el hierro regula la expresión de varias OMP's (de ~ 70,57,55,28,25,23, y 19kDa) y de proteínas secretadas (~ 114, 104, 50 y 49 kDa). Para determinar la identidad de las proteínas secretadas al medio se realizó Western blot con lo que se pudo establecer que las proteínas



de 114 y 104 correspondían a Pic y Pet respectivamente. Con respecto a la proteína de ~ 49 kDa se encontró que corresponde a un producto de degradación de Pet, sin embargo, la de 50 kDa al parecer es un producto nuevo no reportado aún. Para conocer la identidad de las OMP's se enviaron a secuenciar. Por este procedimiento se pudieron identificar la de 19 kDa que corresponde a la proteína Dps (DNA-binding protein from starved cells) y la de ~ 25 kDa que ha sido reportada como el precursor de Omp W ( receptor de la colicina S4) .

El análisis de la expresión de OMP's y proteínas secretadas obtenidas de la fase estacionaria de crecimiento de la cepa O42, permitieron establecer que la bacteria ante un estado de disminución del hierro activa o inhibe la expresión de genes que codifican para diferentes productos que en el caso de este estudio representan proteínas necesarias para la supervivencia de la bacteria. Sin embargo, no se observó la activación de OMP's relacionadas con los sistemas de captación y transporte de hierro, lo anterior nos hace suponer que la función principal de Pic no se relaciona con los sistemas de captación y transporte de hierro, aunque tiene la capacidad de romper la hemoglobina y fijar el grupo hemo. Sin embargo, es importante considerar que el modelo que utilizamos es artificial y no necesariamente reproduce las condiciones del hospedero. Es necesario conocer la identidad de las proteínas que no se pudieron secuenciar, ya que esta información nos permitirá tener un panorama más claro en relación con el comportamiento de EAEC bajo condiciones de estrés como es la limitación del hierro.

## II. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades infecciosas intestinales cobran importancia en México debido a que aproximadamente el 50% de los habitantes viven en mayor o menor medida en condiciones de pobreza y desnutrición, lo cual abre una puerta a condiciones higiénico sanitarias deficientes, mala manipulación y contaminación de alimentos, que son los vehículos que transmiten a los agentes causantes de diarrea( INEGI/ SSA . 2003 ).

La interacción entre pobreza, estado nutricional y exposiciones ambientales ejercen un efecto adverso potenciado en la salud de la población, principalmente en la infantil. En nuestro país en el 2001(SSA), las enfermedades infecciosas intestinales fueron reportadas como la 5<sup>ta</sup> causa de mortalidad infantil. Así mismo, los reportes de la SSA mostraron que estos padecimientos en el 2003 representaron la cuarta causa de mortalidad en niños menores de 1 año y la primer causa en los de edad preescolar ( 1-4 años). Actualmente aunque la mortalidad por enfermedades diarreicas ha disminuido, la morbilidad se mantiene elevada lo que hace al padecimiento un problema importante de salud pública.

La etiología de la diarrea es diversa, sin embargo, la de origen infeccioso es la más común. Los microorganismos más frecuentemente asociados al padecimiento son: *Rotavirus* , *Escherichia coli* , *Campylobacter jejuni* , *Shigella sp.*, *Salmonella sp*, *Giardia lamblia*, *Yersinia enterolítica* y *Entamoeba histolytica* ( INEGI/ SSA . 2003 ) . *Vibrio cholerae* O1/O139 es otra bacteria involucrada en la patogénesis de la diarrea, sin embargo, solo se busca intencionalmente durante epidemias por lo que solo se tienen datos clínicos en dichos periodos.

De acuerdo al manual Bergey's *Escherichia coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichiae* la cual involucra los generos *Shigella* y *Escherichia*. El género *Shigella* es genética y bioquímicamente semejante al de *Escherichia* y sólo razones históricas y de conveniencia para el trabajo en la clínica y el laboratorio, hace que se sigan considerando como dos géneros independientes. Dentro del género *Escherichia*, *Escherichia coli* es la especie tipo, aunque actualmente se conocen otras cuatro: *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermannii* y *E. vulneris* (Brenner, 1978; Farmer, 1985; Krieg, 1984).

### ***Escherichia coli***

Es un bacilo corto, Gram negativo, no esporulado, generalmente con flagelos peritricos y fimbrias. Es un microorganismo predominante de la microbiota del colon humano. Es inocuo cuando esta confinado al lumen intestinal, su habitat natural. Sin embargo, cuando el huésped se encuentra en estado de inmunosupresión o cuando la bacteria sale del tracto gastrointestinal y coloniza otros órganos puede causar síndromes clínicos, como son; infección de tracto urinario, septicemia y meningitis (Juárez, 2001). *E. coli* es un anaerobio facultativo, que puede ser recuperado de muestras clínicas, empleando medios generales (agar sangre y agar nutritivo) o diferenciales (agar Mac Conkey y Eosina azul de metileno) incubando a  $35 \pm 2$  °C. De heces, orina y líquido cefalorraquídeo se puede aislar en los medios diferenciales antes mencionados. Otras características de la bacteria son la producción de catalasa, es negativa a la oxidasa, reduce nitratos a nitritos, fermenta glucosa y lactosa con producción de gas (Koneman, 1999).

De las cepas de *Escherichia coli* causantes de diarrea se han identificado varios grupos cuyas diferencias radican en su estructura antigénica, el tipo de cuadro clínico que desencadena, distribución epidemiológica y el grupo de edad del hospedero que afecta, entre otros. Algunas de las características antes referidas están relacionadas con los factores de virulencia que a su vez se asocian con la

presencia de material genético transmitido por vía horizontal. Tal situación ha dado lugar a agrupar de acuerdo con las propiedades referidas, en grupos patógenos a las cepas de *Escherichia coli* que causan diarrea en: *E. coli* enterotoxigena (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* con adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Juárez, 2001).

La gran diversidad antigénica de *E. coli*, ha permitido utilizar diferentes antígenos para su tipificación, de los cuales, los principales incluyen; la cápsula, que se conoce como antígeno "K" y cuya composición es de polisacáridos. El antígeno somático llamado "O", que forma parte del lipopolisacárido (en membrana externa) y el antígeno flagelar ó "H", de constitución proteica. En base a esto la caracterización serológica de esta bacteria se realiza analizando 175 antígenos somáticos (O) y 56 flagelares (H). Mediante este procedimiento se pudieron establecer inicialmente los grupos patógenos asociados con la generación de enfermedad (tabla 1) (Juárez, 2001; Koneman , 1999).

### *Escherichia coli* enterotoxigena (ETEC)

Las cepas de ETEC son causa frecuente de diarrea severa en lactantes en países en desarrollo, así como la causa más común de diarrea del viajero. Estas bacterias elaboran al menos uno de dos grupos de enterotoxinas: toxina termolábil (LT) y toxina termo estable (ST). Estas cepas además expresan proteínas fimbriadas con las cuales se adhieren a receptores celulares específicos. El cuadro clínico que inducen es similar al que se observa en el caso del cólera, con evacuaciones abundantes (de ocho a doce) al día por un periodo de cuatro a cinco días (Nataro, 1998; Juárez, 2001).

Tabla 1. Cepas patógenas de *Escherichia coli*

Grupo	Población afectada	Síndromes clínicos	Serogrupos
<i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC)	Recién nacidos y lactantes	Diarrea aguda	18, 20, 26, 28, 44, 55, 86, 91, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128, 142, 158, 159.
<i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	Niños <5 años, viajeros turistas	Diarrea acuosa	6, 8, 11, 15, 16, 20, 25, 27, 63, 78, 80, 85, 115, 126, 128, 139, 148, 149, 153, 159, 167, 173.
<i>E. coli</i> Enteroinvasiva (EIEC)	Todas las edades	Evacuaciones con moco y sangre (disentería)	28ac, 29, 112ac, 115, 124, 135, 136, 143, 144, 152, 159, 164, 167.
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	Todas las edades	Colitis hemorrágica, Síndrome urémico hemolítico.	4, 26, 45, 46, 48, 50, 55, 91, 98, 111, 113, 117, 118, 119, 121, 125, 128, 145, 157, 172.
<i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAEC)	Niños	Diarrea persistente	3, 7, 15, 44, 86, 77, 111, 126, 127.
<i>E. coli</i> Adherente difusa (DAEC)	Niños	Evacuaciones Líquidas con moco	

Sainz E.T. 1998. Tesis de maestría. Facultad de Química. UNAM

### *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC)

Estas cepas pertenecen a un grupo reducido de serotipos que se parecen bioquímica y antigénicamente al género *Shigella*. El mecanismo de patogenicidad de las cepas EIEC es la capacidad de invadir y reproducirse dentro del citoplasma, ocasionando la destrucción de la célula hospedera. Las cepas EIEC afectan la mucosa del colon y producen un cuadro disentérico similar, aunque menos severo, al que produce *Shigella dysenteriae* tipo 1. Las manifestaciones clínicas asociadas con esta infección son: evacuaciones escasas acompañadas de moco y sangre, dolor abdominal tipo cólico y fiebre (Nataro, 1998; Juárez, 2001).

### *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC)

EHEC incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7; considerado como prototipo de este grupo. Las citotoxinas que produce EHEC, por sus características antigénicas y por su actividad sobre cultivos celulares reciben dos diferentes denominaciones: citotoxina semejante a la de Shiga (SLT), dado que anticuerpos anti toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 neutralizan su actividad y el término verotoxina (VT), por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero. Se conocen tres tipos antígenicos de éstas citotoxinas de las cuales VT1 o SLT-I y VT2 o SLT-II afectan específicamente a humanos. Otra propiedad de virulencia observada en estas cepas es el daño celular conocido como adherencia y esfacelamiento (A/E), similar al descrito en el grupo de EPEC. Diferentes serotipos de EHEC se han relacionado con la etiología de diarrea esporádica en adultos, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica. Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países con climas templados como son: Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, entre otros (Nataro, 1998; Juárez, 2001).

### *Escherichia coli* **con adherencia difusa (DAEC)**

Estas cepas presentan un patrón de adherencia a células epiteliales característico, en el cual las bacterias se observan dispersas sobre la superficie de las mismas, con poca agregación y poca adherencia sobre el vidrio de la preparación. DAEC se ha asociado a diarrea de tipo agudo y persistente. Poco se conoce acerca de las características patogénicas y clínicas producidas por estas cepas, sin embargo se ha observado un incremento en el riesgo de adquirir enfermedad diarreica asociada a DAEC con la edad, en pacientes pediátricos (Nataro, 1998).

### III. ANTECEDENTES

#### *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

El grupo de EAEC es un grupo importante asociado con la etiología de diarrea aguda y persistente en niños menores de 5 años, ancianos y pacientes con síndrome de Inmunodeficiencia Adquirida (SIDA) a nivel mundial. EAEC se definen como cepas de *Escherichia coli* que se adhieren a células HEP-2 en un patrón característico en el cual las bacterias forman agregados apilados (adherencia agregativa), tanto en la superficie de la célula como en el cristal de la preparación (Nataro , 1998).

#### Epidemiología

Estudios en voluntarios humanos y brotes epidémicos mostraron la importancia de *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) en los últimos años, lo anterior por su participación en cuadros de diarrea persistente (duración de 14 días o más) y aguda en niños pequeños de diversas regiones geográficas. Un estudio realizado en India mostró que EAEC se aisló en 29.5% de niños con diarrea aguda, 12.7 % con diarrea persistente y en 9.8 de niños sin cuadro clínico (Nataro, 1998). La evidencia del papel de EAEC como agente causal de diarrea en países desarrollados resultó de un estudio de casos y controles en Escandinavia, en éste las bacterias se recuperaron principalmente de casos de diarrea (Okeke, 2001). Durante el mismo periodo en otro estudio realizado en Londres se encontró que estas bacterias eran recuperadas tan frecuentemente como otros patógenos en muestras de heces obtenidas de niños con diarrea aguda y persistente (Okeke, 2001). Varios brotes epidémicos han sido reportados en algunos países, Cobeljic et al (1996), reportaron en Serbia el primer brote de diarrea producido por EAEC, en éste 19 bebés fueron afectados, una cepa EAEC



del serogrupo O4 resistente a diferentes antibióticos fue aislada e implicada en el brote.

El brote más grande que ha sido reportado afectó a 2697 niños japoneses en 1993, quienes comieron desayunos escolares contaminados con EAEC. Los niños presentaron diarrea severa, la cual se prolongó por varios días en el 10 % de los casos (Nataro, 1998). Otros brotes han sido descritos en otras partes del mundo. El Laboratorio de Salud Pública en el Reino Unido ha documentado múltiples brotes adicionales causados por cepas EAEC con diferentes propiedades (Okeke, 2001). En México Eslava y col. (1993), reportaron dos brotes de diarrea asociados a la infección por cepas de EAEC en niños internados en la sala de nutrición del Instituto Nacional de Pediatría, durante estos brotes 5 niños afectados murieron a consecuencia de la diarrea inducida por dos diferentes cepas de EAEC ( tabla 2 ).

Tabla 2. Brotes de enfermedad diarreica asociada con infección por EAEC

Ciudad	Año	Población afectada	Signos y síntomas	Propiedades de cepas relacionadas
Reino Unido	1994	19 niños (restaurante)	Diarrea y vomito	O62, O73, O134, O- no tipificada
Reino Unido	1994	10 niños (restaurante)	Diarrea algunos persistente	O19, O113, O125, O-no tipificada
Reino Unido	1994	51 adultos en un centro de conferencia	Diarrea aguda acuosa	O86( 3 aislados), O116 (1 aislado)
Reino Unido	1994	53 adultos en un hotel	Diarrea acuosa persistente	O98
Serbia	1995	19 recién nacidos e infantes de < de 6 meses	Diarrea acuosa aguda (16/19), persistente(3/19) y con moco(3/19). Con fiebre(11/23)	O4, CVD432, AA, Pet, EAST-1 negativo, α-hemolisina positivo.
India	1996	20 aldeanos de diferente edad, asociados con agua de un pozo.	Diarrea acuosa aguda y persistente	Multirresistente, toxigenica
Japón	1993	2697 estudiantes en 16 escuelas	Diarrea aguda y persistente	CBD432-negativo, EAST-1 positivo
Francia	1996	Niños (1-13 años)	Diarrea y síndrome urémico hemolítico	O111 H2, CVD432 positivo, EAST-1 positivo
México		No reportados (guardería)	Diarrea severa; 5 muertes	

James P. Nataro. Lancet Infectious Diseases, 2001 ; 1 :304-313

### **Manifestaciones clínicas**

Las características clínicas de la infección intestinal producida por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), muestran una diarrea secretora acuosa con moco, fiebre en bajo grado y en ocasiones vómito. La presencia de sangre en heces se ha reportado en poco más de la tercera parte de pacientes con diarrea asociada a EAEC, la cual es frecuentemente persistente (duración de más de 14 días). Se ha observado que un porcentaje elevado de los pacientes infectados con estas cepas, presentan lactoferrina fecal (un indicador sensitivo de leucocitos fecales) y niveles elevados de IL-8 en las heces, sugiriendo que la infección por EAEC puede ser acompañado por una forma sutil de inflamación de la mucosa (Nataro, 1998).

### **Alteraciones Histopatológicas**

Estudios hechos en asa ligada de la porción ileal de intestino de rata y de conejo, así como de necropsias de niños fallecidos a causa de una diarrea por este patógeno reportaron daño a la mucosa intestinal con acortamiento de las vellosidades intestinales, hemorragia, necrosis y ulceración del epitelio asociado a una respuesta inflamatoria intermedia con edema e infiltración mononuclear de la submucosa, relacionado con la participación de toxinas secretadas por EAEC (Vial, 1988 ; Eslava 1993).

### **Mecanismos de patogenicidad**

La capacidad de adherencia, que contribuye a la colonización así como la producción de toxinas son propiedades que se consideran como los principales mecanismos de patogenicidad de la bacteria.

Las adhesinas AAFI y AAFII (fimbrias de adherencia agregativa) están codificadas en el plásmido de 60-MDa de *Escherichia coli* enteroagregativa. AAFI se ha

relacionado con la adherencia a células HEP-2 y la propiedad de hemaglutinación de eritrocitos humanos, AAFII es distinta morfológica y genéticamente a AAF/I (Nataro,1998). Sin embargo, una gran proporción de las cepas EAEC no expresan ninguno de los dos tipos de fimbrias, por lo que posiblemente existan otros factores implicados en la adherencia. Wai y col. (1996) al realizar el análisis de proteínas de membrana externa de EAEC, reportaron la presencia de una proteína de 38 kDa con propiedades hidrofóbicas asociada también con la adherencia.

Otro factor de virulencia descrito en cepas EAEC es la producción de toxinas. La primera descripción al respecto fue el de una proteína de 10 kDa codificada en el plásmido (pAA) de 60 MDa. Por compartir características con la toxina termoestable de ETEC se denominó EAST-1 (toxina estable al calor de EAEC I). En ensayos *in vitro* en cámara de Ussing mostró actividad de enterotoxina, sin embargo, esta toxina no ha sido asociada de manera contundente con la producción de enfermedad, ya que en estudios recientes se ha encontrado la presencia de EAST-1 en cepas de *E. coli* no causantes de diarrea, así como en cepas de *E. coli* de la biota natural (Savarino, 1993).

En años recientes Eslava et al (1993), reportaron que cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa elaboran dos proteínas de alto peso molecular, una de 104 kDa llamada Pet (toxina codificada en el plásmido) y la otra de 114 kDa Pic (proteína involucrada en colonización intestinal). Estas se identificaron en el sobrenadante del cultivo de cepas aisladas del intestino de un niño que murió a consecuencia de la infección por dichas bacterias y que presentó un cuadro de diarrea severa. El análisis de los genes de ambas proteínas (*pet* y *pic*), permitió observar que presentan alta identidad con integrantes de la familia de proteínas autotransportadoras (Henderson ,1998 ), que pertenecen a la subfamilia SPATES (Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*), llamada así por el motivo de serina proteasa conservado y por su capacidad de autotransportarse.

Pet presenta actividad de enterotoxina y citotoxina, actividades que son dependientes de su motivo de serina proteasa. *In vitro* Pet es capaz de degradar las cadenas  $\alpha$  y  $\beta$  de la espectrina en eritrocitos o su homólogo la fodrina en células nucleadas, lo anterior ocasiona arreglos en el citoesqueleto que conducen a alteraciones morfológicas de las células (Villaseca, 2000).

Pic es una proteína cuyo gen está en el cromosoma de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa, *Shigella flexneri* 2a y más recientemente se ha identificado en cepas uropatógenas de *E. coli*. Pic tiene actividad mucinolítica, degrada complemento y el factor V de coagulación, propiedades consideradas para señalar que la proteína contribuye al proceso de colonización de la bacteria (Henderson, 1999). La secuencia de aminoácidos de esta proteína presenta alta identidad con Hbp (hemoglobina proteasa de 110 kDa), identificada en una cepa de *E. coli* asociada con infección extraintestinal. Dada la identidad entre estas dos proteínas se consideró factible que otra actividad de Pic pudiera estar relacionada con los sistemas de captación y transporte de hierro, contribuyendo también de esta manera en la colonización del hospedero. Estudios realizados en el laboratorio mostraron que Pic además de romper la hemoglobina tiene la propiedad de unirse al grupo hemo formando un complejo Pic-hemina (Hernández, 2002).

### **Papel del hierro en el crecimiento bacteriano**

El hierro es un elemento importante para el crecimiento bacteriano, dentro de la célula su principal función es participando en reacciones enzimáticas de óxido-reducción (redox), aunque también juega un papel en la estructura de proteínas. En el hospedero humano, la mayor parte de hierro se encuentra intracelularmente como hemo o asociado a proteínas de almacenaje como la ferritina. Fuera de la célula está unido a la transferrina, la lactoferrina y a veces al citrato, por lo que este elemento no está fácilmente disponible (Andrews, 2003; Clarke, 2003).

## **Sistemas de captación y transporte de hierro en Enterobacterias**

Las Enterobacterias utilizan dos sistemas de captación de hierro: 1) Los sistemas de adquisición del grupo hemo dependientes de hemofero o por producción de sideroforos y 2) por medio de las proteínas Feo ABC , involucradas en la captación de hierro en condiciones anaeróbicas (Andrews ,2003).

Los sideroforos son moléculas de bajo peso molecular, quelantes de la unión al ión férrico producidos por algunos miembros de la familia *Enterobacteriaceae*. En ambos sistemas; sideroforos y hemoferos forman complejos con el grupo hemo o el hierro principalmente y lo transportan a la superficie celular en donde dicho ligando es reconocido por un receptor de membrana externa en la célula bacteriana. Estos receptores unen sus ligandos con alta afinidad y especificidad para transportar compuestos contra un gradiente de concentración usando energía de la membrana interna asociada al complejo TonB- ExbB- ExbD. Una proteína de transporte periplásmica y varias proteínas asociadas a membrana interna completan el transporte de hierro hacia el citoplasma (Braun, 2002).

Un Sistema de adquisición de hemo dependiente de hemofero ha sido observado en *Serratia marcescens* , la cual secreta la proteína llamada HasA que utiliza hemo de la hemoglobina y lo transporta a la superficie de la célula donde es reconocido por su receptor HasR (Létoffé, 1994).

En *Escherichia coli* se ha observado captación de hierro por medio de los receptores de membrana externa de sideroforos tal como FepA (para enterobactina ferrica) y FhuA (para ferricromo). *E. coli* 0157:H7 fija el grupo hemo por medio de una proteína de membrana llamada ChuA de 70 kDa (Braun,2002;Clarke, 2003; Andrews, 2003).

### Genes para transporte y captación de hierro en EAEC

En estudios realizados en cepas de referencia de *Escherichia coli* enteroagregativa clasificadas filogenéticamente por MLEE ( patrón electroforético de enzimas multilocus), se evaluó la presencia de genes involucrados en diversos sistemas de captación de hierro en estas cepas ( Tabla 3 y 4), en las cuales se observó una alta prevalencia de los genes *iucA* , *fyuA* y *irp2<sup>c</sup>* , genes para la producción de los sideroforos aerobactina y yersiniabactina .

Los genes *chuA* y *iucA* también estuvieron presentes en un número significativo de estas cepas. Estos genes se han observado también en otras cepas de *E. coli* patogénicas en las cuales se ha demostrado que presentan un papel potencial en la virulencia de las mismas. En base a esto las cepas pertenecientes a las categorías EAEC2 y DAEC2 que presentaron únicamente los genes *chuA* y *fepC*, se piensa que podrían involucrar cepas virulentas. Sin embargo, la patogenicidad de EAEC también se ha observado que está relacionada con la susceptibilidad del hospedero, así como con la región geográfica de procedencia de las cepas (Okeke, 2004).

Tabla 3. Genes involucrados en sistemas de captación de hierro en EAEC.

Gen	Descripción
<i>fyuA</i>	Codifica el receptor de membrana externa Fe- yersiniabactina/pesticina <i>fyuA</i> .
<i>iucA</i>	El producto del gen es una sintetasa involucrada en la síntesis de aerobactina.
<i>fepC</i> (HIP)	Homologo del gen genérico <i>fepC</i> el cual codifica un componente de unión a ATP en el complejo de membrana citoplásmica, para el transporte de enterobactina ferrica .
<i>chuA/shuA</i>	Codifica al receptor de membrana externa para el transporte de hierro.
<i>ireA</i>	Codifica un receptor sideroforo putativo.
<i>iroN</i>	Codifica una proteína receptora de sideroforo en <i>S. entérica</i> y <i>E. coli</i> uropatogenica.
<i>hbp</i>	Codifica una hemoglobina proteasa autotransportadora.
<i>pic</i>	Codifica una hemoglobina proteasa autotransportadora multifuncional.

**Iruka N. Okeke. Journal Of Clinical Microbiology. 2004: 36-44**

HIP , Región de alta patogenicidad presente en especies de *Yersinia*

Tabla 3. Genes para la captación y utilización de hierro en cepas de EAEC.

Iruka N. Okeke. Journal Of Clinical Microbiology. 2004: 36-44

Cepa	Grupo filogenético	Ciudad de aislamiento	Hemolisis en agar sangre	Utilización de hemo	Utilización de hemoglobina	fepC (PAI) <sup>a</sup>	chuA	iucA	irp2	fyuA	ireA	iroN	hbp	pic <sup>c</sup>
AA 60A	EAEC1	México	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
NA H191-1	EAEC1	Perú	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	+
AA H232-1	EAEC1	Perú	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
AA 17-2	EAEC1	Chile	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
AA 253-1	EAEC1	Tailandia	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
AA 6-1	EAEC1	Tailandia	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-
AA DS65-R2	INT1	Filipinas	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA 501-1	INT2	Tailandia	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-
AA H223-1	INT2	Perú	-	+	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-
DA WC212-11	DAEC2	Tailandia	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-	-	-
AA DS67-R2	DAEC2	Filipinas	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
AA H38-1	EAEC2	Perú	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-
AA 142	EAEC2	Perú	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
AA 144-1	EAEC2	Tailandia	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-
AA 44-1	EAEC2	Tailandia	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
AA H145-1	EAEC2	Perú	-	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+
AA 309-1	EAEC2	Tailandia	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+
AA 103-1	AA/DA	Tailandia	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	-	-
DA H92-1	AA/DA	Perú	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-
AA 435-1	AA/DA	Tailandia	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
AA 199-1	AA/DA	Tailandia	-	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	+
AA H194-2	AA/DA	Perú	-	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+
AA278-1	AA/DA	Tailandia	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+
AA 239-1	AA/DA	Tailandia	-	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-	+

AA/DA, grupo conteniendo EAEC y DAEC ; INT, intergrupo.

<sup>a</sup> PAI, región de patogenicidad



#### IV. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

*Escherichia coli* enteroagregativa es un patógeno importante responsable de cuadros de diarrea aguda y persistente, en este grupo de bacterias se han identificado genes necesarios para la síntesis o transporte de sideroforos, receptores para el transporte de hemo y hemoglobina proteasas asociados con la captación y transporte de hierro. Estudios recientes reportan que Pic una de las dos proteínas secretadas por estas bacterias, degrada la hemoglobina y se une a la hemina. Lo anterior sugiere que Pic pudiera estar participando como un elemento más en los sistemas de captación y transporte del hierro, lo que a su vez confirmaría su participación en la colonización del intestino por EAEC. Hasta el momento no se conoce el comportamiento de cepas EAEC productoras de Pic, cuando hay un estado de estrés relacionado con disminución de los niveles de hierro. Es factible que ante dicha situación la producción de Pic se incremente y a su vez se induzca la expresión de proteínas de membrana externa de la bacteria, que pudieran participar en la captación del complejo Pic/hemina. De presentarse tal situación se podría confirmar que Pic es un factor de virulencia con diferentes propiedades y de manera contundente establecer su participación en la colonización y supervivencia de la bacteria en el hospedero.

## V. OBJETIVOS

### GENERAL

Estudiar el papel de la concentración del hierro en la expresión de proteínas de superficie y aquellas secretadas al medio en cepas de *Escherichia coli* enteroagregativas para determinar su participación en los procesos de supervivencia y colonización de la bacteria.

### PARTICULARES

- Evaluar el crecimiento de cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa en condiciones limitantes de hierro.
- Comparar el perfil electroforético de proteínas de membrana externa (OMP's) obtenido en la cepa EAEC O42 crecida en un medio completo y en condiciones limitantes de hierro.
- Evaluar la expresión de Pic en la cepa O42 bajo condiciones limitantes de hierro.
- Determinar la secuencia de las proteínas cuya expresión este relacionada con los niveles de hierro en el medio de cultivo.

## VI. HIPOTESIS

Niveles de baja concentración de hierro regulan la expresión de OMP's, así como de proteínas secretadas al medio como Pic, esta última considerada un factor que contribuye a la colonización de *Escherichia coli* enteroagregativa .

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### Cepas

Se utilizaron las cepas; O42 de *Escherichia coli* enteroagregativa ( cepa de referencia aislada en Perú de un niño enfermo) y la clona pPic (P56) resistente a tetraciclina, clona mínima de expresión de Pic preparada de un fragmento cromosomal de la cepa O42. Estas se conservaron en gelosa especial con y sin tetraciclina 12 µg/ml para la cepa O42.

Antes de cada ensayo se verifico la pureza de las cepas por siembra en los Medios de cultivo Agar sangre, Agar Mac Conkey y Agar Luria con Tetraciclina (12 µg/ml ).

### Cultivo de las cepas en caldo Luria (LB) y caldo Luria depletado de hierro (LBD).

Se preparó caldo Luria completo (LB) y caldo Luria depletado (LBD) de hierro con el agente quelante 2,2'-Dipyridil (SIGMA-Aldrich. St. Louis, USA) a una concentración final de 2mM. A este se le adicionó la mezcla de sales MgCl<sub>2</sub>, MnCl<sub>2</sub>, CuSO<sub>4</sub>, ZnSO<sub>4</sub>, a una concentración final de 0.1 mM. En éstos medios se preparó un preinoculo de la cepas (P56 y O42) en tubos de ensayo conteniendo 3 ml de LB y LBD, los tubos se incubaron en agitación a 150 rpm durante 4 hrs. a 37 °C. De éste preinoculo se inocularon 1000 µl a matraces que contenían 1litro de LB y LBD. Los matraces se incubaron en agitación a 100 rpm ,37 °C durante 18 hrs .

### Cultivo de las cepas en caldo LBD suplementado con FeSO<sub>4</sub> (LBSFe).

El medio de cultivo LBD se modificó por la adición de FeSO<sub>4</sub> ( Reactivos analíticos Reasol ) a una concentración final de 2mM (LBSFe) ( Létóffé, 1994).

Se prepararon caldo LB y caldo LBSFe, en los cuales se sembraron las cepas p56 y O42. Para tal se preparó un preinoculo de la manera descrita anteriormente, a partir del cual se inocularon 1000 µl de cultivo a matraces que contenían 1 litro de LB y LBSFe y se incubaron en agitación a 100 rpm , 37°C durante 18 horas.

### **Curva de crecimiento de la cepa p56**

Se evaluó el crecimiento de la cepa p56 en LBD mediante una curva de crecimiento. Para tal a partir de un cultivo confluyente en Agar Luria ( tetraciclina 12 µg/ml) se realizó un barrido del crecimiento de la cepa, el cual se resuspendió en 3ml de LBD y se ajusto a  $\sim 1.58 \times 10^{10}$  UFC/ml, de esta suspensión se tomaron 1000 µl y se inocularon en un matraz con 250ml de LBD. El matraz se incubó en agitación a 150 rpm, 37°C, cada hora durante 10 horas se tomaron muestras del cultivo, se midió la absorbancia a 600 nm en un espectrofotómetro (Spectronic GENESYS 2) y se determinaron las UFC/ ml realizando diluciones seriadas (1:10) de cada muestra en solución salina isotónica. En placas de agar Luria se inocularon 100 µl de las muestras y se realizó cultivo por extensión. Para definir las UFC se tomaron en cuenta las placas que presentaban de 30 a 300 colonias (Ramírez, 2000).

### **Curva de crecimiento de la cepa O42**

El crecimiento en el medio LBSFe se evaluó únicamente para la cepa O42 (cepa silvestre), por medio de una curva de crecimiento. Para este ensayo se preparo un cultivo de la cepa en agar sangre del cual se tomo una asada que se inoculó en un matraz conteniendo 250ml de LBSFe. El matraz se incubó en agitación a 200 rpm 37°C. Como en el caso anterior se tomaron alícuotas cada hora (durante 11 hrs.) para determinar la absorbancia y las UFC.

### **Proteínas de membrana externa (OMP's)**

Se determinó el perfil electroforético de OMPs únicamente de la cepa O42 crecida en LB y LBSFe incubando durante 18 hrs a 37°C. El cultivo se centrifugo a 7491X G a 4°C durante 30 minutos, (Rotor GSA). El paquete de bacterias se utilizó para obtener las proteínas de membrana externa y del sobrenadante se analizaron las proteínas secretadas al medio.

Para obtener las OMP's el paquete de bacterias se lavó 2 veces con Hepes 100 mM (pH 7.6) y se centrifugó a 3 220 X G, 15 min a 4°C (Rotor SS-34), se resuspendió en 8ml de Hepes 100 mM (pH 7.6), se le adicionó PMSF (inhibidor de proteasas) a una concentración final de 5 mM, el tubo ependorff con bacterias se colocó en hielo y se sometió a sonicación (Vibra cell .Sonics & materials) por 3 min a una amplitud de 30 watts de salida. La muestra se centrifugó a 8855 x G durante 10 min. a 4°C para separar las células no lisadas. El sobrenadante obtenido se centrifugó a 11904 X G durante 30 min. a 4°C (Rotor S120AT2), para obtener las membranas celulares. El pellet obtenido se resuspendió en 600 µl de HEPES (10 mM) Sarcosil 1%, se incubó en agitación durante 1 hora a temperatura ambiente para liberar proteínas de la membrana externa.

Finalmente la suspensión obtenida se centrifugó a 11904 X G durante 30 min. a 4°C (Rotor S120AT2) para obtener las OMP's, éstas se lavaron dos veces con HEPES 10 mM y se resuspendieron en 100 µl de la misma solución (Fedorka-Cray et al, 1990).

### **Proteínas secretadas al medio**

El sobrenadante obtenido se sometió a precipitación con sulfato de amonio al 75% de saturación durante 18 hrs a 4°C. Para obtener el precipitado se centrifugó a 7491 X G a 4°C durante 30 min (Rotor GSA). Y se solubilizó y

dializó contra una solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.07M p H 8.2 durante tres días.

La concentración de proteínas (membrana externa y secretadas) se determinó por el método de Bradford ( Bradford, 1976 ), utilizando albúmina sérica bovina como estándar, la lectura se realizó en espectrofotómetro (Sectronic GENESY 2 ) a 595 nm.

### **Electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE)**

Las OMP's y proteínas secretadas se analizaron por electroforesis de una dimensión en presencia de beta mercaptoetanol (condiciones desnaturalizantes), en geles de poliacrilamida al 12 y 10% respectivamente con 0.1% de duodecil-sulfato de sodio ( Leammli,1970; Ausudel, 1987). Para el análisis del perfil electroforético se colocaron en cada pozo del gel 15 µg de las proteínas secretadas y entre 10 y 15 µg de las OMP's. El corrimiento se realizó en una fuente de poder (BRL mod.4000) a 100 volts constantes, 200 watts y 200 miliampers. El peso molecular de las proteínas se calculó por comparación con marcadores de peso molecular conocido ( Prosieve color , Cambrex Bioscience Rockland, USA.) posterior a la tinción del gel con azul de Coomassie R-250 ( Sigma Chemical, St . Louis, Missouri).

### **Inmunoelectrotransferencia (Western blot)**

Para evaluar si las proteínas secretadas correspondían a Pet y/o Pic se realizó inmunotransferencia de las fracciones precipitadas con sulfato de amonio (Towbin et al, 1979). Las proteínas obtenidas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa ( 0.45µm. BIO-RAD) por electroforesis a 500 volts, 200 watts y 200 miliampers (BRL mod.4000) durante 2 hrs. Las proteínas se visualizaron al teñir la membrana con rojo de Ponceau, las membranas se lavaron con PBS 1x y los espacios vacíos se bloquearon utilizando leche descremada al 5% en PBS 1x durante 1 hora. La membrana se lavó 3 veces 5 min c/u con PBS-Tween 0.1% y se incubó 1 h a temperatura ambiente con el primer anticuerpo (IgG α Pic

o IgG  $\alpha$  Pet) a una concentración de 30  $\mu\text{g/ml}$  y a una dilución 1: 100 respectivamente. Se lavó nuevamente 3 veces 5 minutos c/u con PBS-tween 1% y se colocó un segundo anticuerpo (anti IgG de conejo) marcado con peroxidasa a una dilución de 1:3000, se incubó nuevamente durante 1 hora en las mismas condiciones descritas. Finalmente la membrana se lavó 3 veces 5 minutos c/u con PBS-Tween 1% y una vez con TB. Para visualizar la reacción se agregó a la membrana solución reveladora. La reacción se paró al adicionar agua una vez que aparecieron las bandas coloreadas.

### **Secuenciación**

Algunas de las proteínas que se obtuvieron en el perfil electroforetico se secuenciaron. Para este propósito las OMP's obtenidas en LB y LBSFe se corrieron en SDS-PAGE y se transfirieron en las mismas condiciones previamente descritas a una membrana de difluoruro polivinilo ( PVDF) de 0.45  $\mu\text{m}$  (MILLIPORE ). Las membranas se tiñeron con azul Coomasie para visualizarlas y seleccionar las de interés. Estas membranas se enviaron al laboratorio de análisis de péptidos y proteínas del Departamento de Bioquímica (Facultad de Medicina. UNAM), para que se realizara la secuenciación.

La secuencia N – terminal se determinó por degradación automatizada de Edman, en un secuenciador de proteínas en fase gas (LF 3000; Beckman Instruments) equipado con un sistema de cromatografía líquida de alta resolución (HPLC). La columna del HPLC utilizada fue Beckman Spherogel Micro PTH (2 por 150).



## VIII. RESULTADOS

### Crecimiento de las cepas en LBD y LBSFe

Al realizar la evaluación del crecimiento de las cepas p56 y O42 en LBD, utilizando un preinoculo de 4 hrs, se observó que bajo estas condiciones ninguna de las dos cepas crecía. Por tal motivo se modificaron las condiciones que consistieron en incrementar el inóculo a  $1.58 \times 10^{10}$  UFC/ml y realizar el cultivo en matraces con 250 ml de LBD. Bajo estas condiciones de cultivo se realizó la curva de crecimiento de la cepa p56, los resultados obtenidos permitieron observar que aunque la bacteria crece en este medio, la fase de adaptación observada fue de 8 hrs (Fig. 1a). El incremento en UFC fue de un logaritmo que se observó a partir de las 4 hrs., el ensayo se siguió por 10 hrs. determinando en ese momento cuentas de  $1 \times 10^8$  UFC. Al graficar absorbancias en la fase de adaptación se observa un incremento del número de células bacterianas, sin embargo, como se observó al graficar UFC estas no corresponden a células viables si no totales (Fig. 1b).

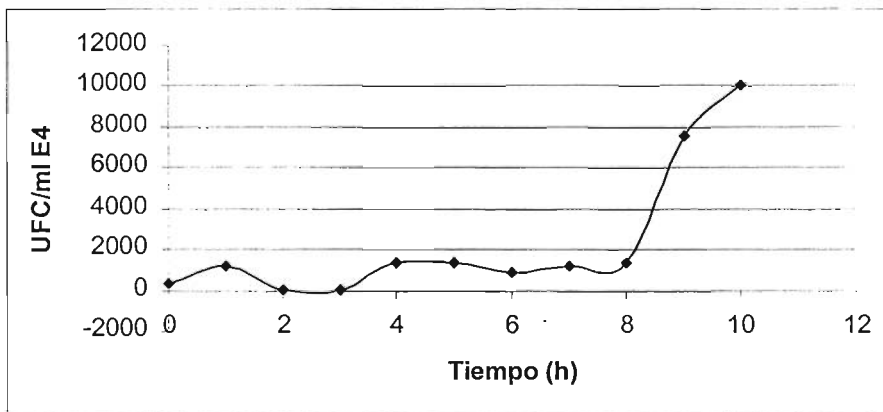


Fig. 1a .Dificultad de crecimiento de la cepa p56 en medio LBD. Se observa una fase de latencia de 8 hrs. tiempo en que inicia la fase de crecimiento exponencial.

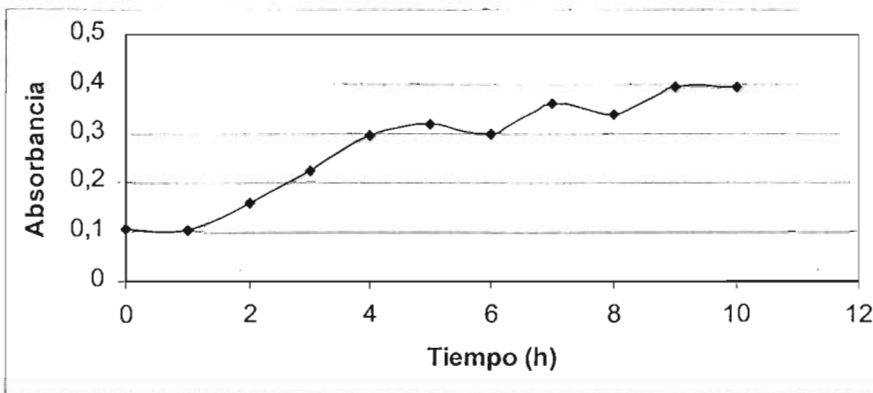


Fig. 1b. Aumento de la densidad celular total durante la fase de latencia (hasta 8hrs). La fase exponencial es apenas visible a partir de las 8 hrs.

Los resultados obtenidos señalan que no obstante haber utilizado una cepa hiper productora de Pic, el crecimiento fue muy lento y escaso. Por tal motivo el medio LBD se suplemento con  $\text{FeSO}_4$  a una concentración final de 2 mM (LBSFe) de acuerdo a lo propuesto por Létoffé (1994). En este medio se observó que el crecimiento de ambas cepas (p56 y O42) se favoreció.

Con los resultados obtenidos y al considerar que al parecer Pic no contribuye al crecimiento de la bacteria en un medio depletado de hierro, se procedió a analizar el comportamiento de la cepa silvestre O42 en el medio suplementado (LBSFe) y así poder definir el comportamiento de EAEC en condiciones de estrés asociadas con disminución de hierro. En este ensayo no se pudo observar la fase de adaptación por UFC debido a fallas en las diluciones, ya que únicamente se realizaron las cuentas a partir de la siembra directa y de la dilución 1:10 (Figura 2a). Sin embargo, al analizar la curva de absorbancia se observó incremento en las lecturas a partir de las 4 hrs., lo que sugiere que la fase lag es de 4 horas, el inicio de la fase exponencial es a las 5 hrs. y la fase estacionaria se presenta a partir de las 9 hrs. (Figura 2b). El ensayo se siguió por 11 hrs. determinando en este momento cuentas de  $1 \times 10^9$  UFC.

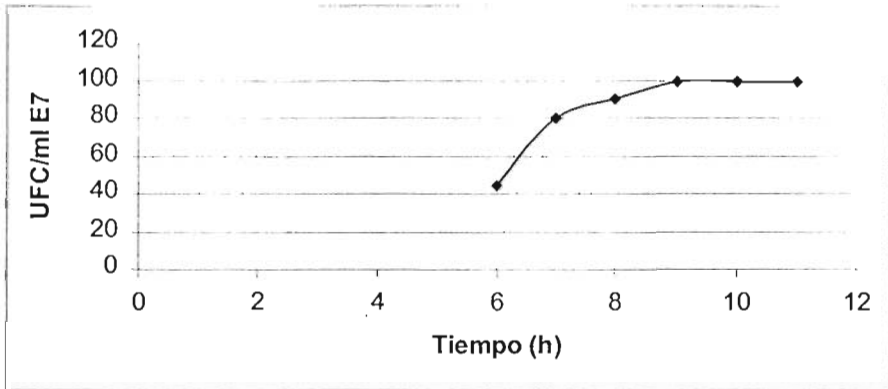


Fig. 2a. El medio LBSFe favorece el crecimiento de la cepa O42. A partir de las 9 hrs. se observa ya la fase estacionaria de la curva de crecimiento.

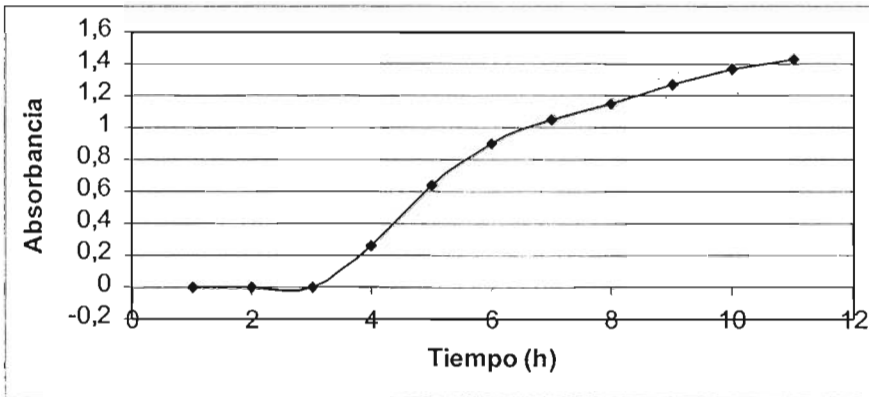


Fig. 2b. A partir de las 5 hrs. de crecimiento se observa la fase exponencial, sugiriendo una fase de latencia de aproximadamente 4hrs.

### **SDS-PAGE de proteínas membrana externa**

Se realizaron 5 ensayos para la obtención de OMP's, en el último se realizó una modificación de la técnica con el fin de aumentar la concentración de proteínas para realizar la secuencia de las de interés.

El perfil electroforético de OMP's obtenido en los diferentes ensayos fue constante en cada una de las condiciones de cultivo. Sin embargo, en los primeros ensayos las fracciones enriquecidas de OMP's se observaron contaminadas por componentes celulares, lo que dificultó establecer claramente los perfiles obtenidos (Figura 3). Tal situación se corrigió al realizar una manipulación menos enérgica de las muestras. En los siguientes ensayos en los que se mejoró el método de obtención de OMP's, se pudo hacer el estudio comparativo de los perfiles obtenidos con los dos medios de cultivo utilizados (LB y LBSFe). Al respecto se observó que al crecer la cepa O42 en el medio LBSFe, se expresaba una proteína de ~ 70 kDa que no se observó cuando la bacteria se creció en LB. Otra de 19 kDa aumentó ligeramente su expresión y en otras cuatro de ~55, ~57, ~ 25 y ~23 kDa la expresión disminuyó. Otra más de ~ 28 kDa prácticamente no se produjo (Figura 4).

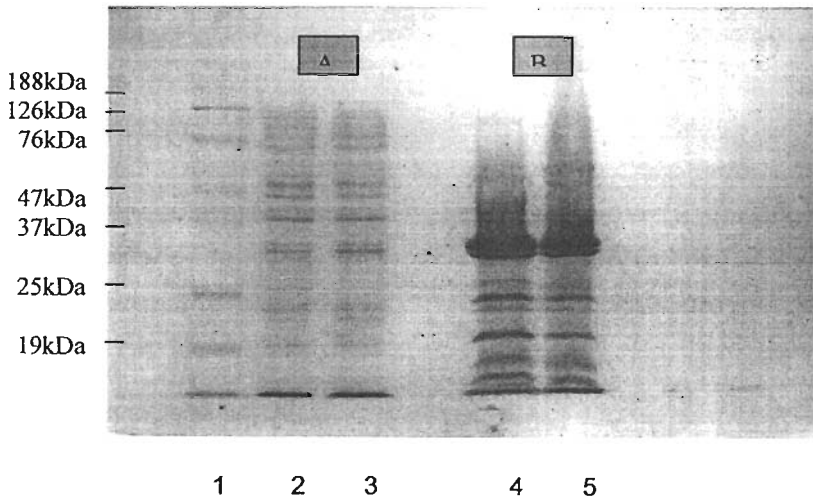


Fig. 3. SDS-PAGE de proteínas de membrana interna (A) y externa (B). Perfil electroforético de la cepa EAEC O42. Se observó contaminación de las fracciones enriquecidas de OMP's, por componentes celulares lo que dificultó identificar las diferencias para la expresión de proteínas de alto peso molecular entre ambos medios de cultivo. Carriles: 1, marcador de pesos moleculares; 2, 4 medio LB; 3, 5 LBSFe. Gel de poliacrilamida al 12%, tinción azul Coomassie.

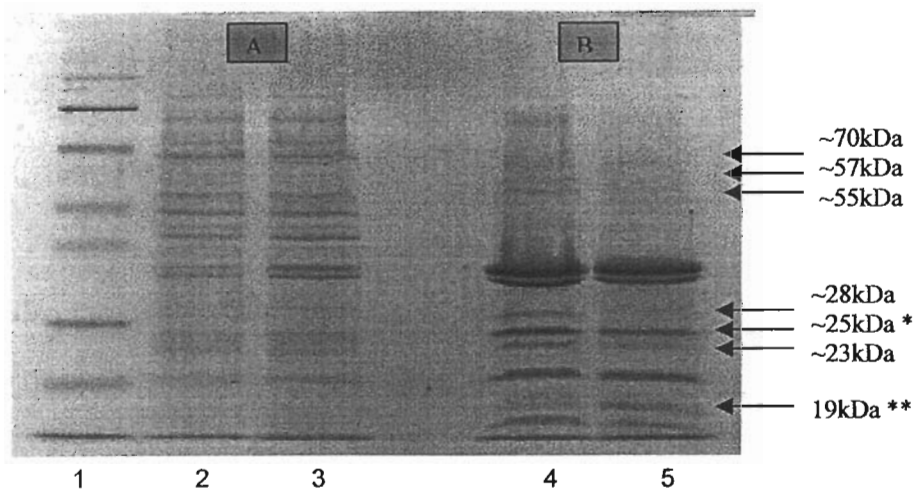


Fig. 4 SDS-PAGE de proteínas de membrana interna (A) y externa (B) de la cepa EAEC O42 bajo dos condiciones de cultivo. Carriles: 1, marcador de pesos moleculares; 2, 4 medio LB; 3, 5 LBSFe. Gel de poliacrilamida al 12%, tinción azul Coomassie.

\*Precursor de OmpW

\*\* Dps

### **SDS-PAGE de proteínas secretadas**

Además del análisis de proteínas estructurales de la bacteria, se analizó si las condiciones de cultivo influían en la expresión de proteínas secretadas. La cantidad obtenida en los diferentes ensayos fue constante en ambas condiciones de cultivo (LB y LBSFe) de la cepa EAEC O42.

El análisis del perfil electroforético obtenido de las proteínas secretadas al sobrenadante del medio de cultivo y precipitadas con sulfato de amonio, mostró que en el medio LBSFe la expresión de dos proteínas de alto peso molecular (114 y 104 kDa) que probablemente corresponden a Pic y Pet disminuye. En el análisis se observó en ambas condiciones de cultivo una proteína de ~ 49 kDa, aunque en el medio LB la expresión fue mayor. Se identificó además una fracción proteica de ~ 50 kDa presente únicamente en el medio LBSFe (Figura 5).

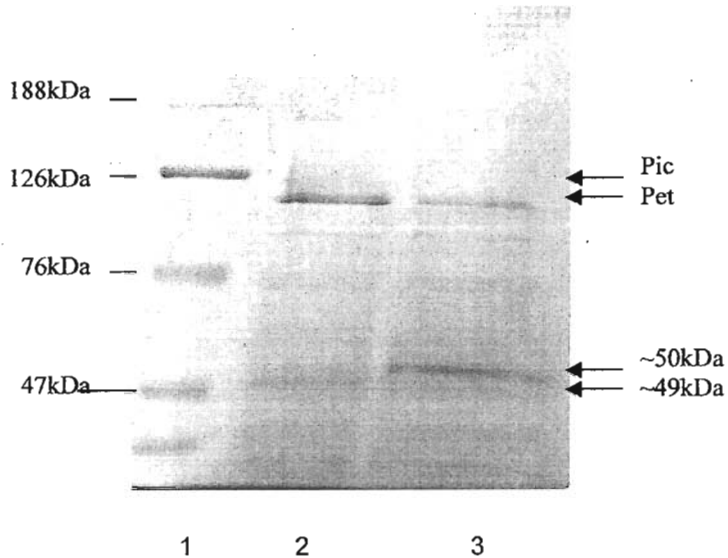


Fig. 5. SDS-PAGE de las proteínas secretadas. Se observa disminución en la expresión de Pet y Pic en los cultivos de la cepa O42 en medio LBSFe, así como la presencia de dos subfracciones una de 49 kDa que disminuye y otra de 50 kDa que aparece. Carriles; 1) marcador de pesos moleculares, 2) medio LB y 3) medio LBSFe. Gel de poliácridamida al 10%, tinción azul Coomassie.

### ***Inmunoelectrotransferencia (Western blot) de Proteínas Secretadas.***

El análisis por Western blot con anticuerpos policlonales preparados en conejo contra Pet y Pic permitieron corroborar que las proteínas de 114 y 104 kDa correspondían a Pic y Pet y que la fracción de ~ 49 kDa es un producto de degradación de Pet (Figura 6). Con respecto a la fracción observada de ~ 50 kDa al parecer es una proteína no reportada previamente en cepas EAEC y cuya expresión se ve favorecida en el medio LBSFe.

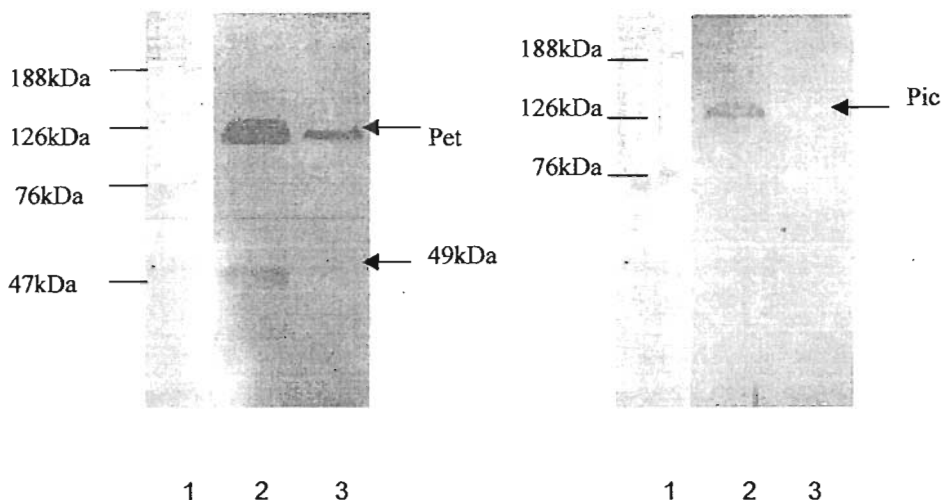


Fig. 6. Western blot. Anticuerpos  $\alpha$  Pic y  $\alpha$  Pet permitieron corroborar que las proteínas observadas en el gel de poliacrilamida de 104 y 114 kDa corresponden a Pic y Pet, observándose una disminución de la concentración de ambas en medio LBSFe. Carriles; 1 marcador de pesos moleculares, 2 medio LB, 3 medio LBSFe.

### ***Secuencia N-terminal***

Para conocer la identidad de las proteínas reguladas por los niveles de hierro observadas en los ensayos de SDS-PAGE y Western blot, se decidió determinar la secuencia de las mismas. Los resultados obtenidos hasta el momento permitieron conocer la identidad de las OMP's de 19 y 25 kDa. La secuencia de la porción amino terminal de los primeros 20 aminoácidos de la primera **STAKLVKSKATNLLYTRNDV**, corresponden a la proteína Dps (Acceso Gene Bank AAC73899). Con respecto a la de 25 kDa se identificó la secuencia **HEAGEFFMRAG**, que corresponde a los 11 primeros aminoácidos del precursor de la proteína Omp W (Acceso Gene Bank P21364). La secuencia de las otras proteínas identificadas no se pudo obtener por la escasa cantidad que se obtuvo de las mismas.

## IX. DISCUSIÓN

Diferentes propiedades biológicas como: actividad de mucinasa, capacidad para romper el complemento y de hemaglutinina entre otras, han sido descritas en Pic. Recientemente Hernández et al (2002) reportó que ésta proteína presentaba actividad de hemoglobina proteasa y capacidad de unión a la hemina formando un complejo Pic- hemina. Tal propiedad hizo suponer la participación de Pic como un mecanismo de captación de hierro utilizado por la bacteria. Durante la infección del hospedero un mecanismo de defensa de éste es la eliminación de hierro libre y una forma de contrarrestar estas restricciones de hierro es a través de la activación de genes relacionados con transporte y captación de este elemento. Los resultados obtenidos en el presente trabajo mostraron que el crecimiento de las cepas se dificultó en un medio depletado de hierro (LBD), la evaluación del crecimiento de la cepa p56 (hiper productora de Pic) en este medio permitió observar que el crecimiento se desarrolló en forma lenta y escasa. Tal observación señala que el hierro es un elemento importante para el crecimiento de la bacteria en particular de una clona de origen no silvestre como es el caso de HB101 p56.

El mismo ensayo realizado con la cepa de *Escherichia coli* enteroagregativa O42 de origen silvestre crecida en un medio en el que se eliminó el hierro (Létoffé, 1994) y posteriormente se suplemento con  $\text{FeSO}_4$  (LBSFe), permitió observar que el crecimiento en estas condiciones es satisfactorio con una fase de adaptación (lag) de aproximadamente 4 hrs (Fig. 2b), similar a la que se presenta en un medio completo. Estos resultados nos permitieron seleccionar el medio, las condiciones de cultivo más convenientes y la cepa, para realizar el análisis de expresión de proteínas.

Los perfiles electroforéticos de la cepa EAEC O42 en medio completo (LB) y sin hierro (LBSFe), mostraron que la disminución en la concentración de este



elemento, probablemente regula la expresión tanto de proteínas de superficie como de las que se secretan al medio (Figuras 4,5).

Al realizar el análisis de los perfiles de OMP's obtenidos con ambos medios de cultivo, se observó que la expresión de dos proteínas una de ~ 25 y otra de 23 kDa disminuía en el medio LBSFe. Con el propósito de establecer su identidad se enviaron a secuenciar. Por el hecho de que la concentración de la proteína de ~ 23kDa obtenida en la transferencia resulto pobre, únicamente se obtuvo la secuencia de la porción amino terminal de la de ~ 25 kDa. El reporte señalo que se trataba del precursor de Omp W, proteína que se ha reportado como receptor de la colicina S4 en *Escherichia coli* (PilsI, 1999). Además de su función como receptor, poco se conoce en relación a otra u otras funciones de esta proteína en la célula bacteriana. Con relación a la proteína de ~ 23kDa, probablemente corresponda a Omp W ya que el peso molecular reportado para ésta es de 21kDa, que es muy cercano a la estimación hecha en nuestro estudio. Consideramos lo anterior por el hecho de que las dos proteínas ~ 25 kDa y ~ 23kDa muestran un comportamiento de expresión similar (disminución en medio LBSFe y expresión en mayor cantidad en LB). En el estudio realizado por PilsI et al (1999), señalan que tanto Omp W (21kDa) como su precursor (24kDa) se observan en un perfil electroforético obtenido de OMP's para *E. coli*, situación que se observó en el estudio (figura 4).

El porque de la disminución de la expresión de ambas proteínas podría estar relacionado con una estrategia de la bacteria, para aumentar sus posibilidades de supervivencia ante condiciones poco propicias. Un estado poco favorable para los patógenos se presenta durante la infección, ya que los microorganismos que forman parte de la biota liberan productos como las colicinas con el propósito de eliminar a los extraños (Smajs, 2001). El hecho de que la bacteria disminuya la expresión de Omp W y su precursor limita la posibilidad de que las colicinas puedan introducirse y matar a la bacteria. Otra posible explicación al respecto podría estar relacionada con la proteína Fur, la cual regula la expresión de

genes relacionados con sistemas de captación de hierro . Lo anterior ha sido observado en algunas proteínas receptoras de colicinas de *Shigella sp* y *E. coli* enteroinvasiva , cuya expresión esta regulada por los niveles de hierro en el medio de cultivo (Smajs , 2001) .

Otra de las proteínas que se identificó en el estudio mostró un peso de 19kDa, con respecto a esta se observó un ligero incremento en el medio LBSFe. Al analizar la secuencia amino terminal que nos fue reportada, se encontró que ésta correspondía a la proteína Dps( DNA-binding protein from starved cells). Los trabajos realizados con *E. coli* señalan que ésta proteína es secretada principalmente durante la fase exponencial y estacionaria del crecimiento, la función que se ha identificado en la misma es de protección en situaciones de estrés múltiple (Nair ,2004).

El aumento en la expresión de esta proteína en LBSFe puede estar relacionado con varios eventos. Por un lado tenemos que el estudio del perfil electroforético se realiza con las células bacterianas en fase estacionaria y en un medio con bajos niveles de hierro. En ambos casos los niveles de nutrientes son bajos lo que constituye un estado de estrés, factor este último relacionado con la expresión de Dps. Existen reportes que señalan que esta proteína constituida por un dodecamero envuelve al DNA cromosomal para protegerlo (Andrews, 2003). Lo anterior asegura que no se presenten cambios mutacionales que afecten la supervivencia de la célula. También ha sido reportado que la unión de Dps al DNA, regula la expresión de genes que codifican diferentes proteínas (Nair, 2004). Lo anterior podría ser una explicación de lo observado en nuestro estudio, en relación a los cambios en los perfiles de OMP's obtenidos en las diferentes condiciones de cultivo de la cepa O42. Otra posibilidad con respecto a lo observado es el hecho de que durante la fase exponencial de crecimiento en el medio LBSFe, la bacteria activó genes relacionados con sistemas de captación de hierro , como son la producción de sideroforos que atrapan y transportan dicho elemento a la célula. Es probable que los niveles de hierro dentro de la

bacteria se incrementen en tal medida que resulta tóxico para la misma. En este caso se ha observado que Dps tiene una estructura semejante a la ferritina (Nair, 2004), y se encarga de eliminarlo evitando de esta manera que el DNA de la bacteria sea dañado a través de estrés oxidativo.

No fue posible conocer la identidad de las proteínas de ~ 28,55,57 y 70 kDa, ya que la cantidad de proteína obtenida fue insuficiente para poder secuenciarlas. Las proteínas de ~ 28 kDa y 70 kDa son particularmente interesantes, la primera porque su expresión en LBSFe es inhibida casi completamente y la segunda por encontrarse dentro del peso molecular entre 75 y 85 kDa, de algunos de los receptores que participan en los sistemas de captación de hierro identificados en diferentes organismos y cuya expresión se observa bajo condiciones limitantes de hierro (Clarke, 2003). Con relación a las proteínas Pic y Pet se observó que su expresión está regulada por los niveles de hierro en el medio, éste resultado es el primer reporte al respecto situación que resulta importante por la posible participación de ambas proteínas en la patogénesis de EAEC. Sin embargo, este resultado también influye en la posible participación de Pic como uno de los mecanismos de captación de hierro utilizado por la bacteria. Con respecto a lo anterior se puede señalar que la bacteria tiene diferentes mecanismos involucrados en la captación y transporte de hierro (Okeke, 2004), los resultados señalan que esta al parecer no es una de las funciones primordiales de Pic. Sin embargo, el hecho de haber realizado nuestro estudio solo con cultivos en fase estacionaria podría estar influyendo en las observaciones.

La utilización únicamente del cultivo la cepa O42 para obtener OMP's y proteínas secretadas permitió tener un panorama general de la activación de algunos mecanismos utilizados por la bacteria en un estado de estrés de nutrientes por medio de la expresión de proteínas. Considerando que esta es una cepa silvestre posiblemente posee genes que codifican para ciertos sistemas, que le permiten habituarse y sobrevivir bajo condiciones ambientales en el

hospedero que pueden parecerse a las condiciones de cultivo utilizado en este experimento.

Finalmente los resultados obtenidos ejemplifican como el ambiente externo influye sobre la activación o inhibición de algunos genes dependiendo de las necesidades de las células. La expresión de proteínas como Dps y Omp W al parecer esta relacionada con la protección y aumento en el periodo de supervivencia de las bacterias en un medio deficiente de nutrientes (LBSFe) . Sin embargo no se observó claramente la expresión de proteínas involucradas con algún mecanismo de captación de hierro , a pesar de que se trabajó bajo condiciones depletadas de hierro y considerando que la cepa O42 posee genes para la producción de los sideroforos ; yersiniabactina y enterobactina , para receptores de compuestos de hemo , así como para la producción de la proteína Pic (Okeke,2004). A pesar de esto aun falta la identificación de las OMP's de ~ 28 ,55 ,57 y 70 kDa así como de la proteína secretada al medio LBSFe de ~ 50 kDa para poder concluir acerca del comportamiento de la cepa O42 bajo niveles limitantes de hierro.

## X. CONCLUSIONES

- El hierro es un elemento esencial para el crecimiento de cepas de EAEC .
- Durante la fase estacionaria de crecimiento la proteína Pic no tiene un papel fundamental para la supervivencia de la cepa O42. Así mismo bajo las condiciones del estudio no es posible establecer si Pic esta relacionada con la captación y transporte de hierro.
- Bajos niveles de hierro así como de otros nutrientes en el medio de cultivo determinan la expresión o inhibición de genes que codifican proteínas, cuya función esta relacionada con la supervivencia de la cepa O42 ( Omp W y Dps) durante un periodo más largo de tiempo.
- Se requieren otros estudios para definir de manera más contundente el comportamiento de EAEC bajo condiciones limitantes de hierro, ya que en el presente no fue posible identificar varias de las proteínas reguladas por este elemento.
- Trabajar con la cepa silvestre O42 permitió conocer el comportamiento de EAEC en condiciones limitantes de hierro, sin embargo, es importante utilizar algunas otras cepas EAEC aisladas de niños con el propósito de conocer si el comportamiento es uniforme o cambia dependiendo de las características de cada cepa.

## XI. REFERENCIAS

1. Ausbel, F.M., R.brent, R.E. Kington, D.D. More,J.G.Seidman. 1987. Analysis of proteins. In: Ausbel , F. M., et al.(de) Current Protocols in Molecular Biology. Green Publishing Associates and Wiley-Intersciencie, New York, Chap. 10,p.10.0.1-10.12.9.
2. Agin S. T. and M. K. Wolf. 1997. Identification of a family of intimins common to *Escherichia coli* causing attaching-effacing lesions in rabbits, humans , and swine. Infect. Immun. 42.1: 320-326.
3. Andrews C. S. , A. K. Robinson and F. Rodríguez-Quiñones .2003.Bacterial iron homeostasis. Rev. Microbiol. 215-237.
4. Base de datos INEGI/ SSA. Direccion general en salud.
5. Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. Anal. Biochem. 72: 248-50.
6. Brenner. et al. 1986. Bergey's manual of systematic bacteriology.1: 409 – 515.
7. Braun V . and M. Braun . 2002. Active transport of iron and siderophore antibiotics. Curr Opin Microbiol. 5: 194-201.
8. Clarke E. T , L. W. Tari and H.J Vogel. 2003. Structural biology of bacterial iron uptake systems. 1-21.
9. Farmer, J. J. , B. R. Davis, F.W. Hickman-Brenner, A. Wathen-Grady , et al. 1985.Biochemical identification of new species and biogrups of *Enterobacteriaceae* isolated from clinical specimes. J. Clin. Microbiol.21:46-76.
10. Fedorka-Cray, M., M. J. Huether, D. L. Stine and G. A. Anderson . 1990. Efficacy of a cell extract from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1 against disease in swine. Infect. Immun. 58: 358-365.

11. Eslava C. J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro, y A. Cravioto. 1993. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroagregative *Escherichia coli*, abstr. B-105. In Abstracts of the 93<sup>rd</sup> General Meeting of the American Society for Microbiology.
12. Henderson I. R. , F. Navarro- García and J.P Nataro . 1998 The great escape: Structure and function of the autotransporter proteins. Trends Microbiol. 6: 370-378.
13. Hantke K .2001. Iron and metal regulation in bacteria. Curr Opin Microbiol. 4:172-177.
14. Henderson I. R. , J. Czeczulin , C. Eslava , F. Noriega and J. P. Nataro . 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroagregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 67.11: 5587 -5596.
15. Juárez M. N. , J. P. Pardo Et al. 2001. Mensaje Bioquímico. Departamento de Bioquímica .Fac. Medicina . UNAM . XXV : 149-167 .
16. Koneman W. et al. 1999. Diagnostico microbiológico . 5<sup>ta</sup> edición . p.171-200.
17. Létoffé S. , J. M. Ghigo and C. Wandersman . 1994. Iron acquisition from heme and hemoglobin by *Serratia marcescens* extracellular protein. Microbiol. 91:9876 – 9880.
18. Nair S. and S. E. Finkel. 2004. Dps protects cells against multiple stresses during stationary phase. J. Bacteriol.186.13:4192-4198.
19. Nataro P. J. and J. B. Kaper.1998 . Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11.1: 142-201.
20. Nataro P. J. , T. Steiner and R. L. Guerrant. 1990 . Enteroagregative *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. 4.2: 251- 260.

21. Okeke N. I. and J. Nataro . 2001. Enteroaggregative *Escherichia coli* . Lancet Infect. dis. 1: 304 – 313.
22. Okeke N. I. , I. C. Scaletsky , E.H. Soars , L.R. Macfarlane and A.G. Torres . 2004. Molecular Epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli* . J. Clin. Microbiol. 42.1: 36- 44.
23. Otto R. B. , S. J.M. van Dooren , J. H. Nuijens , J. Luirink and B. Oudega. 1998. Characterization of a Hemoglobin Protease secreted by the pathogenic *Escherichia coli* Strain EB1. J. Exp. Med. 188.6: 1091 – 1103.
24. Ramirez. R.M. , et al. 2000. Manual de prácticas de microbiología. 135-166.
25. Russo A. T. , C.D. McFadden , U.B. Carlino-MacDonald, J. M. Beanan .et al. 2002. IroN functions as a siderophore receptor and Is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. Infect. Immun. 70.12:7156 – 7160.
26. Sainz E. T. 1998. Tesis de maestría. Facultad de Química . UNAM.
27. Savarino S.J. , A. Fascano, J. Watson, B.M. Martin, et al.1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of E. coli heat-stable toxin. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 90:3093-3097.
28. Smajs D. and G. M. Weinstock. 2001. The iron-and temperature-regulated *cjrBC* genes of Shigella and Enteroinvasive *Escherichia coli* strains code for colicins Js uptake. J. Bacteriol. 183.13:3958-3966.
29. Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications Proc. Natl. Acad. Sci. USA.79:4530-34.
30. Vial P.A. , R. Browne , H. Lior , et al .1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli* , a putative agent of diarrheal disease. J. Infect. Dis. 158: 70-79.



**31. Villaseca J. M. , F. Navarro, G. Mendoza , J.P. Nataro, A. Cravioto, C. Eslava** .2000. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect. Immun.* 68.10: 5920 – 5927.

**32. Wai S. N. , A. Takade and K. Amako.** 1996. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett.* 135:17-22.

## Anexo I

### Medios de cultivo y Soluciones

#### 1. Caldo Luria Bertani 1L (LB)

10g de Bacto triptona , 5g de Extracto de levadura y 10 g de NaCl , p H 7 .  
Autoclave 121°C , 30 min.

#### 2. Caldo Luria depletado de hierro (LBD)

Preparar Caldo Luria Bertani y adicionar agente quelante 2,2'-Dipyridil (Sigma - Aldrich . St. Louis , USA ) a una concentración final de 2mM . Agitar 30 min. a temperatura ambiente y filtrar . Autoclave 121°C , 15 min. Adicionar la mezcla de sales MgCl<sub>2</sub> ,MnCl<sub>2</sub> ,CuSO<sub>4</sub>,ZnSO<sub>4</sub> a una concentración final de 0.1 mM.

#### 3. Caldo Luria depletado y suplementado con FeSO<sub>4</sub> (LBSFe)

Preparar caldo LDB. Autoclave 121°C , 15 min. y adicionar FeSO<sub>4</sub> a una concentración final de 2mM .

#### 4. Agar Luria 0.5L

7.5 g de Agar bacteriológico , 5 g de Bacto triptona, 2.5 g de Extracto de levadura y 5g de NaCl . Calentar hasta disolución . Autoclave 121°C , 15 min. en caso requerido adicionar tetraciclina a concentración final de 12 µg /ml. vaciar en cajas petri .

#### 5. Gelosa especial 100ml

2 g de Base de gelosa sangre, 1.5 g de Agar bacteriológico , 0.15 g de Extracto de carne . Calentar hasta disolución, p H. 7.4 . Autoclave 121°C ,15 min y vaciar en viales. En caso requerido adicionar tetraciclina a concentración final de 12 µg /ml.

## **Soluciones**

### 1. Buffer de fosfatos 0.07M 4L

1.6 g  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$  y 38 g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  . p H. 8.2 . Almacenar en frío.

### 2. Buffer de fosfatos salino (PBS) 10x. 1L

80 g de NaCl ; 2 g de KCl , 14.4 g de  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  y 2.4 g de  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  . p H. 7.4 . Almacenar en frío.

### 3. Hepes sarcosil 1% 100ml

1g de sarcosil disolver en 100ml de Hepes 10 mM. Almacenar en frío.

### 4. PBS Tween 0.1 y 1% 100ml

0.1ml ó 1ml de Tween disolver en 100ml de PBS 1x. Almacenar a temperatura ambiente.

### 5. Tris – HCl 10 mM (TB) 250ml

0.394 g de Tris – HCl disolver en  $\text{H}_2\text{O}$ . p H 6.8. Almacenar a temperatura ambiente.

### 6. Solución reveladora

30 mg de 4-cloro-1 naftol se disuelven en 10ml de metanol , se adicionan 40 ml de TB y 16.5  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}_2$  al 30%.

## **Geles de poliacrilamida 10 y 12%**

Para 10ml al 10% de gel concentrador: 4ml de  $\text{H}_2\text{O}$  , 3.3ml de acrilamida al 30 % , 2.5ml de tris - base 1.5 M p H. 8.8 , 0.1ml de SDS 10% . Para polimerizar se añaden 0.1ml de persulfato de amonio 10% y 8  $\mu\text{l}$  de TEMED .

Para 5ml de gel separador: 3.4ml de de H<sub>2</sub>O , 0.830ml de acrilamida al 30 % , 0.630 ml de tris -HCl 0.5 M p H. 6.8 , 50 µl de SDS 10% . Para polimerizar se añaden 50 µl de persulfato de amonio 10% y 8 µl de TEMED .

Para el gel al 12% únicamente se modifica a 3.3ml de H<sub>2</sub>O y 4ml de acrilamida al 30 % para el gel concentrador, el resto de los reactivos se adicionan en igual cantidad.