



**UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**UN/M
POSGRADO** 

FACULTAD DE QUÍMICA

PROGRAMA DE ESPECIALIZACIÓN, MAESTRÍA Y
DOCTORADO EN BIOTECNOLOGÍA

**CARACTERIZACIÓN DE RECEPTORES
ANÁLOGOS PARA *Campylobacter jejuni*
PRESENTES EN LECHE MATERNA**

**TESIS
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA**

PRESENTA
MenBIOT. LUZ ELENA CERVANTES VILLAR

TUTOR
DR. GUILLERMO M. RUIZ-PALACIOS Y SANTOS



MÉXICO, D.F.

2006



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



PROGRAMA DE MAESTRÍA Y DOCTORADO EN CIENCIAS BIOQUÍMICAS

Of. No. PMDCB/385/2006

M. en BIOT. LUZ ELENA CERVANTES VILLAR
Alumna del Doctorado en Biotecnología,
Sede Facultad de Química
P r e s e n t e-

Los miembros del Comité Académico reunido el día 27 de marzo del año en curso, conocieron su solicitud de asignación de JURADO DE EXAMEN para optar por el grado de DOCTORA EN BIOTECNOLOGÍA con la réplica de la tesis "Caracterización de receptores análogos para *Campylobacter jejuni* presentes en leche materna", dirigida por el Dr. Guillermo Ruiz-Palacios y Santos.

De su análisis se acordó nombrar el siguiente jurado:

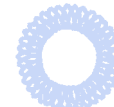
PRESIDENTE	Dr. Edmundo Calva Mercado
VOCAL	Dra. Amelia Farrés González-Saravia
VOCAL	Dra. Ma. del Carmen Wachter Rodarte
VOCAL	Dra. Ma. Amanda Gálvez Mariscal
SECRETARIO	Dra. Bertha González Pedrajo
SUPLENTE	Dra. Marina Gavilanes Ruiz
SUPLENTE	Dr. Edgar Zenteno Galindo

Sin otro particular por el momento, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

Atentamente
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"
Cd. Universitaria, D.F., a 29 de marzo de 2006.
EL COORDINADOR DE LA ENTIDAD ACADÉMICA

DR. ROGELIO RODRÍGUEZ SOTRES

C.c.p. Archivo



Este proyecto fue realizado bajo la dirección del Dr. Guillermo M. Ruiz-Palacios y Santos, en el área de investigación del Departamento de Infectología del Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán, con financiamiento del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Beca y Subsidio 1428) y de los Institutos Nacionales de Salud de EUA (Subsidio HD13021).

El Comité Tutoral que asesoró el desarrollo de esta tesis estuvo formado por:

Dr. Guillermo M. Ruiz-Palacios y Santos	Instituto Nacional de Ciencias Médicas y Nutrición Salvador Zubirán
Dra. Ma. Amanda Gálvez Mariscal	Facultad de Química, UNAM
Dr. David S. Newburg	Program in Glycobiology, University of Massachusetts Medical School

Se reconoce la colaboración del Dr. Pedro A. Prieto, de Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, USA, por la donación de las líneas celulares CHO-FUT1 y CHO-V, así como de las cepas de ratones BG/SJL transgénicas y no transgénicas.

Se reconoce la colaboración de la Dra. Beatriz R. Ruiz-Palacios en la revisión del manuscrito.

Al alcanzar una meta, es necesario hacer un alto en el camino, volver la vista atrás y agradecer a todos los que nos acompañaron en el trayecto.

Al Dr. Guillermo Ruiz-Palacios con admiración y respeto.
Gracias Doctor por haberme dado la oportunidad de trabajar a su lado.
Por ser mentor y maestro, consejero y guía, por su apoyo de siempre.

A la Dra. Beatriz Ruiz-Palacios por brindarme apoyo y confianza.

A todos los miembros del área de Investigación del Departamento de Infectología
Gracias

Gracias a Dios, porque a lo largo de mi camino nunca me ha abandonado.

A la memoria de mis padres, Jesús y José, porque su recuerdo es y será siempre mi guía.

A mi Padre tengo que agradecerle el haberme dado la vida.

A mi tío José, el haberme enseñado a vivirla.

Los dos viven en mi alma.

A mi madre, Pilar, porque para mí representa la fuerza para luchar y salir adelante. Gracias Mamá por darme la vida, por tu amor, por ser ejemplo vivo a seguir.

A mi tía Luz, porque es mi apoyo incondicional. Gracias Lucita por todos tus desvelos, por tus enseñanzas, por tu espíritu inquebrantable que es mi motivación.

Las quiero con todo mi corazón, son lo mejor que Dios me ha dado.

A mis hermanas, Teresa, Rosa y Ana porque los lazos que nos unen van más allá de la sangre.
Gracias por ser quienes son y estar siempre a mi lado.

A Pily y More, porque son mis mejores amigas.
Gracias por todo lo que hemos compartido.

A mis sobrinas y sobrinos:
Chuy, Bety, Juan, Haydeé, Cano, Emilio, Paco, Nevid y Valeria,
porque son la nueva generación que enriquece y da continuidad a nuestra familia.
Los quiero mucho.

A mis amigas y amigos:
Julia, Esther, Lupita, Miriam, Violeta, Isela y Luz del Carmen
Gustavo, Fer Arteaga y Fer Tuz

CONTENIDO

	Página
RESUMEN	1
ABSTRACT	2
INTRODUCCIÓN	3
Epidemiología	3
Microbiología.....	3
Patogénesis.....	3
ANTECEDENTES	5
Interacción bacteria-célula	5
Oligosacáridos como receptores celulares	10
Antígenos de grupo sanguíneo como determinantes en los receptores celulares	12
Oligosacáridos de la leche materna.....	16
Efecto protector de los oligosacáridos de la leche materna	21
Receptores análogos para <i>Campylobacter</i>	22
JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO	23
Primera fase.....	23
HIPÓTESIS.....	26
OBJETIVOS	26
MÉTODOS	27
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	45
PERSPECTIVAS	46
REFERENCIAS.....	47
ANEXOS	58
Anexo I.....	59
Anexo II	60
Anexo III.....	61
Anexo IV.....	62

RESUMEN

Las infecciones por *Campylobacter* son un problema de salud pública en nuestro país y en todo el mundo, especialmente en la población infantil. La adherencia a las células epiteliales del hospedero es uno de los mecanismos de virulencia de los enteropatógenos y es el primer paso para iniciar el proceso de infección. Uno de los mecanismos fundamentales de la patogénesis de *C. jejuni* es su capacidad para adherirse a los receptores celulares de la mucosa intestinal. Se ha propuesto que los epítopes glicanos en la superficie de las células sirven como los receptores iniciales para muchos patógenos. La protección conferida por la leche humana en contra de la diarrea por *Campylobacter* en niños ha sido bien documentada. Los oligosacáridos fucosilados y los glicoconjugados son los principales componentes de la leche humana y se cree que juegan un papel importante en la protección contra las infecciones diarreicas y respiratorias, como receptores análogos solubles que compiten en la unión del patógeno con los receptores celulares de la mucosa. El objetivo de este proyecto fue caracterizar los receptores análogos para *C. jejuni* presentes en la leche humana, mediante estudios *in vitro*, *ex vivo* e *in vivo* y definir la naturaleza molecular y bioquímica de esas estructuras biológicas activas.

La adherencia fue inhibida *in vitro* por la leche humana y, con mayor avidez, por carbohidratos α 1,2-fucosilados que contenían al epítipo de grupo sanguíneo H(O) (Fuc α 1,2Gal β 1,4GlcNAc-R). En los estudios de los mecanismos de adherencia, *Campylobacter*, que normalmente no se adhiere a células de ovario de hámster chino, se adhirió con gran avidez cuando las células se transfectaron con el gen de una α 1,2-fucosiltransferasa humana que causa la sobreexpresión del antígeno H-2; la adherencia fue inhibida específicamente por ligandos H-2 (lectinas *Ulex europaeus I* y *Lotus tetragonolobus*, y el anticuerpo monoclonal anti-H-2), homólogos de H-2, y oligosacáridos de leche humana. Los oligosacáridos de la leche humana inhibieron la colonización por *Campylobacter* de ratones *in vivo* y en la mucosa intestinal humana *ex vivo*. La colonización por *Campylobacter* en los ratones lactantes era inhibida si las madres habían sido transfectadas con el gen de la α 1,2-fucosiltransferasa humana, que causaba la expresión del antígeno H(O) en su leche.

Proponemos que un componente importante del receptor intestinal para *Campylobacter* es el antígeno de tejido-grupo sanguíneo H-2 y que la leche materna contiene oligosacáridos fucosilados capaces de inhibir la unión de la bacteria a su receptor. Los resultados de este estudio apoyan el concepto de que los oligosacáridos y glicoconjugados de leche materna contribuyen a la protección de los lactantes en contra de la infección por *Campylobacter*.

Compuestos sintéticos similares a estos oligosacáridos podrían convertirse en una nueva clase de agentes antimicrobianos profilácticos y terapéuticos, con mecanismos distintos a los desarrollados por los antibióticos actuales.

ABSTRACT

Campylobacter infections are a major public health problem in our country and worldwide, especially among children. Adherence to epithelial host cells is an important virulence mechanism of enteropathogens and is the first step to initiate the process of infection. One of the fundamental mechanisms of *C. jejuni* pathogenesis is its ability to bind to cell receptors on the intestinal mucosa. Glycan surface epitopes have been hypothesized to serve as the initial cell receptors for many pathogens. The protection conferred by human milk against *Campylobacter* diarrhea in children has been well documented. Fucosylated oligosaccharides and glycoconjugates are major components of human milk and are thought to play an important role on protection against diarrheal and respiratory infections as soluble receptor analogues that compete with pathogen binding to cellular receptors of the mucosa. The aim of this project was to characterize the receptors analogues for *C. jejuni* present in human milk by means of *in vitro*, *ex vivo* and *in vivo* studies, and to define the molecular and biochemical nature of these biological active structures.

Binding was inhibited *in vitro* by human milk and, with high avidity, by α 1,2-fucosylated carbohydrate moieties containing the H(O) blood group epitope (Fuc α 1,2Gal β 1,4GlcNAc-R). In studies on the mechanism of adherence, *Campylobacter*, which normally does not bind to Chinese hamster ovary cells, avidly bound when the cells were transfected with a human α 1,2-fucosyltransferase gene that caused overexpression of H-2 antigen; binding was specifically inhibited by H-2 ligands (lectins *Ulex europaeus I* and *Lotus tetragonolobus* and H-2 monoclonal antibody), H-2 mimetics, and human milk oligosaccharides. Human milk oligosaccharides inhibited *Campylobacter* colonization of mice *in vivo* and human intestinal mucosa *ex vivo*. *Campylobacter* colonization of nursing mouse pups was inhibited if their dams had been transfected with a human α 1,2-fucosyltransferase gene that caused expression of H(O) antigen in milk.

We suggest that an important component of the intestinal receptor for *Campylobacter* is the histo-blood group antigen H-2, and human milk contains fucosylated oligosaccharides capable of inhibiting the bacterial binding to its receptor. The results of this study support the concept that oligosaccharides and glyconjugates from human milk contribute to the protection against *Campylobacter* infection in children.

Synthetic compounds similar to these oligosaccharides could become in a new type of prophylactic and therapeutic antimicrobial agents, with different mechanisms of action to those developed by the present antibiotics.

INTRODUCCIÓN

Epidemiología

Campylobacter jejuni es una de las principales causas de diarrea en todo el mundo (1-3). En nuestro país, la incidencia de infecciones por *Campylobacter* en niños menores de 5 años es de 2.1 episodios/niño/año, con una relación de enfermedad:infección de 50% durante los primeros 6 meses de vida, que disminuye con la edad (4). En los países industrializados, la frecuencia de infección sintomática por *Campylobacter* varía de 4 a 14% mientras que la infección asintomática oscila entre 0 y 1.5% (5), siendo el número de infecciones intestinales significativamente mayor que el reportado para otros patógenos entéricos incluyendo *Salmonella*, *Shigella* y *Escherichia coli* O157:H7 (6-8). Aún cuando la diarrea es la presentación clínica más frecuente de la infección por *C. jejuni*, se le ha asociado con bacteremias (9) y otros padecimientos extraintestinales (2). La principal complicación de la enteritis por *Campylobacter* es el Síndrome de Guillain-Barré, una neuropatía progresiva aguda considerada como la primera causa de parálisis flácida en el mundo, que ocurre en aproximadamente 1 de cada 1000 casos (2,10,11). Considerando las infecciones emergentes, *Campylobacter* es la causa bacteriana más común de infección alimentaria (8,12). La carga económica global de las infecciones por *Campylobacter* es substancial. Sólo en los Estados Unidos se ha estimado que anualmente el costo de las enfermedades en humanos causadas por esta bacteria es de 1.3 a 6.2 billones de dólares, pero si además se consideran las secuelas asociadas con el síndrome de Guillain-Barré, el costo rebasa los 8 billones de dólares (13); en Europa, específicamente en Holanda, se calcula un gasto promedio anual aproximado de 21 millones de euros (14).

Microbiología

El género *Campylobacter* pertenece a la familia campylobacteriaceae, son microorganismos Gram negativos, no formadores de esporas, con forma típica de S o espiral y móviles por flagelos polares únicos que pueden estar presentes en uno o ambos extremos de la bacteria. *C. jejuni* es microaerófilico, ya que requiere de una atmósfera del 5 al 8% de oxígeno, y su temperatura óptima de crecimiento es de 42°C; a diferencia de otros enteropatógenos Gram negativos, *C. jejuni* no fermenta ni oxida carbohidratos. La bacteria se caracteriza por un bajo contenido de G+C, que va del 32 al 35% en su genoma pequeño y circular (15).

Patogénesis

Poco se conoce acerca de la fisiopatología de la infección por *Campylobacter*; sin embargo, se han descrito diversos factores de virulencia que podrían estar implicados en el proceso patogénico.

Toxinas. Se ha descrito la producción de una enterotoxina (CJT) similar a la CT de *Vibrio cholerae* y a la toxina termolábil (LT) de *E. coli*, que se asocia con una diarrea de tipo secretor (16). Las cepas enterotoxigénicas se aíslan más frecuentemente de pacientes sintomáticos (17), además de que en ellos provoca una respuesta inmunológica importante (18).

Por otra parte, la producción de citotoxinas se ha relacionado con el desarrollo de procesos inflamatorios en los pacientes infectados (19,20); las citotoxinas se han caracterizado y clasificado por el efecto citopático diferencial que provocan en diversas líneas celulares (21,22).

Movilidad. La movilidad que le confiere el flagelo le permite a la bacteria alcanzar la mucosa del íleon y colon, por las que muestra un tropismo específico (23-25). Estudios experimentales en conejos y pollos (26,27), así como en líneas celulares (28,29), han demostrado la importancia del flagelo en el proceso patogénico. Cepas aflageladas o con mutaciones en el gen *flaA* pierden la capacidad de colonizar *in vivo* (30) y de adherirse a cultivos celulares *in vitro* (31,32). Aún más, la capacidad patogénica de dos variantes de la cepa de *C. jejuni* NCTC 11168 que difieren en movilidad, invasión a células Caco-2 y colonización de pollos se ha asociado al sistema de regulación de la expresión de sus genes estructurales flagelares (33,34).

Adherencia e invasión. Finlay y Falkow (35) establecieron que la habilidad para adherirse a la superficie de las células del hospedero era un paso necesario para la colonización exitosa y para la producción de enfermedad por un patógeno microbiano. Diversos estudios han demostrado la capacidad de *C. jejuni* para adherirse e invadir cultivos celulares (36-39); y se ha sugerido que existe una correlación importante entre la habilidad de *C. jejuni* para invadir células Caco-2 y su capacidad de colonización *in vivo* en intestino de pollo (40). En nuestro laboratorio se han estandarizado métodos *in vitro* que nos han permitido evaluar la capacidad de *C. jejuni* para asociarse a células epiteliales HEp-2 (17,41). Se demostró que tal asociación estaba relacionada con el cuadro clínico del cual fue aislada la cepa, es decir, el número de cepas adherentes fue significativamente mayor entre los niños con diarrea que en los niños asintomáticos (41).

Uno de los propósitos en los estudios de los mecanismos de adherencia bacteriana ha sido el desarrollo eventual de medidas para prevenir la adhesión de las bacterias patógenas a las superficies mucosas; de allí se desprende la importancia de definir la interacción bacteria-receptor y de la búsqueda de receptores análogos capaces de interferir con la adherencia microbiana y la colonización *in vivo*.

ANTECEDENTES

Interacción bacteria-célula

Disponibilidad de nutrientes y quimiotaxis. Durante su proceso evolutivo, las bacterias han desarrollado mecanismos variados y complejos que les permiten explotar virtualmente cualquier nicho biológico. Así, la superficie y el citoplasma de las células eucarióticas representan sitios nutricionalmente ricos y privilegiados donde el microorganismo puede persistir (42,43).

Existe un tropismo específico bacteria-célula determinado por factores que se derivan tanto de la bacteria como de la célula hospedera, muchos de los cuales aún son desconocidos; además, algunos parámetros bioquímicos entre los que se incluyen el pH, disponibilidad de nutrientes, sustancias promotoras del crecimiento, entre otros, pueden ser factores moduladores potenciales del proceso de atracción. Más aún, algunos mecanismos de virulencia muy especializados no pueden ser expresados sino hasta el momento en que el organismo infectante encuentra un medio ambiente propicio dentro de su hospedero (43).

Adherencia. Se ha establecido que la adherencia es un prerrequisito para que la bacteria pueda colonizar las superficies mucosas, ya que si carece de la habilidad para adherirse podría ser rápidamente eliminada por los mecanismos de defensa del hospedero, esto es, el movimiento peristáltico, la actividad ciliar, etc. (44). En general, la adherencia está mediada por el reconocimiento entre antígenos de superficie bacterianos denominados adhesinas y receptores disponibles en la superficie de las células epiteliales; este reconocimiento determina el curso de la interacción procariótica-eucariótica al disparar una serie de eventos que le permitirán a la bacteria multiplicarse de manera eficiente para asegurar su transmisión exitosa a un nuevo hospedero susceptible. En el caso de las bacterias patógenas, representa el inicio del proceso patogénico que finalmente dará lugar a un padecimiento determinado (42).

Adhesinas bacterianas. Se ha propuesto que las estructuras superficiales de *Campylobacter* podrían desempeñar un papel decisivo en la interacción con el receptor celular. Se han descrito diversas proteínas de membrana externa (PMEs) que podrían estar involucradas en la adherencia y que se denominan adhesinas. De Melo y Pechère (45) identificaron cuatro PMEs con pesos moleculares de 28, 32, 36 y 42 kDa en los extractos proteicos de cepas invasivas de *C. jejuni* que se adherían a células HEp-2. Fauchère (46) por su parte, encontró que algunos antígenos bacterianos involucrados en la adherencia a células HeLa se localizaban en la fracción proteica de PMEs con pesos moleculares entre 26 y 30 kDa, por lo que la denominó fracción de unión a células (CBF, por sus siglas en inglés, Cell-Binding Fraction). En la fracción se destacaron dos proteínas principales altamente inmunogénicas de 27 y 29 kDa, CBF1 y CBF2 respectivamente, cuyos antisueros inhibían la adherencia de la bacteria a las células epiteliales (47). Mediante extracción ácida y cromatografía, Pei y col. (48) purificaron y caracterizaron cuatro antígenos proteicos básicos con pesos moleculares de 28 kDa (PEB1), 29 kDa (PEB2), 30 kDa (PEB3) y 31 kDa (PEB4), similares en su composición de aminoácidos, pero diferentes en su secuencia amino terminal, demostrando, además, que tanto PEB1 como PEB3 estimulaban la respuesta inmune durante la infección natural. Se demostró que PEB1 era un antígeno común conservado en todos los aislados de *C. jejuni*, localizado en la superficie bacteriana y que

funcionaba como una molécula de adherencia importante y que era homólogo al componente de unión en los sistemas ABC transportadores de otras bacterias Gram negativas (49). Posteriormente observaron que PEB1 poseía características muy similares a las de CBF1, y que la inactivación del locus *peb1A* reducía de manera significativa tanto la adherencia de la bacteria a las células, como la tasa y duración de la colonización intestinal en ratones, aunque no las abolía por completo. Por ello sugirieron que PEB1A era una adhesina importante de *C. jejuni*, pero no la única (50).

Un hecho demostrado es que *C. jejuni* es capaz de adherirse a la fibronectina celular, una glicoproteína de 220 kDa presente en los sitios de contacto célula-célula en el epitelio gastrointestinal y que es un componente importante de la matriz extracelular, por medio de una proteína de 37 kDa denominada CadF (*Campylobacter* adhesin to Fibronectin), que es conservada en las cepas de *C. jejuni* y provoca una respuesta inmunogénica en los individuos infectados (51). Monteville y col. (52) proponen que *C. jejuni* transloca el epitelio intestinal, se une a la fibronectina y entonces invade la célula blanco a través de la superficie basolateral. Se ha identificado un solo dominio en la proteína CadF que es capaz de unirse a la fibronectina, constituido por una secuencia de cuatro aminoácidos, fenilalanina-arginina-leucina-serina (FRLS); está expuesto en la superficie bacteriana y no se ha reportado en otras proteínas bacterianas con actividad de unión a fibronectina (53).

Por otro lado, se ha descrito la clonación de genes que codifican para diferentes proteínas que pudieran estar involucradas en la adherencia de *Campylobacter* a las células epiteliales. Una de ellas corresponde a una adhesina putativa de 869 aminoácidos denominada P95, cuya secuencia genética muestra marcada homología con otros factores de virulencia involucrados en adhesión de otros géneros bacterianos, como *Bordetella* spp. y *Haemophilus* ssp. (54). La segunda es una lipoproteína de 42.3 kDa expuesta en la superficie bacteriana y denominada JlpA (*jejuni* lipoprotein A) que es específica de la especie, mutantes con remociones o inserciones en el gen *jlpA* mostraron una marcada disminución de la adherencia a células HEP-2, en comparación con la cepa silvestre (55).

El lipopolisacárido (LPS) es un componente de superficie de membrana externa de las bacterias Gram negativas. En *C. jejuni*, su síntesis está determinada por un fragmento de DNA cromosomal de 16 kb; el fragmento, denominado *wla* está constituido por 11 genes homólogos: tres genes de síntesis de azúcares, dos de transporte y seis de glicosiltransferasas (56). El primer gen secuenciado en *wla* demostró homología con los genes *galE* de otras especies, codifica para una UDP-galactosa epimerasa y cataliza la interconversión de UDP-galactosa y UDP-glucosa. Estudios *in vitro* demostraron que las cepas de *C. jejuni* con mutaciones en el gen *galE* disminuían su capacidad de adherencia e invasión en células INT407, y aún cuando no se alteraron sus potenciales de colonización en pollos recién nacidos, se propone que podría desempeñar un papel importante en la interacción bacteria-célula (57).

Invasión. Muchos microorganismos patógenos no sólo son capaces de adherirse a una célula, sino que pueden penetrar y sobrevivir dentro de ella. Los mecanismos utilizados por estos organismos para mantener su estilo de vida intracelular varía considerablemente, pero muchos de ellos involucran la utilización de las estructuras del citoesqueleto de la célula hospedera (58). En las células eucariotas, el citoesqueleto es un complejo arreglo de proteínas entre las que se destacan la actina, constituida por microfilamentos y la tubulina, que está conformada por microtúbulos. El citoesqueleto es necesario para efectuar diferentes procesos celulares, entre los que se incluyen el movimiento celular y subcelular y las interacciones célula-célula y célula-

sustrato; asimismo, define la forma de la propia célula (59). Se ha observado que la actina forma núcleos en sitios asociados a la membrana celular que se conocen como adhesiones focales; así, las adhesiones focales son los sitios donde los paquetes de microfilamentos se unen a través de la membrana celular con las moléculas de adhesión asociadas a ella (60).

Hasta el momento no se ha definido el proceso exacto por el que *Campylobacter* se adhiere y penetra en la célula epitelial. Los estudios que reportan el papel del citoesqueleto en la penetración de la bacteria varían dependiendo de la cepa bacteriana y de la célula hospedera utilizada. Los primeros estudios realizados por De Melo y col. (61) y Konkel y col. (62), establecieron que *C. jejuni* podría entrar a la célula por un proceso dependiente de microfilamentos, ya que por microscopía electrónica se observaba una gran concentración de filamentos de actina en el sitio de contacto bacteria-célula, pero sin involucrar microtúbulos. Por otra parte, Oelschlaeger y col. (63) y Russell y Blake (37) propusieron que la penetración de la bacteria en la célula era un proceso endocítico que dependía exclusivamente de microtúbulos. Estudios realizados con la cepa de *C. jejuni* 81-176 demostraron que durante el proceso de invasión de las células epiteliales la bacteria se asociaba con los microtúbulos y con la dineína, que es una proteína motora involucrada en el transporte vesicular, dependiente de microtúbulos, de la superficie de la célula a la región perinuclear (59,64). Estudios posteriores demuestran que el proceso de invasión es un fenómeno activo en el que participan bacterias y células, ya que la inhibición de la síntesis proteica bacteriana por cloranfenicol, el uso de citocalasina B ó micalolide B, que despolimerizan la actina e inhiben el proceso fagocítico, así como de citocalasina D ó nocodazol que despolimerizan los microtúbulos, provoca una disminución importante en el grado de penetración de la bacteria. Los datos sugieren que la estrategia de invasión de *C. jejuni* puede depender de microfilamentos y microtúbulos, en una acción concertada de cooperación para facilitar la penetración bacteriana (38,60).

Citotoxicidad. Aun cuando se ha descrito la producción de diferentes citotoxinas por *Campylobacter* (20), la mejor caracterizada es la CDT (Cytolethal Distending Toxin), que pertenece a una familia de citotoxinas que inducen la distensión celular progresiva y finalmente la muerte en diferentes líneas celulares, entre las que se incluyen HeLa, HEp-2, CHO, Vero y Caco-2 (65). En *Campylobacter*, la actividad de CDT está determinada por tres genes adyacentes denominados *cdtA*, *cdtB*, y *cdtC*, que codifican para proteínas con pesos moleculares de 30, 29 y 21 kDa respectivamente (66). Se ha propuesto que la holotoxina CDT es una toxina heterodimérica del tipo AB₂, en la que CdtB corresponde a la subunidad A activa enzimáticamente, mientras que CdtA y CdtC conforman la subunidad B heterodimérica necesaria para la liberación de CdtB en la célula blanco (67). Estudios realizados con las tres subunidades purificadas y con mutantes con remociones en las regiones conservadas de CdtA y CdtC demostraron que CdtA y CdtC reconocen específicamente al mismo receptor en células HeLa, y que ambas son necesarias para la máxima actividad de la holotoxina (68). Se ha sugerido que CdtB posee actividad de DNasa, lo que provoca el bloqueo del ciclo celular en la fase de transición G₂/M, por lo que la célula aumenta de tamaño y finalmente muere (69,70). Aun cuando se ha encontrado una alta prevalencia de los genes *cdt* tanto en *C. jejuni* como en *C. coli*, estudios realizados en cepas aisladas de macacos (71) y de pollos (72) mostraron que la actividad de citotoxina es característica de *C. jejuni*.

Función de la célula hospedera y sistemas de señalización. Uno de los mecanismos de virulencia bacterianos más reconocidos es la utilización de las funciones celulares a través de la

activación de mecanismos de señalización en la célula hospedera, ya sea directamente por componentes bacterianos ó bien estimulando factores de activación de la propia célula, tales como las citocinas inflamatorias (35).

Estudios *in vitro* han mostrado que la unión de *C. jejuni* a la fibronectina por medio de CadF promueve la fosforilación de la paxilina, una molécula focal de adhesión y señalización en la célula hospedera, e indica la estimulación de integrina. Intracelularmente, la integrina se asocia con complejos proteicos que finalmente se unen a microfilamentos lo que provoca el rearrreglo del citoesqueleto; además, esta unión es necesaria para la máxima invasión de la célula hospedera (60). La eficiencia de invasión de *C. jejuni* se ha asociado con la actividad de la tirosinproteín-cinasa en la célula hospedera, enzima responsable de la fosforilación de la tirosina; el tratamiento con inhibidores de la enzima como estaurosporina, tirofostina 46 y genisteína en células INT407 que se infectaron con la bacteria disminuyó de manera significativa el grado de invasión de *C. jejuni*, por lo que se sugirió que la fosforilación de tirosina podría ser una señal celular involucrada en la internalización de *C. jejuni* (73).

Se ha propuesto también que la interacción de *C. jejuni* con las células HEp-2 se da a través de la lipoproteína de superficie JlpA y de Hsp90, una proteína de choque térmico con función de chaperonina que está asociada con diferentes factores de transcripción y proteínas-cinasas y juega un papel esencial en las vías de señalización intracelulares. La interacción JlpA-Hsp90 induce la activación del factor de transcripción dimérico NF- κ B y la fosforilación de la p38 MAP-cinasa, ambos involucrados en la regulación de la respuesta inflamatoria a infecciones (74).

Konkel y col. (75) sugirieron que *C. jejuni* podría secretar proteínas vía un sistema de secreción tipo III, lo que estimularía la señalización en la célula hospedera y dispararía la internalización bacteriana. Observaron que al co-cultivar *C. jejuni* con células INT407 se secretaban en el sobrenadante al menos 8 proteínas a las que denominaron CiaA a CiaH (*Campylobacter* invasion antigen), siendo CiaB la más importante, ya que además de ser translocada en el citoplasma de la célula hospedera, era requerida en el proceso de secreción. Mutantes nulas en el gen *ciaB* mostraron una reducción significativa en su capacidad de invasión. La síntesis de las proteínas Cia ocurre en la presencia de una señal estimuladora mediada por factores propios de la célula hospedera (76) y se ha demostrado que son secretadas vía el aparato de exportación flagelar que es aparentemente un sistema tipo III (77).

Por otra parte, estudios realizados en células INT407 han demostrado que *C. jejuni* estimula la secreción temprana de interleucina 8 (IL-8) por dos mecanismos diferentes e independientes. El primero está relacionado directamente con la capacidad de adherencia/invasión de la bacteria *in vitro*, es decir, los más altos niveles de IL-8 se asociaron con cepas más invasivas, por lo que se sugiere que la inducción de IL-8 requiere la adherencia, a través de un ligando bacteriano específico, y la liberación de proteínas directamente en la célula eucariótica por un proceso que requiere de la síntesis *de novo* de proteínas; mientras que el segundo está determinado por la actividad de CDT. Más aún, se propone que la secreción de IL-8 por las células del epitelio intestinal expuestas a *C. jejuni* podría ser la señal inicial para la respuesta inflamatoria aguda (78,79).

Diversidad genética de *Campylobacter*. Se considera a la diversidad genética como una de las principales cualidades de las diferentes poblaciones de microorganismos patógenos. La plasticidad genómica, determinada por las variaciones en el genotipo de la población bacteriana, aumenta el potencial de adaptación e incrementa las probabilidades de supervivencia del

patógeno en entornos desfavorables o francamente hostiles (80), y podría estar relacionada con la variabilidad en la expresión clínica y en las características fenotípicas de las cepas aisladas de pacientes sintomáticos y asintomáticos (81). La publicación de la secuencia genómica completa de la cepa de *C. jejuni* NCTC 11168 (82) ha proporcionado un parámetro de comparación para definir, mediante diferentes métodos moleculares, la ausencia o la presencia de genes adicionales en otras cepas de *Campylobacter* y así definir la diversidad genética de la especie.

En diversos estudios ya han sido identificados y caracterizados diferentes genes en *Campylobacter* asociados con el fenotipo de adherencia e invasión a células epiteliales: *flaA* (30-34), *peb1* (49,50), *cadF* (51,52), *jlpA* (55), *galE* (56,57) y *ciaB* (75-77).

En la cepa de *C. jejuni* 81-176 se ha descrito la presencia de un plásmido (pVir) que consta de 37.5 kb, y que posee siete genes que codifican para homólogos de las proteínas de secreción tipo IV de *Helicobacter pylori*, agrupados en una región de 8.9 kb (83,84). pVir se ha relacionado con la virulencia de la cepa, ya que mutaciones en algunos de estos genes disminuyen de manera considerable los niveles de adherencia e invasión de la cepa *in vitro* en células INT407, y disminuyen la severidad de los síntomas en un modelo *in vivo* en hurones (83). Sin embargo, la transferencia del plásmido a la cepa NCTC 11168 no alteró sus bajos niveles de invasión en células INT407, lo que indica la necesidad de otros factores de virulencia que no están presentes en la cepa 11168 (84). Aun cuando se ha reportado un bajo porcentaje de cepas pVir positivas en aislados de muestras clínicas, 10% de 58 (83) y 17% de 104 (85), se encontró una asociación significativa entre la detección del plásmido y la presencia de diarrea con sangre, lo que lo relaciona a su vez con la invasión del epitelio *in vivo* y enfatiza su potencial como un marcador para el riesgo de desarrollar una infección clínica más severa (85).

Estudios realizados con cepas seleccionadas de *Campylobacter* aisladas de individuos sintomáticos y asintomáticos y definidas fenotípicamente como invasivas o no invasivas, y con técnicas moleculares de amplificación aleatoria de los polimorfismos de DNA como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), permitieron la identificación de un nuevo marcador genético de virulencia de 1.6 kb en el cromosoma de las cepas invasivas de *Campylobacter* al que se denominó IAM (invasion-associated marker). La tipificación molecular del locus *iam* por PCR-RFLP, con la endonucleasa *HindIII*, demostró que la mayoría de las cepas invasivas contenían un sitio de restricción específico para la enzima que no estaba presente en la mayoría de las cepas no invasivas, mientras que unas cuantas cepas, tanto invasivas como no invasivas, presentaban el sitio de restricción en una posición diferente. Estos hallazgos confirmaron el polimorfismo del locus *iam* y la diversidad genética de las cepas, y permitieron proponer el uso de los ensayos de RAPD y PCR como métodos moleculares efectivos para la discriminación de cepas invasivas y no invasivas de *Campylobacter* (81).

Las cepas de *C. jejuni* 81-116 y 11168 presentan diferentes potenciales de colonización en pollos y, al ser comparadas genéticamente aplicando la técnica de hibridación sustractiva, se demostró que un total de 23 secuencias de DNA presentes en la cepa 81-116 se encontraban ausentes en la cepa 11168. Estas diferencias cepa-específicas podrían estar relacionadas con la capacidad de colonización de cada una de ellas, aún cuando hay que hacer notar que estas secuencias son sólo fragmentos de genes más grandes cuya expresión no ha sido probada (86).

Las técnicas de análisis por microarreglos de DNA, además de que permiten definir las diferencias en el genoma de diversas cepas, permiten explorar las diferencias en la expresión de genes que puedan estar relacionados con variaciones fenotípicas entre ellas (87). Mediante esta técnica, Poly y col. (88) definieron 87 marcos de lectura abiertos u ORFs (Open ReadinG Frames), agrupados en siete categorías funcionales, entre las que se incluían las estructuras de

superficie, los sistemas de restricción y modificación del DNA, metabolismo, transporte y resistencia a antibióticos, que estaban presentes en la cepa 81-116 pero no en la 11168.

Por su parte, Gaynor y col. (34) demostraron que las dramáticas diferencias en el fenotipo de virulencia entre la variante de la cepa de *C. jejuni* 11168 secuenciada (11168-GS) y la cepa original (11168-O) que fue aislada de un caso clínico y de la cual se derivó, se debe a la existencia en estas cepas de cambios genéticos muy sutiles sólo detectables por secuenciación directa. Estos cambios claramente producen marcadas diferencias en la transcripción, afectando principalmente genes involucrados en respiración, metabolismo, movilidad y otros genes desconocidos, y en el fenotipo incluyendo la capacidad de colonización, invasión, translocación y movilidad.

Ahora bien, son los estudios de expresión genética durante la interacción de *Campylobacter* con células epiteliales, en modelos *in vitro* e *in vivo*, los que han permitido identificar nuevos factores de virulencia potenciales y han demostrado la importancia de la respuesta bacteriana en condiciones de estrés. Se ha observado que la interacción bacteria-célula provoca la expresión diferencial de diversos genes, que le permiten a *Campylobacter* modificar sus estructuras de superficie y con ello lograr sobrevivir en una variedad de condiciones ambientales naturales. Se ha propuesto que esta flexibilidad en la expresión genética podría ser esencial, en la adaptación de *Campylobacter* al medio ambiente variable del intestino (89,90).

Oligosacáridos como receptores celulares

Desde 1975, Sharon propuso que los carbohidratos eran idealmente convenientes para la formación de determinantes específicos que pudieran ser reconocidos por estructuras complementarias, presumiblemente proteínas, u otras células o macromoléculas (91). Más de 25 años después, está plenamente aceptado que las unidades carbohidrato sobre la superficie de las células epiteliales desempeñan un papel importante en el proceso de reconocimiento célula-célula y que las lectinas, proteínas que se unen a carbohidratos, median muchos de los procesos de reconocimiento biológico (91,92). El análisis estructural de los complejos carbohidrato-proteína ha mostrado que la flexibilidad inherente y la naturaleza dinámica de los oligosacáridos puede ser un determinante importante en su habilidad para formar complejos específicos con las proteínas (93).

La gran variedad de oligosacáridos que se presenta en la superficie de las células epiteliales, ya sea en la forma de glicoproteínas o glicolípidos, es uno de los factores que determina la susceptibilidad a infecciones microbianas y a la acción de toxinas, ya que sirven como moléculas de unión para diferentes bacterias, virus, toxinas y muchas otras moléculas (94). La expresión selectiva de estos receptores sobre la superficie de las mucosas epiteliales proporciona la base molecular para explicar el tropismo de muchos patógenos por tejidos y hospederos muy definidos (95).

Hasta la fecha se han identificado un gran número de patógenos que utilizan la interacción con carbohidratos para adherirse a su célula blanco. En general, este reconocimiento proteína-carbohidrato es no covalente y, aunque es altamente específico, es débil, por lo que la fuerza de la unión patógeno-célula radica en el establecimiento de un gran número de interacciones individuales proteína-carbohidrato (95). La mayoría de las proteínas microbianas reconoce una secuencia específica de azúcares que generalmente se encuentra en el extremo no reductor de la cadena oligosacárida, aunque muchas adhesinas también reconocen azúcares

internos. Además, algunos patógenos secretan enzimas que modifican las cadenas carbohidrato en la célula, con lo que incrementan la densidad de receptores en la superficie de la célula epitelial para lograr un reconocimiento multivalente (96).

Son numerosos los estudios que avalan el papel de los oligosacáridos en el reconocimiento microorganismo-receptor. Así, por ejemplo, para *E. coli* con fimbrias P, que portan una adhesina denominada PapG, se ha descrito un receptor glicolípido definido por la estructura Gal α 1,4Gal, tanto en el tracto urinario como en eritrocitos (97). De igual manera se han descrito receptores de naturaleza oligosacárida para otras *E. coli* fimbriadas; entre ellas *E. coli* K99, patógena para bovinos, que reconoce las terminales NeuGlc α 2,6Gal β 1,4Glc (98). Cabe hacer notar que existen diferencias importantes en el reconocimiento fimbria-oligosacárido, definidas por la especificidad de la interacción adhesina-receptor. Así, para *E. coli* K88, patógena para cerdos, se han descrito diferentes secuencias de oligosacáridos dependiendo de la variedad de la fimbria: K88ab reconoce estructuras Gal α 1,3Gal, mientras que K88ac reconoce estructuras Gal β 1,3GalNAc (99).

Se ha propuesto que un mismo oligosacárido puede funcionar como isoreceptor para diferentes especies bacterianas. Tal es el caso de las terminales Gal α 1,4Gal que también son reconocidas por las variedades fimbriadas P_N y P₀ de *Streptococcus suis*, un patógeno para cerdos que puede llegar a causar meningitis en humanos. Por estudios bioquímicos de sustitución, se ha demostrado que la especificidad de *S. suis* difiere de la de *E. coli*: los grupos OH esenciales para la unión del estreptococo se localizan en las posiciones 4', 6', 2 y 3 del lado β' - α de la molécula, la variedad P₀ reconoce además los OH en las posiciones 6 y 3', mientras que *E. coli* reconoce un conjunto de 5 grupos OH en las posiciones 6, 2', 3', 4', y 6'. Esto implica que se une a una porción diferente del disacárido, demostrándose así que la especificidad del reconocimiento está influenciada por la presentación del sitio de unión en el receptor, por las interacciones hidrofóbicas, por la orientación y conformación de las cadenas de oligosacáridos, y por la arquitectura del glicolípido en la membrana celular (100).

Estudios *in vitro* de la adherencia de *Salmonella typhimurium* a células Caco-2 han demostrado la existencia de un receptor glicoconjugado con terminales Gal β 1,3GalNAc, localizado en el glicocálix, y sugieren que las diferencias en los patrones de glicosilación y/o accesibilidad del glicoconjugado en la membrana de células epiteliales individuales podrían ser suficientes, para explicar la adherencia selectiva de salmonella (101).

Se ha demostrado que los estreptococos del grupo A causantes de faringitis aguda, impétigo y secuelas postestreptocócicas, como fiebre reumática y pielonefritis, reconocen receptores celulares que contienen ácido siálico presentes en la mucina, así como en las células epiteliales de la faringe (102).

La importancia de los oligosacáridos como receptores está demostrada con *Pseudomonas aeruginosa*, que posee la lectina PA-III que se une específicamente a fucosa. La lectina cuenta con dos iones Ca²⁺ que estereoquímicamente favorecen la interacción carbohidrato-proteína, por lo que la unión es muy fuerte. La colonización crónica de los pulmones por *P. aeruginosa* es la mayor causa de morbi/mortalidad en la fibrosis quística. La enfermedad es causada por mutaciones en el gen que codifica para el regulador de la conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR) que actúa como un canal de cloro, lo que se traduce en alteraciones del movimiento iónico y de los patrones de glicosilación, tanto de CFTR como de otros glicoconjugados de la superficie de las células epiteliales. Fenotípicamente se observa un aumento en el grado de fucosilación mientras disminuye la sialilación, con lo que se aumenta de

manera considerable el número de receptores presentes en las células para la *P. aeruginosa*, favoreciendo la colonización crónica (103).

Existen muchos otros ejemplos de la importancia de los oligosacáridos como receptores, ya sea formando parte de glicoproteínas o de glicolípidos. Tal es el caso de los residuos α 2,3-sialilados de los gangliósidos presentes en las células epiteliales del tracto respiratorio que sirven como receptores para *H. influenzae* (104), del pentasacárido del gangliósido GM₁ que es reconocido por la toxina colérica, o bien del undecasacárido de transferrina que es reconocido por la toxina pertussis (97).

Antígenos de grupo sanguíneo como determinantes en los receptores celulares

Las infecciones recurrentes que se presentan en individuos aparentemente normales, podrían deberse a una exagerada expresión en los tejidos de los receptores oligosacáridos de adhesión. Las diferencias genéticas en los antígenos de grupo sanguíneo de los sistemas ABO, Lewis y P, conllevan a diferencias en la expresión de receptores con carbohidratos en tejidos extrahematopoyéticos, especialmente células epiteliales que recubren órganos secretores (95).

Antígenos de grupo sanguíneo. Ahora bien, el término grupo sanguíneo describe las diferencias antigénicas detectadas sobre la superficie de los eritrocitos por medio de anticuerpos específicos y que han sido ampliamente usadas en estudios genéticos y antropológicos. Los antígenos están conformados por glicoesfingolípidos y glicoproteínas insertados en la membrana celular por la fracción proteica ó lipídica, por lo que es la porción carbohidrato la que se encuentra expuesta en la superficie para ser reconocida por el anticuerpo o por otro tipo de moléculas (105). Estas macromoléculas no están confinadas a los eritrocitos, sino que también se presentan en forma soluble en secreciones como saliva, jugo gástrico y leche materna, y como antígenos de superficie en células del tejido epitelial y endotelial, por lo que se les conoce como sustancias de grupo sanguíneo asociadas a tejido, es decir antígenos de tejido-grupo sanguíneo (106,107).

Biosíntesis antigénica. En general, la biosíntesis de cada uno de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo se efectúa a través de la adición de unidades monosacáridas a precursores determinados, con la intervención de glicosiltransferasas específicas. Los grupos sanguíneos más importantes corresponden a los sistemas ABO y Lewis. Se forman a partir de dos precursores principales, el tipo 1 (Gal β 1,3GlcNAc β -R) en el que el residuo β -galactósido está unido a la N-acetilglucosamina por un enlace β 1,3, y el tipo 2 (Gal β 1,4GlcNAc β -R) en el que el enlace es β 1,4. A partir del precursor tipo 1 se generan los determinantes H-1, Lewis^a y Lewis^b, cuya especificidad está dada por moléculas terminales de fucosa unidas a la estructura central por enlaces α 1,2 y α 1,4. De igual manera, a partir del precursor tipo 2, se generan los determinantes H-2, Lewis^x y Lewis^y, y nuevamente son las moléculas de fucosa las responsables de la especificidad de cada uno de ellos, en este caso con enlaces α 1,2 y α 1,3. Los grupos A y B pueden presentar cualquiera de los dos tipos de oligosacárido central, pero su especificidad está definida por una fucosa en posición α 1,2 y N-acetilgalactosamina para A, y galactosa para B (108,109) (Figura 1).

Fucosiltransferasas. Las fucosiltransferasas catalizan la transferencia de fucosa de un sustrato donador, GDP-fucosa, a cadenas de oligosacáridos que se encuentran unidas a proteínas ó lípidos (110). En el humano existen dos enzimas que catalizan la formación de los enlaces fucosilados α 1,2, y son codificadas por los genes *H* (*FUT1*) y *Se* (*FUT2*) que se encuentran unidos estrechamente dentro del cromosoma 19. La enzima FUT1 se encuentra en los tejidos hematopoyéticos y en plasma, mientras que la enzima FUT2 se localiza principalmente en las secreciones, como leche, jugo gástrico y saliva, y en las mucosas y tejidos de los individuos ABO/H secretores. Los enlaces fucosilados α 1,3/4 son catalizados por FUT3 principalmente, codificada por el gen *Le* (*FUT3*) localizado en el brazo corto del cromosoma 19 (111,112). Existen otras 5 fucosiltransferasas que pueden catalizar la adición de fucosa en las posiciones α 1,3 ó α 1,4; al igual que FUT3, FUT5 puede utilizar los precursores tipo 1 y tipo 2 como sustratos, mientras que FUT4, FUT6, FUT7 y FUT9 sólo utilizan el precursor tipo 2 (108) (Figura 1).

Fenotipos fucosilados. Se han descrito diferentes fenotipos definidos por la expresión de cada uno de los determinantes antigénicos. El más raro es el fenotipo Bombay, en el que los individuos carecen de un alelo funcional *FUT1*, por lo que sus eritrocitos carecen de los determinantes ABH. El fenotipo secretor o no secretor está determinado por la funcionalidad y polimorfismo de *FUT2*; el estado secretor se caracteriza por la presencia de los determinantes ABH como antígenos solubles, tanto en tejido como en fluidos corporales, y el estado no secretor carece de ellos por la inactivación de *FUT2*. Se ha descrito también polimorfismo en el gen *Le*, por lo que se han definido cuatro fenotipos dependiendo de la funcionalidad de los loci *Le* y *Se*: Lewis positivo/secretor (*Le* y *Se* activos), Lewis positivo/no secretor (*Le* activo y *Se* inactivo), Lewis negativo/secretor (*Le* inactivo y *Se* activo), y Lewis negativo/no secretor (*Le* y *Se* inactivos). En adultos, los tejidos endodermales, en los que se incluye la mayoría de las células de los tractos respiratorio, digestivo y urinario, expresan principalmente antígenos ABH tipos 1 y 2, bajo el control de la expresión de los genes *Le* y *Se*. Los tejidos ectodermal y mesodermal, en los que se incluyen los eritrocitos y el epitelio vascular, expresan principalmente antígenos ABH tipo 2 independientemente de los genes *Le* y *Se*, pero controlados por el gen *H* (113,114). Es notable que los determinantes Lewis de los eritrocitos no son sintetizados por los propios glóbulos rojos, sino que son adsorbidos en la superficie celular a partir de los glicolípidos circulantes en plasma, que fueron sintetizados por las células del epitelio exócrino, principalmente del tracto digestivo (114).

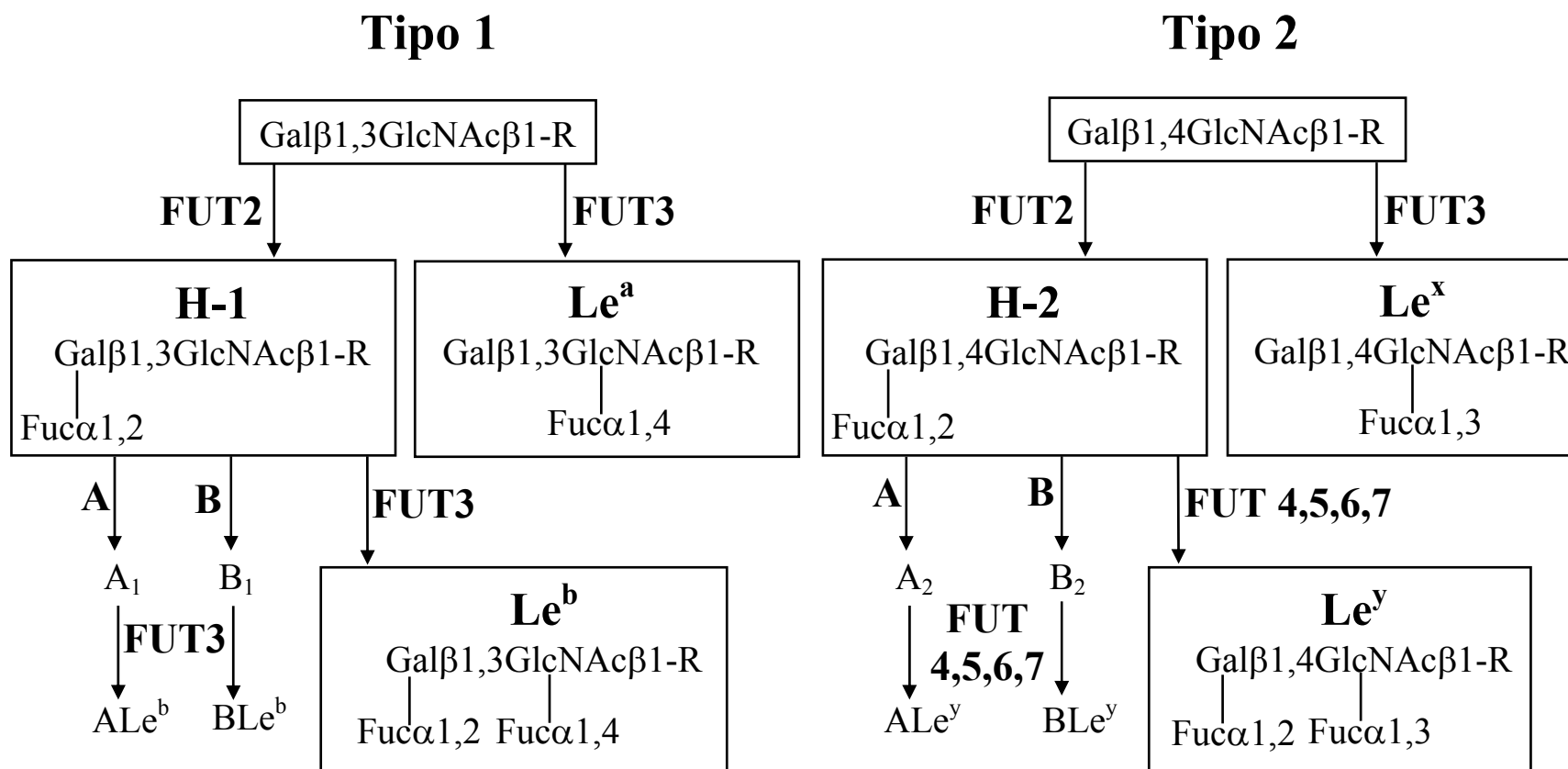


Figura 1. **Biosíntesis de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo.** Rutas biosintéticas de cada uno de los determinantes oligosacáridos a partir de los precursores tipo 1 y 2, y las fucosiltransferasas (FUT) que intervienen en su formación.

Determinantes antigénicos de tejido-grupo sanguíneo en receptores celulares. La primera evidencia de la trascendencia de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo en la susceptibilidad a una infección entérica surgió de los estudios epidemiológicos de Glass y col. (115), que demostraron que la mayor frecuencia de la infección por *V. cholerae* se observaba en individuos del grupo sanguíneo O, siendo la diferencia con respecto a los controles estadísticamente significativa. Y no sólo eso, sino que además la severidad de la infección también era mayor en este grupo de sujetos, es decir, si se clasificaba la diarrea como media, moderada y severa, el cuadro clínico asociado al grupo era en general más grave.

Por su parte, Borén y col. (116) demostraron que el determinante oligosacárido del grupo sanguíneo Le^b, y en menor medida H-1, constituyen los receptores para *Helicobacter pylori* en la mucosa gástrica, es decir que el epítipo receptor se encontraba confinado a la terminal fucosilada de la cadena tipo 1 de la serie de la lactosa. El antígeno de tejido-grupo sanguíneo Le^b es el predominante en la superficie de las células de la mucosa en el epitelio gástrico de los individuos secretores, mientras que el Le^a se presenta en los no secretores; por lo que los individuos secretores podrían ser más susceptibles a la infección con *H. pylori*. Estudios epidemiológicos de individuos con úlcera gástrica demostraron una mayor prevalencia de la infección por *H. pylori* en los sujetos Le^b positivos. Se ha descrito la expresión de una proteína de 75 kDa denominada BabA que se une al determinante Le^b en la mucosa gástrica, además de que el fenotipo adherente de la bacteria se ha asociado con la presencia de la isla de patogenicidad *cag* en los aislados clínicos de *H. pylori* (117). La mayor prevalencia de inflamación gástrica crónica asociada a cambios histológicos más severos se relacionó con las cepas que, además de ser productoras de la toxina vacuolizante VacA y del antígeno citotoxina-asociado CagA, presentaban la adhesina BabA que facilitaba la colonización bacteriana (118,119). Se ha descrito además la existencia de una segunda adhesina denominada SabA que reconoce al antígeno sialilado Le^x, y representa un mecanismo de adherencia alterno (120).

Por otro lado, en mujeres la recurrencia de infecciones urinarias causadas por *E. coli* uropatogénica se ha asociado de manera importante con la expresión del glicoesfingolípido relacionado con el antígeno de tejido-grupo sanguíneo P, un sialosil-galactosil-globósido, y se ha logrado su purificación a partir del riñón humano (121,122). Se encontró una asociación significativa entre el estado no secretor (Le a⁺b⁻ y Le a⁻b⁻) y la pielonefritis aguda no complicada causada por la bacteria, es decir, el estado no secretor podría ser un factor de riesgo para el desarrollo de infección ascendente en mujeres (123).

También se ha descrito que el antígeno P presente en los eritrocitos funciona como el receptor celular para el parvovirus B19; específicamente se trata del globósido Gb4, que se identificó mediante hemaglutinación con el virus, ya que los eritrocitos que carecían del Gb4 no fueron capaces de aglutinarse (124,125). Por ensayos de inmunofluorescencia se ha descrito que el antígeno de tejido-grupo sanguíneo P también podría constituir el receptor celular para la verotoxina (Toxina Shiga-like) de *E. coli*. El reconocimiento está restringido a ciertos fenotipos del antígeno P dependiendo de la disponibilidad y accesibilidad de los residuos Gal α 1,4Gal en cada uno de ellos. Así, la mayor adherencia de las verotoxinas 1 y 2 se observó con los eritrocitos que presentaron fenotipo P1 (126).

Gran parte de los brotes de gastroenteritis viral en los países en desarrollo es causada por calicivirus, y por estudios con proteínas de la cápsula del virus Norwalk integradas en partículas virales-like (VLPs) se demostró que el virus reconoce los antígenos de grupo sanguíneo H tipo 1 y H tipo 3 y 4, siendo las terminales α 1,2-fucosiladas necesarias tanto para la unión inicial a la célula como para la internalización del virus. Así, se sugiere que sólo los individuos secretores

que expresan las terminales α 1,2-fucosiladas en las células epiteliales del intestino podrán ser infectados por el virus (127).

Estudios realizados en voluntarios humanos demostraron la relación existente entre el estado secretor y la susceptibilidad a la infección por el virus Norwalk. En un ensayo de adherencia, las VLPs Norwalk se unieron al 75% de las salivas obtenidas de individuos secretores, pero no reconocieron ninguna de las obtenidas de los individuos no secretores. Además, el 62% (34 de 55) de los individuos secretores se infectaron después de ser retados con el virus mientras que ninguno de los no secretores fue infectado, sugiriendo que la susceptibilidad al virus Norwalk es altamente dependiente de la expresión de *FUT2* (128).

Por otro lado, además del estado secretor, también los epítipes determinantes de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo ABO y Lewis están asociados con la susceptibilidad diferencial a la infección por norovirus. En un ensayo de adherencia con proteínas recombinantes de la cápsula de seis especies de norovirus (NORs) y salivas obtenidas de voluntarios, se establecieron cuatro patrones de adherencia definidos por los antígenos de tejido-grupo sanguíneo: en el primer patrón las cepas reconocían todos los secretores (tipos A, B, y O), en el segundo grupo se reconocían secretores con tipos A y O pero no B, en el tercer grupo, los antígenos reconocidos fueron A y B pero no O, y en el cuarto se reconocieron no secretores y con menor avidez los secretores, pero no los Lewis negativos. Así, se sugiere que la diversidad de estos glicoconjugados podría constituir la primera línea de defensa contra este tipo de patógenos (129). Ensayos posteriores con leche de madres secretoras y no secretoras demostraron que la expresión de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo inhiben de manera específica la unión de los virus a los receptores presentes en saliva (130).

Oligosacáridos de la leche materna

En conjunto, los oligosacáridos constituyen el tercer componente sólido mayoritario de la leche humana, después de la lactosa y la fracción lipídica constituida en gran parte por triglicéridos. Se ha postulado que su síntesis está mediada por glicosiltransferasas, que también están involucradas en la biosíntesis de los glicoconjugados presentes en la membrana de las células epiteliales. Por ello, se propone que algunos de esos oligosacáridos pudieran tener homología estructural con las secuencias de azúcares que determinan la función de receptor de tales glicoproteínas y/o glicolípidos (131,132).

Los carbohidratos presentes en la leche materna humana, a diferencia de la leche de otros mamíferos, son una mezcla altamente compleja de oligosacáridos que difieren en tamaño, carga, secuencia y abundancia; la lactosa por sí sola constituye 7% (p/v) de la leche, siendo lógicamente el azúcar más abundante. En los últimos años se ha caracterizado un número cada vez más grande de los oligosacáridos presentes en la leche. Se han aislado más de 120 oligosacáridos mayoritarios de los que ya se conoce su estructura; aproximadamente 45 de ellos son oligosacáridos neutros que en conjunto constituyen 1% (p/v) de la leche y otros son oligosacáridos ácidos que representan sólo 0.1% (p/v) de ella (133). En general, los monómeros que constituyen los oligosacáridos de la leche humana son D-glucosa (Glc), D-galactosa (Gal), N-acetilglucosamina (GlcNAc), L-fucosa (Fuc) y ácido N-acetilneuramínico (NeuAc), conocido comúnmente como ácido siálico (134).

Existe un número limitado de glicosiltransferasas en la glándula mamaria, por lo que la biosíntesis de oligosacáridos fucosilados se efectúa por cuatro tipos de reacciones y en forma

relativamente simple. En el primer tipo de reacción las estructuras centrales se forman por la transferencia sucesiva de unidades de lactosamina (Gal-GlcNAc) a lactosa; en un segundo tipo de reacción, los residuos GlcNAc se fucosilan por la acción de las enzimas α ,3- ó α ,3/4-fucosiltransferasa, en el tercer tipo de reacción una α ,2-fucosiltransferasa cataliza la transferencia de fucosa a los residuos de galactosa y, finalmente, en el cuarto tipo de reacción, una α ,3-fucosiltransferasa cataliza la fucosilación del residuo de glucosa. Además de las fucosiltransferasas, diferentes sialiltransferasas pueden adicionar NeuAc en diferentes posiciones de las cadenas de oligosacáridos (133,134).

Diversos estudios han descrito variaciones cuantitativas y cualitativas en el contenido de oligosacáridos en diversas poblaciones, dependiendo tanto del perfil genético de la donadora, como de la situación geográfica, dieta, y de las fases de lactancia. Por cromatografía de intercambio aniónico, se definieron cuatro patrones de distribución de oligosacáridos, presentes en la leche materna, con respecto al grupo sanguíneo Lewis de la mujer donadora: el primer grupo correspondió al fenotipo $Le(a^-b^+)$ en el que se observaron residuos con enlaces fucosilados α 1,2, α 1,3 y α 1,4; el segundo grupo, correspondiente a $Le(a^+b^-)$ carecía de residuos fucosilados α 1,2; mientras que el tercer grupo carecía de residuos α 1,4 y presentaba el fenotipo $Le(a^-b^-)$; en el cuarto grupo, también con fenotipo $Le(a^-b^-)$, sólo se observaron residuos fucosilados α 1,3 (135).

Por cromatografía de intercambio aniónico de alta resolución, Coppa y col. (136) demostraron variaciones en la concentración y patrón de oligosacáridos durante las diferentes fases de lactancia, y lo asociaron con el estado secretor y el genotipo Lewis de la donadora. La más alta concentración de todos los oligosacáridos se presentó en el día cuatro después del parto y decayó aproximadamente un 20% al día 30 de lactancia. Utilizando la misma técnica, Erney y col. (137) analizaron muestras individuales obtenidas de 435 mujeres de 10 países diferentes. Establecieron el estado secretor o no secretor de la donadora y pudieron definir una relación clara entre los oligosacáridos presentes en la leche y la prevalencia del gen *Se*, determinada por la raza y la situación geográfica. Así, por ejemplo, encontraron que el 100% de las muestras procedentes de México contenían 2'fucosil-lactosa (2'FL), mientras que sólo se encontró en el 46% de las muestras de Filipinas.

Chaturvedi y col. (131) determinaron el perfil de oligosacáridos fucosilados en la leche de madres mexicanas. Mediante HPLC en fase reversa, de los derivados perbenzoilados de los oligosacáridos intactos de la leche, lograron identificar y cuantificar 12 oligosacáridos mayoritarios. Determinaron que existía una variación individual significativa entre las madres, y sólo el 70% de ellas presentó en su leche 2'FL y lacto-N-fucopentosa I como oligosacáridos principales; en el 30% restante los oligosacáridos principales fueron 3fucosil-lactosa y lacto-N-fucopentosa II, o bien lacto-N-fucopentosa III. Se determinó una composición similar en leche de madres japonesas, en las que las estructuras fucosiladas representaron 73% (p/p) del total de la fracción de oligosacáridos neutros (138). En la figura 2 se muestran las estructuras de los oligosacáridos neutros mayoritarios que han sido determinados en leche materna (131,134,136,138).

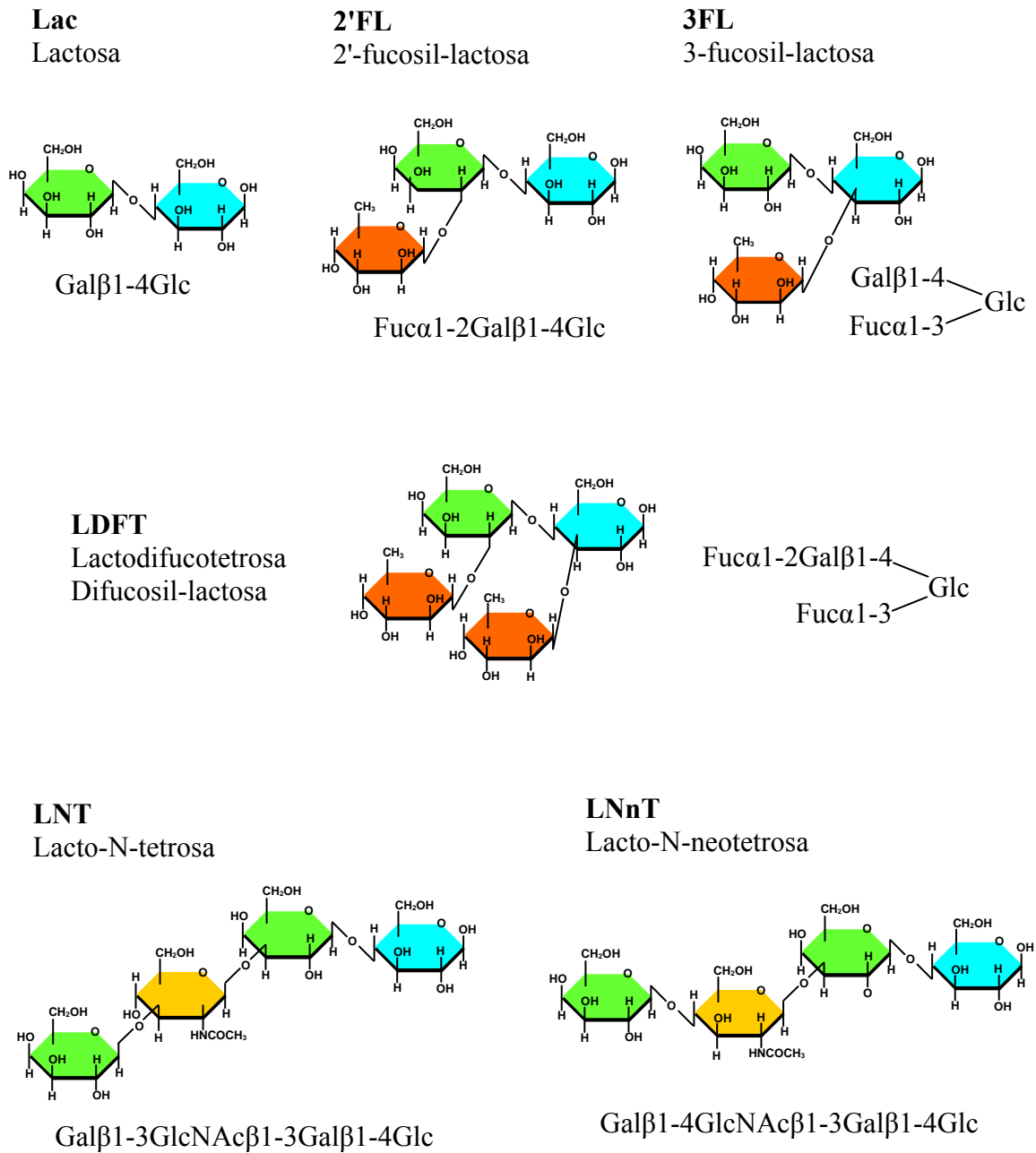
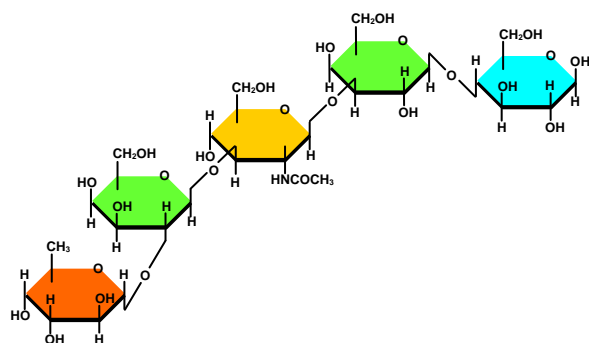
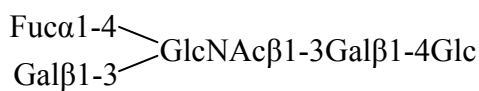
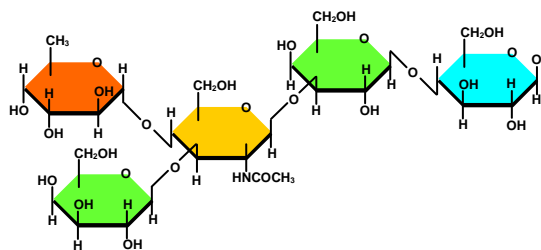


Figura 2. Estructuras de los oligosacáridos neutros mayoritarios determinados en leche materna.

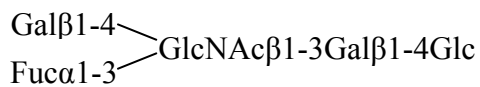
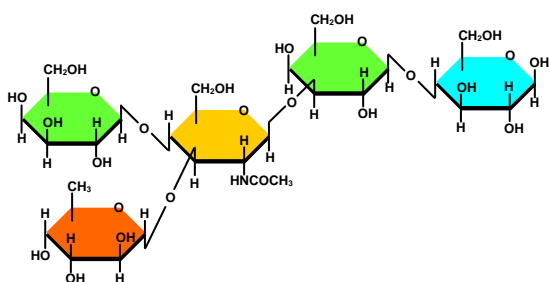
LNF I
Lacto-N-fucopentosa I



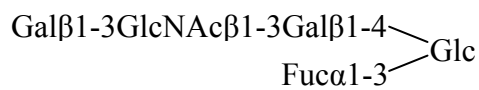
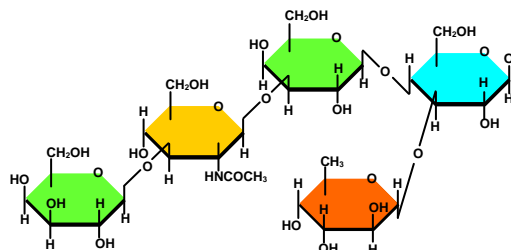
LNF II
Lacto-N-fucopentosa II



LNF III
Lacto-N-fucopentosa III



LNF V
Lacto-N-fucopentosa V



LNDFH I
Lacto-N-difucohexosa I

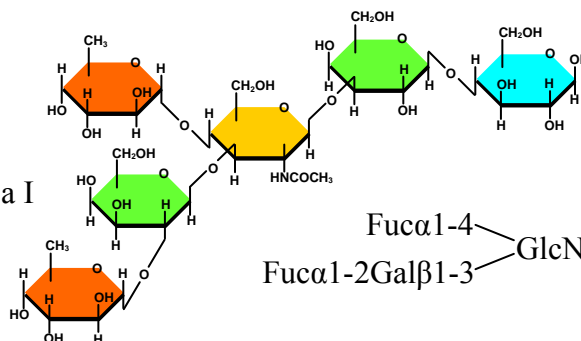


Figura 2. Estructuras de los oligosacáridos neutros mayoritarios determinados en leche materna. (Continuación)

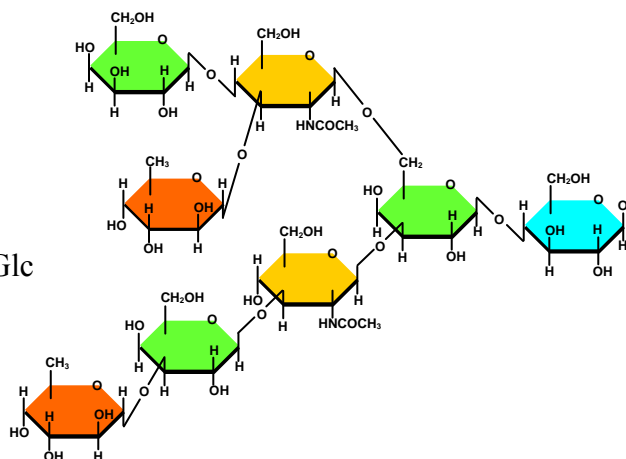
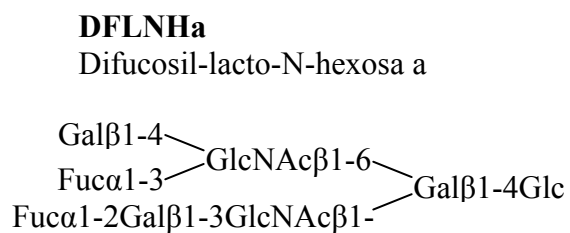
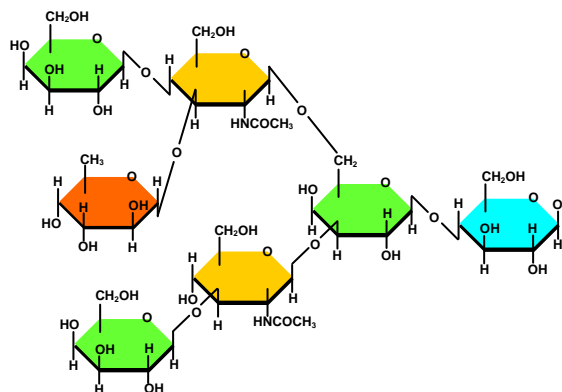
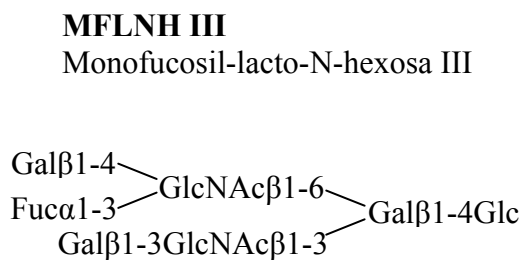
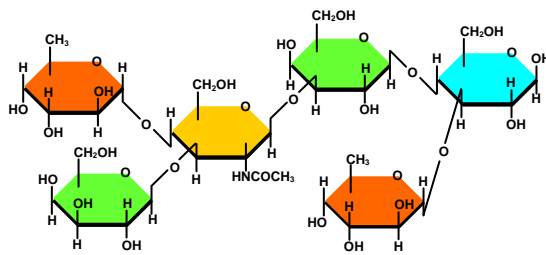
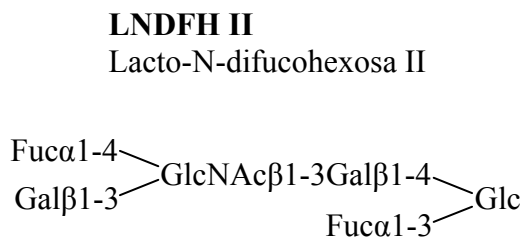


Figura 2. Estructuras de los oligosacáridos neutros mayoritarios determinados en leche materna. (Continuación).

Efecto protector de los oligosacáridos de la leche materna

Se ha propuesto que el efecto protector de la fracción no inmunoglobulínica de la leche materna en contra de las infecciones de los tractos gastrointestinal, respiratorio y urinario durante el primer año de vida se debe a las propiedades de los oligosacáridos presentes en ella como inhibidores de la adherencia y la colonización *in vivo* (95). Por ello, las variaciones en el perfil de oligosacáridos presentes en las muestras de leche materna pueden tener gran importancia biológica, ya que al estar reguladas genéticamente, podrían explicar las diferencias en susceptibilidad a distintos patógenos entre los niños alimentados al seno materno (131,132,139).

Al funcionar como receptores análogos, se presume que los oligosacáridos de la leche materna actúan inhibiendo el reconocimiento entre el microorganismo y su receptor en la superficie de la célula epitelial (140). Entre los primeros reportes de la importancia de esta actividad inhibitoria se encuentra el trabajo de Andersson y col. (141), que demostró que un trisacárido de leche materna del tipo Gal β 1,4GlcNAc β 1,3Gal β -R era capaz de inhibir la adherencia de *S. pneumoniae* a células de la mucosa bucal. De la misma manera, se describió la existencia de un oligosacárido fucosilado, constituido por 5 a 7 residuos monosacáridos, que era capaz de inhibir la asociación de EPEC a sus receptores en células HEp-2 (142).

Se ha descrito que las diferentes variedades de *E. coli* fimbriadas tienen la capacidad de aglutinar eritrocitos, entre ellas *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), que expresa los factores de colonización CFAI y CFaII y es causante de diarrea en niños, así como la *E. coli* uropatogénica (UPEC) que expresa las fimbrias P y es causa importante de pielonefritis y cistitis. La fracción de oligosacáridos sialilados de la leche materna inhibe la hemaglutinación *in vitro* por ETEC y UPEC, lo que sugiere de manera indirecta su papel protector en la prevención de estas infecciones en neonatos (143).

Utilizando un vector de expresión con el cDNA de la α 1,3/4- fucosiltransferasa humana, Xu y col. (144) lograron la expresión transitoria de la fucosiltransferasa humana en la glándula mamaria de cabras y con ello, la producción de proteínas fucosiladas en la leche, que inhibieron la asociación de *H. pylori* al antígeno Lewis^b hasta en un 83%. De esta manera, propusieron que la presencia de estructuras similares al receptor celular para la bacteria puede ser una alternativa para la prevención de la infección.

Aun cuando no se conoce la concentración de oligosacáridos que puede alcanzarse de manera natural, en distintos puntos del tracto gastrointestinal de los infantes que son alimentados al seno materno, se ha estimado que la ingesta promedio de oligosacáridos alcanza 170mg/Kg durante las dos primeras semanas de lactancia, disminuyendo gradualmente hasta 20mg/Kg después de la décima semana (95). Estudios realizados con las fracciones de oligosacáridos neutros y ácidos y con extractos enzimáticos de las membranas de los bordes en cepillo de intestino humano, demostraron que los oligosacáridos de leche materna son resistentes a la hidrólisis enzimática en el tracto intestinal superior, ya que menos del 5% son hidrolizados (145,146). Con estos datos, puede suponerse que la mucosa gastrointestinal de los lactantes se encuentra cubierta por altas concentraciones de oligosacáridos, cuya capacidad para bloquear la adhesión de patógenos a las células epiteliales ha sido demostrada repetidamente *in vitro*, lo que explicaría porqué la incidencia y severidad de las infecciones bacterianas son significativamente menores en los niños alimentados al seno materno (95).

Los polimorfismos de los genes secretor y Lewis que determinan los fenotipos de grupo sanguíneo también contribuyen a la variación en las cantidades relativas de oligosacáridos 2- y

3/4-fucosilados en la leche materna. Esta variación se expresa como la proporción de todos los oligosacáridos fucosilados principales que contienen fucosa en posición 2' con respecto a los que no presentan fucosa en esa posición. El contenido de oligosacáridos 2'fucosilados en leche materna se ha asociado de manera significativa con un menor riesgo de diarrea por la toxina termoestable (ST) de *E. coli*, en los niños alimentados al seno materno. Así, mientras mayor sea la proporción de oligosacáridos 2'fucosilados con respecto a los no 2'fucosilados, mayor será la protección brindada por la leche materna (147). La evidencia clínica de que los oligosacáridos de leche materna pueden ofrecer protección relevante, en contra de la diarrea ocasionada por patógenos específicos, ha surgido de estudios de cohortes en los que se han relacionado los bajos niveles de oligosacáridos 2'fucosilados con un incremento en las tasas de diarrea, así como con mayores tasas de presentación de diarrea moderada a severa (148).

Receptores análogos para *Campylobacter*

Entre los factores de virulencia de *Campylobacter*, la quimiotaxis y la movilidad desempeñan un papel fundamental en su proceso patogénico, al permitirle alcanzar las porciones bajas del intestino (21,22). *Campylobacter* muestra una notable atracción quimiotáctica en presencia de fucosa pero no de otros azúcares (149). La L-fucosa es un componente importante tanto de la bilis como de la mucina, y se ha propuesto que la colonización de la capa de mucina en el intestino es un prerrequisito para la patogénesis *in vivo*. Por otro lado, la bilis, junto con otros factores como pH y osmolaridad, regula de manera positiva el gen *flaA* favoreciendo la síntesis de *flaA* y por ende la actividad del flagelo (150). Esto explicaría la importancia de la fucosa en la patogénesis de la infección por *Campylobacter* en el tracto gastrointestinal. Estudios anteriores han demostrado que la L-fucosa es capaz de inhibir la adherencia de *Campylobacter* a células epiteliales (151).

JUSTIFICACIÓN DEL PROYECTO

La propiedad de adherirse a los receptores de la mucosa intestinal es uno de los mecanismos de patogenicidad primordiales de los enteropatógenos. Estudios en cohortes de niños mexicanos han señalado que la alimentación al seno materno protege en contra de la diarrea por *Campylobacter*. Esta protección es conferida tanto por su contenido de IgA secretora específica (152,153), como por componentes de naturaleza no inmunoglobulínica que actúan como receptores análogos solubles, que bloquean la adherencia de la bacteria a las células epiteliales. El efecto protector se ha atribuido principalmente a carbohidratos complejos, entre los que se incluyen oligosacáridos y glicoconjugados con estructura química similar a los receptores de la mucosa intestinal (154,155).

Por otro lado, se ha observado una mayor susceptibilidad a infecciones gastrointestinales en individuos con determinados grupos sanguíneos. Se ha demostrado que los individuos del grupo O tienen una mayor probabilidad de infectarse con *V. cholerae* O1 y de tener una enfermedad más grave (94).

Los oligosacáridos que están presentes en la leche materna tienen la misma estructura química de los antígenos de grupo sanguíneo, ya que ambos son sintetizados por glicosiltransferasas que son reguladas genéticamente. Los antígenos de grupo sanguíneo también se han identificado en mucosas, por lo que actualmente se denominan antígenos de tejido-grupo sanguíneo. Por lo tanto, es muy probable que los receptores para algunos enteropatógenos, entre ellos *Campylobacter*, estén relacionados con estos antígenos de grupo y que por ende, los receptores análogos para la bacteria posean estructuras similares.

Primera fase

El proyecto que aquí se presenta fue desarrollado en dos fases, en la fase previa se demostró que existían componentes oligosacáridos de leche materna capaces de inhibir la adherencia de *C. jejuni in vitro* a células HEp-2, e *in vivo* en un modelo de colonización con ratones BALB/c (156).

Inhibición de la adherencia de *Campylobacter* a células HEp-2 por oligosacáridos de leche materna. De acuerdo al método descrito por Newburg y col. (157), se obtuvieron 5 fracciones oligosacáridas de la leche materna por un proceso de purificación secuencial. La primera fracción de oligosacáridos crudos inhibió hasta en 62% la adherencia de *Campylobacter* a las células HEp-2, en una concentración de 3mg/ml, que equivale a la mitad de su concentración promedio en leche materna (Figura 3). Cuando la fracción de oligosacáridos crudos se separó en las fracciones neutras y ácidas, sólo la fracción neutra mostró actividad inhibitoria. Posteriormente, cuando la fracción neutra se pasó a través de una columna de afinidad con la lectina *Ulex europaeus I* (UEA I), la actividad inhibitoria se encontró solamente en la fracción fucosilada que fue retenida por la columna. Estudios previos han demostrado que la lectina UEA I reconoce preferencialmente residuos fucosilados de tipo $\alpha 1,2$, con mayor avidez por las cadenas $\text{Fuca}1,2\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ (158,159), entre los que se incluyen principalmente los antígenos de grupo sanguíneo H-2, Le^x , Le^y y en menor medida H-1, Le^b y Le^a .

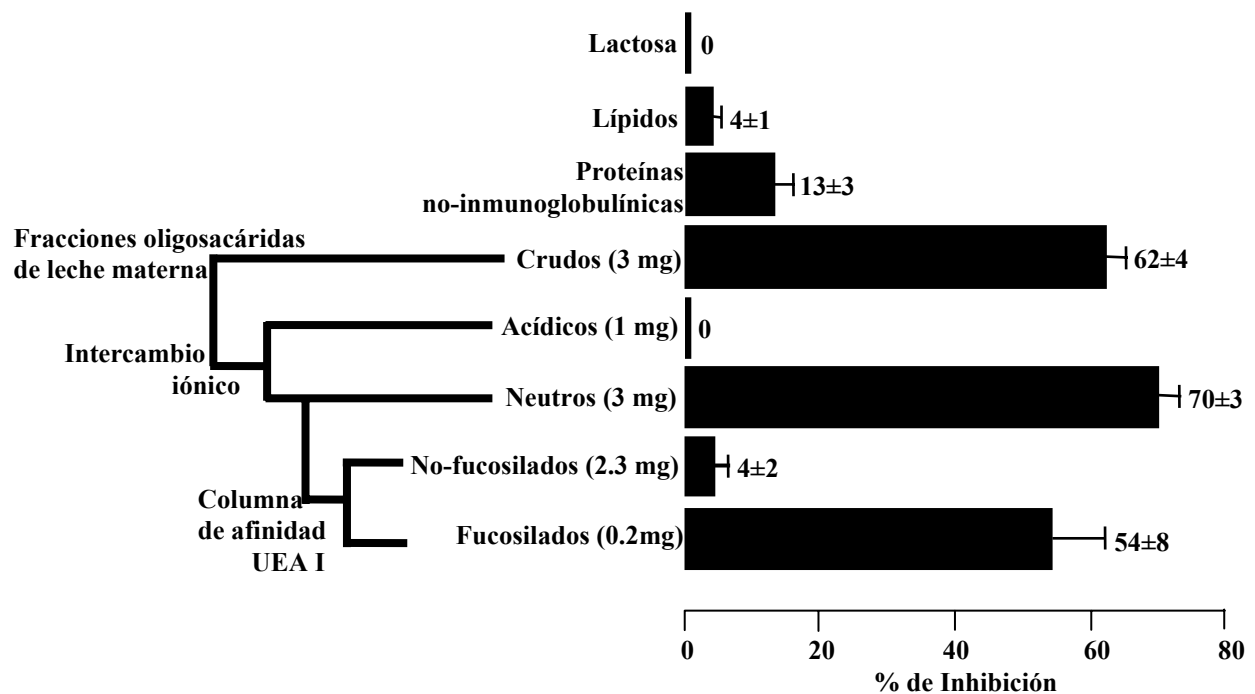


Figura 3. Inhibición de la adherencia de *Campylobacter* a células HEp-2 por fracciones de leche materna (156).

Inhibición de la colonización intestinal por *Campylobacter* en ratones. El modelo de colonización en ratones se utilizó para determinar si la fracción de oligosacáridos de la leche inhibía la colonización intestinal *in vivo*. Brevemente, ratones BALB/c de dos semanas de edad fueron retados con una suspensión de la cepa invasiva de *C. jejuni* 287ip, con 10^4 ó 10^8 UFC/ml. Se conformaron cuatro grupos experimentales con seis ratones cada uno de ellos. Dos de los grupos recibieron el reto más los oligosacáridos neutros de leche materna, por vía oral, y los otros dos únicamente el reto. Los animales que recibieron los oligosacáridos mostraron una reducción significativa de 4.1 y 2.6 logs en la excreción de *Campylobacter* en heces, en respuesta a los inóculos de 10^4 y 10^8 , respectivamente ($p=0.001$ y 0.01) (Figura 4). Estos resultados nos llevaron a proponer que los oligosacáridos fucosilados presentes en la leche materna podrían actuar compitiendo con los receptores específicos para *Campylobacter* en la membrana de las células epiteliales, inhibiendo su reconocimiento.

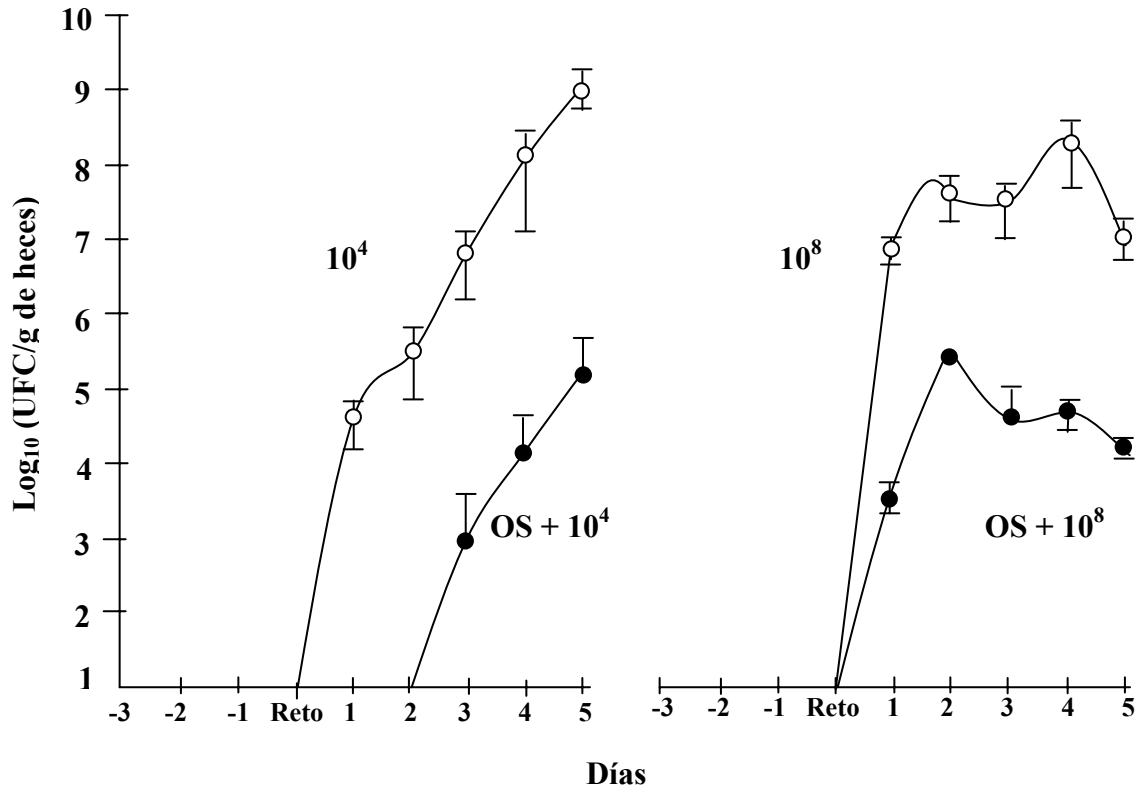


Figura 4. **Inhibición de la colonización intestinal por *Campylobacter* en ratones (156).** OS: oligosacáridos. ○Grupo control de colonización (reto), ●Grupo de prueba (reto + OS)

HIPÓTESIS

Existen oligosacáridos fucosilados en la leche materna con epítopes H, similares a los antígenos de tejido-grupo sanguíneo, que actúan como receptores análogos, compitiendo en la adherencia de *Campylobacter* a las células epiteliales.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar los receptores análogos para *Campylobacter jejuni*, presentes en leche materna capaces de inhibir su asociación a células epiteliales.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Caracterizar a los componentes oligosacáridos fucosilados de la leche materna, que actúan como receptores análogos para *C. jejuni*, mediante transferencia tipo Western.
2. Determinar si las estructuras fucosiladas relacionadas con el determinante antigénico H-2 están involucradas en el reconocimiento bacteria-receptor, mediante ensayos de asociación y de inhibición de la asociación a células CHO normales y células CHO transfectadas con el gen humano para la α 1,2-fucosiltransferasa, CHO-FUT1.
3. Definir los componentes fucosilados responsables de la actividad inhibitoria, mediante ensayos *ex vivo* de asociación e inhibición de la asociación a cortes de íleon, obtenidos de piezas operatorias en pacientes que hayan requerido resección intestinal.
4. Definir si los glicoconjugados α 1,2-fucosilados en leche materna tienen relevancia biológica, mediante un modelo de colonización intestinal *in vivo*, en ratones transfectados con el plásmido pWAP α 1,2FUT1 que expresan el antígeno H(O) en la glándula mamaria durante el periodo de lactancia.

MÉTODOS

Cepas. Se utilizaron cepas de *C. jejuni* aisladas de niños menores de 5 años, participantes en un estudio de cohorte para determinar la incidencia de infección sintomática y asintomática por *Campylobacter* y la proporción de enfermedad/infección en la comunidad (4). Las cepas fueron caracterizadas previamente como patógenas y no patógenas; las cepas invasivas 84sp, 135ip, 166ip, 173ip, 180ip, 187ip, 193ip, 225sp, 268ip, 287ip y 383ip fueron aisladas de niños con diarrea inflamatoria; la cepa adherente 10sp fue aislada de un niño con diarrea no inflamatoria; y las cepas no adherentes 17sp, 49sp, 50sp y 57sp fueron aisladas de niños sanos (41,81).

Objetivo específico 1.

Caracterizar a los componentes oligosacáridos fucosilados de la leche materna que actúan como receptores análogos para *C. jejuni*, mediante transferencia tipo Western.

Se ha demostrado que la presencia de ciertos oligosacáridos fucosilados en la leche materna varía entre individuos y durante el curso de la lactancia. También se ha observado que estas variaciones en el contenido de oligosacáridos está relacionada con el grupo sanguíneo de la donadora (137,139,160). Con el objeto de establecer cuál de los componentes fucosilados de la leche materna está involucrado en la adherencia de *Campylobacter*, se estandarizó un método de transferencia tipo Western utilizando un grupo de neoglicoproteínas comerciales (IsoSep AB; Tullinge, Suecia) correspondientes a los grupos sanguíneos H-1, H-2, Le^b, Le^a, Le^y, Le^x, A y B, transferidas a membranas de nitrocelulosa. Tales neoglicoproteínas están constituidas por el oligosacárido que define al grupo sanguíneo, unido covalentemente a albúmina. Además de estar disponibles comercialmente, los conjugados presentan ventajas metodológicas muy importantes determinadas principalmente por la fracción proteica, ya que son susceptibles de poder someterse a diferentes procesos como electroforesis y posteriormente se pueden fijar a membranas de nitrocelulosa, lo que permite que la fracción oligosacárida se oriente en el espacio de una manera similar a como lo haría en los tejidos.

Transferencia tipo Western. Se estandarizó una transferencia tipo Western (WB) para establecer si existía reconocimiento entre las diferentes neoglicoproteínas y *C. jejuni*, de acuerdo a los métodos descritos por Borén y col. (116), con algunas modificaciones: las neoglicoproteínas se sometieron a SDS-PAGE en geles de poliacrilamida al 7.5% en concentraciones equimoleculares de 6.3×10^{-10} moles del oligosacárido de grupo sanguíneo por carril: Le^b (2.02 µg, 32 moles de azúcar/mol de proteína), H-1 (2.3 µg, 25 moles de azúcar/mol de proteína), H-2 (2.0 µg, 26 moles de azúcar/mol de proteína), Tri-Le^x (2.84 µg, 23 moles de azúcar/mol de proteína), Le^y (2.1 µg, 26 moles de azúcar/mol de proteína), Le^a (2.44 µg, 23 moles de azúcar/mol de proteína), Le^x (2.71 µg, 20 moles de azúcar/mol de proteína), A (3.16 µg, 18 moles de azúcar/mol de proteína) y B (2.57 µg, 19 moles de azúcar/mol de proteína). Las neoglicoproteínas se transfirieron a membranas de nitrocelulosa. Después del lavado y bloqueo con BB2 [TBS pH 7.5, 1% de reactivo de bloqueo (Roche Molecular Biochemicals, Basel, Suiza), MnCl₂ 0.1 mM, MgCl₂ 0.1 mM, y CaCl₂ 0.1 mM] para evitar las uniones inespecíficas, las membranas se pusieron en contacto con cepas prototipo patógena y no patógena de *C. jejuni* marcadas con DIG (Digoxigenina-NHS. Boehringer, Mannheim) y ajustadas a 0.2 DO₆₀₀,

incubándose durante 4 hr con agitación suave. Después de lavar con TBS 6 veces, incubar con un conjugado anti-DIG-fosfatasa alcalina durante 1 hr a temperatura ambiente y volver a lavar con TBS 5 veces, el sistema se reveló con BCIP/NBT como sustrato para la enzima.

Para demostrar la especificidad del reconocimiento bacteria-receptor, se realizaron ensayos de inhibición con anticuerpos monoclonales (MAbs) dirigidos contra los antígenos H-1, Le^a, Le^b, Le^x (Signet Laboratories, Dedham, MA), H-2 o Le^y (Accurate Chemical, Westbury, NY) a diluciones de 1:10 y 1:20. En cada caso se incubó la membrana previamente con cada uno de ellos antes de ponerla en contacto con la bacteria y efectuar el ensayo de la manera ya descrita.

La especificidad del reconocimiento de los antígenos de grupo sanguíneo H-1 y H-2 por *Campylobacter*, se determinó también por inhibición con 2'fucosil-lactosa (2'FL) en el ensayo de WB. Concentraciones equimoleculares de las neoglicoproteínas H-1 y H-2 se sometieron a SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa, se bloquearon e incubaron con una suspensión de *C. jejuni*-DIG ajustada a 0.2 DO₆₀₀, que se incubó previamente con diferentes concentraciones de 2'FL (1, 10, 20, 50 y 250 µg/ml). Después de 4 hr de incubación a temperatura ambiente con agitación suave, las membranas se lavaron 6 veces, se incubaron con el conjugado anti-DIG-fosfatasa alcalina, se lavaron y se revelaron con el sustrato correspondiente.

Las lectinas *Ulex europaeus I* (UEA I) y *Lotus tetragonolobus* (Lotus) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO), que reconocen residuos L-fucosilados, se utilizaron para verificar la afinidad relativa de las estructuras fucosiladas de las neoglicoproteínas transferidas a las membranas de nitrocelulosa. Lotus se caracteriza por una alta afinidad por los residuos fucosilados en los oligosacáridos de cadena tipo H-2. Las membranas se bloquearon con BB2 y posteriormente se pusieron en contacto con las lectinas conjugadas con peroxidasa, durante 2 hr a temperatura ambiente y agitación suave; después de lavar se reveló con H₂O₂ como sustrato para la enzima y α-naftol como cromógeno.

Afinidad de cepas clínicas de *Campylobacter* a epítopes de grupos sanguíneos ABO(H). Con el objeto de demostrar que el reconocimiento de receptores fucosilados es una característica propia del género *Campylobacter*, se estudiaron aislados clínicos de *Campylobacter* procedentes de infecciones sintomáticas y asintomáticas previamente caracterizados por su capacidad de adherencia a células HEp-2. Se analizaron 12 cepas adherentes y 4 no adherentes mediante el método de WB con las membranas de nitrocelulosa transferidas con las neoglicoproteínas con epítopes de los grupos sanguíneos H-1, H-2, Le^a, Le^b, Le^y y Le^x, a la misma concentración previamente descrita.

Objetivo específico 2.

Determinar si las estructuras fucosiladas relacionadas con el determinante antigénico H-2 están involucradas en el reconocimiento bacteria-receptor, mediante ensayos de asociación y de inhibición de la asociación a células CHO normales y células CHO transfectadas con el gen humano para la α1,2-fucosiltransferasa, CHO-FUT1.

Células de ovario de hamster chino (CHO) transfectadas con el gen humano de la α1,2-fucosiltransferasa humana. Con el objeto de demostrar la especificidad de la adherencia de *Campylobacter* a células que expresen radicales α1,2-fucosa en la superficie de sus

membranas, se realizaron ensayos de adherencia con *Campylobacter* en células CHO transfectadas con el gene *FUT1* de la α 1,2-fucosiltransferasa (CHO-FUT1) (161), que expresan en su superficie los determinantes antigénicos del grupo sanguíneo H-2, definido por la estructura $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$. Como control se utilizaron células CHO transfectadas únicamente con el vector pCDM₇, sin el gene *FUT1*, las cuales se denominaron CHO-V (161). Ambas líneas celulares nos fueron donadas por el Dr. Pedro A. Prieto, de Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, USA. Las células CHO-FUT1 se cultivaron en medio de Eagle modificación de Dulbecco (con alto contenido de glucosa), suplementado con 10% de Suero Fetal de Bovino (SFB), 110 $\mu\text{g/ml}$ de piruvato de sodio, 50 $\mu\text{g/ml}$ de sulfato de gentamicina, 15 $\mu\text{g/ml}$ de hipoxantina, 1 $\mu\text{g/ml}$ de aminopterina, y 5.15 $\mu\text{g/ml}$ de timidina. Las células CHO-V se cultivaron en medio de Iscove modificación de Dulbecco suplementado con 10% de SFB, 5 $\mu\text{g/ml}$ de peniciclina-estreptomina, 10 mM de hipoxantina, y 1.6 mM de timidina.

Identificación de epítopes específicos H-2 en la superficie de las células CHO-FUT1 mediante ensayos de inmunofluorescencia. La demostración de la expresión de los residuos fucosilados, determinantes de grupo sanguíneo en la superficie celular, se realizó mediante ensayos de inmunofluorescencia con los MABs para los antígenos de los grupos H-1, H-2 y Lewis. Se colocaron 400 μl por pozo de una suspensión con 2×10^5 células viables por ml en microplacas de cultivo de 8 pozos, y se incubaron por 18 hr a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Las monocapas se lavaron 3 veces con PBS, pH 7.3, y se fijaron con formalina al 10% por 1 hr a temperatura ambiente. Después de lavar y bloquear con BSA al 1% en PBS por 30 min, para evitar uniones inespecíficas, las células fueron incubadas con los MABs anti H-2, Le^x, Le^y, H-1, Le^a y Le^b, diluidos 1:30 en BSA al 0.1% en PBS, por 90 min a temperatura ambiente con agitación suave. Después de lavar 3 veces con PBS, se agregó un anticuerpo policlonal de conejo anti-ratón marcado con isotiocianato de fluoresceína (FITC), diluido 1:40 en BSA al 0.1% en PBS. Después de lavar tres veces más, las células se tiñeron con azul de Evans como colorante de contraste y se observaron por microscopía de fluorescencia.

Asociación de *Campylobacter* a las células CHO. Para determinar la interacción bacteria-oligosacárido a nivel celular, se comparó el grado de asociación de *Campylobacter* a las células CHO normales (CHO-V) y a las células CHO transfectadas (CHO-FUT1), en un ensayo de asociación en microcámaras de cultivo: 400 μl por pozo de una suspensión con 2×10^5 células viables por ml, se colocaron en microplacas de cultivo de 8 pozos y se incubaron por 18 hr a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂. Las células se lavaron con Hank's y 100 μl de una suspensión de *Campylobacter* con 9×10^8 UFC/ml se adicionó a cada uno de los pozos, incubándose por 3 hr a 37°C. Las células se lavaron 6 veces con PBS, se fijaron con formalina al 10% durante 1 hr a temperatura ambiente y se tiñeron por el método de Whartin-Starry. La placa se observó al microscopio para determinar el porcentaje de células con bacterias asociadas. Se realizaron ensayos idénticos creciendo las células en cubreobjetos de vidrio circulares, para observarlos con microscopía electrónica de barrido; en este caso la fijación se realizó con glutaraldehído al 2%, se deshidrató gradualmente con etanol, se congeló a punto crítico y se cubrió con oro.

Inhibición de la asociación de *Campylobacter* a células CHO. Para definir la especificidad de unión bacteria-receptor, se realizaron ensayos de inhibición de la asociación de

Campylobacter en las células transfectadas CHO-FUT1 con α 1,2-fucosil-ligandos y homólogos fucosilados. Por un lado, los posibles receptores celulares se bloquearon con moléculas que se unen al determinante H-2: MAb anti-H-2 diluido 1:10, 1:20, y 1:40, y con las lectinas UEA I y Lotus a concentraciones de 0.05, 0.1, 0.2, 0.4, 0.8, 1.6 y 3.2 mg/ml. En este caso, se utilizaron como controles los MAbs anti-H-1 y anti-A, así como la lectina *Dolichus biflorus* (DB), a las mismas diluciones y concentraciones. Las monocapas celulares crecidas en las microcámaras de cultivo se incubaron por 1 hr con cada uno de los α 1,2-fucosil-ligandos antes de agregar 100 μ l de la suspensión bacteriana con 1×10^8 bacterias/ml. Por otro lado, los antígenos bacterianos que pudieran funcionar como adhesinas se bloquearon con los homólogos del receptor en la superficie celular: los oligosacáridos neutros (0.5, 1, 1.5 y 2 mg/ml), la neoglicoproteína BSA-H-2 (0.5, 1, 1.5 y 2 mg/ml) y 2'FL (0.02, 0.04, 0.08, 0.016, 0.625, 1.25, 2.5 y 5 mg/ml que equivalen a 0.04, 0.08, 0.16, 0.32, 1.28, 2.56, 5.12, y 10.2 μ mol/ml); en este caso 100 μ l de la suspensión bacteriana se incubaron con cada uno de los homólogos fucosilados antes de ponerse en contacto con las monocapas celulares; como controles se utilizaron lactosa (1, 2, 4, 8, y 16 mg/ml que equivalen a 2.9, 5.8, 11.6, 23.3, y 46.7 μ mol/ml), y BSA (0.4, 0.8 y 1.6 mg/ml que equivalen a 6.1, 12.1, 24.2 nmol/ml). Para ambos ensayos, después de 3 hr de incubación a 37°C se lavaron las células, se rompieron por tratamiento con Tritón X100, y se determinaron las UFC/pozo por siembra de diluciones seriadas en agar sangre de carnero. El porcentaje de inhibición en cada caso se determinó comparando el grado de asociación con el ensayo control en el que no se agregaron α 1,2-fucosil-ligandos u homólogos.

Objetivo específico 3.

Definir los componentes fucosilados responsables de la actividad inhibitoria, mediante ensayos *ex vivo* de asociación e inhibición de la asociación a cortes de íleon, obtenidos de piezas operatorias de pacientes que hayan requerido resección intestinal.

Adherencia e inhibición de la adherencia de *Campylobacter* a intestino humano. Los ensayos de asociación e inhibición de la asociación *ex vivo* se realizaron en cortes de íleon obtenidos de piezas operatorias de pacientes que habían requerido resección intestinal. Los cortes fueron proporcionados por cirujanos del propio Instituto, transportándose al laboratorio a 4°C en PBS, pH 7.3, suplementado con 2 μ g/ml de aprotinina.

Los ensayos se realizaron de acuerdo a la técnica estandarizada por Ramos-Cervantes y col. (162). Las porciones de íleon se lavaron con PBS, el exceso de moco se eliminó limpiando suavemente con gasa, y se cortaron en segmentos de 1 cm²; se incubaron posteriormente con 1.5 ml de una suspensión bacteriana ajustada a 0.1 DO₆₀₀, en TBS (tris-buffer salino pH 7.5, MnCl₂ 0.1 mM, MgCl₂ 0.1 mM, CaCl₂ 0.1 mM) adicionado con 1 μ g/ml de aprotinina, a 37°C por 2 hr en atmósfera con 5% de CO₂. Después de lavar exhaustivamente para eliminar las bacterias no adheridas, el tejido se homogenizó en 1 ml de PBS centrifugándose a 1000 rpm por 10 min; finalmente se determinaron las UFC en el sobrenadante del homogenado por siembra de diluciones seriadas en agar carbón, suplementado con vancomicina, cefoperazona y anfotericina B. El grado de adherencia se expresó como UFC por cm² de tejido.

El ensayo de inhibición se realizó de manera similar, incubando previamente la suspensión bacteriana con 2 mg/ml de los oligosacáridos neutros de leche materna o con 2'FL, para ponerse posteriormente en contacto con el tejido y continuar con el proceso establecido. El porcentaje de inhibición se determinó por comparación con el ensayo control.

Objetivo específico 4.

Definir si los glicoconjugados α 1,2-fucosilados en leche materna tienen relevancia biológica, mediante un modelo de colonización intestinal *in vivo*, en ratones transfectados con el plásmido pWAP α 1,2FUT1 que expresan el antígeno H(O) en la glándula mamaria durante el periodo de lactancia.

Modelo de colonización por *Campylobacter* en ratones transgénicos. Para determinar si la presencia de residuos fucosilados de tipo α 1,2 en la leche materna era capaz de inhibir la colonización por *Campylobacter in vivo*, se desarrolló un modelo experimental de colonización en ratones BG/SJL transfectados con un plásmido, pWAP α 1,2FUT1, que contenía el gen de la fucosiltransferasa humana *FUT1*, una secuencia señal poli A para la hormona de crecimiento bovina, y un promotor murino de la proteína ácida del suero que dirige la expresión principalmente a la glándula mamaria, con lo que se logró la secreción de los residuos fucosilados de tipo α 1,2 en la leche de las ratonas (163). Las cepas de ratones BG/SJL transgénicas y no transgénicas nos fueron donadas por el Dr. Pedro A. Prieto, de Ross Products Division, Abbott Laboratories, Columbus, Ohio, USA.

Los ratones se mantuvieron en microaisladores plásticos y recibieron alimento y agua estériles durante todo el seguimiento; se verificó que fueran transgénicos o no transgénicos por PCR. Los ratones hembras lactantes con sus respectivas camadas fueron mantenidos en microaisladores por separado.

Se utilizaron camadas de 10 días de edad, en las que se realizaron cultivos previos de las heces de la madre y del intestino de una de las crías para verificar que no estuvieran colonizadas por *Campylobacter* o bacterias espirilares semejantes. Cada una de las crías fue inoculada por vía oral con 10 μ l de una suspensión de la cepa invasiva 287ip con 10^4 , 10^8 , ó 10^9 UFC/ml (equivalente a 10^2 , 10^6 y 10^7 UFC por animal), y se regresaron con su madre para continuar con su periodo de lactancia. Camadas controles de madres no transgénicas fueron inoculadas con 10 μ l de la suspensión con 10^8 UFC/ml (10^6 UFC por animal). Para determinar la colonización, un ratón de cada camada fue sacrificado en los días 1, 3, 5, 7, 9, 11, 13 y 15 después de recibir el inóculo, hasta contar con 10 ratones en cada día de seguimiento. De cada animal se resecaron 1 cm del íleon distal y 1 cm del ciego, colocándose por separado en 1 ml de PBS, se pesaron, homogenizaron y centrifugaron a 2,000 rpm por 10 min. Diluciones seriadas del sobrenadante se estriaron sobre agar carbón suplementado con antibióticos, para determinar UFC por gramo de tejido.

La colonización se expresó como el porcentaje de crías positivas para *Campylobacter* en cada uno de los días de seguimiento. Las diferencias entre las crías del grupo experimental transgénico y del grupo control no transgénico, retadas con 10^6 UFC de *Campylobacter*, fueron evaluadas por la prueba de Mann-Whitney (164). Las diferencias entre todos los grupos y en los diferentes periodos de prueba fueron evaluadas por un análisis de varianza, seguido por una estimación de los coeficientes de regresión.

RESULTADOS

Unión de *C. jejuni* a oligosacáridos determinantes de grupo sanguíneo en transferencia tipo Western. Para definir la naturaleza de los componentes fucosilados involucrados en el reconocimiento bacteria-receptor, se utilizó un ensayo en fase sólida en el que los determinantes oligosacáridos de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo, unidos covalentemente a albúmina, se fijaron a membranas de nitrocelulosa para evaluar la asociación de *Campylobacter*. Los patrones de reconocimiento observados variaron de acuerdo al origen de la cepa: la cepa 287ip aislada de un caso de diarrea inflamatoria, clasificada como patógena por ensayos *in vitro*, y cuyo índice de asociación en cultivo celular es de 98%, reconoció todos los residuos fucosilados presentes en las neoglicoproteínas (Figura 5a); mientras que la cepa 50sp, aislada de un paciente asintomático y caracterizada *in vitro* como no patógena, no reconoció ninguno de los determinantes (Figura 5b). Al probar un mayor número de cepas se observó un comportamiento similar. En total, 10 de 12 cepas clasificadas como patógenas (180ip, 383ip, 166ip, 268ip, 135ip, 225sp, 187ip, 84sp, 10sp, y 287ip) reconocieron todos los antígenos fucosilados, mientras que ninguna de las cuatro cepas clasificadas como no patógenas (17sp, 49sp, 57sp y 50sp) reconoció alguno de ellos (Figura 5c). La diferencia entre ambos grupos de cepas fue estadísticamente significativa ($p=0.01$), lo que indica que la capacidad de *Campylobacter* para reconocer los determinantes fucosilados de grupo sanguíneo podría estar asociada con sus características de patogenicidad.

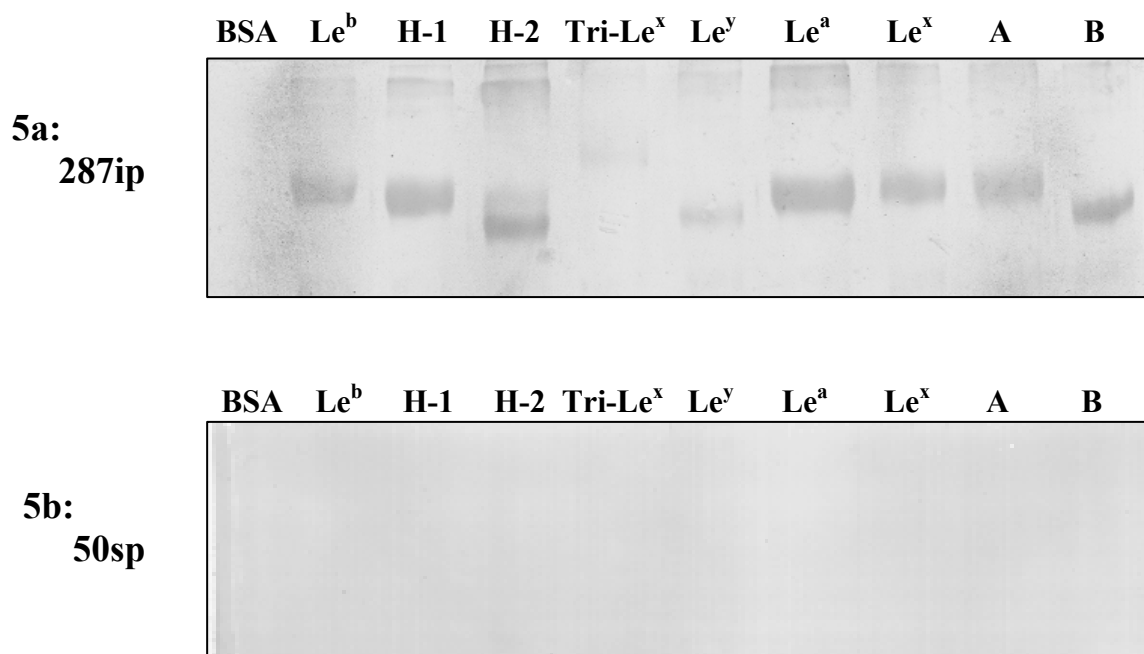




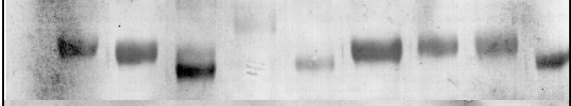






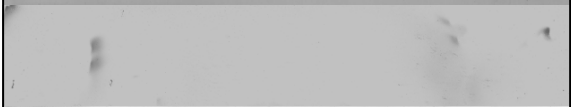
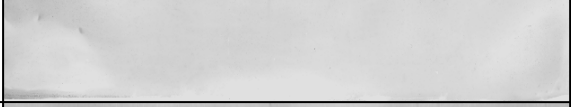



Figura 5. **Patrones de reconocimiento de los epítomos determinantes de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo por *Campylobacter* en WB:** a) Cepa control patógena 287ip. b) Cepa control no patógena 50sp. c) Cepas patógenas y no patógenas aisladas del estudio de cohorte.

5c

Neoglicoproteína

Cepa **Índice de Asociación Celular (%)**

BSA Le^b H-1 H-2 TriLe^x Le^y Le^a Le^x A B

Cepas Patógenas		180 ip	100
		383 ip	73
		166 ip	87
		268 ip	65
		135 ip	95
		225 sp	95
		187 ip	80
		84 sp	86
		10 sp	97
		173 ip	75
	193 sp	100	
Cepas No-Patógenas		17 sp	9
		49 sp	12
		57 sp	7

Especificidad del reconocimiento entre *C. jejuni* y el epítipo H-2. La especificidad del reconocimiento por *Campylobacter* de los determinantes de tejido-grupo sanguíneo se verificó en ensayos de inhibición con MABs dirigidos contra los antígenos H-2, Le^x, Le^y, H-1, Le^a, y Le^b. El mayor grado de inhibición se observó predominantemente con los MABs anti-H-2 (Figura 6a, carriles 4-6), y en menor medida con los dirigidos contra los antígenos del sistema Lewis, pero no con el MAb dirigido contra el precursor de H-1 (Figura 6a, carriles 1-3).

La especificidad del reconocimiento por *Campylobacter* de los antígenos de grupo H-1 y H-2 se confirmó además por un ensayo de inhibición con 2'FL, que es la estructura más pequeña que define el grupo de residuos fucosilados del tipo $\alpha 1,2$. Se probaron diferentes concentraciones y se observó un grado de inhibición notable del reconocimiento de H-2 por *Campylobacter* a concentraciones tan bajas como 10 $\mu\text{g/ml}$ (Figura 6b, carriles pares 6 a 14), mientras que para inhibir la unión a H-1 se requirió una concentración 25 veces mayor, es decir, 250 $\mu\text{g/ml}$ para lograr el mismo efecto (Figura 6b, carril 13). Estos resultados sugieren que la terminal fucosilada en posición $\alpha 1,2$ es un componente crítico para el reconocimiento por *Campylobacter*, siendo el determinante H-2 la estructura fucosilada $\alpha 1,2$ preferida por la bacteria.

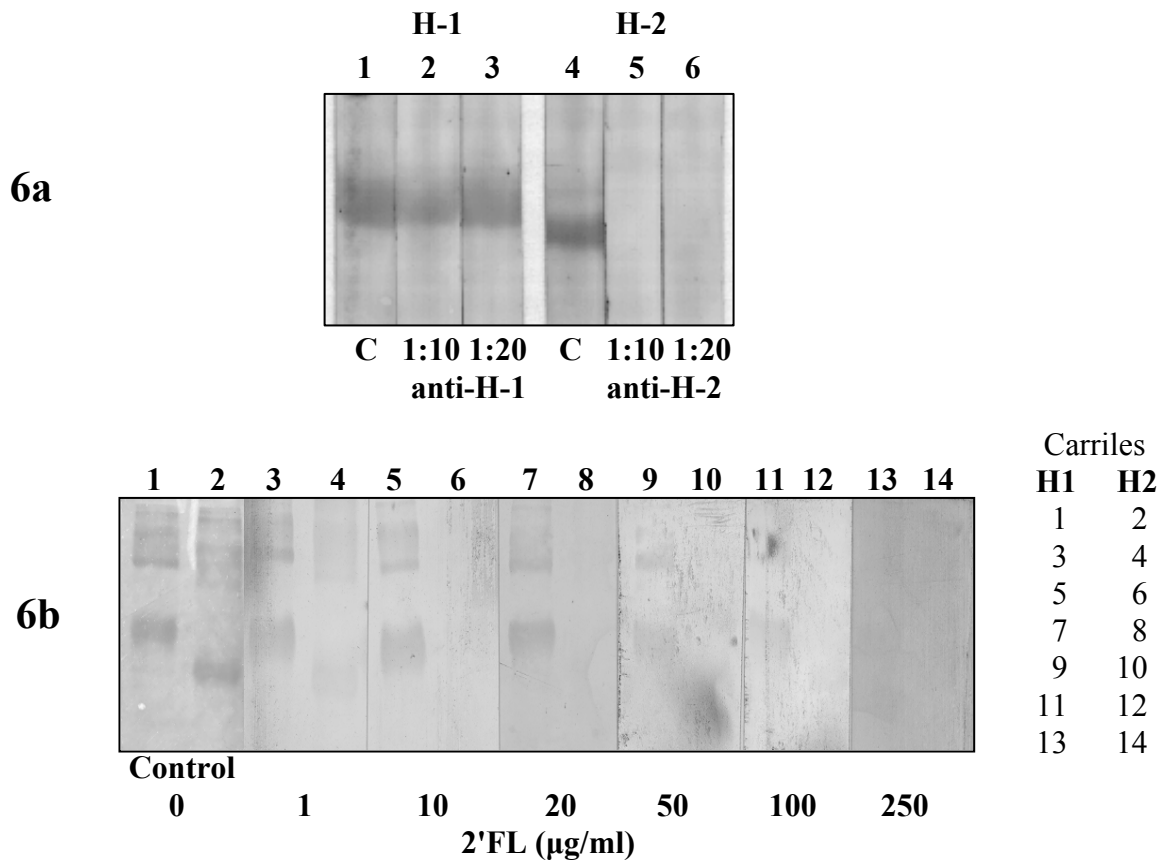


Figura 6. Inhibición del reconocimiento de los epítipos determinantes de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo por *Campylobacter* en WB: a) Inhibición con MABs anti-H-1 y anti-H-2. b) Inhibición con 2'Fucosil-lactosa.

Expresión de los antígenos H-2 en las células CHO-FUT1. Para definir si los epítopes fucosilados podían mediar la adherencia de *Campylobacter* a células epiteliales era necesario contar con una línea celular que expresara estos determinantes antigénicos en su superficie. Para ello utilizamos células CHO que, al estar transfectadas con el gen humano de la α 1,2-fucosiltransferasa *FUT1*, pueden realizar la síntesis de los epítopes α 1,2-fucosilados, ya que disponen de los sustratos endógenos necesarios para ello, y expresarlos de manera homogénea en su superficie. Por inmunofluorescencia con el MAb anti-H-2, se demostró la expresión específica de las terminales $\text{Fuc}\alpha 1,2\text{Gal}\beta 1,4\text{GlcNAc}\beta\text{-R}$ en las células CHO-FUT1, siendo negativas para la expresión de los determinantes H-1 y el grupo Lewis (Figura 7).

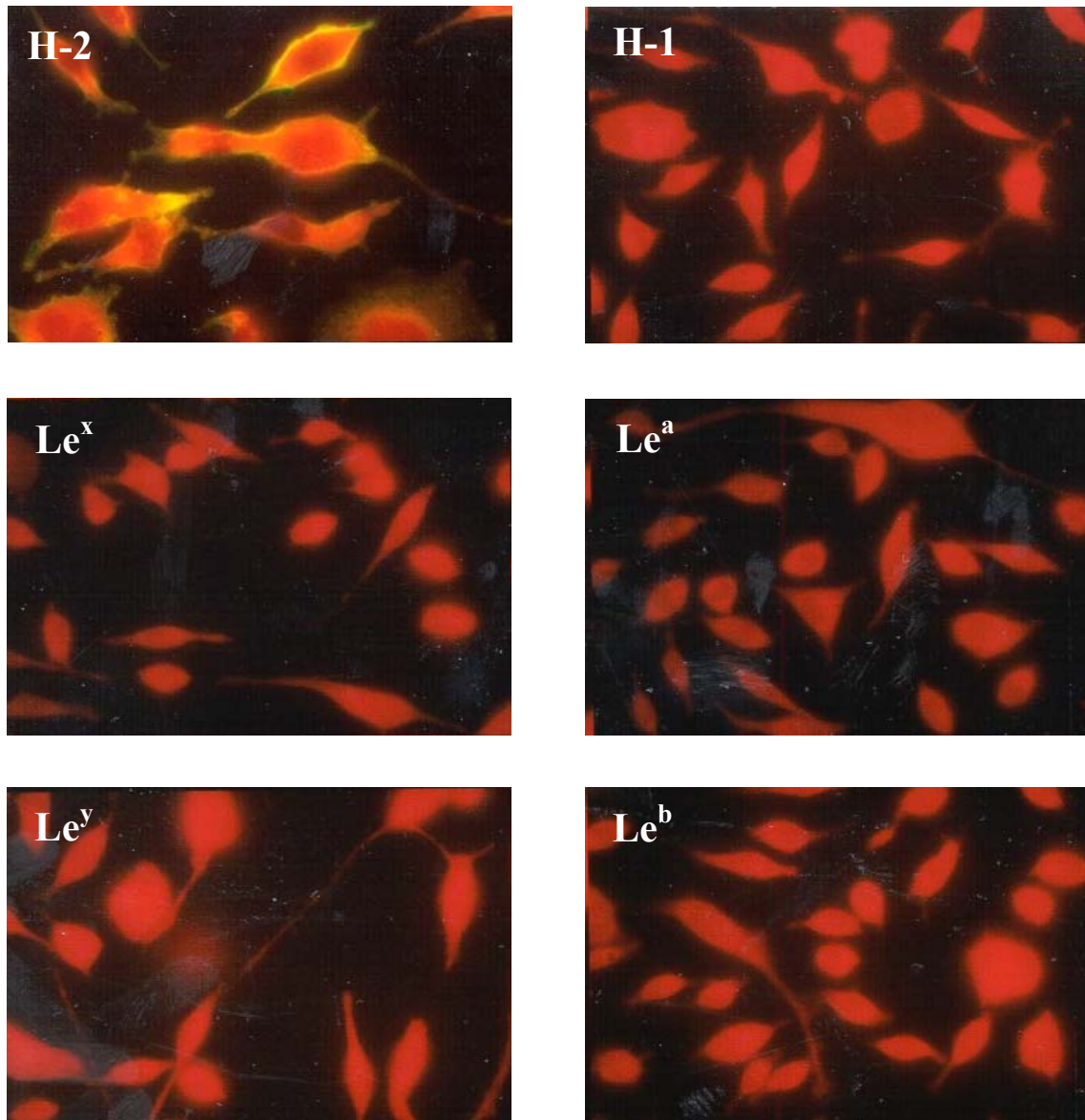


Figura 7. **Inmunofluorescencia en células CHO-FUT1.** Las células se observan teñidas de rojo, mientras que la reacción positiva con el MAb anti-H-2 provoca un halo amarillo intenso en las células que expresan el epítope.

Asociación específica de *Campylobacter* a las células CHO. El índice de adherencia de las cepas patógenas de *Campylobacter* a las células CHO-FUT1 alcanzó el 100%, observándose grandes acúmulos bacterianos (Figura 8a), mientras que las células CHO no transfectadas, y que por ende no expresan los epítopes fucosilados en su superficie, mostraron un índice de adherencia por debajo del 20% (Figura 8b). Cabe hacer notar que las células CHO normales poseen una baja afinidad de reconocimiento con la bacteria, con respecto a la afinidad observada en las células HEp-2. Estos resultados demuestran que la sola expresión de los antígenos de grupo H-2 en las células es suficiente para provocar la adherencia de *Campylobacter*.

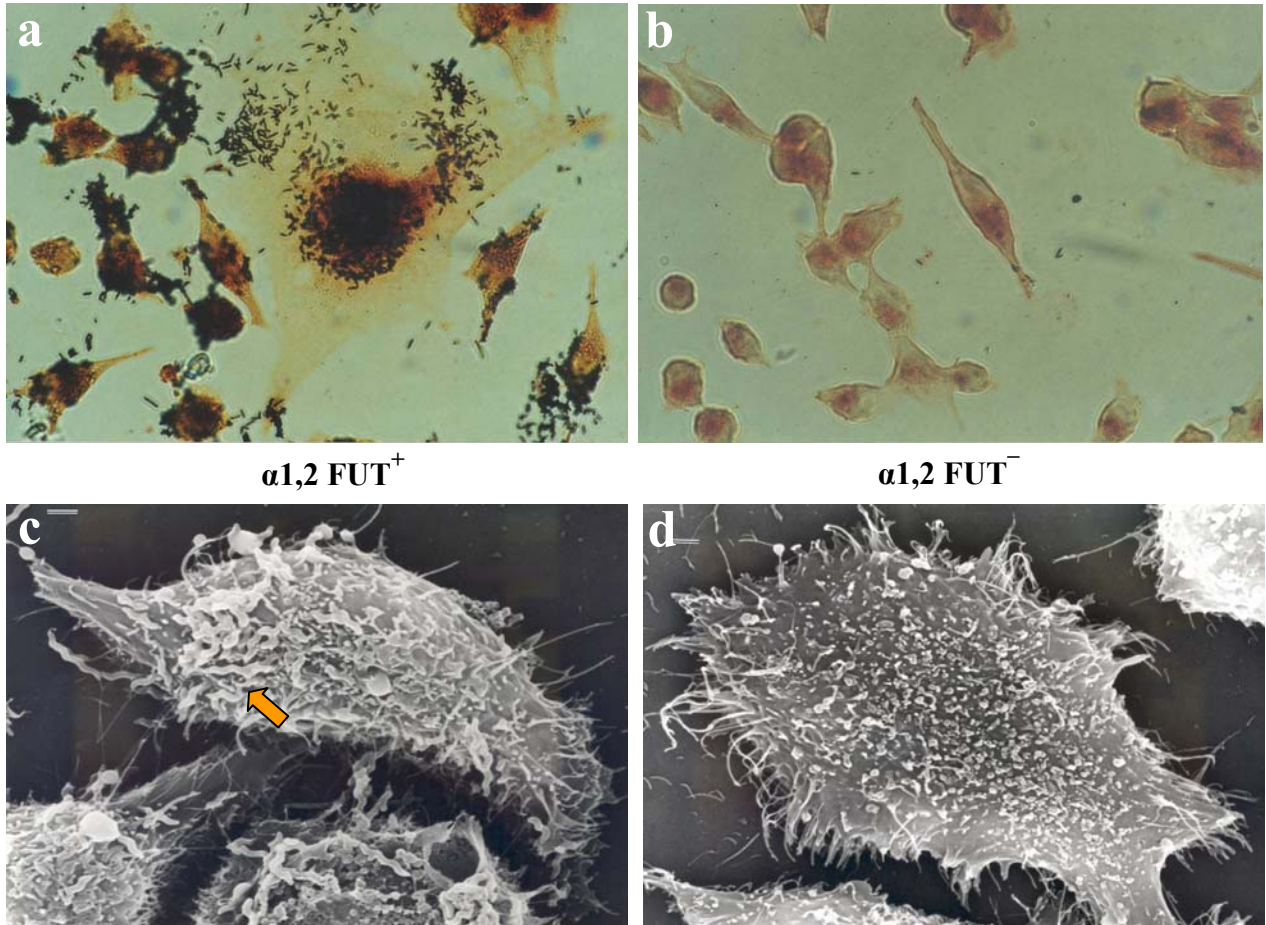


Figura 8. **Microscopía de inmersión y tinción de Warthin-Starry:** a) Las células transfectadas ($\alpha 1,2\text{FUT}^+$) mostraron numerosas bacterias adheridas a su superficie; en la fotografía destaca una célula cuyo citoplasma se ha extendido, ligeramente teñido de amarillo y con grandes acúmulos bacterianos. b) Células CHO normales ($\alpha 1,2\text{FUT}^-$), con adherencia baja. **Microscopía electrónica de barrido:** c) Células transfectadas en las que se observa a *Campylobacter* adherido, con su morfología típica de espirilo. d) Células control no transfectadas con bajo índice de adherencia.

Inhibición de la asociación de *Campylobacter* a células CHO. La especificidad del reconocimiento por *Campylobacter* de los residuos fucosilados, expresados en la superficie celular, se probó con diferentes compuestos que inhiben la unión a H-2. En la primera fase, los receptores fucosilados celulares se bloquearon con moléculas que se unen específicamente al determinante H-2, lográndose inhibiciones significativas con el MAb anti-H-2 y las lectinas Lotus y UEA I; en cambio, cuando las células se trataron con los MAbs anti-H-1 y anti-A o con la lectina DB, que no reconocen H-2, no se observó inhibición de la adherencia de *Campylobacter* a las células. En la segunda fase, los componentes de superficie bacterianos que pudieran actuar como adhesinas y con afinidad por los epítipes fucosilados H-2 se bloquearon con moléculas homólogas al receptor en la superficie celular, lográndose la mayor inhibición con la neoglicoproteína BSA-H-2, los oligosacáridos de leche materna, y en menor medida con 2'FL. No se observó inhibición con otras moléculas heterólogas, como la neoglicoproteína Tri-Le^x, lactosa y BSA (Tabla 1). Estos datos demuestran que el reconocimiento bacteria-receptor es específico para *Campylobacter* y los epítipes fucosilados relacionados con el antígeno de grupo sanguíneo H, además de que este reconocimiento constituye un paso esencial en la adherencia de las cepas patógenas de *Campylobacter* a las células epiteliales del hospedero.

Tabla 1. Concentraciones inhibitorias CI₅₀ y CI₉₀ de los ligandos y homólogos α1,2-fucosilados para la inhibición de la adherencia de *Campylobacter* a las células CHO-FUT1.

	Ligandos u homólogos α1,2-fucosilados	CI ₅₀ *	CI ₉₀ *
Lectinas (mg/ml)	<i>Ulex europaeus I</i>	0.4	1.9
	<i>Lotus tetragonolobus</i>	1.9	>3.2
	<i>Dolichos biflorus</i> (control negativo)	>3.2	>3.2
MAbs (Dilución)	Anti-H-2	1:20	1:10
	Anti-H-1	<1:10	<1:10
	Anti-A (control negativo)	<1:10	<1:10
Oligosacáridos (μmol/ml)	OS ⁺ neutros de leche humana	1.1	2.3
	H-2-BSA	0.28 [¶]	0.6
	BSA (control)	>0.024	>0.024
	2'FL	5.2	11.6
	Lactosa (control)	>23 [§]	>23

*La actividad inhibitoria fue derivada de curvas de inhibición.

+La molaridad de la mezcla de oligosacáridos neutros de leche materna fue calculada usando un tamaño promedio de 4.15 azúcares por molécula (PM 715.5), determinado del análisis del contenido de oligosacáridos de la leche de 93 madres de la Ciudad de México. Este es muy similar al estimado por Jennenss (165), cuyos cálculos estuvieron basados en un tamaño promedio de 4 azúcares por molécula.

¶Equivalente a 0.01 μmol/ml de BSA.

§No se observó inhibición con esta concentración de azúcar. Concentraciones más altas inducen el desprendimiento de la monocapa celular.

Efecto de los oligosacáridos en la adherencia de *Campylobacter* a intestino humano.

El papel de los oligosacáridos en la interacción de *Campylobacter* con su receptor en las células epiteliales del intestino se determinó *ex vivo* en cortes de intestino humano. Se observó que la capacidad de las cepas de *Campylobacter* para adherirse al tejido es dependiente de su potencial patogénico, es decir, la cepa no patógena 57sp se adhirió en menor proporción, casi un 50% menos, que la cepa patógena 287ip. Por otra parte, con la fracción de los oligosacáridos neutros se alcanzaron porcentajes altos de inhibición de la adherencia para ambas cepas, 93% para la cepa 287ip y 82% para la 57sp. Sin embargo, cuando se realizó el ensayo de inhibición con 2'FL se alcanzó hasta un 69% para la cepa patógena, mientras que el porcentaje de inhibición para la cepa no patógena fue notablemente bajo, sólo del 8% (Figura 9). Estos resultados son congruentes con el hecho de que la cepa patógena 287ip reconozca la terminal fucosilada $\alpha 1,2$, en el receptor presente en la superficie de las células epiteliales del hospedero, mientras que la cepa no patógena 57sp podría reconocer otros componentes sobre las células no relacionados con el determinante antigénico H-2, por los que muestra además una menor avidéz, y cuyo reconocimiento puede ser inhibido por otras moléculas presentes en la fracción de oligosacáridos neutros de la leche materna.

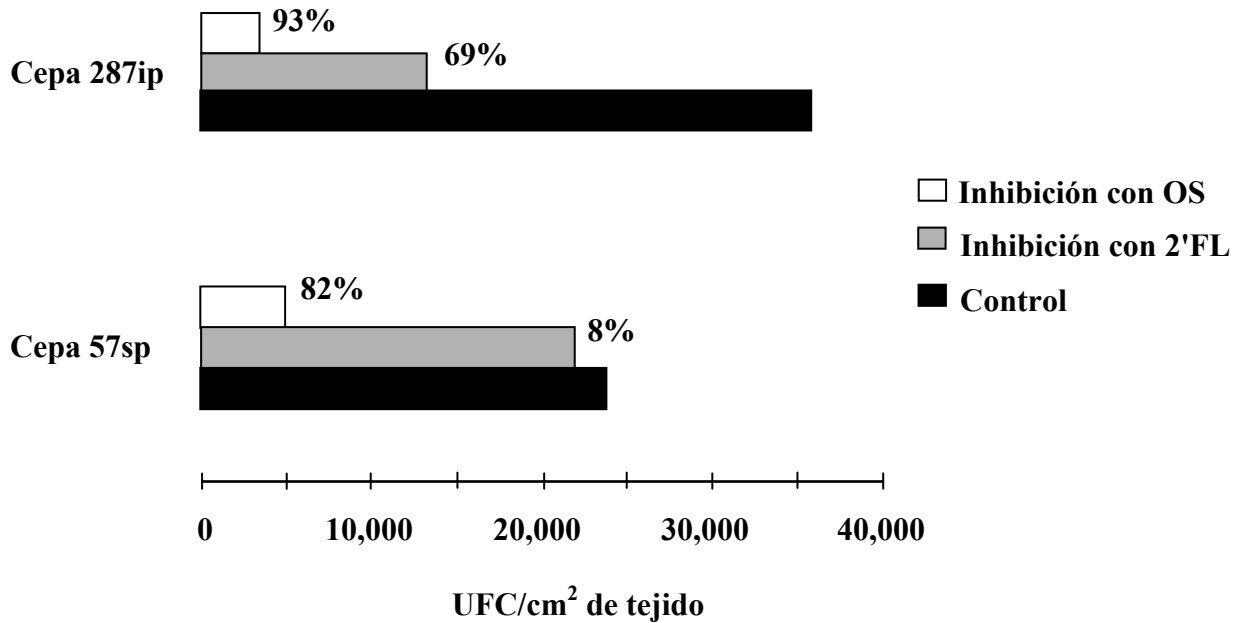


Figura 9. **Inhibición de la adherencia de *Campylobacter* a tejido intestinal humano.** Porcentajes de inhibición obtenidos con la fracción de oligosacáridos de leche materna (OS) y 2'FL para las cepas 287ip (patógena) y 57sp (no patógena).

Actividad biológica de los glicoconjugados α 1,2 en leche materna. La actividad biológica de los oligosacáridos con los determinantes α 1,2-fucosilados presentes en leche materna y relacionados con el determinante antigénico H-2, se valoró *in vivo* en un modelo experimental con ratones transfectados con el gen humano de la α 1,2-fucosiltransferasa. Los ratones hembras lactantes secretan en su leche los determinantes de grupo H-2, por lo que en sus camadas se pudo determinar si su presencia era capaz de inhibir la colonización intestinal por *Campylobacter*, comparándolas con camadas de ratones no transgénicos.

Se expresó la colonización por *Campylobacter* como el porcentaje de animales con la bacteria en el intestino por cada día de seguimiento; se comparó además el comportamiento de cada grupo de acuerdo al inóculo recibido. El grupo control recibió un inóculo de 10^8 UFC/ml, y permaneció infectado durante todo el periodo de estudio, con un porcentaje de colonización entre 67% y 100% por cada día de seguimiento. Por el contrario, en las camadas de animales transgénicos se observó una disminución importante en el porcentaje de crías infectadas durante el periodo de seguimiento, que fue estadísticamente significativa ($p=0.0001$). El tiempo de colonización en los grupos experimentales fue también dependiente del inóculo recibido; así, con un inóculo de 10^4 UFC ninguna de las crías estuvo infectada después del día 5 de seguimiento, y con los inóculos de 10^8 y 10^9 no se observaron crías infectadas después del día 9 (Tabla 2). En el análisis comparativo del grupo control y los grupos experimentales se determinó que la eliminación de *Campylobacter* del intestino de los animales fue significativamente mayor en las camadas de las madres transgénicas que en las de las no transgénicas, cuando las crías de ambos grupos recibieron el mismo inóculo de 10^8 UFC (Prueba de Mann-Whitney, $p=0.006$). Además, cada grupo experimental fue significativamente diferente del grupo control a pesar del inóculo (ANOVA, $p<0.0001$).

Tabla 2. Inhibición de la colonización intestinal por *Campylobacter* en ratones transgénicos

Días después de la infección	Porcentaje de crías colonizadas por <i>Campylobacter</i>			
	Transgénicos (FUT1)			No-Transgénicos
	Inóculo de <i>Campylobacter</i> (UFC/ml)			Control x 10^8
x 10^4	x 10^8	x 10^9		
1	40	30	90	100
3	40	60	60	90
5	10	40	20	70
7	0	0	0	70
9	0	10	10	67
11	0	0	0	70
13	0	0	0	70
15	0	0	0	90

Las áreas sombreadas indican los diferentes grados en los porcentajes de colonización durante el seguimiento.

DISCUSIÓN

Dada la trascendencia del papel de los carbohidratos presentes en las membranas de las células epiteliales como receptores para un gran número de patógenos, se ha propuesto que estos compuestos en sus formas solubles podrían ser excelentes inhibidores competitivos de la interacción bacteria-célula. Así, un receptor análogo, aunque no idéntico al carbohidrato nativo presente en el receptor celular, podría unirse de manera eficiente a la adhesina microbiana e inhibir eficazmente la adherencia y la colonización *in vivo*. Un ejemplo claro del éxito del uso de receptores análogos en el tratamiento de una infección bacteriana, es la cura de terneros por la administración de glicoproteínas naturales después de la infección con dosis letales de *E. coli* K99, que causa diarrea mortal en estos animales; *in vitro*, las glicoproteínas inhibieron la adhesión de la bacteria a los glicoconjugados presentes en los eritrocitos (166).

Las similitudes que se observan entre los carbohidratos de las células epiteliales y los oligosacáridos contenidos en la leche humana, refuerzan la idea de que ocurren interacciones específicas entre esos oligosacáridos con microorganismos patógenos que previenen la adherencia de los microbios a las células epiteliales. Oligosacáridos libres ó en forma de glicoconjugados, podrían actuar como receptores solubles análogos a los expresados en la superficie de la célula epitelial, incrementando la resistencia de los niños alimentados al seno materno (134).

Durante la realización de los estudios para caracterizar los receptores análogos para *Campylobacter jejuni*, presentes en leche materna y capaces de inhibir su asociación a células epiteliales, encontramos que los epítopes α 1,2-fucosilados del antígeno de tejido-grupo sanguíneo H, presentes sobre la superficie de las células epiteliales, sirven como ligandos para unir *Campylobacter* a la mucosa intestinal en el primer paso de la infección.

La capacidad de unión de *Campylobacter* a los antígenos de tejido-grupo sanguíneo fue definida por un ensayo en fase sólida, en el que la mayoría de las cepas clasificadas como virulentas reconocieron los determinantes que contenían fucosa, con una mayor avidéz por los componentes H. Los antígenos H son estructuras fucosiladas (Fuc α 1,2Gal β 1,3/4GlcNAc β -R), cuya expresión está determinada por la presencia de dos diferentes α 1,2-fucosiltransferasas codificadas y reguladas por los genes *FUT1* (*H*), en los glóbulos rojos y en el endotelio vascular, y por el gen *FUT2* (*Se*) en las secreciones exócrinas y la mucosa intestinal (113,114,167). Aunque los antígenos H participan en los eventos de adhesión durante el desarrollo embrionario, la morfogénesis tisular, la diferenciación celular, y la metástasis tumoral (108), su papel en la función celular no está completamente definido.

La propiedad de estas moléculas para funcionar como ligandos para *Campylobacter* se confirmó en las células CHO transfectadas con el gen de la α 1,2-fucosiltransferasa, *FUT1*, y que expresan los determinantes α 1,2-fucosilados en su superficie. Las cepas patógenas de *Campylobacter* se asociaron de manera significativa a estas células, mientras que su índice de adherencia a la línea celular no transfectada, y que por ende no expresa los residuos fucosilados, en comparación se mantuvo muy por abajo. Se demostró que diferentes agentes que reconocen de manera específica H-2, tales como anticuerpos monoclonales específicos contra antígeno H-2 (MAbs-H-2), las lectinas UEA I y Lotus, eran capaces de inhibir la adherencia de *Campylobacter* a las células CHO-FUT1. Se confirma así que para lograr adherirse, *Campylobacter* requiere la expresión específica de H-2 en la superficie de su célula blanco. En concordancia con estos hallazgos, la adherencia de *Campylobacter* a células CHO transfectadas también fue inhibida por moléculas solubles similares a H-2 como la neoglicoproteína H-2, la

fracción de oligosacáridos fucosilados obtenida de leche materna y el oligosacárido 2'fucosil-lactosa (2'FL), moléculas capaces de competir con los epítopes H-2 en la superficie celular. Así se demostró la especificidad de la adherencia de *Campylobacter* al antígeno H-2 en la célula hospedera.

Los glicoconjugados presentes en las superficies celulares se han implicado como mediadores de las interacciones célula-célula, tales como adhesión a células blanco, adhesión de leucocitos y diapedesis. Median también la adherencia de microorganismos (58,103), como en el caso de bacterias patógenas que se han adaptado para utilizar esas estructuras de superficie celulares para su adherencia e invasión (97,168). De esta manera, *Campylobacter* parece utilizar los antígenos H(O), que se localizan en la mucosa intestinal y están ampliamente distribuidos en la población humana, para adherirse e invadir las células epiteliales del hospedero.

El comportamiento de la cepa patógena de *Campylobacter* 287ip en la interacción con su receptor en las células epiteliales del intestino en los ensayos *ex vivo* fue similar al determinado *in vitro*, y su adherencia se inhibió de manera significativa tanto por los oligosacáridos de leche materna como por 2'FL. Sin embargo, el comportamiento de la cepa no patógena 57sp, aislada de un niño asintomático, mostró algunas diferencias relevantes. La cepa 57sp tiene un bajo índice de adherencia *in vitro* a células HEp-2, pero inesperadamente fue capaz de adherirse a la mucosa intestinal, aún cuando lo hizo en menor medida que la cepa patógena; además, su grado de asociación fue disminuido significativamente por la fracción de oligosacáridos de leche materna, pero no fue inhibido por 2'FL. Este comportamiento sugiere que la cepa podría reconocer epítopes diferentes presentes en la mucosa intestinal, y que esta asociación podría ser inhibida por componentes presentes en la leche materna que no están relacionados con el antígeno H-2.

Proponemos que la interacción de *Campylobacter* con los enterocitos desencadena una serie de eventos que se inician por la unión al epítope H-2 presente en la membrana celular; este primer paso podría ser un hecho común para diversos enteropatógenos. La densidad de los receptores de tipo H-2 sobre la superficie de la célula podría amplificar la especificidad de la interacción con la bacteria y aumentar su avidéz, logrando así un reconocimiento multivalente. Por tanto, el enlace de *Campylobacter* a una glicoproteína transmembranal que contenga epítopes H-2 podría disparar la cascada de eventos que permite la invasión por *Campylobacter*, proceso análogo al observado en otro tipo de asociaciones bacterianas a enterocitos (35,58). La expresión diferencial de los antígenos de tejido-grupo sanguíneo en diversos sitios a lo largo del tracto gastrointestinal podría explicar las características de la patología en la diarrea por *Campylobacter*, como por ejemplo la localización del sitio de infección. Es decir, la mayor expresión de los determinantes antigénicos H-2 en el íleon y en las criptas del ciego, explicaría el tropismo específico de la bacteria y el mayor grado de colonización en las secciones bajas del intestino.

La leche humana contiene una gran variedad de oligosacáridos, a los que se les han atribuido diferentes funciones por su similitud estructural con ligandos involucrados en muchas interacciones célula-célula. Tal es el caso de los ligandos para selectinas, que se han encontrado en grandes cantidades en la leche y que se propone podrían formar parte de los procesos inflamatorios, aún cuando no se ha definido si pueden actuar como inmunomoduladores *in vivo* (169). Se ha demostrado también que contiene grandes cantidades de oligosacáridos fucosilados con una amplia variedad de estructuras, y en la leche de la mayoría de las madres se destaca la presencia de los oligosacáridos con enlaces fucosilados de tipo α 1,2 (131,138). La expresión de estos epítopes está determinada por la actividad de la enzima α 1,2-fucosiltransferasa en el epitelio de la glándula mamaria, regulada genéticamente por la forma dominante del gen secretor

FUT2 o *Sec*. Las personas que cuentan con alelos funcionales de *FUT2* presentan cantidades apreciables de las estructuras α 1,2-fucosiladas en sus secreciones, entre las que se incluyen leche y saliva. Por su parte, los individuos homocigotos con alelos recesivos no producen cantidades detectables de las moléculas α 1,2-fucosiladas en leche (114).

La relevancia biológica de los glicoconjugados α 1,2-fucosilados en leche materna se valoró en un modelo experimental con ratones transfectados con el plásmido pWAP α 1,2FUT1, con lo que se logró que se expresaran los determinantes H-2 en la glándula mamaria durante la lactancia, secretándolos en grandes cantidades en su leche; por el contrario, en la leche de las madres no transgénicas no se detectaron cantidades apreciables de H-2. Las crías lactantes de las madres transgénicas fueron protegidas de manera significativa en contra de la colonización por *Campylobacter*, mientras que las de las madres no transgénicas no tuvieron protección. Estos resultados, además de reforzar el hecho de que H-2 actúa como receptor para *Campylobacter*, indican que las formas solubles de las moléculas con epítopes H-2 pueden proteger a los mamíferos lactantes en contra de la infección por la bacteria. Este modelo apoya el concepto de que las grandes cantidades de determinantes H-2 presentes en leche materna representan un componente importante del sistema de inmunidad innata de la leche capaz de proteger a lactantes en contra de aquellos patógenos que inician el proceso de infección por contacto y adherencia a la mucosa intestinal.

Nuestros hallazgos, de que la fracción fucosilada de oligosacáridos neutros de la leche materna inhiben la unión de *Campylobacter* a su célula blanco, representan la mejor evidencia de que los componentes no inmunoglobulínicos de la leche materna pueden ser factores protectores específicos contra diversas infecciones microbianas. Estudios previos han demostrado que la fracción no inmunoglobulínica protege contra infecciones tanto del tracto gastrointestinal como de los tractos respiratorio y urinario en los niños alimentados al seno materno, lo que se ha atribuido precisamente a la actividad bloqueadora de los oligosacáridos lácteos en contra de los patógenos (132,140,170).

En el intestino, la expresión de los determinantes antigénicos de tejido-grupo sanguíneo está relacionada con su expresión en eritrocitos, por lo que el grupo sanguíneo de un individuo en particular podría ser indicativo de su nivel de susceptibilidad a la infección por *Campylobacter*. La heterogeneidad en la expresión de los glicanos que definen los grupos sanguíneos ha sido relacionada con la susceptibilidad a diversos patógenos, como es el caso de *H. pylori* (117,120). La recurrencia de infecciones urinarias por *E. coli* uropatógena se ha asociado con la presencia del antígeno P (121,122), mientras que los individuos que expresan este antígeno en menor medida en sus eritrocitos desarrollan más frecuentemente síndrome hemolítico urémico (171). En voluntarios humanos, las personas con el fenotipo H(O) presentaron una mayor probabilidad de ser infectadas con virus Norwalk (172).

Así, la combinación de los genotipos madre/hijo podrían conducir a diferencias en la expresión de los antígenos H(O) en el intestino del niño y en la leche de la madre, lo que a su vez podría definir las diferencias en el riesgo de infección por *Campylobacter* en cada niño a nivel individual, como se muestra en el siguiente cuadro:

Susceptibilidad del niño a la infección

		Genotipo del niño	
		Secretor	No Secretor
Protección proporcionada por la leche materna	Secretor	Niño con riesgo alto de infección al que la leche materna proporciona protección alta Riesgo de Diarrea: Moderado	Niño con riesgo bajo de infección al que la leche materna le proporciona protección alta adicional Riesgo de Diarrea: Bajo
	No Secretor	Niño con alto riesgo de infección al que la leche materna le proporciona protección baja Riesgo de Diarrea: Alto	Niño con bajo riesgo de infección al que la leche materna le proporciona protección baja adicional Riesgo de Diarrea: Moderado

Los resultados de este proyecto apoyan la evidencia de que tales estructuras fucosiladas pueden ser componentes importantes del sistema de inmunidad innata de la leche humana, ya que en este estudio parecen funcionar como ligandos solubles que compiten con los receptores presentes en la superficie de las células epiteliales, en la unión de *Campylobacter* a los residuos α 1,2.

En los últimos años se ha observado un incremento alarmante en la aparición de cepas resistentes a diversos antibióticos, lo que hace necesaria la búsqueda de nuevos agentes antimicrobianos con mecanismos de acción diferentes a los que desarrolla un antibiótico. Una alternativa prometedora podría ser el uso de receptores análogos que interfieren con la habilidad de la bacteria para adherirse a los receptores en las células del hospedero, y así evitar la colonización subsecuente y por ende el proceso de infección (173). En este sentido, proponemos que los oligosacáridos de leche materna, en especial las estructuras fucosiladas, constituyen una buena alternativa. Además, es muy importante enfatizar que la actividad biológica de protección conferida por este tipo de estructuras, en contra de la infección por *Campylobacter*, podría funcionar para otras bacterias y microorganismos patógenos, lo que aumenta su relevancia como una nueva alternativa de agentes antimicrobianos.

El reto es lograr la síntesis a gran escala de esas estructuras protectoras. Ya se han descrito métodos químicos y enzimáticos para la preparación de un gran número de oligosacáridos fucosilados de las series de la lactosa y neo-lactosa similares a los encontrados en leche materna, entre ellos 2'FL. Los derivados fucosilados, que funcionan como unidades para construir los diferentes oligosacáridos, se sintetizan a partir de un precursor común disacárido, en el que, mediante manipulación enzimática, los grupos hidroxilo se protegen de manera selectiva con radicales acilo para poder fucosilar el disacárido en la posición adecuada (174). Por otro lado, para la obtención de 2'FL se ha propuesto una nueva ruta biosintética utilizando

enzimas bacterianas recombinantes, y métodos de cromatografía de intercambio aniónico y filtración en gel, reportándose rendimientos de hasta 65% (175). En general, los métodos de síntesis química requieren de un manejo muy cuidadoso de las condiciones experimentales, son limitados por los altos costos de los procesos, y los rendimientos son relativamente bajos. En los métodos de síntesis enzimática, las glicosiltransferasas transfieren un azúcar nucleotídico activado a un aceptor. En este caso, la reacción está determinada por la especificidad de la enzima por el sustrato y la disponibilidad limitada de donadores glicosídicos, por lo que las enzimas recombinantes con espectros de especificidad más amplios ofrecen mayores porcentajes de rendimiento.

Sin embargo, el desarrollo de nuevos agentes inhibidores no solamente debe involucrar un proceso biosintético factible, sino que requiere además de mecanismos y modelos de prueba que permitan definir sus propiedades, actividad biológica, especificidad, etc., como los desarrollados para *Campylobacter*, y para ello es necesario mejorar día a día el conocimiento de la interacción bacteria-receptor.

CONCLUSIONES

El primer paso en la patogénesis de *Campylobacter*, como en otras infecciones entéricas, es su adherencia a las células epiteliales de la mucosa intestinal. El reconocimiento de receptores específicos en la superficie celular, permite a la bacteria iniciar el proceso de infección. En este estudio, con el diseño de modelos experimentales *in vitro*, con neoglicoproteínas con epítopes correspondientes a los oligosacáridos determinantes de grupo sanguíneo, y con células que expresan los antígenos en su superficie, se demostró que un componente importante del receptor intestinal para *Campylobacter* es el antígeno H-2, cuya estructura activa está dada por radicales α 1,2-fucosa.

La inhibición del reconocimiento bacteria-receptor, con homólogos estructurales del antígeno H-2 y con ligandos específicos para el antígeno, confirmó la especificidad del reconocimiento. Así, los antígenos de tejido-grupo sanguíneo del tipo H-2 y los residuos fucosilados en posición α 1,2 parecen funcionar como receptores solubles para *Campylobacter* inhibiendo su unión al receptor intestinal, y bloquean lo que constituye el primer paso en su mecanismo de virulencia.

En general, los oligosacáridos constituyen el tercer componente mayoritario de la leche humana, y están asociados con la protección significativa de los niños alimentados al seno materno en contra de diversas infecciones gastrointestinales. Las concentraciones de la fracción de oligosacáridos neutros fucosilados, en leche materna, fueron suficientes para inhibir la adherencia de *Campylobacter in vitro* a cultivos celulares, y *ex vivo* en intestino humano. Por lo que se confirmó que funcionan como receptores solubles o análogos de los receptores celulares.

Se diseñó un modelo de colonización con ratones BG/SJL, transfectados con el gen de la α 1,2-fucosiltransferasa humana, que permitió valorar la relevancia biológica de los determinantes H-2 *in vivo*. Cuando los glicoconjugados H-2 se expresaron y secretaron en la leche materna de los ratones transgénicos, sus crías fueron claramente protegidas de la infección con la cepa patógena de *Campylobacter*. Estos resultados corroboran que los oligosacáridos de leche materna contribuyen a la protección de los lactantes en contra de la infección por *Campylobacter*, y forman parte del sistema de inmunidad innata.

Uno de los principales objetivos del estudio de los mecanismos de interacción bacteria-célula, es el desarrollo de medidas para bloquear la adherencia del patógeno a sus receptores celulares y, así, inhibir su capacidad para infectar al hospedero, lo que finalmente reduce el riesgo de enfermedad. Al funcionar como receptores análogos, los oligosacáridos de la leche humana representan una clase totalmente nueva de agentes antimicrobianos, por lo que se propone la síntesis de moléculas con estructuras similares a ellos, que podrían convertirse en una nueva alternativa de agentes antimicrobianos, profilácticos y terapéuticos. Al actuar con mecanismos distintos a los desarrollados por las generaciones de antibióticos, se esperaría que los compuestos sintéticos pudiesen superar el problema de la emergencia de patógenos resistentes a ese tipo de antimicrobianos.

PERSPECTIVAS

La síntesis de compuestos con estructura similar a la de los glicanos, que se presentan de manera natural en la leche, permitiría contar con una nueva clase de agentes antimicrobianos altamente efectivos para muchos patógenos humanos comunes, que colectivamente se encuentran entre las mayores causas de muerte, sufrimiento, y pérdidas económicas en muchas poblaciones.

Los avances recientes en bioingeniería hacen factible la síntesis a gran escala de glicanos, en levaduras modificadas genéticamente, que muestren tanto la alta afinidad, como la amplia especificidad necesarias para ser efectivos contra la multiplicidad de los patógenos encontrados en la mayoría de las poblaciones. Además, la estrategia desarrollada en este estudio permite contar con sistemas modelo, *in vitro* e *in vivo*, para probar la inhibición de la adherencia, la prevención de la infección, y el tratamiento de la infección por diferentes patógenos. Posteriormente, se podría probar su eficacia en la prevención y tratamiento de las infecciones en niños y adultos, en estudios preclínicos y ensayos controlados en humanos.

Con ventajas que son inherentes a su naturaleza, como su estabilidad a temperatura ambiente y su sabor agradable, los glicanos sintéticos podrían ser producidos y distribuidos de manera económica como parte de una bebida o un suplemento nutritivo a niños y adultos sin ningún riesgo; entre los beneficios potenciales secundarios, se incluiría su capacidad para superar la resistencia de los patógenos a los antibióticos. Finalmente, lo más importante es que se brindaría protección a la población infantil, mejorando su calidad de vida y contribuyendo en la campaña contra los índices de mortalidad por diarrea.

REFERENCIAS

1. Mead PS, Slutsker L, Dietz V, McCaig LF, Bresse JS, Shapiro C, Griffin PM, Tauxe RV. Food related illness and death in the United States. *Emerg Infect Dis.* 1999;5:607-625.
2. Allos BM. *Campylobacter jejuni* infections: Update on emerging issues and trends. *Clin Infect Dis.* 2001;32:1201-1206.
3. Coker AO, Isokpehi RD, Thomas BN, Amisu KO, Obi CL. Human campylobacteriosis in developing countries. *Emerg Infect Dis.* 2002;8:237-243.
4. Calva JJ, Ruiz-Palacios GM, Lopez-Vidal AB, Ramos A, Bojalil R. Cohort study of intestinal infection with *Campylobacter* in Mexican children. *Lancet.* 1988;March:503-506.
5. Ketley JM. Pathogenesis of enteric infection by *Campylobacter*. *Microbiol.* 1997;143:5-21.
6. Jones K. The *Campylobacter* conundrum. *Trends Microbiol.* 2001;9:365-366.
7. de Wit MAS, Koopmans MPG, Kortbeek LM, van Leeuwen NJ, Bartelds AIM, van Duynhoven YTHP. Gastroenteritis in sentinel general practices, The Netherlands. *Emerg Infect Dis.* 2001;7:82-91.
8. Adak GK, Long SM, O'Brien SJ. Trends in indigenous foodborne disease and deaths, England and Wales: 1992 to 2000. *Gut.* 2002;51:832-841.
9. Pigrau C, Bartolome R, Almirante B, Planes AM, Gavalda J, Pahissa A. Bacteremia due to *Campylobacter* species: clinical findings and antimicrobial susceptibility patterns. *Clin Infect Dis.* 1997;25:1414-1420.
10. Nachamkin I, Allos BM, Ho T. *Campylobacter* species and Guillain-Barré syndrome. *Clin Microbiol Rev.* 1998;11:555-567.
11. Hughes R. *Campylobacter jejuni* in Guillain-Barré syndrome. *Lancet Neurol.* 2004;3:644.
12. Park SF. The physiology of *Campylobacter* species and its relevance to their role as foodborne pathogens. *Intl J Food Microbiol.* 2002;74:177-188.
13. Buzby JC, Allos BM, Roberts T. The economic burden of *Campylobacter*-associated Guillain-Barré syndrome. *J Infect Dis.* 1997;176:S192-S197.
14. Mangen MJJ, Havelaar AH, de Wit GA. Campylobacteriosis and sequelae in The Netherlands. Estimating the disease burden and the cost-of-illness. RIVM report 250911004 / 2004.
15. Smibert RM. The genus *Campylobacter*. *Ann Rev Microbiol.* 1978;32:673-709.
16. Ruiz-Palacios GM, Torres J, Torres NI, Escamilla E, Ruiz-Palacios B, Tamayo J. Cholera like enterotoxin produced by *Campylobacter jejuni*. Characterization and clinical significance. *Lancet.* 1983;ii:250-253.
17. Lindblom GB, Cervantes LE, Sjogren E, Kaijser B, Ruiz-Palacios GM. Adherence, enterotoxigenicity, invasiveness and serogroups in *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* strains from adult humans with acute enterocolitis. *APMIS.* 1990;98:179-184.
18. Ruiz-Palacios GM, Lopez-Vidal Y, Torres J, Torres N. Serum antibodies to heat-labile enterotoxin of *Campylobacter jejuni*. *J Infect Dis.* 1985;152:413-416.
19. Guerrant RL, Fang G, Pennie RA, Pearson RD. *In vitro* models for studying *Campylobacter* infections. In: Nachamkin IM, Tomkins LJ, Blaser M. eds.

- Campylobacter jejuni*. Current Status and Future Trends. Washington DC. American Society for Microbiology, 1992. pp 178-185.
20. Wassenaar TM. Toxin production by *Campylobacter* spp. Clin Microbiol Rev. 1997;10:466-476.
 21. Wassenaar TM, Blaser MJ. Pathophysiology of *Campylobacter jejuni* of humans. Microbes Infect. 1999;1:1023-1033.
 22. van Vliet AHM, Ketley JM. Pathogenesis of enteric *Campylobacter* infection. Symp Ser Soc Appl Microbiol. 2001;30:45S-56S.
 23. Ottemann KM, Miller JF. Roles for motility in bacterial-host interactions. Mol Microbiol. 1997;24:1109-1117.
 24. Bourke B. *Campylobacter* infection: small bowel and colon. Curr Opin Gastroenterol. 2002;18:4-9.
 25. Marchant J, Wren B, Ketley J. Exploiting genome sequence: predictions for mechanisms of *Campylobacter* chemotaxis. Trends Microbiol. 2002;10:155-159.
 26. Pavlovskis OR, Rollins DM, Haberberger RL, Green AE, Habash L, Strocko S, Walker RI. Significance of flagella in colonization resistance of rabbits immunized with *Campylobacter* spp. Infect Immun. 1991;59:2259-2264.
 27. Nachamkin I, Yang X, Stern NJ. Role of *Campylobacter jejuni* flagella as colonization factors for three-day-old chicks: analysis with flagellar mutants. Appl Environm Microbiol. 1993;59:1269-1273.
 28. Szymanski CM, King M, Haardt M, Armstrong GD. *Campylobacter jejuni* motility and invasion of Caco-2 cells. Infect Immun. 1995;63:4295-4300.
 29. Andrews E, Fernandez H, Folch H, Eller G, Pollette M. Participación de epítopes flegelares de *Campylobacter jejuni* en la adhesión celular. Medicina (Buenos Aires) 1996;56:487-492.
 30. Wassenaar TM, van der Zeijst BAM, Roger A, Newell DG. Colonization of chicks by motility mutants of *Campylobacter jejuni* demonstrates the importance of flagellin A expression. J Gen Microbiol. 1993;139:1171-1175.
 31. Wassenaar TM, Bleumink-Pluym NMC, Newell DG, Nuijten PJM, van der Zeijst BAM. Differential flagellin expression in a *flaA flaB*⁺ mutant of *Campylobacter jejuni*. Infect Immun. 1994;62:3901-3906.
 32. Yao R, Burr DH, Doig P, Trust TJ, Niu H, Guerry P. Isolation of motile and non-motile insertional mutants of *Campylobacter jejuni*: the role of motility in adherence and invasion of eukariotic cells. Mol Microbiol. 1994;14:883-893.
 33. Carrillo CD, Taboada E, Nash JHE, Lanthier P, Kelly J, Lau PC, Verhulp R, Mykytczuk O, Sy J, Findlay WA, Amoako K, Gomis S, Willson P, Austin JW, Potter A, Babiuk L, Allan B, Szymanski CM. Genome-wide expression analysis of *Campylobacter jejuni* NCTC11168 reveals coordinate regulation of motility and virulence by *flhA*. J Biol Chem. 2004;279:20327-20338.
 34. Gaynor EC, Cawthraw S, Manning G, MacKichan JK, Falkow S, Newell DG. The genome-sequenced variant of *Campylobacter jejuni* NCTC 11168 and the original clonal clinical isolate differ markedly in colonization, gene expression, and virulence-associated phenotypes. J Bacteriol. 2004;186:503-517.
 35. Finlay BB, Falkow S. Common themes in microbial pathogenicity revisited. Microbiol Mol Biol Rev. 1997;61:136-169.

36. Babakhani FH, Joens LA. Primary swine intestinal cells as a model for studying *Campylobacter jejuni* invasiveness. *Infect Immun*. 1993;61:2723-2726.
37. Russell RG, Blake Jr. DC. Cell association and invasion of Caco-2 cells by *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*. 1994;62:3773-3779.
38. Biswas D, Itoh K, Sasakawa C. Uptake pathways of clinical and healthy animal isolates of *Campylobacter jejuni* into INT407 cells. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 2000;29:203-211.
39. Friis LM, Pin C, Pearson BM, Wells JM. *In vitro* cell culture methods for investigating *Campylobacter* invasion mechanisms. *J Microbiol Methods*. 2005;61:145-160.
40. Hänel I, Müller J, Müller W, Schulz F. Correlation between invasion of Caco-2 eukaryotic cells and colonization ability in the chick gut in *Campylobacter jejuni*. *Vet Microbiol*. 2004;101:75-82.
41. Ruiz-Palacios GM, Cervantes LE, Newburg DS. *In vitro* models for studying *Campylobacter* infections. In: Nachamkin IM, Tomkins LJ, Blaser M. eds. *Campylobacter jejuni*. Current Status and Future Trends. Washington DC. American Society for Microbiology, 1992. pp 176-185.
42. Falkow S. Perspectives series: host/pathogen interactions. Invasion and intracellular sorting of bacteria: searching for bacterial genes expressed during host/pathogen interactions. *J Clin Invest*. 1997;100:239-243.
43. Falkow S, Isberg RR, Portnoy DA. The interaction of bacteria with mammalian cells. *Annu Rev Cell Biol*. 1992;8:333-363.
44. Falk P, Borén T, Normark S. Characterization of microbial host receptors. *Methods Enzymol*. 1994;236: 353-374.
45. De Melo MA, Pechère JC. Identification of *Campylobacter jejuni* surface proteins that bind to eucaryotic cells *in vitro*. *Infect Immun*. 1990;58:1749-1756.
46. Fauchère JL, Kervella M, Rosenau A, Pagès JM, Fendri C. *In vitro* study of virulence factors of enteric *Campylobacter spp*. In: Nachamkin IM, Tomkins LJ, Blaser M. eds. *Campylobacter jejuni*. Current Status and Future Trends. Washington DC. American Society for Microbiology, 1992. pp 168-175.
47. Kervella M, Pagès JM, Pei Z, Grollier G, Blaser MJ, Fauchère JL. Isolation and characterization of two *Campylobacter* glycine-extracted proteins that bind to HeLa cells membranes. *Infect Immun*. 1993;61:3440-3448.
48. Pei Z, Ellison RT, Blaser MJ. Identification, purification, and characterization of major antigenic proteins of *Campylobacter jejuni*. *J Biol Chem*. 1991;266:16363-16369.
49. Pei Z, Blaser MJ. PEB1, the major cell-binding factor of *Campylobacter jejuni*, is a homolog of the binding component in gram-negative nutrient transport systems. *J Biol Chem*. 1993;268:18717-18725.
50. Pei Z, Burucoa C, Grignon B, Baqar S, Huang XZ, Kopecko DJ, Bourgeois AL, Fauchère JL, Blaser MJ. Mutation in the *peb1A* locus of *Campylobacter jejuni* reduces interactions with epithelial cells and intestinal colonization of mice. *Infect Immun*. 1998;66:938-943.
51. Konkel ME, Garvis SG, Tipton SL, Anderson Jr. DE, Cieplak Jr. W. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin-binding protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Mol Microbiol*. 1997;24:953-963.
52. Monteville MR, Konkel ME. Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. *Infect Immun*. 2002;70:6665-6671.

53. Konkel ME, Christensen JE, Keech AM, Monteville MR, Klena JD, Garvis SG. Identification of a fibronectin-binding domain within the *Campylobacter jejuni* CadF protein. *Mol Microbiol.* 2005;57:1022-1035.
54. Kelle K, Pages JM, Bolla JM. A putative adhesin gene cloned from *Campylobacter jejuni*. *Res Microbiol.* 1998;149:723-733.
55. Jin S, Joe A, Lynett J, Hani EK, Sherman P, Chan VL. JlpA, a novel surface-exposed lipoprotein specific to *Campylobacter jejuni*, mediates adherence to host epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2001;39:1225-1236.
56. Fry BN, Korolik V, ten Brinke JA, Pennings MTT, Zalm R, Teunis BJJ, Coloe PJ, van der Zeijst BAM. The lipopolysaccharide biosynthesis locus of *Campylobacter jejuni* 81176. *Microbiol.* 1998;144:2049-2061.
57. Fry BN, Feng S, Chen YY, Newell DG, Coloe PJ, Korolik V. The *galE* gene of *Campylobacter jejuni* is involved in lipopolysaccharide synthesis and virulence. *Infect Immun.* 2000;68:2594-2601.
58. Finlay BB, Cossart P. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 1997;276:718-725.
59. Hu L, Kopecko DJ. *Campylobacter jejuni* 81-176 associates with microtubules and dynein during invasion of human intestinal cells. *Infect Immun.* 1999;67:4171-4182.
60. Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. Maximal adherence and invasion of INT407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiol.* 2003;149:153-165.
61. De Melo MA, Gabbiani G, Pechère JC. Cellular events and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* during infection of HEp-2 cells. *Infect Immun.* 1989;57:2214-2222.
62. Konkel ME, Hayes SF, Joens LA, Cieplak Jr. W. Characteristics of the internalization and intracellular survival of *Campylobacter jejuni* in human epithelial cell cultures. *Microb Pathog.* 1992;13:357-370.
63. Oelschlaeger TA, Guerry P, Kopecko DJ. Unusual microtubule-dependent endocytosis mechanisms triggered by *Campylobacter jejuni* and *Citrobacter freundii*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1993;90:6884-6888.
64. Kopecko DJ, Hu L, Zaal KJM. *Campylobacter jejuni*-microtubule-dependent invasion. *Trends Microbiol.* 2001;9:389-396.
65. Pickett AL, Whitehouse CA. The cytolethal distending toxin family. *Trends Microbiol.* 1999;7:292-297.
66. Pickett CL, Pesci EC, Cottle DL, Russell G, Erdem AN, Zeytin H. Prevalence of cytolethal distending toxin production in *Campylobacter jejuni* and relatedness of *Campylobacter* spp. *cdtB* genes. *Infect Immun.* 1996;64:2070-2078.
67. Lara-Tejero M, Galan JE. CdtA, CdtB, and CdtC form a tripartite complex that is required for cytolethal distending toxin activity. *Infect Immun.* 2001;69:4358-4365.
68. Lee RB, Hassane DC, Cottle DL, Pickett CL. Interactions of *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin subunits CdtA and CdtC with HeLa cells. *Infect Immun.* 2003;71:4883-4890.
69. Whitehouse CA, Balbo PB, Pesci EC, Cottle DL, Mirabito PM, Pickett CL. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin causes a G₂-phase cell cycle block. *Infect Immun.* 1998;66:1934-1940.

70. Elwell CA, Dreyfus LA. DNase I homologous residues in CdtB are critical for cytolethal distending toxin-mediated cell cycle arrest. *Mol Microbiol.* 2000;37:952-963.
71. Dassanayake RP, Zhou Y, Hinkley S, Stryker CJ, Plauche G, Borda JT, Sestak K, Duhamel GE. Characterization of cytolethal distending toxin of *Campylobacter* species isolated from captive macaque monkeys. *J Clin Microbiol.* 2005;43:641-649.
72. Bang DD, Scheutz F, Ahrens P, Pedersen K, Blom J, Madsen M. Prevalence of cytolethal distending toxin (*cdt*) genes and CDT production in *Campylobacter* spp. isolated from danish broilers. *J Med Microbiol.* 2001;50:1087-1094.
73. Biswas D, Niwa H, Itoh K. Infection with *Campylobacter jejuni* induces tyrosine-phosphorylated proteins into INT407 cells. *Microbiol Immunol.* 2004;48:221-228.
74. Jin S, Song YC, Emili A, Sherman PM, Chan VL. JlpA of *Campylobacter jejuni* interacts with surface-exposed heat shock protein 90 α and triggers signalling pathways leading to the activation of NF- κ B and p38 MAP kinase in epithelial cells. *Cell Microbiol.* 2003;5:165-174.
75. Konkel ME, Kim BJ, Rivera-Amill V, Garvis SG. Bacterial secreted proteins are required for internalization of *Campylobacter jejuni* into cultured mammalian cells. *Mol Microbiol.* 1999;32:691-701.
76. Rivera-Amill V, Kim BJ, Seshu J, Konkel ME. Secretion of the virulence-associated *Campylobacter* invasion antigens from *Campylobacter jejuni* requires a stimulatory signal. *J Infect Dis.* 2001;183:1607-1616.
77. Konkel ME, Klena JD, Rivera-Amill V, Monteville MR, Biswas D, Raphael B, Mickelson J. Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J Bacteriol.* 2004;186:3296-3303.
78. Hickey TE, Baqar S, Bourgeois AL, Ewing CP, Guerry P. *Campylobacter jejuni*-stimulated secretion of interleukin-8 by INT407 cells. *Infect Immun.* 1999;67:88-93.
79. Hickey TE, Mcveigh AL, Scott DA, Michielutti RE, Bixby A, Carroll SA, Bourgeois AL, Guerry P. *Campylobacter jejuni* cytolethal distending toxin mediates release of interleukin-8 from intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 2000;68:6536-6541.
80. de Boer P, Wagenaar JA, Achterberg RP, van Putten JPM, Schouls LM, Duim B. Generation of *Campylobacter jejuni* genetic diversity *in vivo*. *Mol Microbiol.* 2002;44:351-359.
81. Carvalho AC, Ruiz-Palacios GM, Ramos-Cervantes P, Cervantes LE, Jiang X, Pickering LK. Molecular characterization of invasive and noninvasive *Campylobacter jejuni* and *Campylobacter coli* isolates. *J Clin Microbiol.* 2001;39:1353-1359.
82. Parkhill J, Wren BW, Mungall K, Ketley JM, Churcher C, Basham D, Chillingworth T, Davies RM, Feltwell T, Holroyd S, Jagels K, Karlyshev AV, Moule S, Pallen MJ, Penn CW, Quail MA, Rajandream MA, Rutherford KM, van Vliet AH, Whitehead S, Barrell BG. The genome sequence of the food-borne pathogen *Campylobacter jejuni* reveals hypervariable sequences. *Nature* 2000;403:665-668.
83. Bacon DJ, Alm RA, Burr DH, Hu L, Kopecko DJ, Ewing CP, Trust TJ, Guerry P. Involvement of a plasmid in virulence of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun.* 2000;68:4384-4390.
84. Bacon DJ, Alm RA, Hu L, Hickey TE, Ewing CP, Batchelor RA, Trust TJ, Guerry P. DNA sequence and mutational analyses of the pVir plasmid of *Campylobacter jejuni* 81-176. *Infect Immun.* 2002;70:6242-6250.

85. Tracz DM, Keelaan M, Ahmed-Bentley J, Gibreel A, Kowalewska-Grochowska K, Taylor DE. pVir and bloody diarrhea in *Campylobacter jejuni* enteritis. *Emerg Infect Dis*. 2005;11:838-843.
86. Ahmed IH, Manning G, Wassenaar TM, Cawthraw S, Newell DG. Identification of genetic differences between two *Campylobacter jejuni* strains with different colonization potentials. *Microbiol*. 2002;148:1203-1212.
87. Wren BW, Linton D, Dorrell N, Karlyshev AV. Post genome analysis of *Campylobacter jejuni*. *J Appl Microbiol*. 2001;90:36S-44S.
88. Poly F, Threadgill D, Stintzi A. Genomic diversity in *Campylobacter jejuni*: identification of *C. jejuni* 81-176 specific genes. *J Clin Microbiol*. 2005;43:2330-2338.
89. Stintzi A, Marlow D, Palyada K, Naikare H, Panciera R, Whitworth L, Clarke C. Use of genome-wide expression profiling and mutagenesis to study the intestinal life style of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*. 2005;73:1797-1810.
90. Gaynor EC, Wells DH, MacKichan JK, Falkow S. The *Campylobacter jejuni* stringent response controls specific stress survival and virulence-associated phenotypes. *Mol Microbiol*. 2005;56:8-27.
91. Sharon N. Carbohydrate-lectin interactions in infectious disease. In: Kahane, Ofek I eds. *Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases*. Plenum Press, 1996. pp 1-8.
92. Sears P, Wong CH. Intervention of carbohydrate recognition by proteins and nucleic acids. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1996;93:12086-12093.
93. Rini J, Drickamer K. Carbohydrates and glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol*. 1997;7:615-616.
94. Sharon N, Lis H. Carbohydrates in cell recognition. *Sci Am*. 1993;Jan:74-81.
95. Zopf D, Roth S. Oligosaccharide anti-infective agents. *Lancet*. 1996;347:1017-1021.
96. Lingwood CA. Oligosaccharide receptors for bacteria: a view to a kill. *Curr Opin Chem Biol*. 1998;2:695-700.
97. Karlsson KA. Microbial recognition of target-cell glycoconjugates. *Curr Opin Struct Biol*. 1995;5:622-635.
98. Martin MJ, Martin-Sosa S, Hueso P. Binding of milk oligosaccharides by several enterotoxigenic *Escherichia coli* strains isolated from calves. *Glycoconj J*. 2002;19:5-11.
99. Seignole D, Grange P, Duval-Iflah Y, Mouricout M. Characterization of O-glycan moieties of the 210 and 240 kDa pig intestinal receptors for *Escherichia coli* K88ac fimbriae. *Microbiol*. 1994;140:2467-2473.
100. Haataja S, Tikkanen K, Nilsson U, Magnusson G, Karlsson KA, Finne J. Oligosaccharide-receptor interaction of the Gal α 1-4Gal binding adhesin of *Streptococcus suis*. Combining site architecture and characterization of two variant adhesin specificities. *J Biol Chem*. 1994;269: 27466-27472.
101. Giannasca KT, Giannasca PJ, Neutra MR. Adherence of *Salmonella typhimurium* to Caco-2 cells: identification of a glycoconjugate receptor. *Infect Immun*. 1996;64:135-145.
102. Ryan P, Pancholi V, Fischetti VA. Group A streptococci bind to mucin and human pharyngeal cells through sialic acid-containing receptors. *Infect Immun*. 2001;69:7402-7412.
103. Mitchell E, Houles C, Sudakevitz D, Wimmerova M, Gautier C, Perez S, Wu AM, Gilboa-Garber N, Imberty A. Structural basis for oligosaccharide-mediated adhesion of

- Pseudomonas aeruginosa* in the lungs of cystic fibrosis patients. Nat Struct Biol. 2002;9:918-921.
104. Fakih MG, Murphy TF, Pattoli MA, Berenson CS. Specific binding of *Haemophilus influenzae* to minor gangliosides of human respiratory epithelial cells. Infect Immun. 1997;65:1695-1700.
 105. Kushi Y, Tsunoda A, Komatsuzaki A, Watanabe K, Kasama T, Handa S. Characterization of blood-group ABO(H)active glycosphingolipids in type AB human erythrocytes. Eur J Biochem. 1995;231:862-867.
 106. Bjork S, Breimer ME, Hansson GC, Karlsson KA, Leffler H. Structures of blood group glycosphingolipids of human small intestine. A relation between the expression of fucolipids of epithelial cells and the ABO, Le and Se phenotype of the donor. J Biol Chem. 1987;262:6758-6765.
 107. Holgersson J, Breimer ME, Samuelsson BE. Basic biochemistry of cell surface carbohydrates and aspects of the tissue distribution of histo-blood group ABH and related glycosphingolipids. APMIS. Suppl 1992;27:18-27.
 108. Le Pendu J, Marionneau S, Cailleau-Thomas A, Rocher J, Le Moullac-Vaidye B, Clément M. ABH and Lewis histo-blood group antigens in cancer. APMIS. 2001;109:1-23.
 109. Lloyd KO. The chemistry and immunochemistry of blood group A, B, H, and Lewis antigens: past, present and future. Glycoconj J. 2000;17:531-541.
 110. Javaud C, Dupuy F, Maftah A, Julien R, Petit JM. The fucosyltransferase gene family: an amazing summary of the underlying mechanisms of gene evolution. Genetica 2003;118:157-170.
 111. Kudo T, Iwasaki H, Nishihara S, Shinya N, Ando T, Narimatsu I, Narimatsu H. Molecular genetic analysis of the human Lewis histo-blood group system. J Biol Chem. 1996;271:9830-9837.
 112. Oriol R, Candelier J, Mollicone R. Molecular genetics of H. Vox Sang 2000;78:105-108.
 113. Ameno S, Kimura H, Ameno K, Zhang X, Kinoshita H, Kubota T, Ijiri I. Lewis and secretor gene effects on Lewis antigen and postnatal development of Lewis blood type. Biol Neonate. 2001;79:91-96.
 114. Henry S, Oriol R, Samuelsson B. Lewis histo-blood group system and associated secretory phenotypes. Vox Sang. 1995;69:166-182.
 115. Glass RI, Holmgren J, Haley CE, Khan MR, Svennerholm AM, Stoll BJ, Belayet Hossain KM, Black RE, Yunus M. Predisposition for cholera of individuals with O blood group. Possible evolutionary significance. Am J Epidem. 1985;121:791-796.
 116. Borén T, Falk P, Roth KA, Larson G, Normak S. Attachment of *Helicobacter pylori* to human gastric epithelium mediated by blood group antigens. Science. 1993; 262:1892-1895.
 117. Ilver D, Arnqvist A, Ögren J, Frick IM, Kersulyte D, Incecik ET, Berg DE, Covacci A, Engstrand L, Borén T. *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. Science. 1998;279:373-377.
 118. Prinz C, Schöniger, Rad R, Becker I, Keiditsch E, Wagenpfeil S, Classen M, Rösch T, Schepp W, Gerhard M. Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. Cancer Res. 2001;61:1903-1909.

119. Rad R, Gerhard M, Lang R, Schöniger M, Rösch T, Schepp W, Becker I, Wagner H, Prinz C. The *Helicobacter pylori* blood group antigen-binding adhesin facilitates bacterial colonization and augments a nonspecific immune response. *J Immunol.* 2002;168:3033-3041.
120. Mahdavi J, Sondén B, Hurtig M, Olfat FO, Forsberg L, Roche N, Angström J, Larsson T, Teneberg S, Karlsson KA, Altraja S, Wadström T, Kersulyte D, Berg DE, Dubois A, Patersson C, Magnusson KE, Norberg T, Lindh F, Lundskog BB, Arnqvist A, Hammarström L, Borén T. *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science.* 2002; 297:573-578.
121. Stroud MR, Stapleton AE, Lavery SB. The P histo-blood group-related glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside as a preferred binding receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: isolation and structural characterization from human kidney. *Biochemistry.* 1998;37:17420-17428.
122. Stapleton AE, Stroud MR, Hakomori SI, Stamm WE. The globoseries glycosphingolipid sialosyl galactosyl globoside is found in urinary tract tissues and is a preferred binding receptor *in vitro* for uropathogenic *Escherichia coli* expressing pap-encoded adhesins. *Infect Immun.* 1998;66:3856-3861.
123. Ishitoya S, Yamamoto S, Mitsumori K, Ogawa O, and Terai A. Non-secretor status is associated with female acute uncomplicated pyelonephritis. *BJU Int.* 2002;89:851-854.
124. Brown KE, Anderson SM, Young NS. Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 Parvovirus. *Science.* 1993;262:114-117.
125. Cooling LLW, Koerner TAW, Naides SJ. Multiple glycosphingolipids determine the tissue tropism of Parvovirus B19. *J Infect Dis.* 1995;172:1198-1205.
126. Bitzan M, Richardson S, Huang C, Boyd B, Petric M, Karmali MA. Evidence that verotoxins (Shiga-like toxins) from *Escherichia coli* bind to P blood group antigens of human erythrocytes *in vitro*. *Infect Immun.* 1994;62:3337-3347.
127. Marionneau S, Ruvoen N, Le Moullac-Vaydie B, Clement M, Cailleau-Thomas A, Ruiz-Palacios G, Huang P, Jiang X, Le Pendu J. Norwalk virus binds to histo-blood group antigens present on gastroduodenal epithelial cells of secretor individuals. *Gastroenterol.* 2002;122:1967-1977.
128. Lindesmith L, Moe C, Marionneau S, Ruvoen N, Jiang X, Lindblad L, Stewart P, Le Pendu J, Baric R. Human susceptibility and resistance to Norwalk virus infection. *Nat Med.* 2003;9:548-553.
129. Huang P, Farkas T, Marionneau S, Zhong W, Ruvoën-Clouet N, Morrow AL, Altaye M, Pickering LK, Newburg DS, LePendu J, Jiang X. Noroviruses bind to human ABO, Lewis, and secretor histo-blood group antigens: identification of 4 distinct strain-specific patterns. *J Infect Dis.* 2003;188:19-31.
130. Jiang X, Huang P, Zhong W, Tan M, Farkas T, Morrow AL, Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK. Human milk contains elements that block binding of noroviruses to human histo-blood group antigens in saliva. *J Infect Dis.* 2004;190:1850-1859.
131. Chaturvedi P, Warren CD, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Newburg DS. Milk oligosaccharides profiles by reversed-phase HPLC of their perbenzoylated derivatives. *Anal Biochem.* 1997;251:89-97.
132. Newburg DS. Do the binding properties of oligosaccharides in milk protect human infants from gastrointestinal bacteria?. *J Nutr.* 1997;127:980S-984S.

133. Stahl B, Thurl S, Zeng J, Karas M, Hillenkamp F, Steup M, Sawatzki G. Oligosaccharides from human milk as revealed by matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry. *Anal Biochem.* 1994;223:218-226.
134. Kunz C, Rudloff S, Baier W, Klein N, Strobel S. Oligosaccharides in human milk: structural, functional and metabolic aspects. *Annu Rev Nutr.* 2000;20:699-722.
135. Thurl S, Henker J, Siegel M, Tovar K, Sawatzki G. Detection of four human milk groups with respect to Lewis blood group dependent oligosaccharides. *Glycoconj J.* 1997;14:795-799.
136. Coppa GV, Pierani P, Zampini L, Carloni I, Carlucci A, Gabrielli O. Oligosaccharides in human milk during different phases of lactation. *Acta Pædiatr Suppl.* 1999;430:89-94.
137. Erney RM, Malone WT, Skelding MB, Marcon AA, Kleman-Leyer KM, O’Ryan M, Ruiz-Palacios GM, Hilty MD, Pickering LK, Prieto PA. Variability of human milk neutral oligosaccharides in a diverse population. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 2000;30:181-192.
138. Sumiyoshi W, Urashima T, Nakamura T, Arai I, Saito T, Tsumura N, Wang B, Brand-Miller J, Watanabe Y, Kimura K. Determination of each neutral oligosaccharide in the milk of Japanese women during the course of lactation. *Br J Nutr.* 2003;89:61-69.
139. Chaturvedi P, Warren CD, Altaye M, Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Pickering LK, Newburg DS. Fucosylated human milk oligosaccharides vary between individuals and over the course of lactation. *Glycobiology* 2001;11:365-372.
140. Ashkenazi S. Role of human milk constituents in blocking the adherence of enteric pathogens. In: Kahane, Ofek I eds. *Toward anti-adhesion therapy for microbial diseases.* Plenum Press, 1996. pp 187-192.
141. Andersson B, Porras O, Hanson LA, Lagergard T, Svanborg-Eden C. Inhibition of attachment of *Streptococcus pneumoniae* and *Haemophilus influenzae* by human milk and receptor oligosaccharides. *J Infect Dis.* 1986;153:232-237.
142. Cravioto A, Tello A, Villafan H, Ruiz J, del Vedovo S, Nesser JR. 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.* 1991;163:1247-1255.
143. Martin-Sosa S, Martin MJ, Hueso P. The sialylated fraction of milk oligosaccharides is partially responsible for binding to enterotoxigenic and uropathogenic *Escherichia coli* human strains. *J Nutr.* 2002;132:3067-3072.
144. Xu HT, Zhao YF, Lian ZX, Fan BL, Zhao ZH, Yu SY, Dai YP, Wang LL, Niu HL, Li N, Hammarström L, Borén T, Sjöström R. Effects of fucosylated milk of goat and mouse on *Helicobacter pylori* binding to Lewis b antigen. *World J Gastroenterol.* 2004;10:2063-2066.
145. Engfer MB, Stahl B, Finke B, Sawatzki G, Daniel H. Human milk oligosaccharides are resistant to enzymatic hydrolysis in the upper gastrointestinal tract. *Am J Clin Nutr.* 2000;71:1589-96.
146. Gnoth MJ, Kunz C, Kinne-Saffran E, Rudloff S. Human milk oligosaccharides are minimally digested *in vitro*. *J Nutr.* 2000;130: 3014-3020.
147. Newburg DS, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Chaturvedi P, Meinzen-Derr JK, Guerrero L, Morrow AL. Innate protection conferred by fucosylated oligosaccharides of human milk against diarrhea in breastfed infants. *Glycobiol.* 2004;14:253-263.

148. Morrow AL, Ruiz-Palacios GM, Altaye M, Jiang X, Guerrero L, Meinzen-Derr JK, Farkas T, Chaturvedi P, Pickering LK, Newburg DS. Human milk oligosaccharides are associated with protection against diarrhea in breast-fed infants. *J Pediatr*. 2004;145:297-303.
149. Hugdahl MB, Beery JT, Doyle MP. Chemotactic behavior of *Campylobacter jejuni*. *Infect Immun*. 1988;56:1560-1566.
150. Allen KJ, Griffiths MW. Effect of environmental and chemotactic stimuli on the activity of the *Campylobacter jejuni* *flaA* σ^{28} promoter. *FEMS Microbiol Lett*. 2001;205:43-48.
151. Cinco M, Banfi B, Ruaro E, Crevatin D, Crotti D. Evidence for L-fucosa (6-deoxy-L-galactopyranose) mediated adherence of *Campylobacter* spp. to epithelial cells. *FEMS Microbiol Lett*. 1984;21:347-351.
152. Nachamkin I, Fisher SH, Yang XH, Benitez O, Cravioto A. Immunoglobulin A antibodies directed against *Campylobacter jejuni* flagellin present in breast-milk. *Epidemiol Infect*. 1994;112:359-365.
153. Ruiz-Palacios GM, Calva JJ, Pickering LK, Lopez-Vidal Y, Volkow P, Pezzarossi H, West MS. Protection of breast-fed infants against *Campylobacter* diarrhea by antibodies in human milk. *J Pediatr*. 1990; 116:707-713.
154. Newburg DS. Oligosaccharides and glycoconjugates in human milk: their role in host defense. *J Mam Gland Biol Neoplasia*. 1996;1:271-283.
155. Dingwei D, Nanda NN, Newburg DS, Allan WW. Role of oligosaccharides and glycoconjugates in intestinal host defense. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2000; 30:S23-S33.
156. Cervantes LE. Receptores análogos para *Campylobacter jejuni* en leche materna. Tesis de Maestría en Biotecnología. UACPyP/CCH, Sede Facultad de Química, UNAM, 1993.
157. Newburg DS, Pickering LK, McClear RH, Cleary TG. Fucosylated oligosaccharides of human milk protect suckling mice from heat-stable enterotoxins of *Escherichia coli*. *J Infect Dis*. 1990;162:1075-1080.
158. Mollicone R, Cailleau A, Imberty A, Gane P, Perez S, Oriol R. Recognition of the blood group H type 2 trisaccharide epitope by 28 monoclonal antibodies and three lectins. *Glycoconj J*. 1996;13:263-271.
159. Audette GF, Vandonselaar M, Delbaere LTJ. The 2.2 Å resolution structure of the O(H) blood-group-specific lectin I from *Ulex europaeus*. *J Mol Biol*. 2000;304:423-433.
160. Wiederschain GY, Newburg DS. Human milk fucosyltransferase and L-fucosidase activities change during the course of lactation. *J Nutr Biochem*. 1995;6:582-587.
161. Prieto PA, Larse RD, Cho M, Rivera HN, Shilatifard A, Lowe JB, Cummings RD, Smith DF. Expression of human H-type alpha1,2-fucosyltransferase encoding for blood group H(O) antigen in Chinese hamster ovary cells. Evidence for preferential fucosylation and truncation of polylactosamine sequences. *J Biol Chem*. 1997;272:2089-2097.
162. Ramos-Cervantes MP, Cervantes LE, Ruiz-Palacios GM. Determinación de la capacidad de asociación de *Campylobacter jejuni* a células epiteliales por un método de inmunofluorescencia. XX Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica. Mérida, Yucatán. 8-11 de Noviembre de 1995.
163. Prieto PA, Mukerji P, Kelder B, Erney R, Gonzalez D, Yun JS, Smith DF, Moremen KW, Nardelli C, Pierce M, Li Y, Chen X, Wagner TE, Cummings RD, Kopchick JJ. Remodeling of mouse milk glycoconjugates by transgenic expression of a human glycosyltransferase. *J Biol Chem*. 1995;270:29515-29519.

164. Bailey Norman TJ. Statistical methods in biology. 2nd Edition. Unibooks, United Kingdom.
165. Jenness R. The composition of human milk. *Semin Perinatol.* 1979;3:225-239.
166. Mouricout M, Petit JM, Carias JR, Julien R. Glycoprotein glycans that inhibit adhesion of *Escherichia coli* mediated by K99 fimbria: treatment of experimental colibacillosis. *Infect Immun.* 1990;58:98-106.
167. Bry L, Falk PG, Gordon JL. Genetic engineering of carbohydrate pathways in transgenic mice demonstrates cell cycle-associated regulation of glycoconjugate production in small intestinal epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1996;93:1161-1166.
168. Yoshida S, Sasakawa C. Exploiting host microtubule dynamics: a new aspect of bacterial invasion. *Trends Microbiol.* 2003;11:139-143.
169. Rudloff S, Stefan C, Pohlentz G, Kunz C. Detection of ligands for selectins in the oligosaccharide fraction of human milk. *Eur J Nutr.* 2002;41:85-92.
170. Coppa GV, Gabrielli O, Giorgi P, Catassi C, Montanari MP, Varaldo PE, Nichols BL. Preliminary study of breastfeeding and bacterial adhesion to uroepithelial cells. *Lancet.* 1990;335:569-571.
171. Newburg DS, Chaturvedi P, Lopez EL, Devoto S, Fayad A Clery TG. Susceptibility to hemolytic-uremic syndrome relates to erythrocyte glycosphingolipid patterns. *J Infect Dis.* 1993;168:476-479.
172. Hutson AM, Atmar RL, Graham DY, Estes MK. Norwalk virus infection and disease is associated with ABO histo-blood group type. *J Infect Dis.* 2002;185:1335-1337.
173. Ofek I, Hasty DL, Sharon N. Anti-adhesion therapy of bacterial diseases: prospects and problems. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2003;38:181-191.
174. La Ferla B, Prosperi D, Lay L, Russo G, Panza L. Synthesis of building blocks of human milk oligosaccharides. Fucosylated derivatives of the lacto- and neolacto-series. *Carbohydr Res.* 2002;337:1333-1342.
175. Albermann C, Piepersberg W, Wehemeier UF. Synthesis of the milk oligosaccharide 2'fucosyllactose using recombinant bacterial enzymes. *Carbohydr Res.* 2001;334:97-103.