

Pet de *E. coli* enteroagregativa y su estimulación de las vías MAPK p38 y NFκB en macrófagos J774, conducen a la transcripción de citocinas inflamatorias

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS
PRESENTA:

ALEJANDRO BENÍTEZ GUZMÁN

COMITÉ TUTOTAL

Dra. María Eugenia Torres Márquez

Dra. Marina Macías Silva

Dr. Alejandro Fernández Velasco



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

Este trabajo se realizó gracias al apoyo de los proyectos:
DGAPA IN219508 de la Dra. María Eugenia Torres y
CONACYT 82755 del Dr. Carlos Eslava

El alumno fue apoyado con la beca de CONACYT, otorgada a los alumnos del Programa de Doctorado en Ciencias Biomédicas de la UNAM

El trabajo se realizó en los laboratorios:
Laboratorio 4bis del Departamento de Bioquímica, Facultad de Medicina (UNAM) a cargo de la Dra. María Eugenia Torres Márquez

Laboratorio de Investigación Básica del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina (UNAM) a cargo del Dr. Carlos Eslava Campos

Laboratorio 11 del departamento de Farmacobiología, CINVESTAV-Coapa a cargo de la Dra. Claudia González Espinosa

Agradecimientos

A todos los investigadores que apoyaron para la elaboración de este trabajo de tesis, por sus valiosas aportaciones.

Dr. Carlos Eslava Campos, Dra. María Eugenia Torres Márquez, Dra. Marina Macías Silva, Dr. Alejandro Fernández Velasco, Dra. Claudia González Espinosa, Dra. Luz María Rocha, Dr. Ulises Hernández Chiñas, M en C Alicia Vega.

Al jurado, integrado por:

Dr. Roberto Coria
Dra. María Eugenia Torres
Dr. Ricardo Lascurain
Dra. Bertha González

INDICE

ABREVIATURAS	6
RESUMEN	7
ABSTRACT	8
INTRODUCCIÓN	9
HIPÓTESIS	22
OBJETIVOS	22
<i>Purificación de Pet</i>	23
<i>Prueba de Limulus</i>	23
<i>Autoproteólisis de Pet</i>	23
<i>Cultivo celular</i>	24
<i>RNA</i>	24
<i>Ensayo de RPA (Ensayo de Protección de RNAsa)</i>	24
<i>Western Blot</i>	25
<i>Ensayo de supervivencia intracelular</i>	25
RESULTADOS	27
<i>Purificación de Pet</i>	27
<i>Inducción de la expresión de citocinas como respuesta a Pet</i>	27
<i>Fragmentación de Pet</i>	29
<i>Pet activa a IKKα/β y MAPK p38</i>	31
<i>Pet estimula la activación de IKKα/β</i>	32
<i>Efecto de la Inhibición de MAPK p38 sobre MIF, IL1 e IL1Ra</i>	33
<i>Pet estimula la inducción de citocinas por medio de la vía del NFκB</i>	34
<i>La inducción de citocinas pro-inflamatorias no requiere que la proteína esté intacta.</i>	35
<i>Ensayo de supervivencia intracelular</i>	37
DISCUSIÓN	38
<i>Pet estimula la secreción de citocinas</i>	38
<i>MAPK p38 es activada en respuesta a Pet</i>	40
<i>NFκB media la secreción de citocinas estimulada por Pet.</i>	41
CONCLUSIONES	49

PERSPECTIVAS	50
BIBLIOGRAFÍA	51
ANEXO 1	61
Artículo de revisión	61
ANEXO 2	69
Artículo original	69

ABREVIATURAS

CD	Enfermedad de Crohn
ASK1	Cinasa de la señal reguladora de apoptosis 1
ATF2	Activador de factor de transcripción 2
CU	Colitis ulcerativa
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena
ERK	Cinastas reguladas por señales extracelulares
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica
ICAM-1,	Moléculas de adhesión intracelular 1
IFNγ	Interferón gama
IgE	Inmunoglobulina E
IκB	Inhibidor del factor κ B
IKK	Cinasa del I κ B
IL	Interleucina
IRAK	Cinasa asociada al receptor de IL1
JNK	Cinastas del amino terminal de c-Jun
LAL	Lisado de amebocitos <i>Limulus</i>
LPS	Lipopolisacárido
MAPK	Mitógenos activados por proteínas cinasas
MAPK2K (MKK)	Mitógenos activados por proteínas cinasas 2 y 3
MyD88	Proteína de diferenciación mieloide
NFκB	Factor de transcripción nuclear kappa B
Omp85	Proteína de membrana externa 85
pCEFβ1	Plásmido con Pet recombinante
PRRs	Receptores que reconocen patrones
RPA	Ensayo de Protección del RNA
SPATEs	Proteínas de serina autotransportadas de la familia Enterobacteriaceae
STAT	Activador de la transcripción en cascadas de señalización 1
TAK1	Cinasa activadora de TGF β
TLR	Receptores tipo Toll
TNF-R1 y TNF-R2	Receptor 1 y 2 de TNF
TNFα	Factor de necrosis tumoral alfa
TSS	Sistema de secreción
Ub	Ubiquitinación
VCAM-1	Molécula de adhesión vascular 1
WB	Western blot

RESUMEN

Pet (toxina codificada en un plásmido) es secretada por *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y pertenece a la familia de las SPATEs. EAEC y sus productos, se han vinculado a enfermedades intestinales de tipo crónico como: colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn. Un evento clave de estas patologías es la secreción de citocinas que participan en el proceso inflamatorio. Entre estas están: las citocinas conocidas como pro-inflamatorias, tal como la interleucina 1 (IL1) y el factor de necrosis tumoral α (TNF α), las citocinas anti-inflamatorias como el antagonista del receptor de IL1 (IL1Ra) e IL10 y otra con actividades no totalmente establecidas en el proceso, como el factor de la inhibición de la migración del macrófago (MIF). La expresión de estas citocinas está determinada por cascadas de señalización como la vía del NF κ B/IKK y la vía de las MAPK. La participación de estas cascadas es tan amplia que se consideran nodos de procesos inflamatorios crónicos. Se ha encontrado que toxinas con dominios de proteasa de serina pueden desencadenar la secreción de citocinas de la respuesta inflamatoria. Debido a que Pet contiene uno de tales dominios consideramos que la proteína podría desencadenar la transcripción de citocinas de tipo inflamatorio. En este trabajo nos enfocamos a presentar evidencias de la estimulación que ejerce Pet en la transcripción de citocinas que intervienen en el proceso inflamatorio, así como de la participación de elementos cascada arriba del proceso. Los resultados nos muestran que las citocinas pro-inflamatorias TNF α y MIF tienen una estimulación temprana de (10 min) seguidas por la IL1. En el caso de las citocinas anti-inflamatorias se observó una respuesta tardía para IL1Ra y la nula respuesta para el caso de la IL10. En cuanto a la participación de cascadas de señalización, los resultados muestran que tanto la vía de MAPK p38 y como la de IKK/NF κ B son estimuladas, pero sólo la vía del NF κ B interviene en la respuesta que estimula la transcripción de citocinas. Por lo tanto concluimos que: los macrófagos estimulados con Pet desencadenan la transcripción de citocinas pro-inflamatorias de manera temprana y posteriormente una de sus contrapartes. Una vía que funciona como nodo es la IKK /NF κ B.

ABSTRACT

Pet (plasmid encoded toxin) is secreted for enteroaggregative *E. coli* (EAEC), and belongs to the SPATEs family. EAEC and its products have been associated to chronic intestinal diseases like: ulcerative colitis and Crohn's disease. A key event in these diseases is the secretion of cytokines involved in inflammation. Among these cytokines are: the pro-inflammatory, such as interleukin 1 (IL1), and tumor necrosis factor alpha (TNF α), anti-inflammatory cytokines such as antagonist IL1 receptor (IL1Ra) and IL10, and other with a not well defined role in the inflammation process such as macrophage migration inhibitory factor (MIF). The expression of these cytokines is determined by the NF κ B/IKK and MAPK signaling pathways. The participation of these pathways is so broad that they are considered as nodes within chronic inflammatory processes. It has been found that serine protease domain toxins may trigger the secretion of cytokines in the inflammatory response. Since Pet contains one of such domains we hypothesized that Pet could trigger the transcription of pro-inflammatory cytokines. In this work we present evidence that Pet stimulates the transcription of cytokines belonging to the inflammatory process, as well as elements upstream. The results show that pro-inflammatory cytokines such as TNF and MIF have an early stimulation (10 min) followed by IL1. In the case of anti-inflammatory cytokines a late response was observed for IL1Ra expression (3h) and a null response for IL10. As for the involvement of signaling cascades, the results show that both IKK/NF κ B and MAPK p38 pathways are stimulated, but only the NF κ B pathway is involved in the cytokine transcription stimulating response. We therefore conclude that Pet stimulates macrophages to trigger the early transcription of pro-inflammatory cytokines followed by one of its counterparts. One of the nodes involved is the IKK/NF κ B pathway.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria que coloniza el tracto gastrointestinal de los mamíferos a las pocas horas de nacidos. Este género puede coexistir de manera mutualista con el hospedero, compitiendo en la colonización del intestino contra géneros como: *Bacteroides*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Eubacterium* (7, 44). Es por esta competencia que la concentración de *E. coli* en el intestino puede variar dependiendo del estado fisiológico y clínico del hospedero (89). *E. coli* se ha dividido considerando diferencias genéticas en 5 grupos (A, B1, D, E y B2) (40), dentro de estos se encuentran biotipos saprófitos y aquellos que pueden ocasionar enfermedad. Dentro de los que ocasionan procesos infecciosos se han dividido en patotipos: ETEC (enterotoxigénica), EPEC (enteropatógena), EIEC (enteroinvasiva), EHEC (enterohemorrágica) *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y enteroagregativa (EAEC) cada uno de los patotipos, muestran distintos comportamientos clínicos y epidemiológicos (25).

EAEC se describió por primera vez en 1985, su nombre se debe al patrón de adherencia definido como “ladrillos apilados” que forma en cultivos de células HEP-2 (46). Es responsable de cuadros de diarrea persistente (>14 días) y es el segundo agente más importante en la diarrea del viajero, está presente en las diarreas de pacientes inmuno-comprometidos y con enfermedades inflamatorias intestinales crónicas. A partir de su identificación y hasta la fecha, el número de casos ha aumentado, sobre todo en niños tanto de países industrializados como en vía de desarrollo, al grado de reconocerlo como un patógeno emergente. La infección por EAEC está pobremente definida, las manifestaciones clínicas que se han observado en pacientes infectados con EAEC son: diarrea profusa con moco y sangre ocasional. En muestras histopatológicas de cortes intestinales, se ha observado infiltración linfocitaria y hemorragias en el epitelio intestinal (49). Hallazgos similares se han obtenido en modelos de animales infectados con EAEC (96). Los factores que se han asociado a la infección por EAEC son la adherencia bacteriana en el intestino, inducción de inflamación en la mucosa y producción de enterotoxinas y citotoxinas (Figura 1A-C). Entre las toxinas de importancia clínica, se han reportado aquellas que pertenecen al

grupo de las proteínas de serina autotransportadas de la familia Enterobacteriaceae (SPATEs) (110).

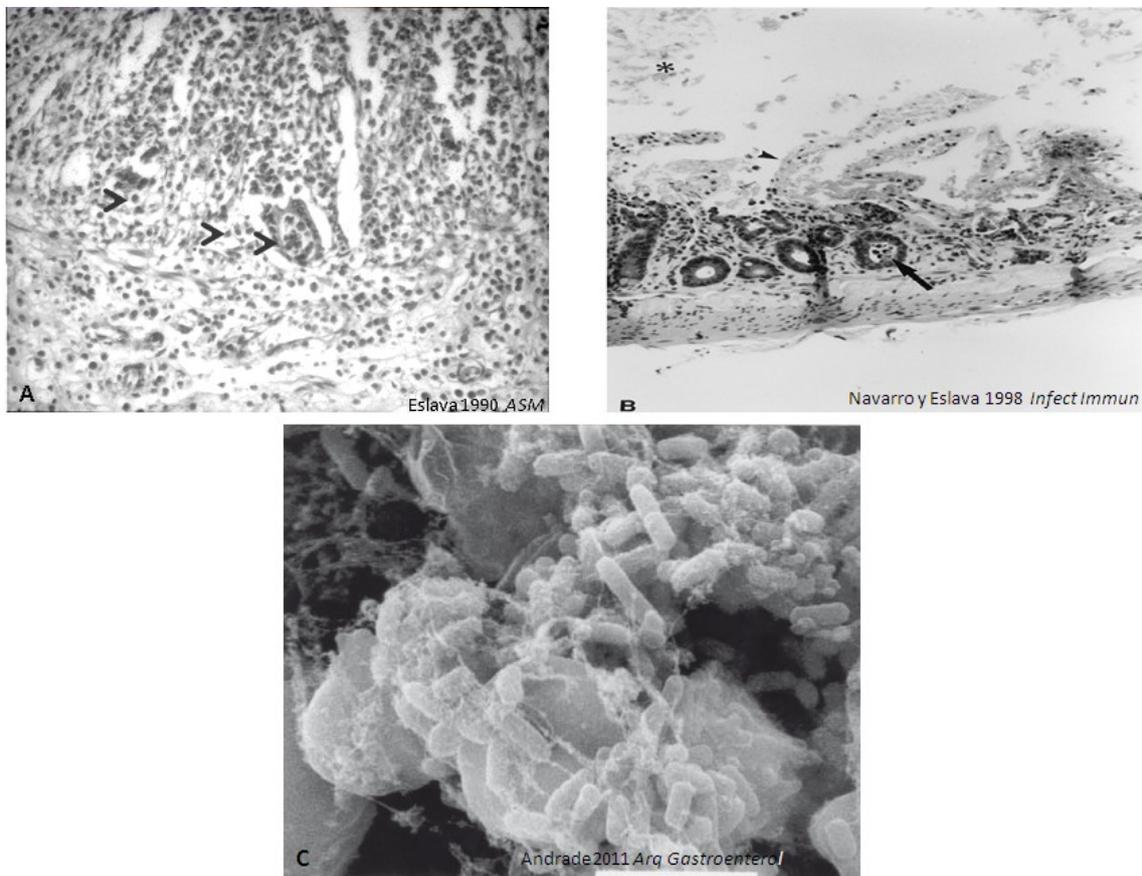


Figura 1. Factores que intervienen en la infección por EAEC.

A) Corte histológico de intestino de un niño infectado por EAEC, en donde se aprecia infiltrado leucocitario y hemorragias (flechas). **B)** Corte histológico de infección in vitro de intestino inoculado con Pet (SPATE), en donde observamos destrucción del epitelio y hemorragias (cabeza de flecha) y vacuolización en la mucosa (flecha completa). **C)** Adherencia de EAEC al epitelio intestinal en forma de "ladrillos apilados".

La familia de las SPATEs es un grupo de proteínas secretadas, a través de un mecanismo definido como "autotransporte" que se incluye en el sistema de secreción tipo 5. Hasta el momento se han descrito 7 diferentes sistemas de secreción (TSS) en bacterias Gram negativas, cuyos nombres se han determinado por el orden

cronológico en el que se identificaron asignándoles un número. La finalidad de estos mecanismos de secreción, es el paso de proteínas a través de las membranas interna y externa hacia el exterior. Para poder exportar proteínas, algunos de estos sistemas (TSS 3, 4, 6) necesitan del acoplamiento bacteria-célula blanco del hospedero, por lo que se les conoce como dependientes de contacto, mientras que otros (TSS1,2,5 y 7) son independientes de éste.

El mecanismo TSS5 se subdivide en tres (TSS5a, b y c), las SPATEs se secretan por el TSS5a y tienen una gran diversidad en efectos, tales como: citotoxicidad, adhesión, lipasa, etc. La liberación de las proteínas está determinada por estructuras que se encuentran dentro de su secuencia, mismas que son reconocidas en el proceso de translocación (90).

Estas proteínas presentan un péptido señal; localizado en la región amino terminal, el dominio pasajero ubicado en la parte central de la proteína (dominio funcional) y el dominio de translocación o β -barril que se encuentra en el extremo carboxilo terminal (Figura 2).

El péptido señal, localizado en la región amino terminal, está compuesto por un rango de entre 48 y 59 aminoácidos, este se divide a su vez en tres dominios: el N-terminal (25 aminoácidos) en el cual se encuentra una región conservada con aminoácidos básicos (carboxilo), el dominio-H con aminoácidos hidrofóbicos y el dominio C-terminal que contiene la parte que reconoce al aparato secretor. Este último dominio es el responsable de reconocer a la molécula que se encuentra en la membrana interna de la bacteria. Su función principal es facilitar el paso de la proteína (pasajero y barril) a través de la membrana interna hacia el espacio periplásmico, por medio del translocon Sec (32, 106)

En el dominio pasajero se localiza la porción catalítica de la proteína, este es el fragmento que se excreta al espacio extracelular a través de un "poro", formado por el dominio beta barril (31). Las longitudes de los dominios pasajeros que se han reportado hasta el momento, van de los 966 a los 1050 aminoácidos y se les atribuyen funciones enzimáticas, de locomoción, adhesinas, citotóxicas, inmunomodulatorias y de cofactores (112). La familia de las SPATEs, compuesta hasta el momento de 20

proteínas, portan el motivo **GD*Ser*GS** que les da el nombre de proteasas de serina. Los sustratos que pueden hidrolizar son diversos (mucina, caseína, espectrina, fodrina, IgA, etc.) y al igual que la familia de la quimiotripsinas para catalizar, forman una triada compuesta por Ser, Asp e His, aminoácidos que son conservados espacialmente (86). El beta barril; es la parte más conservada de las SPATEs, su función es liberar al dominio pasajero del espacio periplásmico al exterior. Hasta el momento se desconoce el mecanismo exacto por el cual se libera el dominio pasajero del dominio β -barril. El corte que los separa se realiza en el dominio conservado FxxEVN/NLNK y específicamente entre las dos Asparaginas. Hasta el momento no se sabe el mecanismo exacto de salida del dominio pasajero, una de las teorías más difundidas es: el dominio pasajero se pliega en el espacio periplásmico, con la participación de las proteínas chaperonas como Omp85, que le permite atravesar por el “poro” formado por barriles beta. La separación se da finalmente por autoproteólisis en el extremo C-terminal (Figura 2) (57).

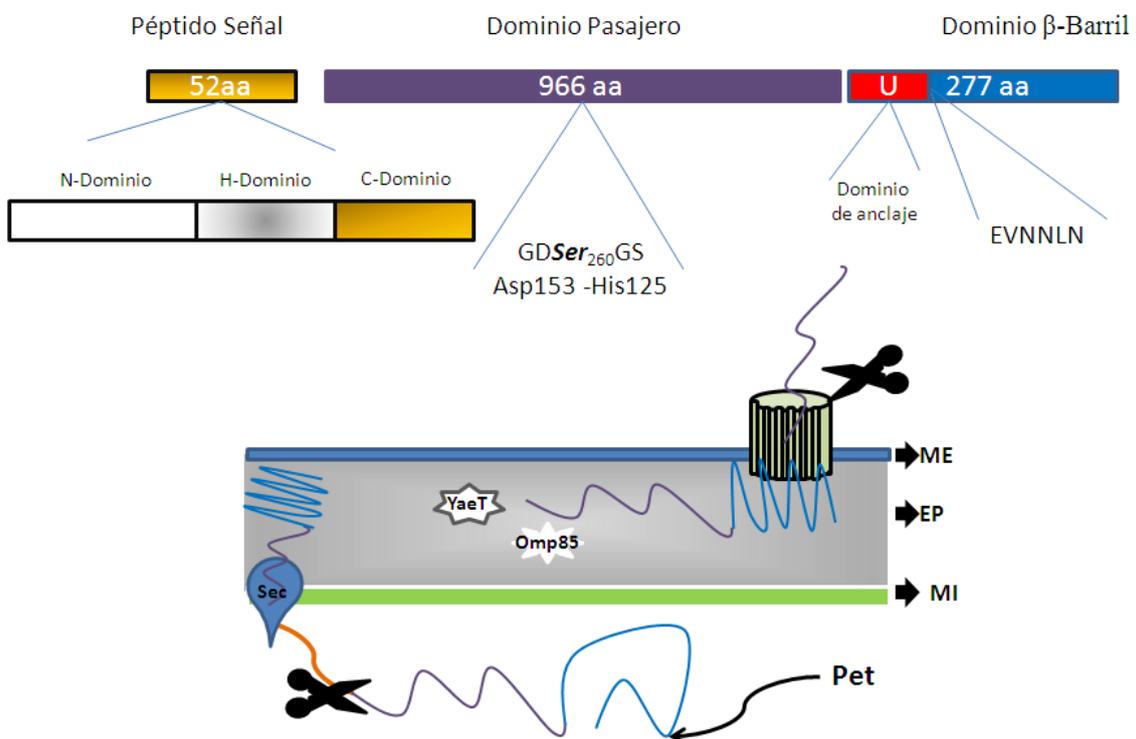


Figura 2. Estructura y mecanismo de secreción de Pet (TSS5-a).

Dominios de Pet (arriba) y el número de aminoácidos que lo componen (aa). Mecanismo de liberación del dominio pasajero (abajo), el péptido señal se muestra en amarillo, el dominio pasajero en morado y el β -barril en azul

Las SPATEs que se han identificado en EAEC son la toxina codificada en un plásmido (Pet) y la proteína que interviene en la colonización (Pic) (110), de estas últimas Pet se ha relacionado con eventos inflamatorios (96). Pet se reportó por primera vez en 1998 como un producto de secreción de la cepa O42 de *E. coli* enteroagregativa. Es una proteína de 108 kDa codificada en un plásmido de 65MDa relacionado a la adherencia de la bacteria. Pet es considerada una SPATE de la familia de las IgA1 proteasas, tiene efectos citopáticos dependientes de dosis y tiempo en células HEp-2 y HT29/C1. En estas líneas celulares es capaz de alterar el citoesqueleto por la pérdida de fibras de estrés, provocando redondeo y liberación del contacto focal celular (41, 84). Los efectos anteriores se inducen al internalizarse la toxina a las células, utilizando un mecanismo endocítico dependiente de clatrina (82). Posteriormente, la toxina por transporte retrógrado pasa por el aparato de Golgi y llega a la membrana plasmática para degradar a la fodrina. La proteólisis de la fodrina se lleva a cabo entre los aminoácidos M1198 y V1199 en una hélice C, dentro del dominio de unión a calmodulina (20, 83). Se ha utilizado a Pet como modelo para el estudio del plegamiento proteico y el análisis funcional de la familia de las SPATEs (36, 37). A nivel extracelular, se ha observado que actúa como quimioattractante para células mononucleares (47). Otras toxinas de la familia de las IgA1 proteasas, secretadas por géneros como *Neisseria*, *Haemophilus* y *Streptococcus*; se han relacionado a procesos inflamatorios y dentro de la secuencia de estas toxinas el dominio de quimiotripsina se ha considerado como uno de los factores de importancia en la respuesta inmune (18, 76).

EAEC y sus toxinas (SPATEs) se han asociado a enfermedades inflamatorias crónicas del intestino, como la enfermedad de Crohn (CD) y la colitis ulcerativa (CU) (11). Dentro de su secuencia Pet posee dominios que podrían estar relacionados con el proceso inflamatorio, los dominios involucrados son:

Dominio parecido a tripsina; secuencia que se encuentra en proteasas de serina, como característica principal se encuentra la triada catalítica conformada por una Ser, His, Asp (24, 76).

El dominio Ricina también está involucrado en procesos inflamatorios y se han asociado a la activación de cascadas de señalización como: JNK, MAPK p38 y NFκB (66). CASH es el dominio presente en proteínas que ligan carbohidratos e hidrolasas. Se caracteriza por repeticiones de glicinas y residuos hidrofóbicos conformando las unidades repetitivas que forman hélices-β en la superfamilia de las pectato liasas. En Pet este dominio se encuentra entre los aa 311-479 (29).

BID 2 es un dominio parecido a inmunoglobulina, éste dominio se encuentra en una gran cantidad de bacterias y superficies de fagos, es una molécula de adhesión bacteriana que interactúa con la célula hospedera. Contiene 3 dominios de los cuales dos de ellos son “parecidos a inmunoglobulina” y otros son de tipo lectina, los dominios modulan e implican reconocimiento que podría ser importante en la adhesión celular, en Pet esta región se encuentra de los aa 418 al 497 (76)

MA es el factor quimiotáctico bacteriano, fragmentos que responden a cambios en la concentración de atractantes y repelentes en el medio ambiente, en Pet abarca de los aa 542 al 754.

El factor von Willebrand r (VWA); es una glicoproteína multimérica que forma parte de los factores del complemento (C2, CR3 y CR4), integrinas, diferentes tipos de colágenas (VI, VII, XII and XIV) y otras proteínas extracelulares. Una característica común es que pueden formar complejos multiprotéicos que participan en diferentes procesos biológicos (adhesión, migración y transducción de señales), e interactúan con una gran cantidad de ligandos; en Pet se encuentra entre los aa 654 al 705 (13, 24).

Los dominios mencionados arriba, se han asociado a procesos que intervienen con la respuesta inmune innata, particularmente con el proceso inflamatorio, fenómeno que se manifiesta en el hospedero, como respuesta hacia el daño que causa la infección por patógenos y sus productos. De manera secuencial, la inflamación se caracteriza por el reclutamiento celular en la periferia de los vasos sanguíneos; las células involucradas son leucocitos polimorfonucleares, macrófagos y monocitos (30). El macrófago es una célula que se especializa en la fagocitosis y la eliminación de microorganismos y sus productos. Este tipo celular proviene de la médula ósea, en donde a partir de una célula pluripotencial, se convierte a promonocito y posteriormente madura a monocito. Así

será liberado a la circulación sanguínea, en donde conformará del 1 al 6% de leucocitos totales y posteriormente emigrará a su lugar de residencia, en donde se convertirá en macrófago (60, 71). Para desarrollar con eficacia sus funciones, los macrófagos poseen en su superficie gran cantidad de receptores conocidos como: receptores que reconocen patrones (PRRs). Dentro de este grupo podemos encontrar a todos los receptores que son capaces de reconocer a patógenos y sus productos para su posterior destrucción y eliminación. Algunos PRRs que se encargan de detectar antígenos son los receptores tipo: Toll (TLRs), manosa, “scavenger”, CD14, CD40 (105). Una vez unidos a sus ligandos los PRRs tienen la capacidad de transducir la señal para desencadenar la transcripción de citocinas, mismas que intervienen en la respuesta inmune y activan la inmunidad innata (52). Las citocinas son proteínas secretadas por las células del hospedero que regulan acciones sobre otros y/o el mismo tipo celular. Las principales citocinas que se involucran en el proceso inflamatorio son: el factor de necrosis tumoral alfa (TNF α) e interleucinas (IL) como: IL1, IL6, MIF, IL1Ra, IL10, entre otras (62, 109).

TNF α es una citocina pro-inflamatoria multifuncional que interviene en la regulación de la proliferación celular, diferenciación y apoptosis; además induce la producción de otras citocinas de la respuesta inmune (1). Es producida principalmente por los macrófagos, aunque se ha observado que otros tipos celulares pueden generarla, tal es el caso de: células linfoides, cebadas, endoteliales, fibroblastos y tejido neuronal (65). Es un homotrímero de 157 aminoácidos y transduce su señal principalmente a través de dos tipos de receptores TNF-R1 y TNF-R2, ambos transducen la señal hacia factores de transcripción nuclear tales como: c-Jun y NF κ B, que a su vez pueden inducir la expresión de otros genes importantes para el desarrollo, crecimiento, diferenciación celular, supervivencia, estrés, inflamación y oncogénesis (22). La producción de esta citocina y sus efectos se han asociado a enfermedades tales como colitis ulcerativa, enfermedad de Crohn y artritis reumatoide (97).

IL1 fue la primera interleucina descrita, se han encontrado diversas funciones para esta citocina, sobre todo las relacionadas con la respuesta inmune innata (inflamación) y en la diferenciación de células T que intervienen en procesos inflamatorios crónicos (102).

Las dos proteínas que unen y activan al receptor de IL1 (IL1R); son la IL1 α y la IL1 β , ambas ejercen la misma actividad biológica, aunque se ha especificado que la IL1 β se secreta por leucocitos y se puede encontrar en circulación, mientras que la IL1 α está más asociada a la membrana plasmática de las células epiteliales, por lo tanto puede actuar de manera local. La IL1 β se produce en su mayoría por monocitos circulantes y macrófagos, mientras que la IL1 α se ha encontrado además en queratinocitos y células endoteliales (34). Ambos tipos se han asociado a procesos inflamatorios agudos y crónicos. De manera particular la IL1 α juega un papel importante en el “priming” o preparación de las células T, en la hipersensibilidad e inducción de IgE, mientras que la IL1 β se ha implicado en la inducción de fiebre y procesos inflamatorios (80).

MIF (factor inhibidor de la migración) es una citocina que se relacionó inicialmente en reacciones de hipersensibilidad retardada, pero hoy en día se sabe que participa en eventos como la inflamación, diferenciación, supervivencia y apoptosis celular. En procesos infecciosos se ha observado que MIF puede actuar como citocina de tipo pro-inflamatorio, promoviendo las respuestas innata y adaptativa, a través de la activación de macrófagos y células T (94). MIF es liberado después de que el hospedero interactúa con los microorganismos y/o sus toxinas, por efecto de citocinas pro-inflamatorias o la activación por otros antígenos. Como respuesta a los estímulos anteriores promueve la supervivencia celular, evitando en algunos casos el choque séptico, pero prolongando los efectos inflamatorios de otras citocinas (77). Además se ha asociado con la producción de TNF α , IFN γ , IL1, IL12 e IL6, óxido nítrico y productos de la vía del ácido araquidónico (18).

La respuesta inflamatoria puede ser regulada de manera parácrina y autócrina, por lo tanto al estimularse citocinas de tipo pro-inflamatorio, se activan otras vías para disminuir la actividad inflamatoria. Para este último evento IL1Ra y la IL10 son citocinas que son importante en la regulación de la respuesta inflamatoria

IL1Ra pertenece a la familia de la IL1 y tiene afinidad por el mismo receptor. Se ha observado que su secreción está mediada directamente por la estimulación en la producción de IL1(3), al competir por el mismo receptor disminuye los efectos inflamatorios de IL1(93). Por otro lado la IL10, es una citocina que se considera anti-

inflamatoria, es secretada por linfocitos B, diferentes subtipos de células T (TH2, TH17), monocitos y células dendríticas (98). Dentro de sus funciones se encuentran la inhibición de la expresión del complejo mayor de histocompatibilidad de tipo II y la expresión de moléculas como CD80 y CD86, por lo que inhibe la maduración de células dendríticas. Otro efecto de la IL10, es inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL1 TNF α , IL12 y aumenta la producción de IL1Ra. De manera interesante no se ha observado producción en enfermedades inflamatorias intestinales (42, 59).

Como hemos descrito las citocinas necesitan unirse a un receptor para que cumplan su función biológica, de este modo pueden desencadenar la señalización y activar la maquinaria genética y funcional que caracteriza a la respuesta inmune innata, específicamente el proceso inflamatorio. Las vías de señalización más comunes que intervienen dentro del proceso inflamatorio son: la vía de los mitógenos activados por proteínas cinasas p38 (MAPK p38) y la vía del factor de transcripción nuclear kappa B (NF κ B) (5, 14).

La cascada de MAPK, está integrada por 3 componentes secuenciales que se activan por fosforilación de las proteínas llamadas proteínas cinasas de las cinasas de MAPK (MAP3-K), que activan a las MAP 2- cinasas (MAP2K), que a su vez activan a las MAPK (Figura 3). Todas las MAPK tienen como característica general un motivo de Thr-Xaa-Tyr (TXY), difieren entre ellas por el aminoácido intermedio. La fosforilación de la Thr y la Tyr dentro del asa de activación es necesaria para que se encuentren en su forma activa. Las MAPK se dividen en tres familias principales: a) Las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2 o p42/44), cuyo dominio de modulación es Thr-Glu-Tyr, esta gran familia se divide en 2 grupos: ERK1 y ERK2, y el otro grupo conformado por: ERK3, ERK5, ERK7 y ERK8; estas últimas consideradas como cinasas de gran tamaño pues sus pesos radican entre 60 y 100kD. b) Las cinasas del amino terminal de c-Jun (JNK) que contienen la secuencia Thr-Pro-Tyr como dominio de activación y se dividen en JNK1, JNK2 y JNK3. c) Las cinasas p38 (incluyen a los tipos α , β , γ , δ) tienen un dominio de activación Thr-Gly-Tyr, su peso es de 38 kDa y está reguladas por diferentes estímulos extracelulares, tales como la luz UV, calor, estrés y citocinas

(TNF α e IL1). Los diferentes activadores muestran lo complejo que pueden ser los caminos de p38 y por lo tanto puede ser estimulada corriente arriba por diversas cinasas, como son: MAP3K, MAP2K y MAPK p38.

Estas vías se pueden estimular cuando las células están sensibilizadas con TNF α o IL1. Después de que IL1 es ligada al receptor, se forma un complejo citosólico que comprende a MyD88 (Gen 88 de respuesta primaria en diferenciación mieloide) y TollIP (proteína que interactúa con Toll). Este complejo recluta a proteínas como IRAK (cinasa asociada al ceptor de IL1) que a su vez activa a TRAF6 formando un complejo y este activa a TAK1 (cinasa activadora de TGF β). TAK1 puede activar a las MKK2, que a la vez pueden activar a MAPK p38 mismo que actúa sobre el activador de factor de transcripción 2 (ATF2) o el activador de la transcripción en cascadas de señalización 1 (STAT1) quienes regularán funciones como: respuesta inmune, diferenciación celular y sobrevivencia (Figura 3) (2, 113)

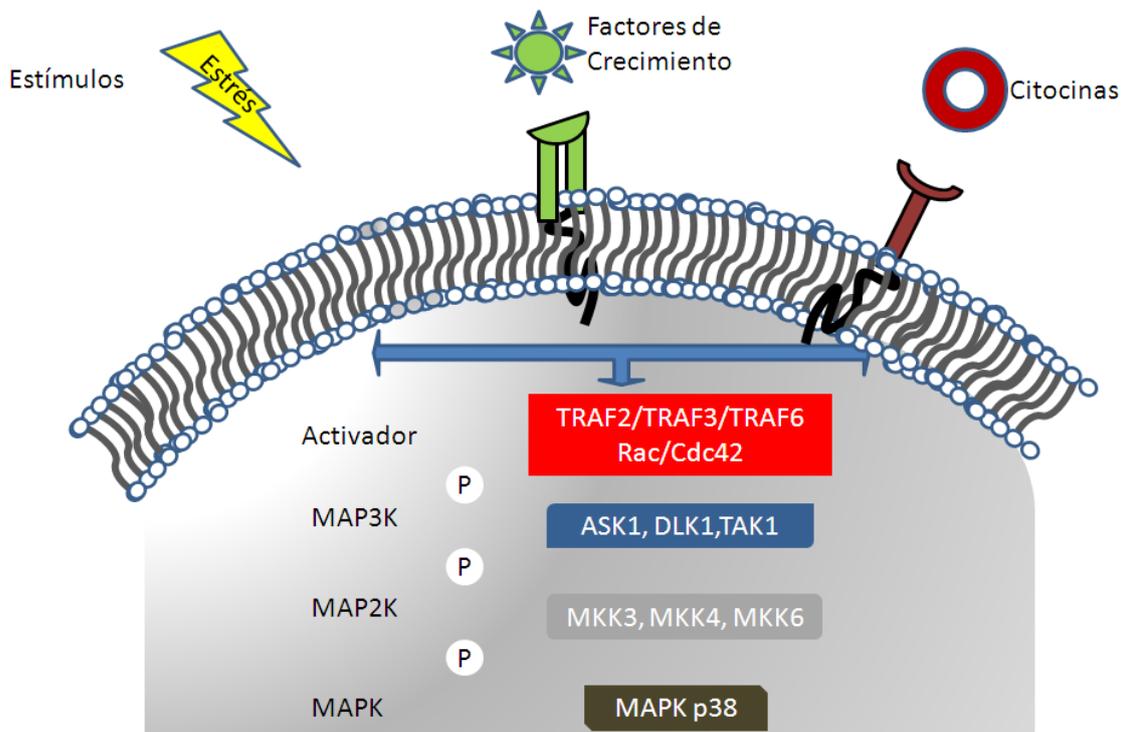


Figura 3. Cascada de señalización de MAPK p38

Diferentes estímulos tales como: factores de crecimiento, citocinas inflamatorias o un amplio rango de factores medio ambientales que provocan estrés, son los activadores de la vía de MAPK p38 dando como resultado diversos blancos corriente abajo, proteínas que pueden fosforilar a las MAPK3K (MKKK), que a su vez fosforilarán a las MAPK2K para finalmente tener como blanco a la MAPK p38.

TRAF (Factor asociado al receptor TNF), Cdc42 (Ciclo de división celular 42), ASK1 (cinasa de la señal reguladora de apoptosis 1), DLK1 (proteína similar a delta 1), TAK1 (cinasa activadora del factor de crecimiento transformante β), MAPK (mitógenos activados por proteínas cinasas), MKK3 (MAPK cinasa de cinasas).

La activación de la vía del NF κ B está caracterizada corriente arriba por dos vertientes: la vía clásica y la vía alterna; ambas vías pueden activar la transcripción de genes que intervienen en la inflamación. La vía clásica se ha observado que se dispara en infecciones por virus y bacterias e involucra la activación del complejo IKK, el cual está compuesto por IKK α , IKK β (IKK α/β) y la unidad regulatoria IKK γ , también conocida como NEMO. IKK α e IKK β tienen una estructura similar (50% de identidad), dentro de sus secuencias contienen los dominios de cinasa; que regula la actividad de la proteína, el dominio rico en leucinas; este sirve para formar heteodímeros y la región de anclaje con la IKK γ . El mecanismo exacto por el cual estas proteínas son activadas corriente arriba es desconocido, pero se sabe que su activación está determinada por una fosforilación en la Ser 177 y 181 para la IKK β y la Ser 186 y 180 para la IKK α , localizados en el dominio de cinasa. La activación del complejo IKK se ha relacionado con la activación de diferentes receptores y sus ligandos, tal es el caso de los receptores tipo Toll, que al ser estimulados, pueden transducir la señal vía IKK α y éste a su vez, activa al complejo I κ B, (Ser32 y Ser36 de I κ B α), lo que desencadena la poliubiquitinación (Lys21 y Lys22 de I κ B α) y degradación por el proteosoma. Previo a la estimulación de la vía, el complejo I κ B tiene secuestrado al NF κ B, cuando se fosforila y degrada, promueve la liberación del dímero que compone al NF κ B (p65 y p50). Cuando el complejo es liberado se transloca al núcleo, en el caso de la vía clásica, p50 es favorecido en la translocación, quien a su vez estimula la transcripción de genes que codifican para la expresión de citocinas, quimiocinas, moléculas de adhesión (ICAM-1, VCAM-1), enzimas que producen mediadores secundarios de la inflamación,

mediadores de la apoptosis y diferenciación celular (Figura 4). Estas moléculas son importantes para la respuesta inmune y particularmente en el proceso inflamatorio, donde predominan citocinas como: $TNF\alpha$, IL1, IL6, IL12 (51, 54, 67).

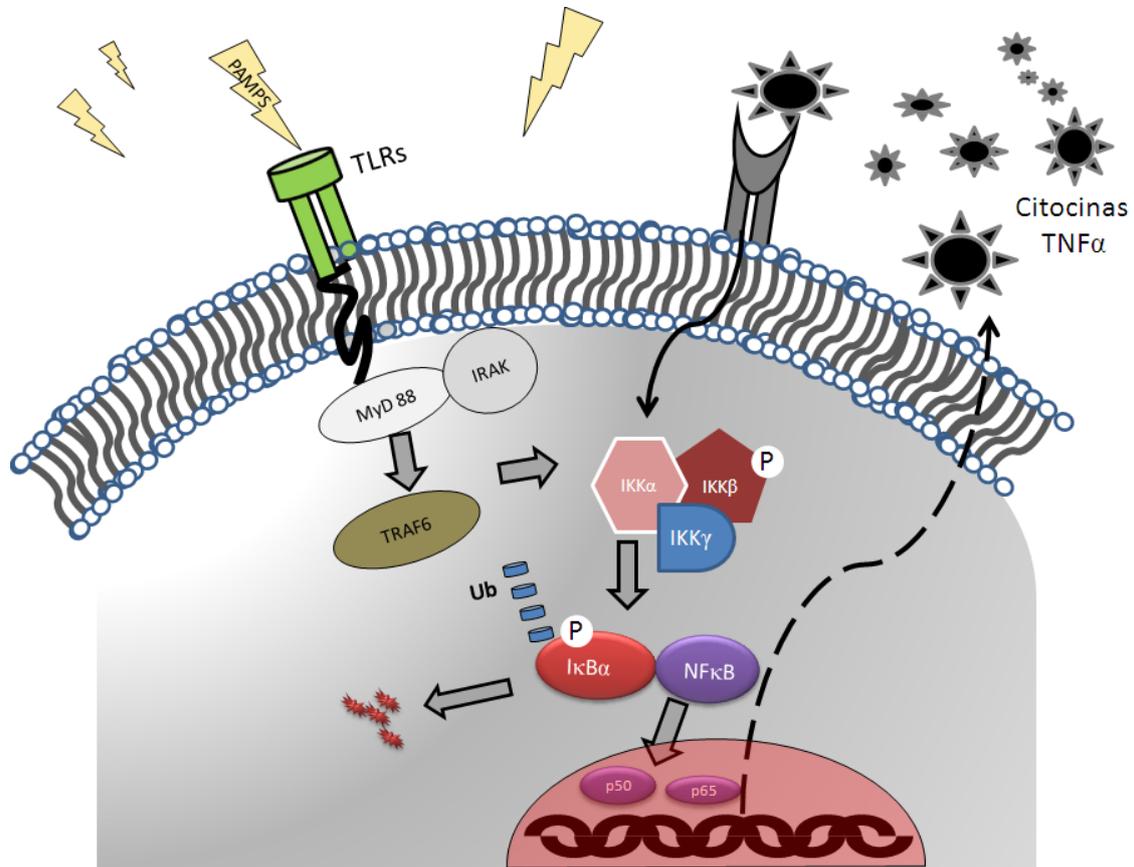


Figura 4. Vía de activación clásica del NFκB a través de TLRs.

Los receptores tipo Toll, reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs), una vez unidos con el ligando, para transducir la señal y amplificar la señal, reclutan proteínas adaptadoras que se encuentran en el citoplasma, proteínas como MyD88 (proteína de diferenciación mieloide) que recluta a proteínas como las IRAK (cinasa asociada al receptor de IL1) y TRAF6 (factor asociado al receptor de TNF). Las proteínas blanco del complejo MyD88-TRAF son las IKK α , β y γ . Cuando éste otro complejo se fosforila, activa al complejo IκB, que tiene secuestrado NFκB (p50, p65), cuando el complejo es fosforilado IκB se degrada y promueve la liberación y translocación del NFκB. Los genes blanco de éste factor de transcripción, codifican para una gran variedad de citocinas que pertenecen al proceso inflamatorio, tales como IL1 y $TNF\alpha$, que a su vez pueden activar al mismo NFκB creando retroalimentación positiva.

La vía del NFκB forma parte de un nodo central asociado con enfermedades inflamatorias crónicas, tal es el caso de la CU y CD, que forman parte del síndrome

inflamatorio crónico intestinal (27). Uno de los factores de gran relevancia en el síndrome inflamatorio crónico del intestino es la polarización en la microbiota intestinal. Se ha observado que las *E. coli* proliferan cuando los procesos inflamatorios crónicos se han establecido (58, 93). Los grupos filogenéticos que se han relacionado con la inflamación crónica son aquellos en los que se ha comprobado tienen la capacidad de secretar SPATEs, lo que sugiere que dichas proteasas podrían estar relacionadas con el proceso inflamatorio (28, 70, 73, 99). Lo anterior permite sugerir que Pet podría estar participando en la inducción de la respuesta inflamatoria. Por lo tanto en este estudio analizamos la participación de Pet en la inducción de algunos de los procesos de la respuesta inmune innata de macrófagos.

HIPÓTESIS

- La toxina Pet secretada por *E.coli* activará la transcripción de citocinas inflamatorias de la respuesta inmune a través de las vías MAPKp38 y NFKB/IKK.

OBJETIVOS

- Determinar la transcripción de citocinas de la respuesta inflamatoria inducidas como respuesta a Pet en macrófagos J774.
- Identificar la cascada de señalización que participa en la transcripción de citocinas del proceso inflamatorio.
- Determinar si la transcripción de citocinas es generada por fragmentos de Pet

MATERIAL Y MÉTODOS

Purificación de Pet

Se cultivó la cepa pCFN-1 (recombinante con Pet) en medio LB con 100 µg/ml de ampicilina durante 16h, posteriormente se sembró el 10 % de este cultivo en medio fresco durante 4 horas con agitación con constante (100 rpm) a 37°C, después se resembró el 1% del último cultivo en medio LB fresco y se incubó por 6 horas más. Posteriormente, se centrifugó el total del cultivo a 17500 X *g* durante 20 minutos a 4°C y se obtuvo el sobrenadante, el cual se precipitó con sulfato de amonio a una saturación del 75% (470gr/L) durante toda la noche a 4°C. El precipitado se colectó por centrifugación a 17500 X *g* durante 30 minutos a 4°C, se resuspendió con solución amortiguadora de fosfato de sodio 70 mM pH 8.2, y se dializó contra el mismo amortiguador. El dializado se concentró a través de membranas de celulosa Amicón 100 (905024, Millipore USA) para someterlo a cromatografía. Fueron utilizadas columnas de: intercambio aniónico (Q-Sepharose) e intercambio catiónico (Mono S HR 5/5); fueron equilibradas con Tris-HCl 50 mM-EDTA 10 mM a pH 8.0 (Tris-EDTA). Para eluir se utilizó Tris-EDTA en la Q-Sepharose y Mono-S en donde las fracciones proteicas fueron retenidas se utilizó NaCl (1M) para aumentar la fuerza iónica del sistema. La concentración de proteína se determinó por el método de Bradford. El proceso de purificación de Pet se analizó mediante SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie y tinción de plata.

Prueba de Limulus

Se utilizó el ensayo de LAL (lisado de amebocitos *Limulus*) (cat N412 Cambrex) para detectar los niveles de endotoxinas de Pet, RPMI 1640 y RPMI1640 SFB. Se siguió las especificaciones del proveedor para realizar los experimentos. 100µl de la proteína (180µg) se mezclaron con 100µl de LAL y se incubaron durante 60 minutos a 37°C por duplicado.

Autoproteólisis de Pet

Para el ensayo de fragmentación se utilizó 20µg de Pet purificada en 100µl de RPMI, se incubó durante 0.16, 0.5, 1, 3, 12, 24, 36, 48, 72 y 96 horas a 37°C en con 80% de

humedad. Las digestiones se visualizaron por medio de SDS-PAGE 10% teñido con azul de Coomassie.

Cultivo celular

Macrófagos de ratón de la línea J774A.1 se cultivaron en medio RPMI 1640 (cat. R6504 Sigma, USA) suplementado con L-glutamina 2mM (Cat. 25030-149, Gibco USA), aminoácidos no esenciales 1mM (Cat. 111450, Gibco USA), piruvato de sodio 1mM (Cat. 11360070, Gibco USA) y suero fetal bovino al 10% (Cat. 10437010, Gibco USA).

RNA

Se obtuvo el RNA de 8×10^5 células, las cuales se pre-incubaron durante 30 minutos con 20µg de cicloheximida, terminado el plazo, las células se confrontaron con 200ng de Pet purificada a las 0.16, 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 horas. Una vez transcurrido el tiempo las células se lisaron con Trizol (cat. 10296-028 Invitrogen USA), el resto de la extracción se realizó con el Kit Rnaeasy (cat. 74104, Qiagen USA). El RNA se cuantificó por medio de su absorbancia a 260 nm.

Ensayo de RPA (Ensayo de Protección de RNAsa)

El cDNA se sintetizó, en presencia de 100 µCi de ^{33}P -UTP, con el kit de transcripción (BD biosciences 556850) utilizando las sondas mCK-2b y mCK-3b Multi-Probe Template Set (556156 y 556158 BD biosciences). La hibridación se realizó incubando 10µg del RNA de los macrófagos con las sondas (^{33}P -cDNA), toda la noche a 60°C. El ensayo de protección de RNasa se llevó a cabo utilizando los componentes del Kit 556134 (BD biosciences), en donde la digestión con RNasa I se realizó durante 1 hora a una temperatura de 37°C. El tratamiento con proteinasa K se llevó a cabo después de la digestión con RNasa I; los fragmentos digeridos se incubaron con la proteinasa K durante 15min a una temperatura de 37°C y después se transfirieron a 4°C para precipitar los fragmentos digeridos. La precipitación se realizó con 1.5µl acetato de amonio (4M), 1µl Glyco-blue (9515 Ambion) y 650µl de etanol absoluto por muestra, incubando las muestras a -80°C durante 10 min, se centrifugó a 14000 rpm 10min, la pastilla que se obtuvo se resuspendió en amortiguador de carga y se resolvió electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante 6% (urea 40% en TBE). El gel se

secó y fue expuesto a placas de phosphorimager que fueron leídas en el Typhoon. La densitometría se llevó a cabo con el software Lab Works (Cambridge UK). Los resultados fueron expresados como el cociente de la cantidad de citocina y el gen constitutivo L32.

Western Blot

Células J774 (8×10^5) fueron incubadas por 36 horas en RPMI 10% SFB, se retó con Pet en RPMI sin suero a los tiempos indicados en las figuras. Posteriormente las células fueron lisadas con amortiguador de Laemmli, el extracto crudo se resolvió con SDS-PAGE al 8%, los geles fueron transferidos a membranas de PVDF. Las membranas fueron incubadas toda la noche a 4°C en presencia del anticuerpo primario (1:1000), en el caso de los ensayos de IKK $\alpha\beta$ fueron utilizados los siguientes anticuerpos: pIKK $\alpha\beta$ (pSer176/p180 de IKK α) Cell signaling (cat 2697 New England); para determinar el control de carga se utilizó anti- Actina C-terminal (aminoácidos 350-375) de Santa Cruz Biotechnology (sc-8432 USA). En el caso de los ensayos de MAPK/p38 fueron utilizados los anticuerpos; phospho-p38 MAPK (pThr180/pTyr182) mAb (cat 9216 New England) y como control de carga el anticuerpo policlonal p38/MAPK el cual reconoce niveles endógenos de p38 α , β y γ (cat 9212, New England).

El anticuerpo secundario que se utilizó fue anti ratón marcado con peroxidasa (cat. 074-183, KPL USA), en una dilución 1:10,000. Las bandas se revelaron por medio del kit de ECL SuperSignal West Femto (34095 Pierce).

Para los experimentos de inhibición de la IKK se utilizó surfactina de *Bacillus subtilis* (Sigma, S3523) a una concentración de 10 μ M. La surfactina se añadió 2 horas antes del estímulo con Pet.

En el caso de la inhibición de p38 se utilizó SB203580 (cat 559389, Calbiochem USA) a una concentración de 20 μ M.

Ensayo de supervivencia intracelular

Para determinar la supervivencia de los macrófagos se incubó 1×10^4 células en 2 placas de Terasaki (cat. 136528; Nunc Denmark). Las placas fueron centrifugadas a 1200 X g y se incubaron toda la noche a 37°C, 5 % de CO₂ y 95% de humedad.

Posteriormente se retiró el medio de los pozos para inocular 10^5 bacterias (en un volumen de 5 μ l). Las placas se centrifugaron durante 10 minutos a 300 X *g* agregando una gota de agua destilada estéril en cada una de las esquinas de ambas placas para incubarlas 4 horas en las mismas condiciones. Transcurrido el tiempo, cada poso se lavó 5 veces con RPMI (10 μ l). Para la placa del T₁ se depositó 10 μ l de medio fresco y se incubó durante 2 horas. Para la placa correspondiente al T₀, las células fueron lisadas con Tween 20 al 0.5%. Una vez lisadas se determinó el número de unidades formadoras de colonia (UFC) por conteo en placa. Una vez transcurrido el tiempo para la placa T₁ se realizó el conteo de UFC por el mismo procedimiento. Los resultados se reportan en porcentaje (al T₀ se consideró como el 100%) de replicación intracelular. Cada experimento se realizó por triplicado en forma independiente y los resultados se expresan como la media en porcentaje.

RESULTADOS

Purificación de Pet

El proceso de purificación de Pet se muestra en la Figura 1. En el perfil de elución de la columna Q-Sepharose amortiguada con Tris-EDTA, Pet se encontró entre los eluatos 9-13 (Figura 5A). En la columna Mono S, Pet fue retenida, se recuperó cambiando la fuerza iónica del sistema (NaCl 1M), Pet se recuperó en las primeras fracciones (22-25) (Figura 5B). La purificación de la proteína resultó adecuada con el procedimiento utilizado, la identidad de Pet se confirmó tanto por Western-Blot (Figura 5C) como por la secuenciación de la proteína. Con respecto al rendimiento que se obtuvo este fue del 3% partiendo de un volumen inicial de 4L. Con relación a la prueba LAL para verificar de presencia de LPS en la proteína, los resultados obtenidos mostrados que los niveles fueron menores a 0.125 EU/ml (unidades de endotoxina), cantidad no significativa para disparar cascadas de señalización. Los medios de cultivo celular (RPMI, RPMI 10% SFB), fueron reportados como libres de endotoxina. Una vez seguros de que la toxina tenía características adecuadas de pureza, realizamos el resto de los procedimientos. .

Inducción de la expresión de citocinas como respuesta a Pet

Una vez que se purificó Pet y se definió su contenido de LPS, exploramos si Pet desencadenaba la transcripción de citocinas que intervienen en el proceso inflamatorio. La producción de citocinas se analizó por RPA a diferentes tiempos de incubación en macrófagos estimulados con Pet.

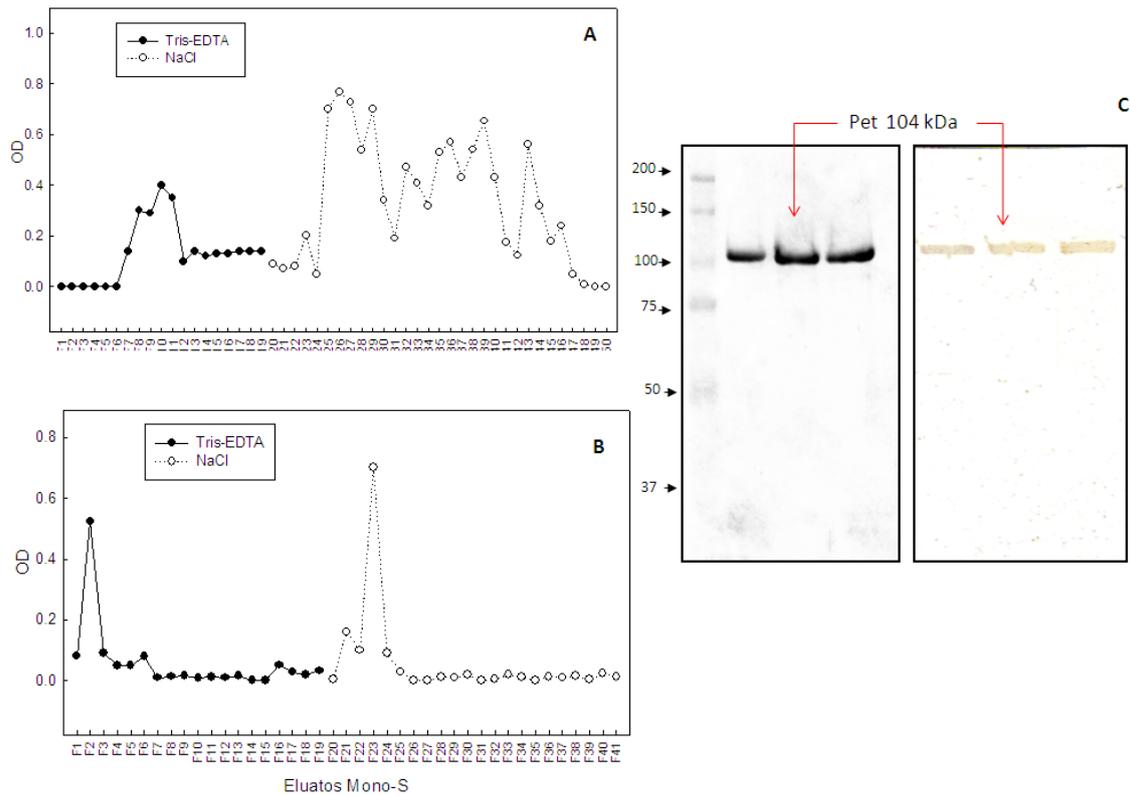


Figura 5. Proceso de purificación de Pet.

A Perfiles de elusión de Pet en cromatografía utilizando Q-Sepharose. **B** Perfiles de elusión de Pet con la Resina Mono-S. **C** SDS Page y Western Blot de Pet después de la obtención por la resina Mono S.

Los resultados obtenidos mostraron que IL1, TNF α , MIF e IL1Ra son las citocinas que se expresaron (Figura 6). Los mRNA de TNF α y MIF fueron los más abundantes. La expresión de ambas citocinas se observa entre los 10 y 30 minutos (50% sobre el basal) y los niveles se incrementan a partir de las 3 horas, sin embargo, TNF α va disminuyendo de manera gradual hasta las 12h sin llegar al basal. En el caso de MIF el incremento es sostenido hasta las 12 h. Con relación a IL1 su expresión se observa partir de los 30 min (2 veces) y los niveles presentan un incremento de hasta 4 veces el cual se sostienen hasta las 3 h; a partir de este momento y hasta las 12 h se observa que disminuye a un valor de 3 veces sobre el basal. En el caso de la IL1Ra se observó

que Pet induce un aumento en su expresión a partir de las 3 horas, con un máximo de 6 veces sobre el basal a las 12 h.

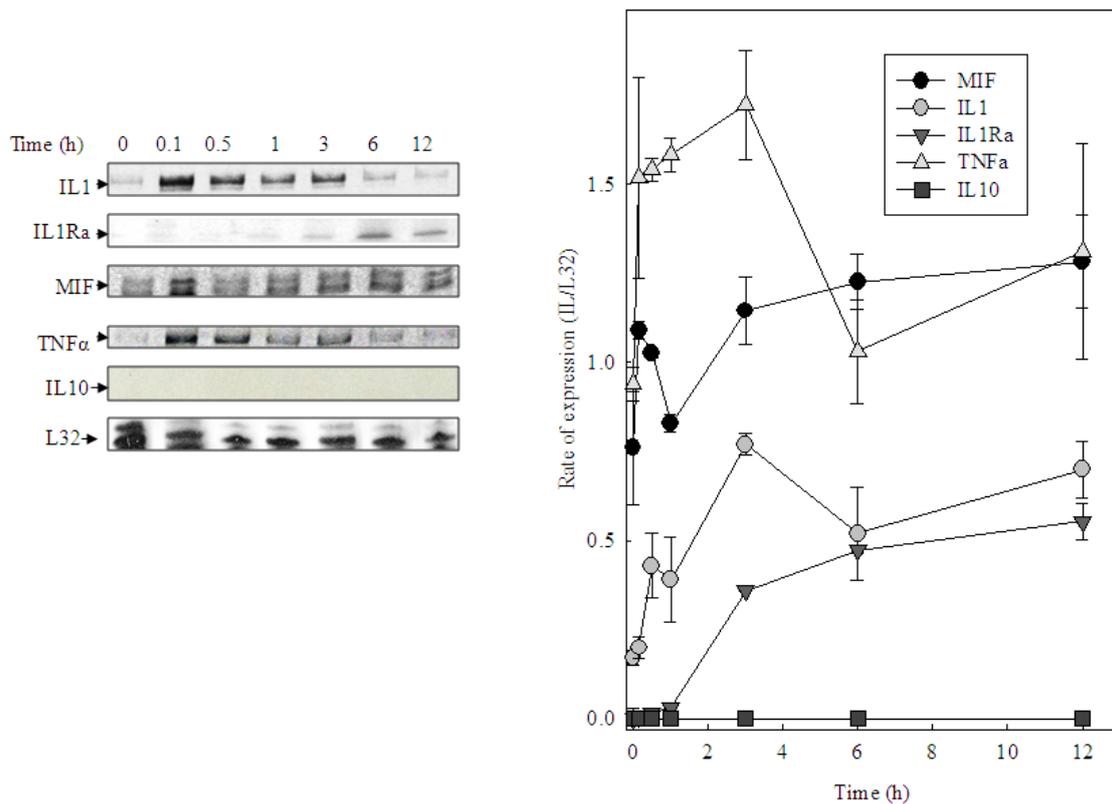


Figura 6. Pet estimula la expresión de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos J774.

Las células fueron incubadas con 200 ng/ml de Pet a los tiempos indicados, en medio RPMI sin suero. La expresión del RNA mensajero fue determinada por RPA. Los valores mostrados fueron obtenidos de la densidad de las bandas (MIF, IL1, IL1Ra, TNF α , IL10 y L32) y son expresados como el cociente de la citocina en estudio y el gen constitutivo L32. El resultado representa el promedio \pm DE de tres experimentos.

Fragmentación de Pet

Una vez comprobado el efecto en la producción de citocinas inflamatorias inducido por Pet, se realizó el fraccionamiento de la toxina con la finalidad de identificar alguna región de la proteína que estuviese involucrada en la transcripción de citocinas sobre los macrófagos. Para tal se realizaron ensayos de degradación utilizando las proteasas:

tripsina, pronasa y la autodegradación de la toxina Pet. En el ensayo con pronasa (Figura 7A) no se identificó un patrón de degradación que permitiera la separación de fragmentos, con tripsina por el contrario se obtuvieron productos de: 80, 60, 45 y 25 kDa. Los productos de degradación con tripsina se consideraron adecuados para la separación. La autoproteólisis de Pet (Figura 7B), ocasionó la degradación completa del dominio pasajero (104kD)

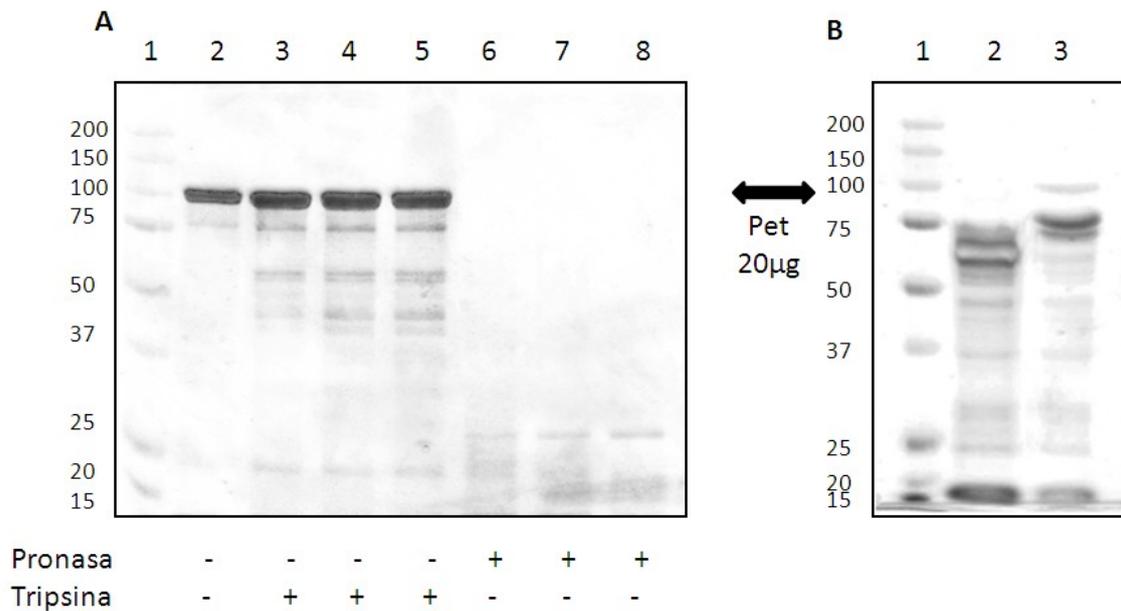


Figura 7. Degradación por proteólisis de Pet.

A; SDS-PAGE de la proteólisis de 20 µg de Pet, con tripsina a los 10, 20, 30 minutos (carriles 3, 4, 5 respectivamente) y pronasa a los mismos tiempos (carriles 6, 7, 8). **B;** SDS-PAGE con la autoproteólisis de 20 µg de Pet a las 96 (carril 2) y 72 horas (carril 3). **A, B;** en el carril 1 se encuentran el marcador de peso molecular

Una vez obtenidos los fragmentos de la proteína se trataron de separar utilizando técnicas como: columnas de exclusión molecular, de intercambio catiónico Mono-S y geles nativos, para cada uno de los casos no se obtuvieron resultados positivos. En este proceso encontramos diferentes dificultades técnicas, la separación de los fragmentos fue complicada debido a las características de los mismos fragmentos, en geles de doble dimensión mostraron puntos isoeléctricos con poca variación (pH 6 y 7.3) lo que

dificultó su purificación, por lo tanto decidimos utilizar a la proteína completa para continuar con los experimentos de señalización.

Pet activa a IKK $\alpha\beta$ y MAPK p38

Una vez que se identificó la transcripción de las citocinas IL1, TNF α , MIF e IL1Ra como respuesta a Pet, el siguiente paso consistió en conocer las posibles vías de señalización involucradas en dichos eventos. Se analizaron la vía de MAPK p38 y la del NF κ B. En el caso de la MAPK p38 se realizó una cinética temporal con macrófagos estimulados con Pet, los tiempos evaluados fueron de: 0.5, 1, 3, 6, 12 y 24 horas. El resultado mostró la activación de MAPK p38, esta inicia a los 30 minutos post-inoculación, hasta alcanzar el máximo nivel de fosforilación a las 12 horas con una disminución a las 24 y 48 h (Figura 8A y 8B).

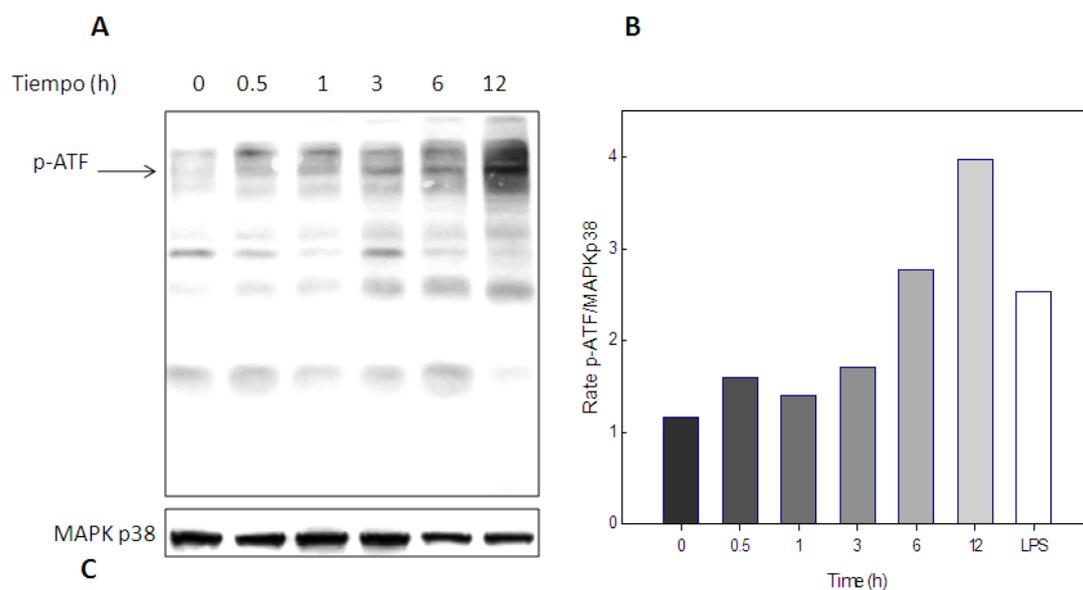


Figura 8. Activación de la MAPK p38 en macrófagos J774.

(A) Macrófagos J774 se incubaron con 200 ng/ml de Pet o 200 ng/ml de LPS a los tiempos señalados, las células fueron lisadas e inmunoprecipitadas con anti-MAPK p38 para ser posteriormente incubada con ATF y 32 P-ATP como sustratos. **(B)** Los datos graficados nos muestra el cociente de la densitometría de la fosforilación del ATF y la **(C)** MAPK p38 total.

Pet estimula la activación de IKK α/β

Otra de las vías utilizadas para desencadenar la secreción de citocinas pro-inflamatorias, es la vía del NF κ B, cuya vía canónica implica la activación corriente arriba de la IKK α/β .

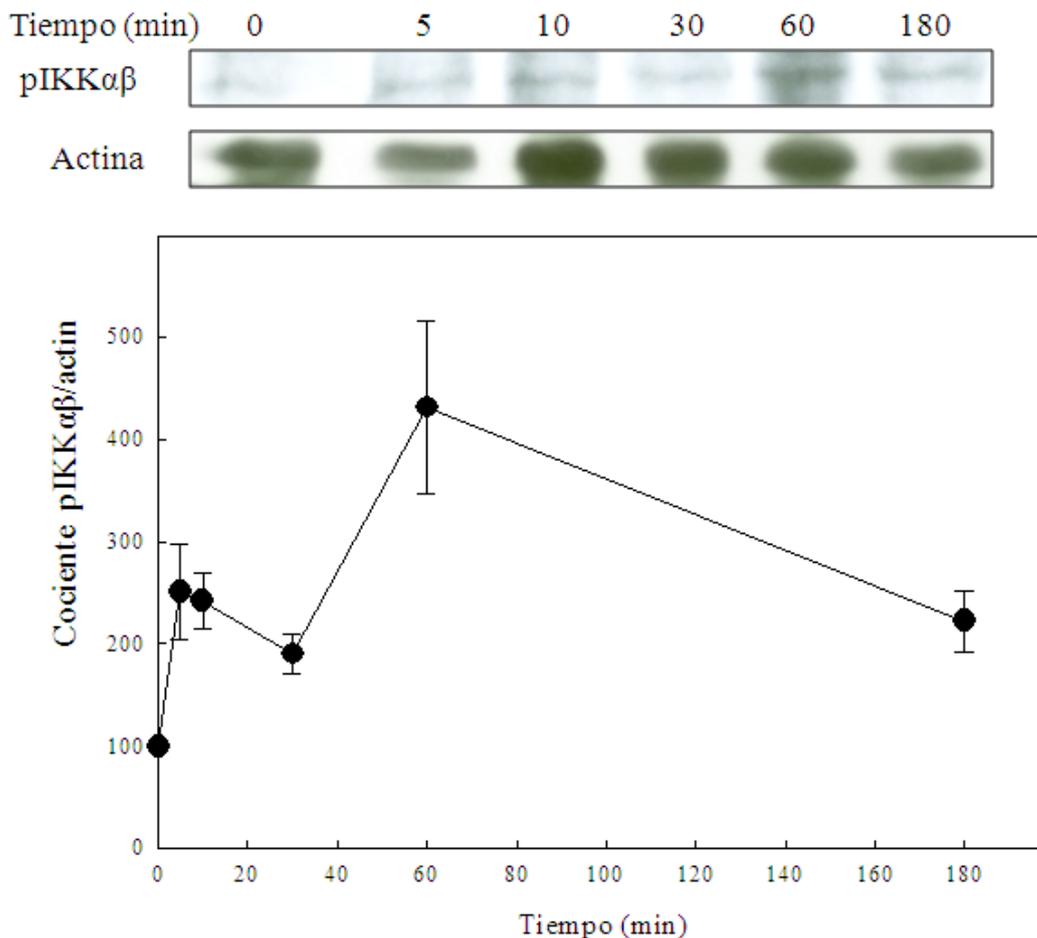


Figura 9. Pet activa IKK α/β en macrófagos J774.

Macrófagos J774 se incubaron con 200ng/ml de Pet a los tiempos indicados en RPMI sin suero. Las células fueron lisadas y las proteínas totales se resolvieron con SDS-PAGE y fueron transferidas a membranas de PVDF. Para el control de carga se utilizó a la actina. La gráfica nos muestra el promedio \pm DE del cociente de la densitometría de pIKK α/β /actina

A partir de los 5 minutos se observa la fosforilación de IKK (Figura 9) como respuesta a la estimulación por Pet, a los 10 minutos se observa un incremento máximo de casi 3 veces sobre el basal. La actividad disminuye rápidamente aunque no a niveles basales, pues la actividad a 1 hora de estimulación se conserva en 20% sobre el basal.

Para determinar si estas vías tenían influencia sobre la secreción de citocinas estimuladas por Pet, se utilizaron inhibidores específicos para cada una de ellas.

Efecto de la Inhibición de MAPK p38 sobre MIF, IL1 e IL1Ra

Para determinar si MAPK p38 está mediando el efecto que Pet tiene sobre la producción de las citocinas expresadas se utilizó SB203580, inhibidor específico para MAPK p38. Los resultados obtenidos al inhibir MAPK p38 y medir la transcripción de algunas citocinas se muestran en la Figura 10. No se observó inhibición en la transcripción de MIF o IL1, sin embargo, se incrementó la transcripción de IL1Ra. Lo anterior sugiere que MAPKp38 es una vía que participa cuando las citocinas se están transcribiendo, pero esta transcripción no está condicionada por la fosforilación de MAPKp38, por lo tanto exploramos si la vía del NFκB tenía efecto directo.

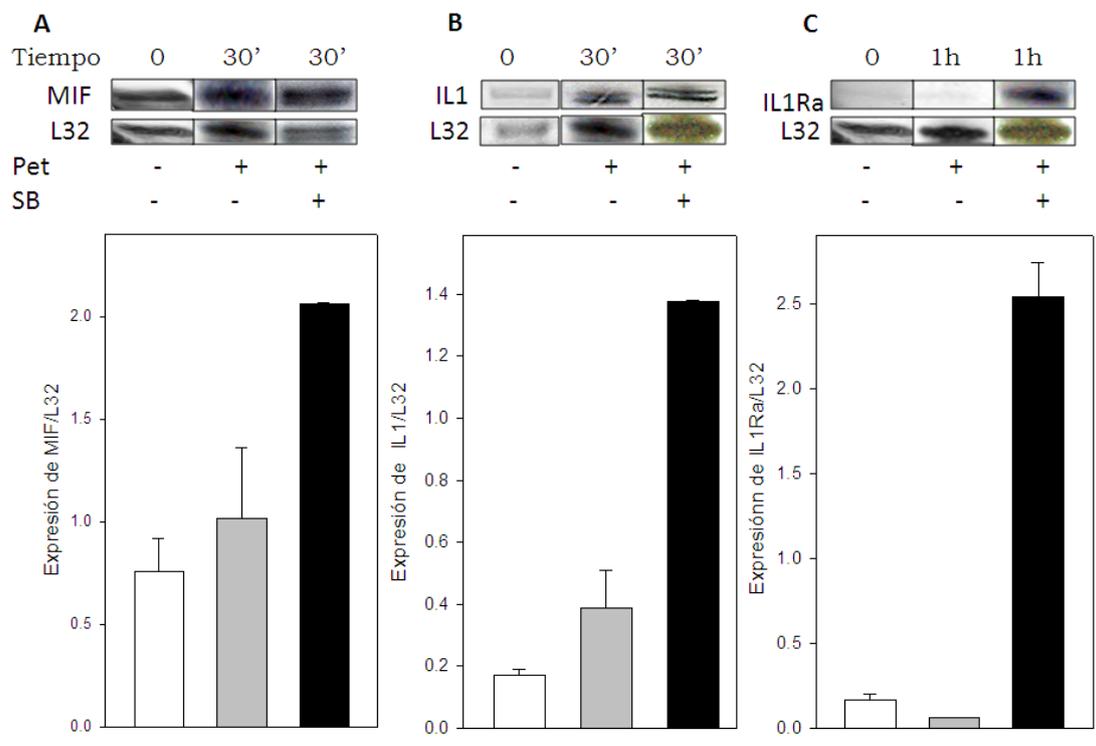


Figura 10. Efecto de la Inhibición de MAPK p38 sobre MIF, IL1 e IL1Ra.

Macrófagos J774 se incubaron con el inhibidor SB203580 (20 μ M) 2 horas antes de ser confrontados con 200ng/ml de Pet a los tiempos indicados. En las gráficas se muestra la expresión de MIF (A), IL1 (B) e IL1Ra (C) incubados con y sin inhibidor. Los resultados son expresados como el cociente de la citocina en estudio y el gen constitutivo L32. El resultado representa el promedio \pm DE de tres experimentos.

Pet estimula la inducción de citocinas por medio de la vía del NF κ B

Para correlacionar la secreción de citocinas estimulada por Pet y la estimulación que la toxina ejerce sobre la vía IKK $\alpha\beta$ /NF κ B se utilizó la surfactina, proteína producida por *Bacillus subtilis* (15). Dado que la surfactina inhibe la fosforilación de IKK $\alpha\beta$, de existir la correlación debe mostrar el mismo efecto inhibitorio en la secreción de citocinas estimulada por Pet. La Figura 11A muestra que la pre-incubación de los macrófagos con surfactina, inhibe la fosforilación de la IKK $\alpha\beta$ estimulada por Pet. De la misma forma, la pre-incubación con surfactina disminuye a sus niveles basales la estimulación ejercida por Pet sobre: la expresión de MIF (Fig. 11B), TNF α (Fig. 11C), IL1(Fig. 11D). Estos datos sugieren que Pet estimula la secreción de citocinas mediante la vía IKK $\alpha\beta$ /NF κ B.

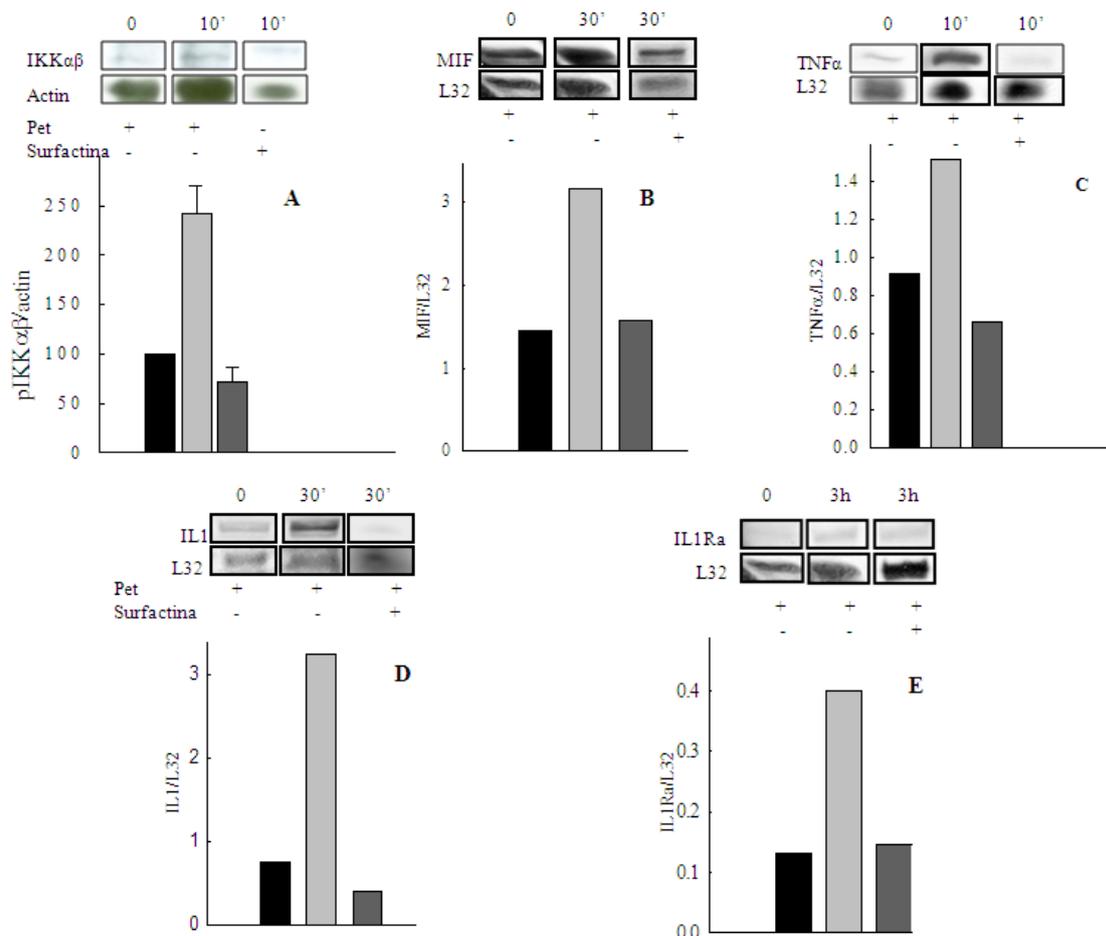


Figura 11. La surfactina inhibe la activación de IKKαβ y la expresión de MIF, TNFα, IL1 e IL1Ra.

Macrófagos J774 se pre-incubaron con y sin 10mM de surfactina por 1 hora después de desafiaron con 200ng/ml de Pet a los tiempos indicados. Los resultados son representativos de 2 o tres experimentos diferentes y se expresaron como el cociente pIKKαβ/actina (A) o la expresión de MIF/L32 (B), TNFα/L32 (C), IL1/L32 (D) e IL1Ra/L32 (E).

La inducción de citocinas pro-inflamatorias no requiere que la proteína esté intacta.

Una vez fragmentada la proteína, se utilizó el extracto crudo de la autoproteólisis para estimular a macrófagos y observar la producción de citocinas pro-inflamatorias. Los resultados que se obtuvieron fueron similares a los obtenidos con la proteína completa. En la Figura 12 se observa un primer pico de estimulación en la transcripción entre los 10 y 30 minutos, excepto para la IL1Ra, en donde el aumento en la transcripción se encuentra entre las 1 y 3 horas.

Lo anterior nos sugiere que la proteína no necesita estar completa para inducir la estimulación de citocinas pro-inflamatorias, por lo tanto se podría sugerir que existe(n) regione(s) que estimulan éste efecto.

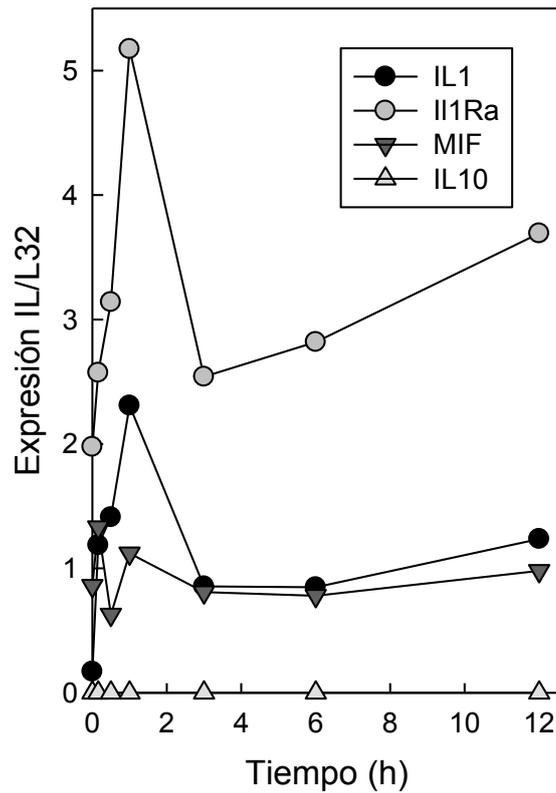


Figura 12. Pet estimula la expresión de citocinas pro-inflamatorias en macrófagos J774.

Las células se incubaron en medio RPMI sin suero con 200 ng/ml de Pet a los tiempos indicados. La expresión del RNA mensajero se determinó por RPA. Los valores que se muestran fueron obtenidos de la densidad de las bandas (MIF, IL1, IL1Ra, IL10 y L32) y se expresaron como el cociente de la citocina en estudio y el gen constitutivo L32. El resultado representa el promedio \pm DE de tres experimentos.

Activación de la fagocitosis y destrucción de bacterias inducida por Pet

Cuando existe la transcripción de citocinas pro-inflamatorias, los macrófagos aumentan la producción de reactivos intermediarios de oxígeno, derivado de esto hay una correcta eliminación de antígenos. Para comprobar si Pet estimulaba la mejor eliminación de patógenos se evaluó la capacidad de fagocitosis y destrucción de una cepa de *Salmonella typhimurium* (cepa Dublin), patógeno intracelular facultativo. Los resultados al respecto mostraron un incremento en el número de bacterias fagocitadas en los macrófagos estimuladas (5 veces), comparado con lo observado en los testigos sin estimular (Figura 13). Con respecto la replicación de las bacterias dentro de los macrófagos estimulados, el número de bacterias fue menor (2.5 veces) con respecto a lo observado en los testigos no estimulados con Pet.

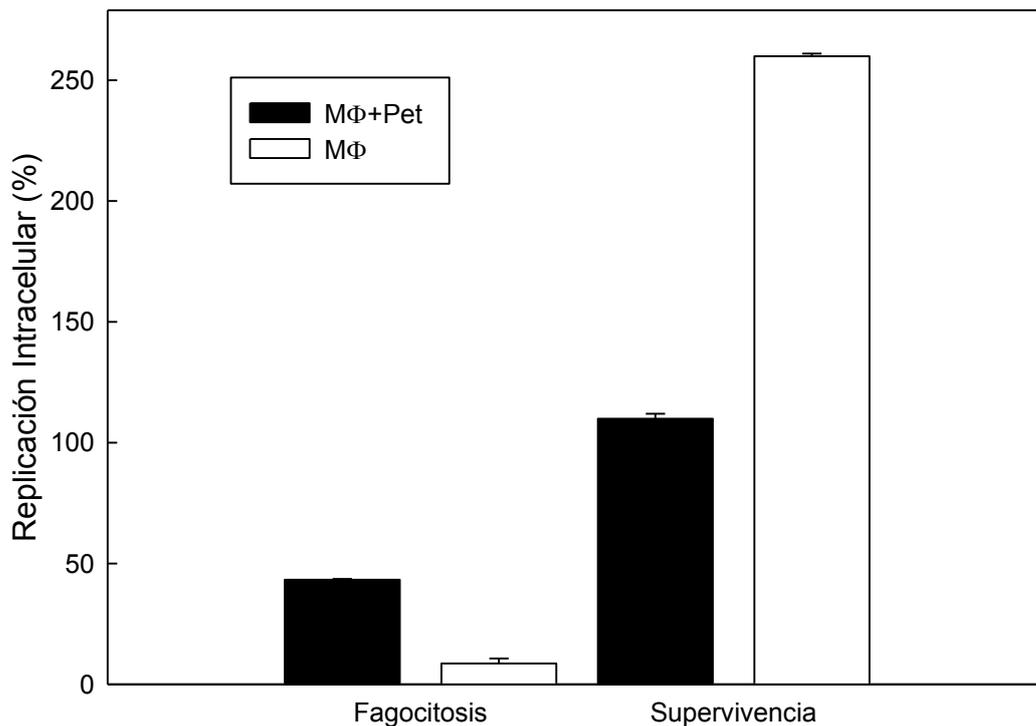


Figura 13. Supervivencia intracelular de *Salmonella typhimurium*.

Macrófagos J774 se pre-incubaron con y sin Pet (12 horas) en medio RPMI sin suero después se infectaron con *S. typhimurium* a una concentración de 10:1 a los tiempos indicados en la metodología. Las barras en negro representan a las células estimuladas con Pet y en blanco a las células sin estimular.

DISCUSIÓN

Pet estimula la secreción de citocinas

En intestino inoculado con Pet se han observado células que intervienen en la inflamación (41), estas células pueden encontrarse allí posiblemente por el efecto quimiotáctico que Pet ejerce sobre leucocitos (47). Dentro de los leucocitos, una de las células importantes en los procesos inflamatorios es el macrófago, célula encargada de orquestar la respuesta inmune del hospedero. En esta tesis damos evidencia de que Pet induce la transcripción de las citocinas TNF α , IL1, IL1Ra y MIF que intervienen en procesos inflamatorios, lo que nos permite subrayar el papel fundamental de Pet en la respuesta inmune del hospedero.

TNF α es una citocina clave en procesos inflamatorios, tiene diversas actividades biológicas, se produce como respuesta al daño en los tejidos y se ha asociado con diferentes enfermedades inflamatorias como: el choque séptico, colitis ulcerativa, artritis reumatoide, enfermedad de Crohn, entre otras. (22, 75). En nuestro estudio se observó que Pet activa la expresión de TNF α de macrófagos a tiempos cortos, este resultado indica la presencia de una respuesta pro-inflamatoria tal y como se ha descrito en infecciones por patógenos como por sus toxinas (81). La producción de esta citocina se ha relacionado con la activación de factores de transcripción como el NF κ B. En intestino, la expresión del TNF α se ha asociado con padecimientos de tipo inflamatorio crónico (CU, CD), que a su vez se han asociado a la progresión del cáncer, tanto el TNF α como NF κ B se consideran nodos centrales en ambos casos (53). Lo anterior sugiere que el TNF α secretado como respuesta a Pet, podría desencadenar una respuesta más compleja, estimulando a otros tipos celulares exacerbando la respuesta inflamatoria. Este fenómeno se ha observado en enfermedades inflamatorias crónicas intestinales, en donde la producción de TNF α por macrófagos induce la producción de otras citocinas en células del epitelio intestinal u otros tipos celulares como: neutrófilos, células T o dendríticas lo que incrementa la respuesta inflamatoria (104). La secreción del TNF α se ha asociado a diferentes factores de virulencia de *E. coli* tales como: pili, flagelina y LPS (55, 63).

Otra de las citocinas que se expresó en respuesta a Pet fue la IL1, citocina que al igual que el TNF α se considera como clásica en procesos inflamatorios. Como mencionamos anteriormente la IL1 aumenta de manera gradual, alcanzando un máximo alrededor de las 3 horas, mismo que se sostiene hasta las 12h. Resultó interesante observar que la IL1Ra citocina antagonista de IL1 comienza a expresarse a las 3 horas y se sostiene hasta las 12 horas. La IL1Ra es la única citocina que antagoniza de manera fisiológica las acciones de la IL1, ya que se acopla directamente al receptor de ésta manera evita que la respuesta de IL1 se exacerbe. Este patrón de secreción se ha encontrado para otras toxinas como el LPS (78), en donde la IL1Ra actúa como mecanismo de retroalimentación para controlar a la IL1, por lo tanto el fenómeno de regulación que ejerce IL1Ra, se considera de importancia para no extender la temporalidad de los procesos inflamatorios (4). El balance que existe entre la IL1 y la IL1Ra es importante en diversas enfermedades inflamatorias, de manera particular en enfermedades intestinales inflamatorias de tipo crónico. La transcripción de IL1, IL1Ra y TNF α nos indican que el proceso inflamatorio que Pet es capaz de desencadenar el fenómeno inflamatorio de tipo “clásico”(8, 87).

MIF, fue otra de las citocinas que se identificó como respuesta a la estimulación de macrófagos por Pet. Esta citocina se ha implicado en la progresión del proceso inflamatorio en respuesta a bacterias y sus productos como: la exotoxina A de *Streptococcus* (19) y la endotoxina de *E. coli* (6), cuya producción se ha asociado al desarrollo de la respuesta inflamatoria, regulando a otras citocinas importantes como el TNF α (17). Uno de los efectos observados por MIF es el aumento en la vida media celular, ya que inhibe el proceso apoptótico, lo que de manera secundaria contribuye a que la inflamación se prolongue (77). Debido a lo anterior podríamos sugerir que al estimularse la producción de MIF, este inhibiría el proceso apoptótico y de ésta manera prolongaría la respuesta de tipo inflamatorio, lo que resultaría en inflamación persistente o crónica.

Los datos obtenidos en los perfiles de transcripción de citocinas de manera general nos indican que el macrófago estimulado con Pet, está disparando de inmediato una respuesta de tipo inflamatoria en donde las citocinas predominantes son TNF α y MIF.

Por otro lado es inexistente la producción de IL10 a tiempos cortos, citocina que se considera de tipo anti-inflamatorio, ya que dentro de su perfil de secreción se conoce que dispara citocinas que son antagónicas a TNF α y MIF (59, 98). Dentro de patologías como la diarrea del viajero, colitis ulcerativa y enfermedad de Crohn se ha asociado la presencia de SPATEs, Pet pertenece a esta familia y sugerimos que podría agudizar el proceso inflamatorio (58, 99), en donde la secreción de interleucinas es determinante para el establecimiento de dichos padecimientos. Aunado a esto, se ha observado que existe una polarización en la microbiota intestinal (91), en donde *Escherichia coli* juega un papel preponderante. Se ha reportado recientemente la evasión de la respuesta inmune por EAEC, se ha propuesto que la evasión de la respuesta inmune pudiera estar relacionada con la producción de fibras parecidas a cordones (Rops), en los que las bacterias son “envueltas” por lo que no son detectadas por los macrófagos (111). Debido a lo anterior en enfermedades inflamatorias agudas y crónicas, la bacteria podría excretar a Pet y mantener activo en el intestino el proceso inflamatorio, favoreciendo la colonización por coliformes.

MAPK p38 es activada en respuesta a Pet

La activación de la MAPK p38 se ha asociado a fenómenos como el estrés por calor, choque osmótico, luz UV y citocinas pro-inflamatorias como TNF α e IL1 (113). En el presente trabajo se identificó la activación de la MAPK p38 a los 30 minutos, sin embargo al emplear el SB203580, inhibidor específico de la MAPK p38, no se observó disminución de la transcripción de las citocinas pro-inflamatorias, por el contrario hubo un incremento en algunas de ellas, tal es el caso de la IL1Ra. Lo anterior podría ser debido a que no existe un efecto sinérgico entre TNF α y MAPK p38, puesto que se ha observado que p38 puede actuar directamente en la vía de secreción del TNF α , citocina que activará de manera secuencial a NF κ B o bien favorece la translocación del NF κ B aumentando la respuesta (95). Para ambos casos no encontramos relación con los resultados obtenidos. Por otro lado existen otras vías que como producto final dan como resultado la transcripción de citocinas pro-inflamatorias, tal es el caso de la vía del NF κ B, Jack-STAT y JNK (51, 113), por lo tanto la activación de MAPK p38 podría deberse al estímulo de la transcripción y producción de citocinas de tipo inflamatorio

(21). Para comprobar esta hipótesis es necesario realizar experimentos de inhibición selectiva de IKK y/o TNF α observando el comportamiento de MAPK p38 en macrófagos estimulados con Pet.

Un fenómeno interesante fue el aumento de la IL1Ra, lo anterior se ha observado como respuesta al inhibidor SB203580 (88), al parecer este evento fue debido a que el inhibidor favorece la transcripción de la IL1Ra a nivel del promotor NF κ B/PU.1. Este dato refuerza la propuesta de que existen otras vías en la respuesta a Pet.

NF κ B media la secreción de citocinas estimulada por Pet.

Otra vía que se considera clásica cuando se transcriben citocinas de tipo inflamatorio es la vía del NF κ B, su activación depende de manera ortodoxa de la estimulación de I κ B, debido a la estimulación corriente arriba de IKK $\alpha\beta$ (51).

Se pudo observar que Pet activa la IKK $\alpha\beta$ lo cual puede desencadenar las diferentes acciones estimuladas por NF κ B. En este trabajo se identificó como la inhibición de la vía NF κ B por surfactina afecta la secreción de las citocinas. Mediante los datos mostrados podemos establecer que la surfactina inhibe tanto la activación de la IKK $\alpha\beta$ como la transcripción de citocinas, lo que sugiere que la acción de Pet es mediada por esta vía. Efectos semejantes de la surfactina en la producción de IL1 inducida por LPS se han reportado por Byeon y su grupo (16). Al activarse la cascada de señalización del NF κ B una de las primeras citocinas que se transcribió fue el TNF α , además se observó la activación de MAPK p38. Se ha visto que al producirse el TNF α activa a otras citocinas sobre todo a la familia de la IL1, cuando esto sucede se pueden activar otras cascadas de señalización, tal es el caso de la MAPK p38 (23) debido a la estimulación por TNF α . Aunque en el trabajo no exploramos ésta hipótesis, no se puede descartar tal posibilidad. Se ha observado cooperación e independencia entre ambas cascadas, en el caso particular de Pet se necesitan más experimentos para dilucidar este fenómeno (95).

La acción de Pet sobre la estimulación de TNF α , MIF, IL1/IL1Ra, mediada por NF κ B podría sugerir que Pet participa en procesos de inflamación. Las EAEC se han asociado a procesos inflamatorios de tipo crónico como CU y CD, la dupla TNF α -NF κ B son puntos clave de los nodos activados en diferentes enfermedades inflamatorias

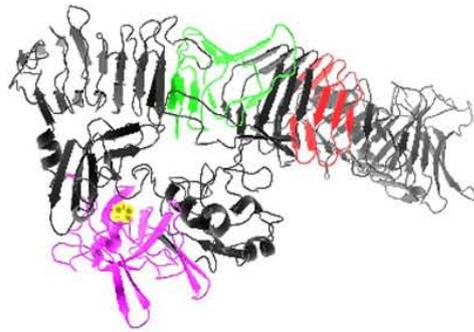
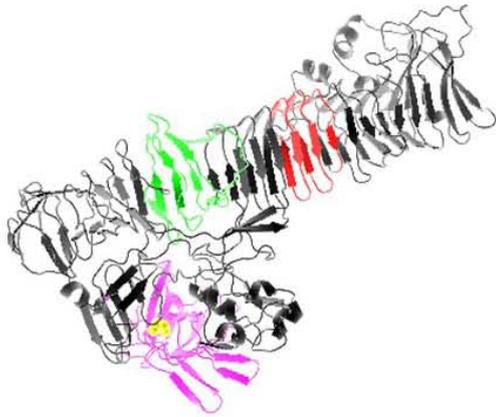
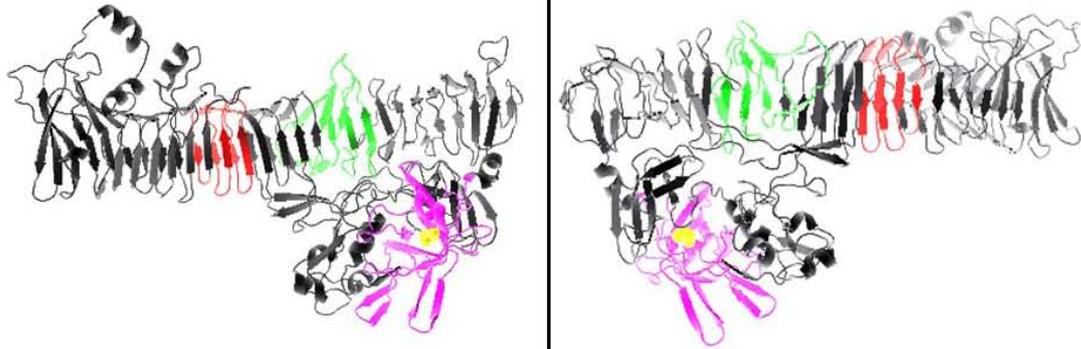
crónicas, que además están ligadas al cáncer (45, 62). Dentro de las toxinas EAEC se encuentran las SPATEs, esta proteína se ha correlacionado con pacientes enfermos con Crohn y colitis ulcerativa (58, 73, 92). En pacientes con inflamación crónica del intestino la dinámica poblacional de la biota normal se altera y la homeostasis se rompe (38, 99), uno de los géneros que prolifera principalmente es *E. coli* (28, 101). Lo anterior nos permite especular que Pet podría participar activamente en procesos inflamatorios crónicos intestinales, por lo sugerimos para evidenciar dicha hipótesis, el realizar experimentos en modelos de inflamación crónica. Por otro lado sería interesante evidenciar el mecanismo por el cual está disparando la vía del NFκB, ya que los mecanismos por el cual se activa la fosforilación del complejo IKKαβ, no están bien definidos, aunque se han asociado diferentes estímulos a éste efecto (51). La estimulación de IKKαβ, nos indica que la vía del NFκB se ha estimulado de manera clásica, éste proceso se ha observado en diferentes fenómenos de tipo inflamatorio, uno de ellos es el estimulado por receptores tipo Toll (61), “Scavengers”(43) y receptores de interleucinas (33), los eventos anteriores involucran a un receptor transduciendo la señal. Pet es una proteína compuesta de 1295 aminoácidos totales (26), el dominio pasajero consta de 965 aminoácidos; hasta el momento no ha sido cristalizada, por lo que las herramientas bioinformáticas podrían ser de gran utilidad en el estudio de otras funciones biológicas de Pet y su familia (64). Se utilizó la base de datos del SMART para realizar el análisis de posibles dominios estructurales, que estuviesen relacionados con los efectos de Pet sobre los macrófagos, de manera interesante en el análisis encontramos dominios que se han asociado a respuestas de tipo inflamatorio. Los aminoácidos que conforman éstos dominios, se encuentran dentro de los primeros 200 aminoácidos de la región amino terminal del dominio pasajero, dentro de este rango al parecer se encuentra el fragmento que podría tener un efecto quimiotáctico de macrófagos (aminoácidos 76-82; PGSTH) (47). Con el fin de ubicar a los primeros 200 aminoácidos dentro de la arquitectura general del dominio pasajero de Pet, se elaboró la predicción de la estructura terciaria de la proteína por homología, utilizando el programa Swiss model (56). El resultado que se obtiene de la predicción se muestra en la Figura 14 A y B, la región amino terminal que comprende

los 200 aminoácidos con efecto quimiotáctico se encuentran dentro de la estructura globular de la proteína. En los dominios de color rojo se encuentra la región de hélices beta de la proteína en donde localizamos dominios involucrados en respuestas inflamatorias. Los aminoácidos que están localizados en la región globular tienen un porcentaje de identidad igual o mayor al 90% comparados con otras toxinas de la familia SPATEs, por lo tanto no se descarta que tengan mecanismos similares (37) y dada su homología (112), es posible que existan dentro de Pet dominios estructurales que disparen funciones como la expresión de citocinas inflamatorias, por lo tanto es interesante comprobar su funcionalidad en las proteínas de toda la familia.

Los efectos de Pet sobre los macrófagos y las evidencias estructurales de otras toxinas reportadas por Hernández y col (47), nos llevan a sugerir que el efecto observado podría ser dependiente de una región específica de la proteína, por lo tanto tratamos de obtener fragmentos de Pet por medio de proteólisis, debido a que ésta metodología interfiere en menor grado con el plegamiento proteico (50).

Los fragmentos obtenidos de la proteólisis se trataron de localizar en la estructura predicha, *in silico*, con el programa "peptide cutter". En el tubo de ensaye, una vez autogenerados se intentaba separarlos utilizando: columnas de exclusión molecular. Debido a que los fragmentos que queríamos separar tenían una diferencia de 20 kDa entre cada uno, utilizamos diferentes matrices para lograr la separación, pero el proceso no fue exitoso. Una de las razones son la altura de la columna y la matriz utilizada, debido a la pérdida de la proteína, decidimos no utilizar esta técnica para la separación de los fragmentos, por lo que optamos por columnas de intercambio aniónico y catiónico. En el caso de las columnas los resultados no fueron favorables, la recuperación de la proteína no era la adecuada, además se requería grandes cantidades de la proteína fragmentada para que la recuperación en la matriz fuera significativa.

A



B

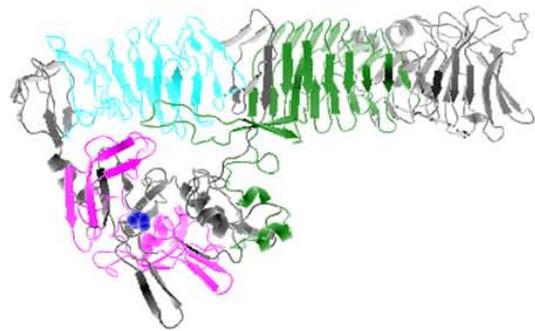
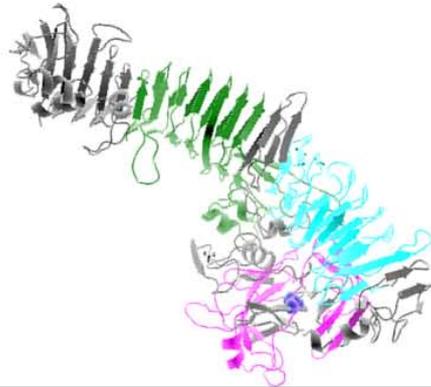
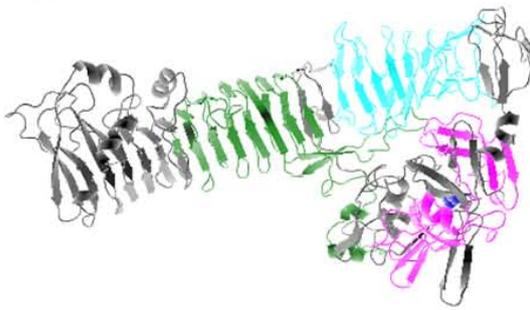


Figura 14. Predicción de la estructura de Pet por homología con HPB y EspP con el programa Swiss Prot.

Figura **A** y **B** posibles dominios estructurales que se encuentran dentro de la secuencia de Pet, se observa en escala de grises al dominio pasajero completo y en colores la localización espacial de la predicción de dominios con el programa SMART. **A**) en amarillo se observa a la Ser 261 de Pet, en rosa; el dominio parecido a quimiotripsina, en turquesa; el dominio CASH y en verde; el dominio quimiotáctico bacteriano.

B; en azul se muestra a la Serina 261, en rosa; el dominio ricina, en turquesa; el dominio BID 2 y en verde el dominio VWA.

Cuando aumentamos la concentración, la separación no se hizo evidente, lo anterior puede ser debido a las características generales de los fragmentos, observamos que son muy similares en cuanto a los puntos isoeléctrico, por lo tanto al eluir cambiando la fuerza iónica del sistema, no fue suficiente para que los fragmentos se separaran, por lo que es necesario determinar de manera exacta el punto isoeléctrico de cada uno de los fragmentos para estabilizar la columna Mono S a diferentes pH para cambiar gradualmente la elución de los fragmentos de la matriz. Existen diferentes alternativas para tratar de separar a los distintos fragmentos, uno de ellos es clonar a cada uno de los dominios que necesitamos separar; expresarlos, para después purificar los fragmentos, confiando en que el plegamiento es el adecuado. Otra opción es hacer péptidos sintéticos de la proteína deseada y probar sus efectos, con la misma observación del plegamiento. Dada la inversión de tiempo y recursos que esto requeriría sin asegurar el éxito deseado, consideramos de importancia asegurarnos que el efecto de Pet en los macrófagos no requiere de la proteína íntegra.

En los experimentos de proteólisis completa, observamos que Pet, en comparación con proteasas de la familia de las quimiotripsinas, no es tan efectiva. El tiempo en el que obtuvimos la proteólisis completa de Pet fue de 3 días. Hallazgos semejantes se han reportado por diversos autores(82, 108), en donde para observar la actividad proteolítica de Pet sobre la fodrina en cultivos celulares, es necesario utilizar hasta 100 veces más de la concentración de Pet, que la utilizada en éste estudio (108). Habrá que hacer una mejor caracterización de actividad enzimática de la proteasa para establecer su óptimo desempeño.

Una vez que Pet estuvo completamente proteolizada se le utilizó a la misma concentración que con la proteína completa (200ng/ml) en los ensayos de activación de los macrófagos. Observamos que el efecto de activación en la transcripción, es ligeramente menor con la toxina fragmentada que con la toxina completa. Lo anterior sugiere que la estimulación es generada por uno o varios fragmentos que interaccionan con el macrófago, éste fenómeno se ha observado en infecciones inducidas por virus (107). También se conocen algunos dominios que pueden disparar respuestas inmunológicas específicas, tal es el caso de las secuencias que reconocen los receptores asociados a patrones (12). La hipótesis propuesta es que podría existir más de un dominio funcional en Pet, lo anterior es fortalecido por los hallazgos encontrados por Hernández-Chiñas (47) en donde con anticuerpos específicos comprueba de manera indirecta que existe un fragmento de la proteína dentro de la parte globular que se encarga de la quimiotaxis de leucocitos. El que la estimulación en la transcripción no requiera de la toxina integra, nos sugiere que podrían existir sitios de estimulación específicos dentro de la estructura de la proteína que estimulan la transcripción de citocinas pro-inflamatorias, vía NFκB. La propuesta anterior se basa en evidencias encontradas en receptores como los tipo Toll, en donde se demostró que el LPS es su ligando y en cooperación con el CD14 transduce la señal hacia el NFκB, por otro lado otras toxinas como la del *Streptococcus* se ha comprobado estimulan a receptores Toll del Tipo 2 y transduce de la misma manera la señal para la producción de citocinas pro-inflamatorias en el hospedero(12, 15, 69). Estudios posteriores podrían dirigirse a la búsqueda de posibles receptores que intervienen en el reconocimiento de Pet.

La activación de la vía del NFκB, puede dar como consecuencia un cambio a nivel fenotípico, la producción de TNFα promueve la activación del macrófago (48) y la estimulación de otros leucocitos que intervienen en la respuesta inmune celular (39). En los macrófagos el evento fenotípico cuando se secretan interleucinas inflamatorias como el TNFα se ve reflejado en el incremento en la capacidad fagocítica y microbicida vía activación. Dicho fenómeno se ha evidenciado como respuesta a productos bacterianos como el LPS (35) y citocinas como el IFNγ (100), el efecto fenotípico final

una vez que se desencadena el proceso es el aumento en los reactivos intermediarios de oxígeno que actúa a nivel del fagolisosoma y aumento en la capacidad bactericida (10). En esta tesis probamos la capacidad bactericida de macrófagos estimulados con Pet, los resultados que obtuvimos sugieren un proceso de activación macrofágica debido al aumento en la fagocitosis. El fenómeno anterior se ha descrito en la activación por parásitos intracelulares facultativos y obligados, en donde se observa un aumento en la expresión de receptores (72, 85, 103), inducido por el aumento en la expresión de citocinas y secreción de citocinas (74). La activación macrofágica deviene en la especialización del macrófago para eliminar a cierto tipo de patógenos, ya sea por la vía clásica o la vía alterna (79). Dentro de la vía clásica el mecanismo más estudiado de activación macrofágica es el inducido por los linfocitos vía $IFN\gamma$ (100), seguido de la secreción de $TNF\alpha$ (9). Otro tipo de activación que se ha documentado es la “alterna”, que de manera antagónica a la clásica, inhibe la capacidad bactericida. Ésta se caracteriza por la producción de IL4, que a su vez estimula la producción de IL1Ra e IL10, dando como resultado el fenotipo referido (79). Los datos encontrados nos sugieren un posible efecto de activación en los macrófagos por la vía clásica, debido a que se confrontaron macrófagos con una bacteria intracelular facultativa (*Salmonella*) la cuenta de bacterias disminuyó drásticamente su replicación intracelular una vez que las células fueron estimuladas con el LPS. El fenómeno anterior se ha observado en *Salmonella* cuando el macrófago se ha “preactivado” con la presencia de $IFN\gamma$ o bien con LPS y recibe un segundo estímulo (68). Estudios posteriores nos darán más evidencias para concluir si Pet puede actuar como un activador clásico o bien es un “primoactivador” de células del sistema inmune.

La activación por la vía alterna la descartamos, puesto que si bien, hay producción de la IL1Ra, no encontramos la transcripción de la IL10, pieza clave en la respuesta de activación, lo anterior podría reforzar la hipótesis de la activación clásica. Otro de los experimentos para determinar la vía de activación es la determinación de la expresión de receptores de superficie y la inducción de proteínas que participan en el proceso como la Sintetasa del Óxido Nítrico, además de rutas que desencadenan la apoptosis (81, 85, 104).

Tanto la activación macrofágica como la apoptosis, son importantes procesos en diversas enfermedades. En el caso de fenómenos inflamatorios, podrían formar parte del complejo sistema en donde participa Pet, como parte de la patogenicidad estimulada por EAEC, de manera particular en proceso de inflamación crónica como EC y CU. Este trabajo es una contribución al complejo panorama de la interacción hospedero-parásito en la que participa Pet, que forma parte de la familia SPATEs. Estas toxinas han sido relacionadas en enfermedades inflamatorias crónicas y son secretadas en todos los grupos filogenéticos de *E. coli* (saprófitos y patógenos). Comparten altas similitudes especialmente en las secuencias dentro del que se presume es el dominio globular, por lo tanto no es tan aventurado pensar que eventualmente en puedan encontrarse dentro de la familia SPATEs efectos similares.

CONCLUSIONES

En este estudio observamos que Pet puede interactuar con células clave en la respuesta inmune, tal es el caso de los macrófagos, células que al ser estimulados con la toxina transcriben citocinas que participan en la respuesta inflamatoria, citocinas como: IL1, TNF α , MIF e IL1Ra; por lo que sugerimos que Pet podría participar en la respuesta inflamatoria desencadenada por EAEC. Además evidenciamos la activación de cascadas de señalización que se activan en éste fenómeno, una de ellas es la vía de la MAPK p38, esta vía participa en la respuesta, sin embargo no es la que determina la transcripción de citocinas, puesto que al inhibirla con SB203580, la transcripción, no fue eliminada, caso contrario a la vía del NF κ B, cascada de señalización que también interviene en la respuesta del macrófago. La vía del NF κ B es la cascada responsable de disparar la transcripción de citocinas como TNF α , MIF e IL1. Al utilizar la Surfactina en los macrófagos observamos la inhibición de la transcripción de TNF α , MIF e IL1.

Estos hallazgos sugieren que Pet podría estimular procesos de tipo inflamatorio en el intestino, en éste órgano existe la secreción de diversas proteasas que podrían comprometer el estado íntegro de Pet, por lo que también evidenciamos que la estimulación de éstas citocinas no depende de la proteína completa para ejercer éste efecto.

PERSPECTIVAS

Tanto la activación macrofágica como la apoptosis, son importantes procesos en diversas enfermedades. En el caso de fenómenos inflamatorios, podrían formar parte del complejo sistema en donde participa Pet. Las SPATEs han sido relacionadas en enfermedades inflamatorias crónicas y son secretadas en todos los grupos filogenéticos de *E. coli* (saprófitos y patógenos). Existe homología entre ellas, las similitudes dentro del dominio pasajero van desde el 50% hasta el 90%. En la actualidad se han cristalizado dos proteínas que pertenecen a las SPATEs (Hbp y EspP), la arquitectura que ha mostrado la cristalografía es similar, por lo tanto no es tan aventurado pensar que puedan encontrarse dentro de la familia SPATEs efectos similares. Para comprobar dichas suposiciones y con los datos que se han obtenido de este trabajo, consideramos importante el encontrar ¿qué dispara la cascada de señalización del NFκB? Se ha observado que ésta cascada de señalización es activada por la estimulación de receptores, por lo tanto es importante saber si existen receptores involucrados en el reconocimiento de Pet, el despejar ésta interrogante no sólo podría darnos información de una proteína, sino de una familia entera.

Otro de los puntos importantes es caracterizar la respuesta de Pet a tiempos más largos y observar si el evento de activación del macrófago desencadena otros procesos relacionados con la respuesta, tal es el caso de la apoptosis.

El investigar ambas hipótesis nos podrían ayudar a comprender el papel que desencadenan las SPATEs en la patogenia de enfermedades inflamatorias crónicas como EC y CU. Otra de las ventajas es el poder diseñar fármacos dirigidos a la respuesta que provocan ésta toxinas.

Por otro lado el poder encontrar la posible vía de estimulación del macrófago por Pet, nos permitiría el desarrollo de herramientas biotecnológicas, dirigidas a la estimulación de respuestas inmune de tipo celular, en enfermedades donde exista ésta deficiencia, tal es el caso de la tuberculosis.

BIBLIOGRAFÍA

1. **Aggarwal B. B.** 2003. Signalling pathways of the TNF superfamily: a double-edged sword. *Nature reviews. Immunology* **3**:745-56.
2. **Alejandro Benítez-Guzmán, Torres-Márquez M. E.** 2010. Efectos de toxinas bacterianas en la señalización de la respuesta inflamatoria. *Rev Educ Bioq* **29**:74-81.
3. **Arend W. P.** 2002. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine & growth factor reviews* **13**:323-40.
4. **Arend W. P.** 2002. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine & growth factor reviews* **13**:323-40.
5. **Ashwell J. D.** 2006. The many paths to p38 mitogen-activated protein kinase activation in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **6**:532-40.
6. **Bacher M., a Meinhardt, H. Y. Lan, W. Mu, C. N. Metz, J. a Chesney, T. Calandra, D. Gemsa, T. Donnelly, R. C. Atkins, and R. Bucala.** 1997. Migration inhibitory factor expression in experimentally induced endotoxemia. *The American journal of pathology* **150**:235-46.
7. **Berg R. D.** 1996. The indigenous gastrointestinal microflora. *Trends in microbiology* **4**:430-5.
8. **Berg W. B. van den.** 2000. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Annals of the rheumatic diseases* **59 Suppl 1**:i81-4.
9. **Bogdan C.** 2001. Nitric oxide and the immune response. *Nature immunology* **2**:907-16.
10. **Bogdan C., M. Röllinghoff, and A. Diefenbach.** 2000. The role of nitric oxide in innate immunity. *Immunological reviews* **173**:17-26.
11. **Boisen N., F. Ruiz-Perez, F. Scheutz, K. a Krogfelt, and J. P. Nataro.** 2009. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *The American journal of tropical medicine and hygiene* **80**:294-301.
12. **Boltaña S., N. Roher, F. W. Goetz, and S. A. Mackenzie.** 2011. PAMPs, PRRs and the genomics of gram negative bacterial recognition in fish. *Developmental and comparative immunology*.
13. **Bongers T., M.-L. P. J. van Goor, V. Bhagwanbali, H. H. D. M. van Vliet, E. B. Gómez García, D. W. J. Dippel, and F. W. G. Leebeek.** 2006. High von Willebrand factor

levels increase the risk of first ischemic stroke: influence of ADAMTS13, inflammation, and genetic variability. *Stroke; a journal of cerebral circulation* **37**:2672-7.

14. **Bonizzi G., and M. Karin.** 2004. The two NF-kappaB activation pathways and their role in innate and adaptive immunity. *Trends in immunology*.

15. **Botos I., D. M. Segal, and D. R. Davies.** 2011. The structural biology of Toll-like receptors. *Structure (London, England : 1993)* **19**:447-59.

16. **Byeon S. E., Y. G. Lee, B. H. Kim, T. Shen, S. Y. Lee, H. J. Park, S.-C. Park, M. H. Rhee, and J. Y. Cho.** 2008. Surfactin blocks NO production in lipopolysaccharide-activated macrophages by inhibiting NF-kappaB activation. *Journal of microbiology and biotechnology* **18**:1984-9.

17. **Calandra T., B. Echtenacher, D. L. Roy, J. Pugin, C. N. Metz, L. Hültner, D. Heumann, D. Männel, R. Bucala, and M. P. Glauser.** 2000. Protection from septic shock by neutralization of macrophage migration inhibitory factor. *Nature medicine* **6**:164-70.

18. **Calandra T., L. a Spiegel, C. N. Metz, and R. Bucala.** 1998. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:11383-8.

19. **Calandra T., L. a Spiegel, C. N. Metz, and R. Bucala.** 1998. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**:11383-8.

20. **Canizalez-Roman A., and F. Navarro-García.** 2003. Fodrin CaM-binding domain cleavage by Pet from enteroaggregative *Escherichia coli* leads to actin cytoskeletal disruption. *Molecular microbiology* **48**:947-58.

21. **Chang L., and M. Karin.** 2001. Mammalian MAP kinase signalling cascades. *Nature* 37-40.

22. **Chen G., and D. V. Goeddel.** 2002. TNF-R1 signaling: a beautiful pathway. *Science (New York, N.Y.)* **296**:1634-5.

23. **Choi S., and W. J. Friedman.** 2009. Inflammatory cytokines IL-1 β and TNF- α regulate p75^{NTR} expression in CNS neurons and astrocytes by distinct cell-type-specific signalling mechanisms. *ASN neuro* **1**.

24. **Cocks T. M., and J. D. Moffatt.** 2000. Protease-activated receptors: sentries for inflammation? *Trends in Pharmacological Sciences* **21**:103-108.

25. **Croxen M. a, and B. B. Finlay.** 2010. Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nature reviews. Microbiology* **8**:26-38.
26. **Czczulin J. R., C. Eslava, F. Navarro-garci, I. A. N. R. Henderson, A. Cravioto, and J. P. Nataro.** 1998. Pet , an Autotransporter Enterotoxin from Enteroaggregative Escherichia coli. *Society* **66**:3155-3163.
27. **Danese S., and a Mantovani.** 2010. Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene. Nature Publishing Group* 1-11.
28. **Darfeuille-Michaud a, C. Neut, N. Barnich, E. Lederman, P. Di Martino, P. Desreumaux, L. Gambiez, B. Joly, a Cortot, and J. F. Colombel.** 1998. Presence of adherent Escherichia coli strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* **115**:1405-13.
29. **Davidson A. L.** 2002. Structural biology. Not just another ABC transporter. *Science (New York, N.Y.)* **296**:1038-40.
30. **Delves P. J., S. J. Martin, D. R. Burton, and I. M. Roitt.** 2011. Roitt's Essential Immunology. Wiley-Blackwell.
31. **Desvaux M., N. J. Parham, A. Scott-Tucker, and I. R. Henderson.** 2004. The general secretory pathway: a general misnomer? *Trends in microbiology* **12**:306-9.
32. **Desvaux M., A. Scott-Tucker, S. M. Turner, L. M. Cooper, D. Huber, J. P. Nataro, and I. R. Henderson.** 2007. A conserved extended signal peptide region directs posttranslational protein translocation via a novel mechanism. *Microbiology (Reading, England)* **153**:59-70.
33. **DiDonato J. a, M. Hayakawa, D. M. Rothwarf, E. Zandi, and M. Karin.** 1997. A cytokine-responsive IkappaB kinase that activates the transcription factor NF-kappaB. *Nature* **388**:548-54.
34. **Dinarello C. a.** 2009. Immunological and inflammatory functions of the interleukin-1 family. *Annual review of immunology* **27**:519-50.
35. **Dobrovolskaia M. A., and S. N. Vogel.** 2002. Toll receptors, CD14, and macrophage activation and deactivation by LPS. *Microbes and infection / Institut Pasteur* **4**:903-14.
36. **Dutta P. R., B. Q. Sui, and J. P. Nataro.** 2003. Structure-function analysis of the enteroaggregative Escherichia coli plasmid-encoded toxin autotransporter using scanning linker mutagenesis. *The Journal of biological chemistry* **278**:39912-20.
37. **Dutta P.** 2002. Functional comparison of serine protease autotransporters of Enterobacteriaceae. *Infection and immunity* **70**:7105-7113.

38. **Eckburg P. B., E. M. Bik, C. N. Bernstein, E. Purdom, L. Dethlefsen, M. Sargent, S. R. Gill, K. E. Nelson, and D. a Relman.** 2005. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science (New York, N.Y.)* **308**:1635-8.
39. **Ehrt S., D. Schnappinger, S. Bekiranov, J. Drenkow, S. Shi, T. R. Gingeras, T. Gaasterland, G. Schoolnik, and C. Nathan.** 2001. Reprogramming of the macrophage transcriptome in response to interferon-gamma and Mycobacterium tuberculosis: signaling roles of nitric oxide synthase-2 and phagocyte oxidase. *The Journal of experimental medicine* **194**:1123-40.
40. **Escobar-Páramo P., O. Clermont, A.-B. Blanc-Potard, H. Bui, C. Le Bouguéneq, and E. Denamur.** 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in Escherichia coli. *Molecular biology and evolution* **21**:1085-94.
41. **Eslava C, Navarro-García F., J. R. Czezulín, I. R. Henderson, A. Cravioto, and J. P. Nataro.** 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative Escherichia coli. *Infection and immunity* **66**:3155-63.
42. **Fiorentino D. F., A. Zlotnik, P. Vieira, T. R. Mosmann, M. Howard, K. W. Moore, and A. O Garra.** 1991. IL-10 acts on the antigen-presenting cell to inhibit cytokine production by Th1 cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **146**:3444-51.
43. **Goh J. W. K., Y. S. Tan, A. W. Dodds, K. B. M. Reid, and J. Lu.** 2010. The class A macrophage scavenger receptor type I (SR-AI) recognizes complement iC3b and mediates NF- κ B activation. *Protein & cell* **1**:174-87.
44. **Gordon D. M.** 2003. The distribution and genetic structure of Escherichia coli in Australian vertebrates: host and geographic effects. *Microbiology* **149**:3575-3586.
45. **Grivennikov S. I., F. R. Greten, and M. Karin.** 2010. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell.* Elsevier Inc. **140**:883-99.
46. **Harrington S. M., E. G. Dudley, and J. P. Nataro.** 2006. Pathogenesis of enteroaggregative Escherichia coli infection. *FEMS microbiology letters* **254**:12-8.
47. **Hernández-Chiñas U., T. Gazarian, K. Gazarian, G. Mendoza-Hernández, J. Xicohtencatl-Cortes, and E. Carlos.** 2009. Peptide sequences identified by phage display are immunodominant functional motifs of Pet and Pic serine proteases secreted by Escherichia coli and Shigella flexneri. *Peptides* **30**:2127-35.
48. **Hibbs J. B.** 2002. Infection and nitric oxide. *The Journal of infectious diseases* **185 Suppl** :S9-17.

49. **Huang D. B., P. C. Okhuysen, Z.-D. Jiang, and H. L. DuPont.** 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Pathogen. *The American Journal of Gastroenterology* **99**:383-389.
50. **Ieva R., and H. D. Bernstein.** 2009. Interaction of an autotransporter passenger domain with BamA during its translocation across the bacterial outer membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **106**:19120-5.
51. **Israël A.** 2010. The IKK Complex, a Central Regulator of NF-kappaB Activation. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **2**:a000158.
52. **Jutras I., and M. Desjardins.** 2005. Phagocytosis: at the crossroads of innate and adaptive immunity. *Annual review of cell and developmental biology* **21**:511-27.
53. **Karin M., and F. R. Greten.** 2005. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nature reviews. Immunology* **5**:749-59.
54. **Karin M., and A. Lin.** 2002. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nature immunology* **3**:221-7.
55. **Khan M. a S., J. Kang, and T. S. Steiner.** 2004. Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology* **112**:651-60.
56. **Kiefer F., K. Arnold, M. Künzli, L. Bordoli, and T. Schwede.** 2009. The SWISS-MODEL Repository and associated resources. *Nucleic acids research* **37**:D387-92.
57. **Kostakioti M., C. L. Newman, D. G. Thanassi, and C. Stathopoulos.** 2005. MINIREVIEW Mechanisms of Protein Export across the Bacterial Outer Membrane. *Society* **187**:4306-4314.
58. **Kotlowski R., C. N. Bernstein, S. Sepehri, and D. O. Krause.** 2007. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2+D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* **56**:669-75.
59. **Kühn R., J. Löhler, D. Rennick, K. Rajewsky, and W. Müller.** 1993. Interleukin-10-deficient mice develop chronic enterocolitis. *Cell* **75**:263-74.
60. **Lan H. Y., and M. M. Centre.** 1993. Trafficking of inflammatory macrophages from the kidney to draining lymph nodes during experimental glomerulonephritis Macrophage trafficking. *Journal of Experimental Medicine* 336-341.
61. **Laroux F. S., X. Romero, L. Wetzler, P. Engel, and C. Terhorst.** 2005. Cutting edge: MyD88 controls phagocyte NADPH oxidase function and killing of gram-negative bacteria. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **175**:5596-600.

62. **Latz E.** 2010. The inflammasomes: mechanisms of activation and function. *Current opinion in immunology*. Elsevier Ltd **22**:28-33.
63. **Ledesma M. a, S. a Ochoa, A. Cruz, L. M. Rocha-Ramírez, J. Mas-Oliva, C. a Eslava, J. a Girón, and J. Xicohtencatl-Cortes.** 2010. The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. *PLoS one* **5**:e12127.
64. **Letunic I., L. Goodstadt, N. J. Dickens, T. Doerks, J. Schultz, R. Mott, F. Ciccarelli, R. R. Copley, C. P. Ponting, and P. Bork.** 2002. Recent improvements to the SMART domain-based sequence annotation resource. *Nucleic acids research* **30**:242-4.
65. **Li H L. X.** 2008. Li Positive and negative signaling components involved in TNF α -induced NF- κ B activation.pdf.
66. **Lindauer M. L., J. Wong, Y. Iwakura, and B. E. Magun.** 2009. Pulmonary inflammation triggered by ricin toxin requires macrophages and IL-1 signaling. *Journal of immunology* (Baltimore, Md. : 1950) **183**:1419-26.
67. **Li Q., and I. M. Verma.** 2002. NF-kappaB regulation in the immune system. *Nature reviews. Immunology* **2**:725-34.
68. **Lopez-Ferrer D., and T. C. Squier.** 2011. Aging Enhances Production of Reactive Oxygen Species and Bactericidal Activity in Peritoneal Macrophages by Up-Regulating Classical Activation Pathways. *Biochemistry*.
69. **Lorenz E.** 2006. TLR2 and TLR4 expression during bacterial infections. *Current pharmaceutical design* **12**:4185-93.
70. **Lupp C., M. L. Robertson, M. E. Wickham, I. Sekirov, O. L. Champion, E. C. Gaynor, and B. B. Finlay.** 2007. Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell host & microbe* **2**:119-29.
71. **Manuscript A.** 2010. Phagosome maturation : going through the acid test. *Molecular Cell* **9**:781-795.
72. **Martinez F. O.** 2011. Regulators of macrophage activation. *European journal of immunology* **41**:1531-4.
73. **Martin H. M., B. J. Campbell, C. A. Hart, C. Mpofu, M. Nayar, R. Singh, H. Englyst, H. F. Williams, and J. M. Rhodes.** 2004. Enhanced *Escherichia coli* adherence and invasion in Crohn's disease and colon cancer 1 ☆. *Gastroenterology* **127**:80-93.
74. **Martins M.** 2009. Targeting human macrophages for enhanced killing of intracellular XDR-TB and MDR-TB. *The international journal of tuberculosis and lung*

disease : the official journal of the International Union against Tuberculosis and Lung Disease **13**:569-73.

75. **Ma X.** 2001. TNF- α and IL-12: a balancing act in macrophage functioning. *Microbes and Infection*.

76. **Mistry D., and R. a Stockley.** 2006. IgA1 protease. *The international journal of biochemistry & cell biology* **38**:1244-8.

77. **Mitchell R. a, H. Liao, J. Chesney, G. Fingerle-Rowson, J. Baugh, J. David, and R. Bucala.** 2002. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p53: regulatory role in the innate immune response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **99**:345-50.

78. **Molnarfi N., L. Gruaz, J.-M. Dayer, and D. Burger.** 2007. Opposite regulation of IL-1 β and secreted IL-1 receptor antagonist production by phosphatidylinositol-3 kinases in human monocytes activated by lipopolysaccharides or contact with T cells. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **178**:446-54.

79. **Mosser D. M.** 2003. The many faces of macrophage activation. *Journal of leukocyte biology* **73**:209-12.

80. **Nakae S., M. Asano, R. Horai, and Y. Iwakura.** 2001. Interleukin-1 β , but not interleukin-1 α , is required for T-cell-dependent antibody production. *Immunology* **104**:402-9.

81. **Nathan C.** 2002. Points of control in inflammation. *Nature* **420**:846-52.

82. **Navarro-García F.** 2007. Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. *Microbiology (Reading, England)* **153**:2828-38.

83. **Navarro-García F., A. Canizalez-Roman, K. E. Burlingame, K. Teter, and J. E. Vidal.** 2007. Pet, a non-AB toxin, is transported and translocated into epithelial cells by a retrograde trafficking pathway. *Infection and immunity* **75**:2101-9.

84. **Navarro-García F., C. Sears, C. Eslava, a Cravioto, and J. P. Nataro.** 1999. Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection and immunity* **67**:2184-92.

85. **Oeckinghaus A., M. S. Hayden, and S. Ghosh.** 2011. Crosstalk in NF- κ B signaling pathways. *Nature Immunology* **12**:695-708.

86. **Oomen C. J., P. van Ulsen, P. van Gelder, M. Feijen, J. Tommassen, and P. Gros.** 2004. Structure of the translocator domain of a bacterial autotransporter. *The EMBO journal* **23**:1257-66.

87. **Papadakis K. a.** 2000. Role of Cytokines in the Pathogenesis of Inflammatory Bowel Disease. *Annual Review of Medicine* **98**:1010-298.
88. **Park J.-S., S.-H. Jung, H. Seo, and H.-S. Kim.** 2007. SB203580 enhances interleukin-1 receptor antagonist gene expression in IFN-gamma-stimulated BV2 microglial cells through a composite nuclear factor-kappaB/PU.1 binding site. *Neuroscience letters* **416**:169-74.
89. **Penders J., C. Thijs, C. Vink, F. F. Stelma, B. Snijders, I. Kummeling, P. a van den Brandt, and E. E. Stobberingh.** 2006. Factors influencing the composition of the intestinal microbiota in early infancy. *Pediatrics* **118**:511-21.
90. **Pohlner J., R. Halter, K. Beyreuther, and T. F. Meyer.** 1987. Gene structure and extracellular secretion of *Neisseria gonorrhoeae* IgA protease. *Nature* **325**:458-62.
91. **Rawls J. F.** 2007. Enteric infection and inflammation alter gut microbial ecology. *Cell host & microbe* **2**:73-4.
92. **Rhodes J. M.** 2007. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut*. *BMJ Group* **56**:610-2.
93. **Ricote M., I. García-Tuñón, F. R. Bethencourt, B. Fraile, R. Paniagua, and M. Royuela.** 2004. Interleukin-1 (IL-1alpha and IL-1beta) and its receptors (IL-1RI, IL-1RII, and IL-1Ra) in prostate carcinoma. *Cancer* **100**:1388-96.
94. **Roger T., M. P. Glauser, and T. Calandra.** 2001. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *Journal of endotoxin research* **7**:456-60.
95. **Saccani S., S. Pantano, and G. Natoli.** 2002. p38-Dependent marking of inflammatory genes for increased NF-kappa B recruitment. *Nature immunology* **3**:69-75.
96. **Sainz T., J. Perez, M. C. Fresan, V. Flores, L. Jimenez, U. Hernandez, I. Herrera, and C. Eslava.** 2002. Histological Alterations and Immune Response Induced by Pet Toxin During Colonization with Enterohaggative *Escherichia coli* (EAEC) in a Mouse Model Infection. *Journal of Microbiology* **40**:91-97.
97. **Sanchez-Muñoz F.** 2008. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World Journal of Gastroenterology* **14**:4280.
98. **Saraiva M., and A. O'Garra.** 2010. The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews. Immunology*. *Nature Publishing Group* **10**:170-81.
99. **Sartor R. B.** 2008. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* **134**:577-94.

100. **Schroecksadel K.** 2006. Crucial role of interferon-gamma and stimulated macrophages in cardiovascular disease. *Current vascular pharmacology* **4**:205-13.
101. **Schwartz A., M. Jacobi, J.-S. Frick, M. Richter, K. Rusch, and H. Köhler.** 2010. Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *The Journal of pediatrics* **157**:240-244.e1.
102. **Sims J. E., and D. E. Smith.** 2010. The IL-1 family: regulators of immunity. *Nature reviews. Immunology.* Nature Publishing Group **10**:89-102.
103. **Souza Carmo E. V. de, S. Katz, and C. L. Barbiéri.** 2010. Neutrophils reduce the parasite burden in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*-infected macrophages. *PloS one* **5**:e13815.
104. **Strober W., and I. J. Fuss.** 2011. Proinflammatory cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology.* Elsevier Inc. **140**:1756-67.
105. **Stuart L. M., and R. A. B. Ezekowitz.** 2005. Phagocytosis: elegant complexity. *Immunity* **22**:539-50.
106. **Szabady R. L., J. H. Peterson, K. M. Skillman, and H. D. Bernstein.** 2005. An unusual signal peptide facilitates late steps in the biogenesis of a bacterial autotransporter. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**:221-6.
107. **Varga S. M., E. L. Wissinger, and T. J. Braciale.** 2000. The attachment (G) glycoprotein of respiratory syncytial virus contains a single immunodominant epitope that elicits both Th1 and Th2 CD4+ T cell responses. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **165**:6487-95.
108. **Villaseca J. M., F. Navarro-García, G. Mendoza-Hernández, J. P. Nataro, a Cravioto, and C. Eslava.** 2000. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infection and immunity* **68**:5920-7.
109. **Wells C. A., T. Ravasi, and D. A. Hume.** 2005. Inflammation suppressor genes : please switch out all the lights. *Journal of Leukocyte Biology* **78**:9-13.
110. **Wells T. J., M. Totsika, and M. a Schembri.** 2010. Autotransporters of *Escherichia coli*: a sequence-based characterization. *Microbiology (Reading, England)* **156**:2459-69.
111. **Xicohtencatl-Cortes J., Z. Saldaña, W. Deng, E. Castañeda, E. Freer, P. I. Tarr, B. B. Finlay, J. L. Puente, and J. a Girón.** 2010. Bacterial macroscopic rope-like fibers with cytopathic and adhesive properties. *The Journal of biological chemistry* **285**:32336-42.

112. **Yen Y. T., M. Kostakioti, I. R. Henderson, and C. Stathopoulos.** 2008. Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends in microbiology* **16**:370-9.

113. **Zarubin T., and J. Han.** 2005. Activation and signaling of the p38 MAP kinase pathway. *Cell research* **15**:11-8.

EFECTOS DE TOXINAS BACTERIANAS EN LA SEÑALIZACIÓN DE LA RESPUESTA INFLAMATORIA: MAPK, UBIQUITINACIÓN-DESUBIQUITINACIÓN*

Alejandro Benítez-Guzmán y M. Eugenia Torres-Márquez

Departamento de Bioquímica Facultad de Medicina, UNAM. Apdo. Postal 70-159 México 04510 DF. Correo E: meforres@servidor.unam.mx

RESUMEN

La respuesta inflamatoria implica la generación de citocinas en la que participa el factor de transcripción NFκB, éste puede ser activado por la vía de MAPK u otras vías que estimulan a la cinasa IKKβ; la cinasa también es regulada por ubiquitinación/desubiquitinación. Las bacterias para establecer la infección han desarrollado mecanismos de interferencia con ambas vías, con la ubiquitinación al mimetizar las reacciones de las E3 ligasas y las desubiquitinases del hospedero, de manera que evade selectivamente la degradación de proteínas. Las toxinas bacterianas también interfieren con la vía de las MAPK ya sea por desfosforilación o modificación de sus componentes para evitar su activación. En esta revisión nos abocamos a las toxinas bacterianas con acción sobre la ubiquitinación/desubiquitinación y la influencia que tienen en la supresión de la inflamación por la interferencia con la cascada de las MAPK.

ABSTRACT

The inflammatory response involves cytokines generation, in which NFκB transcription factor is activated by either MAPK or IKKβ kinase pathways; those pathways are also under the regulation of ubiquitination/deubiquitination process. To establish an infection, bacteria have developed interference mechanisms to host's ubiquitination and MAPK pathways. Ubiquitination is interfered when bacterial toxins mimic either host E3 ligases or deubiquitination reactions in order to selectively avoid protein degradation. Bacterial toxins also interfere with MAPK pathway by dephosphorylating or modifying its components to avoid their activation. In this review, we focus on bacterial toxins with ubiquitination/deubiquitination action and its influence on the inflammation response.

INTRODUCCIÓN

En el medio ambiente existen algunos microorganismos (virus, bacterias, hongos) que se consideran patógenos para mamíferos, la supervivencia de dichos microorganismos en un proceso infeccioso depende de la respuesta de defensa que desencadena el hospedero. Los mecanismos de defensa son conservados en organismos multicelulares y se les conoce como inmunidad innata, ésta es considerada la primera línea de defensa en el reconocimiento de

agentes extraños y sus productos. La defensa se basa en la identificación de secuencias específicas conocidas como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Los PAMP son reconocidos por receptores extracelulares e intracelulares como los "Toll like" y activan diferentes cascadas de señalización (Fig. 1) como la de cinasas activadas por mitógenos (MAPK) que estimulan la transcripción de genes, entre ellos el factor nuclear que aumenta la transcripción de la cadena ligera kappa de las células B activadas (NFκB) y la proteína activadora-1 (AP-1), que

PALABRAS

CLAVE:

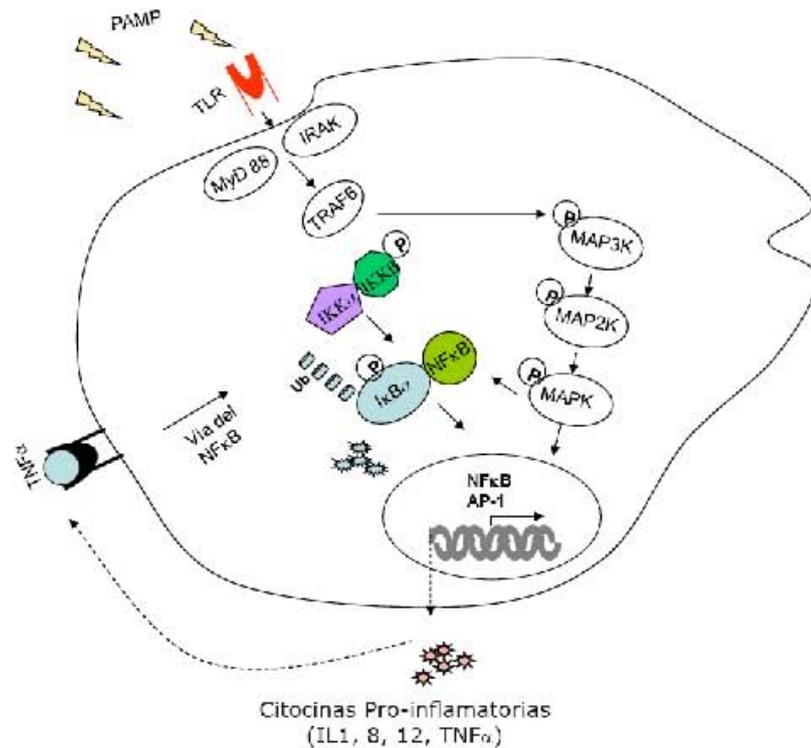
Toxinas bacterianas, MAPK, ubiquitinación, respuesta inflamatoria.

KEY WORDS:

Bacterial toxins, MAPK, ubiquitination, inflammation.

*Recibido: 8 de febrero de 2010 Aceptado: 8 de junio de 2010

Figura 1. Señalización de la respuesta inducida por bacterias. Se presenta de manera muy simplificada la señalización de la respuesta inducida por las bacterias conducente a la generación de citocinas e inflamación en el huésped. Il = Interleucinas, TNF α = factor de necrosis tumoral alta, P = proteína fosforilada, Ub = Ubiquitina, TLR = receptores "Toll like", PAMP = patrones moleculares asociados a microbios, AP1 = proteína activadora 1, I κ B = inhibidor del NF κ B, MAPK = cinasas activadas por mitógenos, NF κ B = factor nuclear κ B.



finalmente desencadenan la producción de citocinas pro-inflamatorias. Además de las MAPK, existen otras vías de señalización que modulan la actividad de NF κ B, estas vías actúan a través de la cinasa α inhibidora de las proteínas que unen al NF κ B (I κ B α), la cual también es regulada por procesos de ubiquitinación.

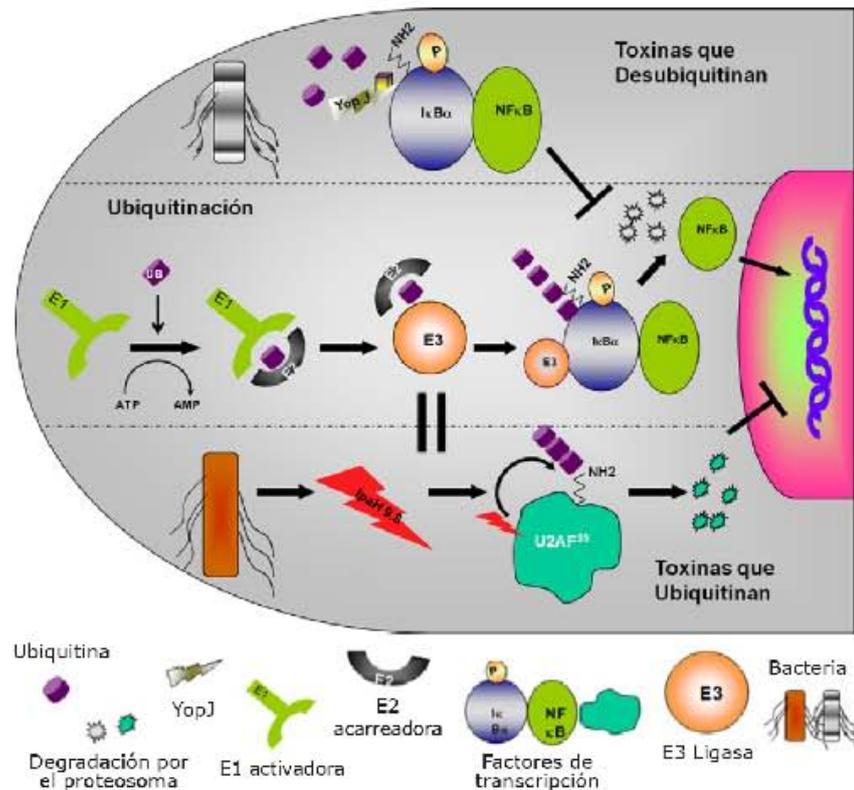
A continuación describiremos brevemente la vía de regulación de NF κ B (como parte de la respuesta inflamatoria) por ubiquitinación y la vía MAPK, para entender el proceso de virulencia del que se están valiendo las bacterias para evadir la respuesta inmune.

LA UBIQUITINACIÓN Y LA DESUBIQUITINACIÓN COMO PROCESOS REGULADORES DE LA RESPUESTA INMUNE

La ubiquitinación es la adición covalente de monómeros o polímeros de ubiquitina (Ub) a residuos de lisina de las proteínas blanco, entre otras funciones, para ser degradadas en el proteosoma (Fig. 2). Este proceso se realiza a través de la participación de las enzimas Ub-activadora (E1), Ub-conjugadora (E2) y Ub-ligasa

(E3). El proceso que lleva a cabo normalmente la célula consiste en la activación de la ubiquitina en la región C-terminal mediante la acción de E1. La ubiquitina activada se transfiere a una cisteína que se encuentra en el sitio activo de la enzima acarreadora de ubiquitina o E2. Finalmente, la proteína ligasa de la ubiquitina o E3 cataliza la unión de la región C-terminal de la ubiquitina al grupo ϵ -amino de un residuo K de la proteína que será degradada. El destino de proteínas ubiquitinadas depende de la combinación e interacción de las enzimas E2, E3, además de la longitud y enlaces de las cadenas de Ub. Cadenas de 4 o más moléculas de Ub (poli-ubiquitinación) ligadas a K-48, marcarán a la proteína para que se degrade por el proteosoma. Cuando la mono-ubiquitinación está en la K-63 regula varios eventos celulares y participa en la señalización de manera semejante a la fosforilación. El reconocimiento de las E1, E2 y E3, no necesariamente se han vislumbrado a través de su actividad, sino que algunas de ellas se han identificado por su estructura primaria o secuencia nucleotídica. Dentro de las características de estructura primaria de las

Figura 2. La interferencia de las toxinas bacterianas en la ubiquitinación y desubiquitinación. Las toxinas bacterianas afectan el proceso de ubiquitinación y desubiquitinación. Por un lado, mimetizando enzimas E3 que tendrán proteínas blanco diferentes al hospedero (IpaH9.8) con el fin de conducirías a su degradación. Por otro lado, producen proteínas que eliminan la ubiquitinación (DUB) de las proteínas marcadas por el hospedero (YopJ) para evitar su degradación. Estos mecanismos disminuyen la respuesta inmune del hospedero e inclinan la balanza en favor de la sobrevivencia bacteriana.



proteínas E2 y principalmente E3, se han hecho distinciones que han sentado las bases para la sub-clasificación en familias. La ubiquitinación de una proteína es un proceso reversible, la separación de la Ub, es catalizada por las enzimas de desubiquitinación (DUB), estas proteínas funcionan editando a las proteínas conjugadas con Ub y removiendo la Ub de éstas (Fig. 2). Aún se conoce poco sobre la función de las enzimas participantes en la DUB, pero se sabe que están presentes en todas las células eucariotas.

Las DUB incluyen metaloproteasas (JAMM/MPN+) y cisteína proteasas, que se secretan como enzimas activas, pero requieren de la presencia de Ub para formar la triada catalítica activa (1).

MECANISMOS BACTERIANOS QUE INTERVIENEN EN LA UBIQUITINACIÓN-DESUBIQUITINACIÓN

Estudios de la interacción entre la bacteria y la célula blanco, han revelado en la última década

una enorme diversidad de procesos celulares que son modulados por patógenos Gram-positivos y Gram-negativos. En el caso de las bacterias Gram negativas existen cinco* diferentes tipos de secreción (TSS), divididos en dos grupos: el dependiente de translocación/contacto, en el cual el patógeno libera la toxina directamente al citosol de la célula blanco TSS3 y TSS4 y el de secreción al ambiente extracelular TSS1, TSS2, TSS5 (2). Se ha observado que las proteínas efectoras transportadas por los TSS3/4, tales como SopB, SopD1, SopE1 y AvrA, tienen similitud con proteínas eucariotas. SopB/SopD, son fosfatasa de fosfatidil inositol semejantes a las PI4 fosfatasa de eucariotes, SopE1 es un eficiente intercambiador de nucleótidos de guanina (GEF) para las Rac y Cdc42 de eucariotes y la AvrA es una proteína con semejanza estructural y funcional a las desubiquitinasa de eucariotes. La importancia de estas proteínas estriba en que

*Durante la edición de éste trabajo se reconocieron otros dos tipos de TSS, por lo que ahora son siete y no cinco.

participan en procesos como: la modulación del citoesqueleto, donde interfieren con microtúbulos de actina y filamentos intermedios (Rac y Cdc42); también alteran etapas específicas de las vías endocíticas (fosfatasa de PI4P) y vías de señalización en donde el proceso de ubiquitinación (AvrA) juega un papel importante.

Se ha encontrado que las toxinas bacterianas interfieren con la respuesta inflamatoria, modulando la ubiquitinación a través de generar señales distintas a las del hospedero (por sus proteínas semejantes a E3) o eliminar la ubiquitinación regulada por el hospedero (con sus proteínas semejantes a DUB). Las toxinas con actividades semejantes a E3 o DUB se enlistan en la Tabla 1 y las más estudiadas se describen a continuación.

EFACTORES BACTERIANOS CON ACTIVIDAD DE E3-LIGASA

SopA. Es secretada mediante el TSS3 por *Salmonella* entérica sero-variedad *Typhimurium*, patógeno intracelular facultativo que coloniza el intestino delgado y sobrevive al ataque de las células fagocíticas dentro del fagosoma. SopA tiene un papel importante en la inducción de la respuesta inflamatoria al promover la migración trans-epitelial de leucocitos polimorfonucleares (PMN). Recientemente (3) se ha encontrado que SopA es una E3 de la familia HECT (Fig. 2), que tiene como enzimas conjugantes (E2) *in vitro* a las Ubch5a, Ubch5c y Ubch7, mismas que participan en el proceso inflamatorio. La actividad de ligasa es importante para la migración trans-epitelial, pero los sustratos a ser ubiquitinados por esta enzima aún no se conocen.

IpaH 9.8. Es otro efector secretado por *Shigella* dentro de las células blanco, donde ésta se transloca al núcleo. Recientemente se demostró que IpaH9.8 es una ligasa E3Ub (Fig. 2). Su caracterización bioquímica fue llevada a cabo usando el modelo de *Saccharomyces* como célula adoptiva (4). En este sistema, IpaH9.8 mostró interferencia con la respuesta en la ruta de señalización de feromona, pues al ubiquitinar a la MAP2K Ste7, interrumpe la cascada hacia MAPK. IpaH9.8 une a U2AF³⁵, proteína que participa en la síntesis de interleucinas (IL) inflamatorias, y se ha propuesto que IpaH9.8 participa en la ubiquitinación dirigiendo a U2AF³⁵ hacia su degradación para disminuir la inflamación. Otras proteínas bacterianas como la SspH1 de *Salmonella* con homología en el dominio de ligasa E3 interaccionan con la proteína cinasa N1 (PKN1) de sus hospederos (5).

EFACTORES BACTERIANOS CON ACCIÓN DE DESUBIQUITINACIÓN

YopJ/P. Son toxinas secretadas por el TSS3 de *Yersinia pseudotuberculosis* y *Y. enterocolitica* respectivamente, inhiben la conjugación de SUMO-1 (proteína parecida a la ubiquitina) con sus proteínas blanco en el hospedero. Particularmente pueden desubiquitinar a la proteína que enlaza a la cinasa inhibidora de NF- κ B (IKB α) y evitar con esto su degradación por el proteosoma, ver Fig. 2 (6).

Ssel. Es una toxina de *Salmonella* capaz de enlazar Ub, *in vitro* muestra actividad de DUB (Fig. 2) y su efecto al infectar células epiteliales o macrófagos con una mutante inactiva es el de aumentar proteínas ubiquitinadas, lo que sugiere que también *in vivo* participa con su actividad DUB (7). El efecto de Ssel no es sobre la IKB α , pero sí sobre blancos que estimulan los efectos citotóxicos de la bacteria en el estado tardío de la infección y dado que sus blancos de preferencia son aquellos ubiquitinados en la K63, es posible que interfiera con procesos de transducción.

Chla-Dub1 y Chla-Dub2. La actividad de éstas toxinas se determinó gracias a la existencia de compuestos enlazados a ubiquitina, al utilizar lisados de células HeLa infectadas con *Chlamydia trachomatis*. La inmunoprecipitación de las proteínas con la Ub reveló dos proteínas que se caracterizaron por espectrofotometría de masas y se determinaron como pertenecientes a las DUB (8). Su actividad de desubiquitinación (Fig. 2) y desnubilación (NEDD es otro homólogo de la ubiquitina) fue comprobada *in vitro* pero sus blancos celulares aun no se establecen.

OspG. No es precisamente una DUB, pero se agrupa con éstas pues inhibe la ubiquitinación en los eventos que se dan entre la acción de E2 y E3. Esta toxina de *Shigella* puede inhibir la degradación de IKB α inducida por TNF, tiene actividad de cinasa e interactúa con la E2 Ubch5b. La actividad de cinasa no tiene ningún efecto sobre la actividad conjugadora de ubiquitina de la E2, no obstante se piensa que interfiere en el proceso de ubiquitinación de la fosfo-IKB α , posiblemente fosforilando algún componente del complejo SCF^{34^{CP}} (9).

Otra toxina no identificada de *Salmonella* no patógena interfiere con la ubiquitinación de IKB α , sin interferir con la fosforilación, lo que inhibe su degradación. La inhibición de la ubiquitinación es específica para los sustratos IKB α y α -catenina del complejo E3-SCF^{34^{CP}} (10).

TABLA 1
TOXINAS QUE MODIFICAN LA UB/DUB

Proteína Bacteriana	Bacteria que la secreta	Proteína blanco del hospedero	Efecto sobre la ubiquitinación	Degradación en el proteosoma	Modo de acción del efector	Papel en la virulencia bacteriana
AvrPtoB	<i>Pseudomona syringae</i> pv <i>tomato</i>	?	Auto ubiquitinación de AvrPtoB	?	Ligasa E3-Ub de la caja U de RING	Ligasa E3-Ub de AvrPtoB supresión de la muerte celular
ExoU	<i>Pseudomona aeruginosa</i>	?	ExoU K63 bi-Ub	No	?	?
GALA	<i>Ralstonia solanacearum</i>	?	?	?	Proteínas de caja F semejante en plantas	GALAs requeridas para la virulencia completa en diferentes plantas
HopM1	<i>Pseudomona syringae</i> pv <i>tomato</i>	AtMIN7	AtMIN7	AtMIN7	Reclutamiento de AtMIN7 por HopM1 para la degradación.	HopM1 suprime la Inmunidad innata del hospedero
OspG	<i>Shigella flexneri</i>	Ubiquitinada UbcH5b	Previene fosfo-IkBa K48 poli-Ub	Previene la degradación de fosfo-IkBa	Inhibe SCF ^{IKKα} , une UbcH5 E2	OspG previene la ubiquitinación y degradación de fosfo-IkBa
SopA	<i>Salmonella typhimurium</i>	HsRMA1	SopA K48-poli-Ub	SopA	?	Ubiquitinación de SopA por HSRMA1 es necesaria para que <i>Salmonella</i> salga de las vacuolas
SopA	<i>Salmonella typhimurium</i>	?	Auto ubiquitinación de SopA (mono-Ub)	?	SopA es una Ub ligasa de HECT E3	Mono Ub de SopA no es requerida para que <i>Salmonella</i> salga de las vacuolas, incluida en la migración transepitelial de neutrófilos
SopB	<i>Salmonella typhimurium</i>	?	SopB k48-poli-Ub	degradación independiente de proteosoma SopB	?	SopB induce la polimerización de actina y la entrada de la bacteria
Chla-Dub1 y Chla-Dub2	<i>Chlamydia trachomatis</i>	?	Inhibe SCF ^{IKKα} , une UbcH5 E2	?	?	?
Ssel	<i>Salmonella</i>	?	?	?	?	Enlaza de Ub
SopE	<i>Salmonella typhimurium</i>	?	SopE k48-poli-Ub	SopE	?	SopE induce el arreglo de la actina y la internalización bacteriana
VirF	<i>Agrobacterium tumefaciens</i>	VIP1	?	Degradación directa de VIP1 e indirecta de VirE2 por el proteosoma	Proteína de la caja F	Inhibición química del proteosoma, inhibe la transformación natural de T-DNA
YopE	<i>Yersinia enterocolitica</i>		YopE k48-poli-Ub	YopE	?	?
YopJ	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	IKK β	IKK β mono-Ub	No	Desubiquitinasa	YopJ inhibe el complejo IKK, de ahí que inhibe la activación de NF- κ B
YopJ	<i>Yersinia pseudotuberculosis</i>	TRAF2, TRAF6, IkBa	TRAF2 y TRAF6 K63-poli-Ub	Previene la degradación de IkBa	Desubiquitinasa	YopJ bloquea la respuesta inflamatoria por inhibición de NF- κ B y rutas MAPK
YopP	<i>Yersinia enterocolitica</i>	TRAF6, NEMO	NEMO y TRAF6 K63-poli-Ub	Previene la degradación de IkBa	Desubiquitinasa	YopP bloquea la respuesta inflamatoria por inhibición de NF- κ B y rutas MAPK
YopP	<i>Yersinia enterocolitica</i>	TAK1, TAB1	?	?	Une TAB1 para inhibir la actividad TAK1. Afecta la ubiquitinación de TAB1 y TAK1	Bloquea la respuesta inflamatoria por inhibición de NF- κ B y rutas MAPK

TABLA 2
TOXINAS QUE MODIFICAN LA ACTIVACIÓN DE MAPK EN LA ACTIVACIÓN DE NFκB

Toxina	Bacteria que la secreta	Proteína blanco del hospedero	Mecanismo de acción del efector	Papel en la virulencia bacteriana
Yop J	<i>Yersinia</i>	MEK6, MEK2	Acetilación y prevención de la fosforilación	Disminuye la respuesta inmune
YopJ	<i>Yersinia</i>	IKK α y β	Acetilación y prevención de la fosforilación	Inhibe la síntesis de factores antiapoptóticos
IpaH9.8	<i>Shigella</i>	MEK (Ste7)	Ubiquitinación de U2AF35	Disminución de la inflamación
SptP	<i>Salmonella</i>	Raf-1	?	Inhibe la activación de MAPK 42/44 vía Raf
SspH	<i>Salmonella typhimurium</i>	PKN1	Ubiquitinación de PKN1	Interviene en la señalización de NFκB

Los procesos de regulación de los eventos de UB-DUB en los que participan las toxinas bacterianas intervienen en la respuesta inflamatoria teniendo como consecuencia la inhibición de NFκB. Otra de las cascadas involucradas en la regulación de éste factor de transcripción son las MAPK y a continuación se analiza lo que se ha estudiado de estos mecanismos hasta ahora y en la Tabla 2 se enlistan las toxinas que afectan a esta vía.

LA FAMILIA DE LAS MAPK CINASAS

De manera breve se puede decir que una vez que los receptores a los PAMP se activan, se desencadena la fosforilación secuencial que lleva a la activación de las MAPK p38.

La cascada de MAPK, está integrada por 3 componentes secuenciales que se activan por fosforilación: las proteínas llamadas proteínas cinasas de las cinasas de MAPK (MAP3-K), que activan a las MAP 2- cinasas (MAP2K), que a su vez activan a las MAPK. Todas tienen como característica general un motivo de TXY, difieren entre ellas por el aminoácido intermedio. La fosforilación de la T y la Y dentro del asa de activación es necesaria para que se encuentren en su forma activa. Las MAPK se dividen en tres familias principales: a) las originalmente denominadas cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK1/2 o p42/44), cuyo dominio de modulación es TEY, esta gran familia se divide en 2 grupos: ERK1 y ERK2, y el otro grupo conformado por: ERK3, ERK5, ERK7 y ERK8, estas últimas consideradas como las cinasas de gran tamaño pues sus pesos radican entre 60 y 100kD. b) las cinasas p38 (incluyen a la α, β, γ y δ) con un dominio de activación TGY. c) las

cinasas del amino terminal de c-Jun (JNK) que contienen la secuencia TPY como dominio de activación y se dividen en JNK1, JNK2 y JNK3.

La respuesta a la activación de los receptores a PAMP inicia con el encendido de las dos MAP3K: las cinasas-1 activadas por el factor de crecimiento transformante β (TAK1) y las cinasas del linaje mixto (MLK), las que son reclutadas por el factor-6 asociado al receptor de TNF (TRAF6) para su activación. El siguiente eslabón en la cascada corresponde a las MAP2K 3/6, que fosforilan a la MAPK p38.

INHIBICIÓN DE LA VÍA DE SEÑALIZACIÓN DE MAPK

OspF. Es una toxina producida por *Shigella flexneri*, una bacteria intracelular facultativa que afecta al humano causándole diarrea severa; la toxina es inyectada a la célula blanco por medio del TSS3 o inyectosoma. Esta toxina entre sus diferentes acciones tiene actividad de fosfotreonina liasa en la cascada de las MAPK, lo que implica que hidroliza al fosfohidroxilo del residuo de fosfotreonina del sitio activo de la cinasa. Esta acción no solo previene la activación de la MAPK, sino que además evita que ésta se realice posteriormente, pues deja al residuo de treonina sin el hidroxilo fosforilable y por lo tanto, mientras la proteína no se recambie no será sensible a la activación. Esta acción difiere de las vías convencionales de regulación de las MAPK, llevada a cabo por las fosfatasa, pues en este caso la fosforilación resultante dependerá de la velocidad de reacción hacia un lado u otro de la vía, mientras que la acción de la liasa es irreversible. OspF tiene como blanco a p42/44 y p38 a tiempos cortos (30 min), mientras que

JNK puede ser inactivada pero a tiempos mas largos (3 h), en el sistema sustituto de levaduras puede tener como blanco al equivalente de p42/44 (KSS1 y FUS3) o de p38 (HOG1) y a SLT2 que participa en la formación de la pared celular, sin equivalente aparente en células animales (11). Otra toxina con posible actividad de liasa es la SpvC de *Salmonella*.

INTERFERENCIA CON REACCIONES CASCA-DA ARRIBA DE MAPK

La toxina Yop J, suprime la respuesta inmune por medio de la acetilación del sitio activo de las cinasas de las cascadas de MAPK y de NFκB y por tanto previene su activación. Yop J acetila los residuos S y T del asa de activación de MAP2K6 (12), también acetila dos residuos S en la MAP2K y un residuo de T conservado en las IKKα y β (13). La inhibición cascada arriba de MAPK, previene entonces su activación y el encendido de genes como el que codifica para la IL8 que participan en el proceso inflamatorio.

SptP es una toxina de *Salmonella* que inhibe la activación de MAPK42/44 mediada por Raf-1, que es una MAP3K (14). La SptP contiene dos dominios funcionales independientes: el amino terminal tiene función activadora de GTPasa (GAP) y el extremo carboxilo contiene la actividad de fosfatasa de Y (15). Ambos dominios se requieren para que realice su función, aunque se desconoce exactamente si la interferencia de la toxina es por inhibición de la actividad de cinasa de la MAP3K o de la MAP2K. Es de interés determinar la participación de Raf-1 en la respuesta inmune para dar cuenta de la especificidad de SptP, pues la toxina no interfiere con la activación de MAPK42/44 mediada por las MAP2K 1/2.

CONCLUSIÓN

La eliminación de patógenos es uno de los procesos que regula la inmunidad innata. El primer

evento en este proceso es el reconocimiento de regiones específicas de éstos mediante receptores, el siguiente evento es la cascada de señalización que transduce esta señal, para que en tercer lugar se promueva la respuesta inflamatoria. Es la transducción de señales el evento que se ve interrumpido por toxinas bacterianas, puesto que una de sus estrategias es interferir y/o mimetizar los procesos de UB-DUB. La interferencia de las toxinas en la vía de la Ub, impide la degradación de las proteínas que inhiben la respuesta inflamatoria (ie. IKKβ), y protege a algunas proteínas bacterianas marcadas para su degradación. El conocimiento de este mecanismo de acción patógena bacteriana es relativamente nuevo y el número de toxinas que tienen ésta función va en aumento. Algunas toxinas como YopJ inhiben además la vía de activación de MAPK en el marco de la respuesta inflamatoria, pues evitan la activación de NFκB y por tanto la síntesis de IL. Algunas toxinas contienen, dentro de su estructura, más de una función como es el caso de YopJ, lo que fortalece su virulencia por varios flancos que posiblemente estén participando en diferentes estadios de la infección. Se desconoce si estos mecanismos de acción de las toxinas bacterianas son exclusivos para aquellas que entran directamente en contacto con el interior de las células, pertenecientes al TSS3/4, pues son hasta ahora de las que se ha reportado. El conocimiento de los efectos que las toxinas bacterianas tienen sobre sus hospederos permitirá eventualmente establecer terapias más eficaces, para combatir las infecciones, y para evitar los daños que se generan como secuelas de la infección bacteriana.

Agradecimientos. Agradecemos la lectura crítica a este trabajo de las Doctoras Claudia González Espinosa y Bertha González Pedrajo, el que se realizó con el apoyo parcial del donativo DGAPA IN224606. 

REFERENCIAS

1. Amerik AY, Hochstrasser M (2004) Mechanism and function of deubiquitinating enzymes. *Biochim Biophys Acta* 1695:189-207.
2. Cambronne ED, Roy CR (2006) Recognition and Delivery of Effector Proteins into Eukaryotic Cells by Bacterial Secretion Systems. *Traffic* 7:929-939.
3. Zhang Y, Dong C (2005) MAP Kinases in Immune Responses. *Cell Mol Immunol* 2:20-27.
4. Rohde JR, Breitskreutz A, Chenal A, Sansonetti PJ, Parsot C (2007) Type III secretion effectors of the IpaH family are E3 ubiquitin ligases. *Cell Host & Microbe* 1:77-83.
5. Rosenberger CM, Finlay BB (2003) Phagocyte sabotage: disruption of macrophage signaling by bacterial pathogens. *Mol Cell Biol* 4:385-396.
6. Orth K, Xu Z, Mudgett MB, Bao ZQ, Palmer LE, Bliska JB, Mangel WF, Staskawicz B, Dixon JE (2000) Disruption of signaling by *Yersinia* effector YopJ, a ubiquitin-like protein protease. *Science* 290:1594-1597.
7. Rytönen A, Poh P, Garmendia J, Boyle C, Thompson A, Liu M, Freemont P, Hinton JCD, Holden DW (2007) SseL, a *Salmonella* deubiquitinase required for macrophage killing and virulence. *Proc Natl Acad Sci USA* 104:3502-3507.
8. Misaghi S, Balsara ZR, Catic A, Spooner E, Ploegh HL, Starnbach MN (2006) *Chlamydia trachomatis* -derived deubiquitinating enzymes in mammalian cells during infection. *Mol Microbiol* 61:142-150.
9. Arbibe L, Kim DW, Batsche E, Pedro T, Mateescu B, Muchardt C, Parsot C, Sansonetti PJ (2007) An injected bacterial effector targets chromatin access for transcription factor NF-kappaB to alter transcription of host genes involved in immune responses. *Nat Immunol* 8:47-56.
10. Collier-Hyams LS, Sloane V, Batten BC, Neish AS (2005) Cutting edge: Bacterial modulation of epithelial signaling via changes in neddylation of cullin-1. *J Immunol* 175:4194-4198.
11. Angot A, Vergunst A, Genin S, Peeters N (2007) Exploitation of eukaryotic ubiquitin signaling pathways by effectors translocated by bacterial type III and type IV secretion systems. *PLoS Pathog* 1:1-13.
12. Mukherjee S, Keitany G, Li Y, Wang Y, Ball HL, Goldsmith EJ, Orth K (2006) *Yersinia* YopJ acetylates and inhibits kinase activation by blocking phosphorylation. *Science* 312:1211-1214.
13. Mittal R, Peak-Chew SY, McMahon HT (2006) Acetylation of MEK2 and I kappa B kinase (IKK) activation loop residues by YopJ inhibits signaling. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:18574-18579.
14. Li H, Xu H, Zhou Y, Zhang J, Long C, Li S, Chen S, Zhou JM, Shao F (2007) The phosphothreonine lyase activity of a bacterial type III effector family. *Science* 315:1000-1003.
15. Stebbins CE, Galan JE (2001) Structural mimicry in bacterial virulence. *Nature* 412:701-705.

Pet Induces IL1, TNF α , MIF and IL1Ra Through the IKK α β /NF κ B Pathway

Alejandro Benitez-Guzmán¹, Carlos Eslava², Claudia González-Espinosa³ and M. Eugenia Torres-Márquez^{*1}

¹Biochemistry and ²Public Health Departments, School of Medicine, Apdo. Postal 70-159, 04510 DF, UNAM, Mexico

³Pharmacobiology Department, Center for Investigation and Advanced Studies, IPN, South Campus, Mexico City, Mexico

Abstract: Plasmid encoded protein (Pet), a product of *E. coli*, infiltrates leukocyte in experimental models and acts on macrophages as a chemokine. As an immune response orchestrator, macrophages play an important role in inducing pro-inflammatory cytokines. In this work, we tested whether in macrophages Pet stimulates the expression of IL1, TNF α , MIF and the antagonist IL1Ra. We also sought the IKK α β /NF κ B pathway as a possible mediator. We found that indeed Pet increases the mRNA of inflammatory cytokines and the antagonist IL1Ra with different rates and kinetics through the IKK α β /NF κ B pathway, which could be consistent as a factor in chronic inflammation.

Keywords: Plasmid encoded protein, inflammation, signal transduction, IBD, macrophage.

INTRODUCTION

Serin proteases, of the *Enterobacteriaceae* family (SPATES), share homology and are widely distributed. They are secreted by all filogenetic groups, A,B1,B2, D and E; of *E. coli* [1, 2]. Plasmid encoded protein (Pet) is a member of SPATES within the IgA1 proteases subfamily. It is reportedly a byproduct of the O42 strain of enteroaggregative *Escherichia coli*, encoded in a 65MDa plasmid related to protein adherence that has a molecular weight of 108 kDa [3]. Pet acts as a chemokine for macrophages [4] process with great relevance for inflammation. Aerobic cultures of colon obtained from IBD, Crohn's disease and colon cancer patients showed a striking increase in bacteria where half were *E. coli* [5].

By secreting cytokines that stimulate the immune response, macrophages actively participate in inflammatory bowel diseases (IBD), such as ulcerative colitis and Crohn's disease [6]. Cytokines, interleukin (IL) IL1, tumor necrosis factor α (TNF α), macrophage migration inhibitory factor (MIF) and the antagonist of interleukin-1 receptor (IL1Ra) have been found to participate in IBD [7, 8], where toll-like receptor (TLR) seem to trigger their secretion. TLR signaling implies the activation of inflammasomes and/or transcription factors such as NF κ B to stimulate the production of the inflammatory cytokines and cytokine antagonist mentioned earlier [9-11]. The IKK α β are essential components upstream of the NF κ B canonical pathway. When the kinase complex is activated, it phosphorylates the I κ B, regulatory proteins of NF κ B,

enabling its release and further translocation to the nucleus. Once in the nucleus, NF κ B promotes the gene expression of inflammation cytokines or other genes involved in survival, apoptosis and cell division [12].

In the present work we report that Pet induces the expression of cytokines, IL1, TNF α , MIF and the antagonist IL1Ra through the IKK α β /NF κ B pathway. This would suggest that *E. coli* toxins, such as Pet, are important contributing factors to the establishment of inflammation and IBD.

MATERIAL AND METHODS

Cell Cultures

Cells of the murine macrophage line J774 were grown in RPMI medium (cat. R6504 Sigma, USA), supplemented with 2 mM glutamine (Cat. 25030-149, Gibco USA), 1mM non-essential aminoacids (Cat. 111450, Gibco USA), 1mM sodium pyruvate (Cat. 11360070, Gibco USA), and 10% FBS (Cat. 10437010, Gibco USA).

Pet Purification

The Pet clone pCEFNI was grown in LB broth. The Pet purification procedure was performed as described by Villaseca *et al.* [13] with only slight modifications. The modification consisted of concentrating the protein, using the 50kDa Amicon Ultra-15 membrane (cat. UFC 905024, Millipore USA), before filtration through the anionic exchange column. Pet and media used through the experiments contained <0.125EU/ml endotoxin/LPS (data not shown).

Chemotaxis

Chemotaxis experiments were carried out in a Boyden's chamber as described by Morales *et al.* [14]. We used

*Address correspondence to this author at the Biochemistry Department, School of Medicina, UNAM, Apdo. Postal 70-159, 04510 DF, México; Tel: (5255) 56232510; Fax: (5255) 56162419; E-mail: metorres@servidor.unam.mx, torresmarquez@gmail.com

macrophages instead of monocytes. However the same conditions in terms of cell number (8×10^5), Pet concentration (5.8 $\mu\text{g/ml}$) and time (90 min), were applied.

RNA Protection Assay (RPA)

The mRNA was obtained from 8×10^5 cells previously incubated with 20 $\mu\text{g/ml}$ cycloheximide and then exposed to serum-free media containing 200 ng/ml of Pet for 10 and 30 min, and for 1, 3, 6, 12, and 24 h. The cells were then lysed with Trizol (cat. 10296-028 Invitrogen USA), and RNA was extracted with RNAeasy mini kit (cat. 74104, Qiagen USA), according to manufacturer instructions.

Complementary RNA for the mCK-2b and mCK-3b Multi-Probe Templates Sets (cat 556156, 556158) were synthesized, starting with 10 ng of probe template, by means of kit 556850, in the presence of ^{32}P -UTP, according to manufacturer instructions. The mix where the reaction took place contained 10 μg of RNA and all procedures followed the manufacturer's instructions on kit 556134 from Pharmingen (BD, USA). Protected fragments were subjected to a 6% PAGE containing 40% urea all dissolved in TBE. The gels were dried, exposed to phosphorimager plates and read by Typhoon equipment for analysis. The quantification was performed by Biorad software Lab Works (Cambridge UK). The results are expressed as a ratio of cDNA of cytokine/cytokine antagonist to cDNA of the housekeeping ribosomal protein L32.

IKK α Detection

The J774 cells (8×10^5 /dish) were incubated for 36 hours, then exposed at indicated times to serum-free medium containing 200 ng/ml Pet. Cells were lysed with a Laemmli buffer. Proteins were separated by SDS-PAGE at 8% and transferred to PVDF membranes. The IKK α were detected by means of the antibody anti- pS176/pS180 IKK α (cat. 2697, Cell Signaling USA) and ECL. The control load was monitored with an anti-actin Ab (cat. sc-8432, Sta Cruz Biotechnol USA). NF κ B pathway inhibition experiments were performed using 10 μM surfactin from *Bacillus subtilis* (cat. S3523, Sigma USA), dissolved in serum-free medium and pre-incubated for 2 h prior to Pet cell exposure.

RESULTS

Under *In vitro* conditions we found that in our cell line model from murine mice Pet indeed is a potent chemoattractant (Fig. 1), as has been shown for human macrophages.

Pet Induces Expression of MIF, IL1, TNF α , and IL1Ra mRNAs

Pet has been shown to induce leukocyte infiltration in a rat intestinal loop model, suggesting a possible inflammatory process [15]. The inflammation is mainly orchestrated by macrophages and dendritic cells [16], and IL secretion by macrophages one of the major contributing events [17]. Hence, we decided to explore whether Pet was able to induce the production of pro-inflammatory and anti-inflammatory IL in macrophages. In Fig. (2) it can be observed that IL1, MIF, TNF α and IL1Ra mRNAs are produced after the addition of Pet to the cells. The IL10 expression was without modification. Basal expression levels are quite different, with TNF α and MIF more abundant than IL1 or IL1Ra. It

can also be observed that indeed Pet triggers the three cytokines and the cytokine antagonist with different kinetics. The fastest cytokine induced by Pet was TNF α , starting at 10 min (1.8 fold over basal) and strongly sustained for 3 h, before returning to its basal level. Pet induced the expression of MIF to peak between 20 and 30 min (48% over basal) reaching 60% over basal at 3 h, a response that was sustained for 12h. The kinetics for IL1 expression increases two fold over basal at 30 min, and reaches a four-fold increase by the third hour of stimulation, and finally a slight decrease at 12 h post-stimulation. Pet also induces IL1Ra expression starting at 3 h post-stimulation, and up to a six fold over basal stimulation; by the 12 h post Pet stimulus.

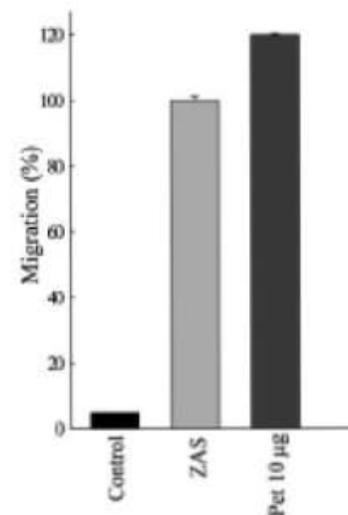


Fig. (1). Pet stimulates chemotaxis in J774 macrophages. Cells were stimulated without or with 10 μg of Pet or 40 mg/ml of zymosan-serum (ZAS) in serum-free medium. The results are expressed as percentage of ZAS-induced response and represent the average \pm SE of two different experiments performed by duplicate.

Pet Stimulates the Activation of IKK α

NF κ B is one of the most common pathways to stimulate the cytokine secretion [18]. The canonical pathways involve the upstream activation of IKK α complex by the phosphorylation of the Ser 177 and 181 for IKK β , and Ser 176 and 180 for IKK α [19]. In order to test whether Pet is capable of stimulating this pathway we exposed macrophages at different times with the toxin and determined the phosphorylation of the kinases with specific antibodies. It was observed (Fig. 3) that IKK α phosphorylation was present 5 min after incubation with Pet. The activation peak (four fold) was reached at 1 hour. The activity is brought to almost basal levels after 3 h of incubation with Pet.

NF κ B Pathway Mediates Pet-Induced Cytokine and Cytokine Antagonist Expression

To correlate the Pet-induced cytokine and IL1Ra expression with the IKK α /NF κ B pathway, we used the *Bacillus subtilis* protein surfactin as an inhibitor [20] of the IKK α /NF κ B pathway, we examined the effects it might

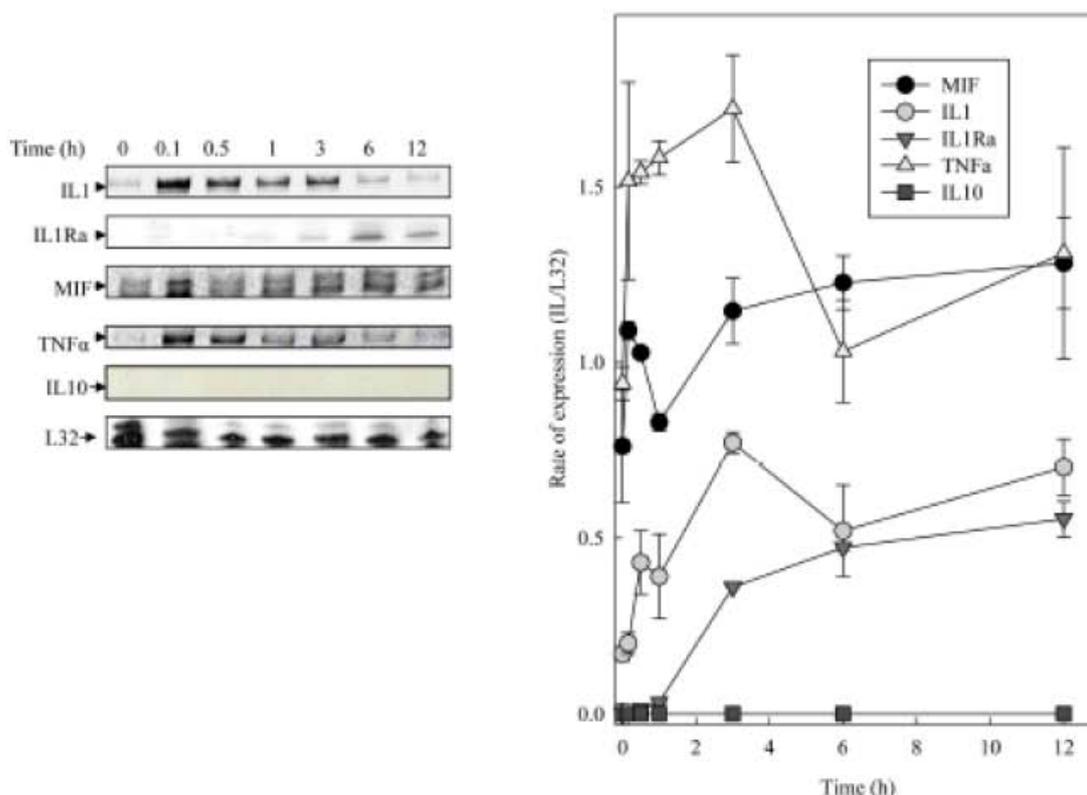


Fig. (2). Pet stimulates MIF, IL1, TNF α and IL1Ra expression in J744 macrophages. Cells were incubated without or with 200 ng Pet prot/ml at indicated times in serum-free medium. Cytokines and antagonist IL1Ra mRNA expression was determined by RPA. The values obtained from densitometries of bands are expressed as the ratio of the gene in study/L32. The results represent the average \pm SE of three different experiments.

have on the inflammatory cytokines expression. In Fig. (4A) we observed that macrophage pre-incubation with surfactin inhibits the IKK α phosphorylation induced by Pet. At the same time, it inhibits the Pet-induced expression of MIF (Fig. 4B), TNF α (Fig. 4C), IL1 (Fig. 4D), and IL1Ra (Fig. 4E). These data strongly suggest that Pet induced expression of the pro-inflammatory cytokines, MIF, TNF α and IL1, as well as the antagonist IL1Ra is mediated by the IKK α /NF κ B pathway.

DISCUSSION

Pet Stimulates the Production of Cytokine and IL1Ra mRNAs

Leukocyte infiltration has been observed in a rat intestinal loop model inoculated with Pet, which suggests inflammation of the bowel [15]. *In vitro*, Pet has shown chemotactic properties in human macrophages [4] and in mice macrophages (this work) which could account for the attraction of cells to the site of the tissue damage. Macrophages are key to the immune response [16], hence our interest in knowing how Pet affects their activities. Inflammatory (pro- and anti-inflammatory) cytokine

production, such as IL1, TNF α and MIF, IL10, and the antagonist IL1Ra is one of the outstanding events that take place during the macrophage inflammatory response [21, 22]. We found that Pet represented a high intensity inflammatory stimulus with effects ranging from nearly half to six times over basal, for IL1, TNF α , MIF. It also stimulated the production of the antagonist IL1Ra, yet the kinetics of such event would suggest that the extended effect of Pet on the macrophages is due to the autacoid effect, that results from its own IL1 production. The production of IL1Ra regulates local effects of IL1 in endometrial cells [23]. IL1Ra is produced after IL1 induction by a different inflammatory stimulus, such as traumatic brain injury [24]. It is worth noting that Pet did not affect the expression of the anti-inflammatory IL10, which suggests that by generating a cellular response, rather than a Th1 [25], it is behaving as an inflammatory stimulus.

The contribution of each cytokine varies. Perhaps an increase in MIF expression could lead to a chronic stimulation pattern on the macrophage. Mitchell *et al.* [26] have demonstrated that MIF delays macrophage apoptosis: extending its active half-life. As a consequence of half-life

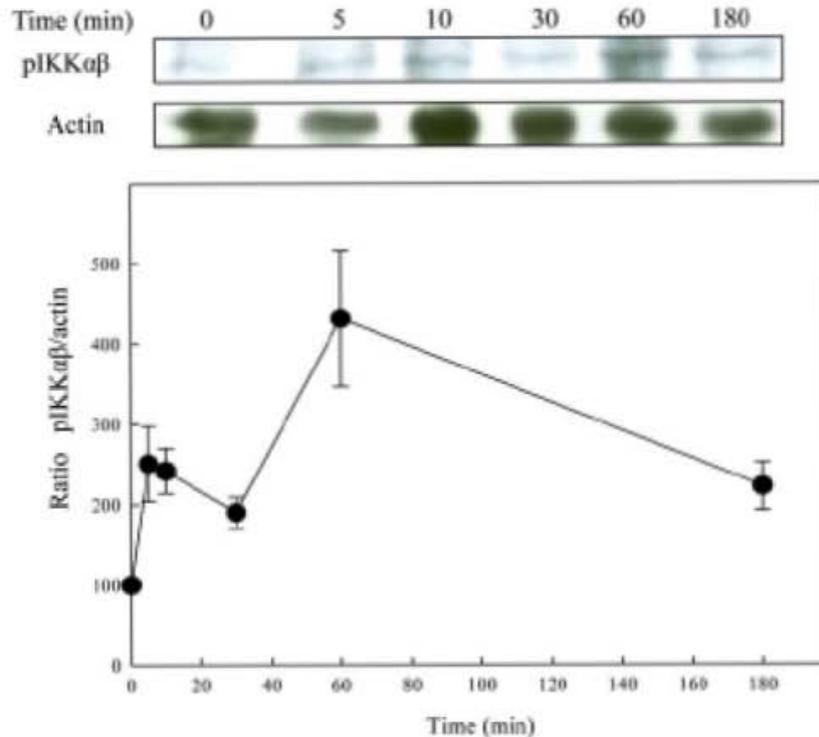


Fig. (3). Pet activates IKKαβ in J744 macrophages. Macrophages were incubated with or without 200 ng Pet prot/ml at the indicated times in serum free medium. Then cells were lysed and subjected to SDS-PAGE electrophoresis, and transferred to PVDF membranes. The resulting pThr-IKKα/pThr-IKKβ was determined as described in Methods. Protein content load was monitored with an anti-actin Ab. The results are representative of 3 different experiments and are expressed as the ratio of pIKKαβ/actin.

increase, other functions are sustained (such as production of IL1), extending the inflammatory process. MIF secretion in macrophages was also induced by the staphylococcal toxic shock syndrome (TSS) toxin 1 (TSST-1) and the streptococcal pyrogenic exotoxin [27]. Interestingly, Staphylococcal and Streptococcal bacteria or their toxins have also been implicated in chronic inflammation pathologies [28].

Pet stimulates an interesting concerting effect on the classical pro-inflammatory cytokines TNFα and IL1. The expression of TNFα started very early and was sustained at least until 3h. While IL1 peaked at 3 hours of Pet stimulation and was sustained for twelve hours. A different kinetics with relevance to the temporary effects was observed in the dextran sulfate sodium colitis-induced mouse model, where TNFα and IL1 were stimulated at acute and chronic models, however, TNFα sustained production was indispensable for the chronic phase [29]. The pattern of IL1/IL1Ra expression was similar to the one triggered by LPS in another report [30]. The balance of IL1/IL1Ra assumes the role of inflammation regulator [31]. In chronic diseases it is important to keep inflammation within a manageable range, hence the need for the IL1/IL1Ra balance; given that IL1Ra binds directly to the IL1 receptor and is capable of avoiding the exacerbation of the response [32, 33]. IBD patients have shown IL1/IL1Ra imbalance [34].

NFκB Mediates the Cytokine and the Antagonist IL1Ra Expression Induced by Pet

NFκB is the classic pathways to stimulate cytokine production. The canonical pathway that leads to NFκB activation involves the participation of IKKαβ [35]. We found that Pet activated IKKαβ and that its activation was sensitive to surfactin. This inhibitor of the NFκB pathway diminished the Pet stimulated cytokine induction, which suggests that the Pet effect is mediated through NFκB. Surfactin abating effects on IL1 induction by LPS have been reported [20]. The effect of surfactin on IL1Ra expression could be a consequence of its effect on IL1 production, i.e. blocking the autacoid effect. The pattern of MIF, TNFα, IL1 induction by Pet, mediated by the NFκB, suggests that Pet could contribute to chronic inflammation. The role of key nodes for IL1, TNFα and NFκB has been found in different chronic inflammatory diseases linked to cancer [36, 37]. Furthermore, SPATES have been found in patients suffering from Crohn's disease and ulcerative colitis [38, 39]. In Crohn's disease and other IBD, the biota population dynamics is disrupted and the homeostasis is broken [39-41]; where *E. coli* is one of the most abundant species [42, 43]. Perhaps its participation is largely due to their secreted toxins.

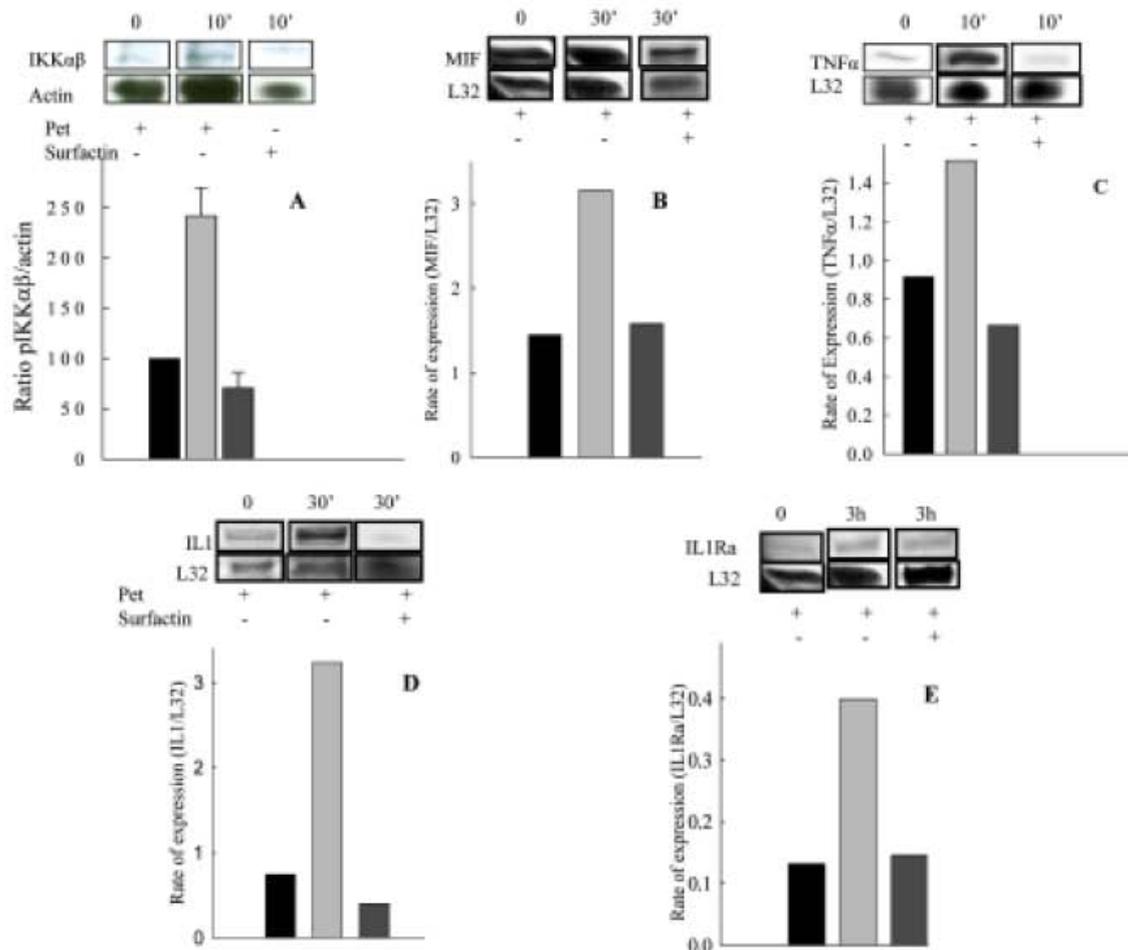


Fig. (4). Surfactin inhibits both IKK $\alpha\beta$ activation, and expression of MIF, TNF α , IL1 and IL1Ra. Cells in serum free medium, were pre-incubated with or without 10 mM surfactin for 2 hours and then challenged with 200 ng Pet prot/ml at the indicated times. The results are representative of 2 or 3 different experiments and are expressed as the ratio of pIKK $\alpha\beta$ /actin (A), or MIF/L32 (B), TNF α /L32 (C), IL1/L32 (D) or IL1Ra/L32 (E) expression.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was partially supported by Grants IN219508-DGAPA to ME T-M, 82755-CONACYT to C.E. A B-D is a recipient of a graduate CONACYT fellowship. We thank for LM Rocha for her assistance to perform the *Limulus* amebocyte and chemotaxis assays. The authors are indebted to J. Mitchell for the English edition of this paper.

REFERENCES

- [1] Escobar-Piramo P, Clermont O, Blanc-Potard A-B, Bui H, Le Bongnocq C, Deumur E. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 2004; 21(6): 1085-94.
- [2] Boisen N, Ruiz-Perez F, Schantz F, Krogfelt K, Nataro JP. Short report: high prevalence of serine protease autotransporter cytotoxins among strains of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Am J Trop Med Hyg* 2009; 80(2): 294-301.
- [3] Eslava C, Navarro-Garcia F, Casaculin JR, Henderson IR, Crivoto A, Nataro JP. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1998; 66(7): 3155-63.
- [4] Hernandez-Chifas U, Gezanian T, Gezanian K, Mendoza-Hernandez G, Nicolson-Cortes J, Carlos E. Peptide sequences identified by phage display are immunodominant functional motifs of Pet and Pic serine proteases secreted by *Escherichia coli* and *Shigella flexneri*. *Peptides* 2009; 30(12): 2127-35.
- [5] Kodowski R, Bernstein CN, Sepseni S, Krause DO. High prevalence of *Escherichia coli* belonging to the B2-D phylogenetic group in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56(5): 669-75.
- [6] Danese S, Mantovani A. Inflammatory bowel disease and intestinal cancer: a paradigm of the Yin-Yang interplay between inflammation and cancer. *Oncogene* 2010; 29(23): 3313-23.
- [7] Sanchez-Munoz F. Role of cytokines in inflammatory bowel disease. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(27): 4280-8.
- [8] Shah YM, Ito S, Morizawa K, et al. Hypoxia-inducible factor segments experimental colitis through an MIF-dependent inflammatory signaling cascade. *Gastroenterology* 2008; 134(7): 2036-48.

[9] Marzimon F, Chen X, Lee A-H, Glimcher LH. TLR activation of the transcription factor NBP1 regulates innate immune responses in macrophages. [Internet]. *Nat Immunol* 2010; 11(7): 411-8.

[10] Tsuchiya A, Inai K, Asanuma K, Wajuzi-nagaya Y, Otsuka T. Inhibition of inflammatory cytokine production from rheumatoid synovial fibroblasts by a Novel I B Kinase Inhibitor. *J Pharmacol Exp Ther* 2010; 333(1): 236-43.

[11] Liu SF, Malik AB. NF-kappa B activation as a pathological mechanism of septic shock and inflammation. *Am J Physiol* 2006; 290(4): L622-L43.

[12] Hacker H, Karin M. Regulation and function of IKK and IKK-related kinases. *Science's STKE* 2006; 2006(357): re13.

[13] Villaseca JM, Navarro-Garcia F, Maudon-Hernandez G, Nataro JP, Cravioto A, Eslera C. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect Immun* 2000; 68(10): 5920-7.

[14] Morales ME, Rico G, Gomez JL, et al. Could the homologous sequence of anti-inflammatory pentapeptide (MLIF) produced by *Entamoeba histolytica* in the N protein of rabies virus affect the inflammatory process? *Parasitol Res* 2006; 98(3): 232-6.

[15] Sainz T, Perez J, Fresan MC, et al. Histological Alterations and Immune Response Induced by Pet Toxin During Colonization with Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) in a Mouse Model Infection. *J Microbiol* 2002; 40(2): 91-7.

[16] Bilsborough J, Vinay JL. Gastrointestinal dendritic cells play a role in immunity, tolerance, and disease [Internet]. *Gastroenterology* 2004; 127(1): 300-9.

[17] Kaiser P, Rothwell L, Avery S, Bahn S. Evolution of the interleukins. *Dev Comp Immunol* 2004; 28(5): 375-94.

[18] Lawrence T. The nuclear factor NF-kappaB pathway in inflammation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2009; 1(6): a001651.

[19] Israel A. The IKK Complex, a Central Regulator of NF-kappaB Activation. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 2010; 2(3): a000158.

[20] Byeon SE, Lee YG, Kim BH, et al. Surfactin blocks NO production in lipopolysaccharide-activated macrophages by inhibiting NF-kappaB activation. *J Microbiol Biotechnol* 2006; 18(12): 1984-9.

[21] Rogier T, Glauser MP, Calandra T. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) modulates innate immune responses induced by endotoxin and Gram-negative bacteria. *J Endotox Res* 2001; 7(6): 456-60.

[22] Kiemer AK, Vollmar AM. The aryl natriuretic peptide regulates the production of inflammatory mediators in macrophages. *Ann Rheum Dis* 2001; 60(Suppl 3): iii68-70.

[23] Bellehumeur C, Blanchet J, Fournier J-Y, Bourcier N, Akoum A. Interleukin 1 regulates its own receptors in human endometrial cells via distinct mechanisms. *Hum Reprod (Oxford, England)* 2009; 24(9): 2193-204.

[24] Helmy A, Carpenter KLH, Menon DK, Pickard JD, Hutchinson PJ a. The cytokine response to human traumatic brain injury: temporal profiles and evidence for cerebral paracrine production. *J Cereb Blood Flow Metab* 2011; 31(2): 658-70.

[25] Geerts JA, Algood SHM, Olivares-Villagomez D, et al. KSR1 protects from interleukin-10 deficiency-induced colitis in mice by suppressing T-lymphocyte interferon-gamma production. *Gastroenterology* 2011; 140(1): 265-74.

[26] Mitchell R, Liso H, Chesney J, et al. Macrophage migration inhibitory factor (MIF) sustains macrophage proinflammatory function by inhibiting p33: regulatory role in the innate immune response. *Proc Natl Acad Sci USA* 2002; 99(1): 345-50.

[27] Calandra T, Spiegel LA, Metz CN, Bucala R. Macrophage migration inhibitory factor is a critical mediator of the activation of immune cells by exotoxins of Gram-positive bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 1998; 95(19): 11383-8.

[28] Tripathi A, Conley DB, Graumier LC, et al. Immunoglobulin E to staphylococcal and streptococcal toxins in patients with chronic sinusitis/nasal polyposis. *The Laryngoscope* 2004; 114(10): 1822-6.

[29] Kojouharoff G, Hans W, Oberbauer F, et al. Neutralization of tumour necrosis factor (TNF) but not of IL-1 reduces inflammation in chronic dextran sulphate sodium-induced colitis in mice. *Clin Exp Immunol* 1997; 107(2): 353-8.

[30] Molinari N, Gruez L, Dayer J-M, Burger D. Opposite regulation of IL-1beta and secreted IL-1 receptor antagonist production by phosphatidylinositol-3 kinases in human monocytes activated by lipopolysaccharides or contact with T cells. *J Immunol* 2007; 178(1): 446-54.

[31] Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev* 2002; 13(4-5): 323-40.

[32] Papadakis K. Role of cytokines in the pathogenesis of inflammatory bowel disease. *Annu Rev Med* 2000; 98(1): 1010-298.

[33] van den Berg WB. Arguments for interleukin 1 as a target in chronic arthritis. *Ann Rheum Dis* 2000; 59(Suppl 1): i81-4.

[34] Ludwiczek O, Vauzier E, Borggraves I, et al. Imbalance between interleukin-1 agonists and antagonists: relationship to severity of inflammatory bowel disease. *Clin Exp Immunol* 2004; 138(2): 323-9.

[35] Karin M, Lin A. NF-kappaB at the crossroads of life and death. *Nat Immunol* 2002; 3(3): 221-7.

[36] Karin M, Greten FR. NF-kappaB: linking inflammation and immunity to cancer development and progression. *Nat Rev Immunol* 2005; 5(10): 749-59.

[37] Grivennikov SI, Greten FR, Karin M. Immunity, inflammation, and cancer. *Cell* 2010; 140(6): 883-99.

[38] Rhodes JM. The role of *Escherichia coli* in inflammatory bowel disease. *Gut* 2007; 56(5): 610-2.

[39] Eckburg PB, Rainan DA. The role of microbes in Crohn's disease. *Clin Infect Dis* 2007; 44: 256-62.

[40] Eckburg PB, Bik EM, Bernstein CN, et al. Diversity of the human intestinal microbial flora. *Science* 2005; 308(5728): 1635-8.

[41] Sartor RB. Microbial influences in inflammatory bowel diseases. *Gastroenterology* 2008; 134(2): 577-94.

[42] Darfeuille-Michaud a, Neut C, Barnich N, Lederman E, Di Martino P, Desreumaux P. Presence of adherent *Escherichia coli* strains in ileal mucosa of patients with Crohn's disease. *Gastroenterology* 1998; 115(6): 1403-13.

[43] Schwirz A, Jacobi M, Frick J-S, Richter M, Rasch K, Kohler H. Microbiota in Pediatric Inflammatory Bowel Disease. *J Pediatr* 2010; 157(2): 240-4.

Received: June 4, 2011

Revised: June 15, 2011

Accepted: July 28, 2011

© Bentzer-Gonzalez et al.; licensee Bentham Open.

This is an open access article licensed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>) which permits unrestricted, non-commercial use, distribution and reproduction in any medium, provided the work is properly cited.