



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

FACULTAD DE MEDICINA

“PROTEÍNAS DE *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA (EPEC)
QUE INTERACTÚAN CON CÉLULAS EPITELIALES”

T E S I S

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE
DOCTORA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS

P R E S E N T A:

M. ENC. SANDRA GAVILANES PARRA

TUTOR PRINCIPAL:

DR. H. ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ
Facultad de Medicina, UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dra. Yolanda López Vidal, Facultad de Medicina, UNAM
Dra. Emma Melendro Lozano, Facultad de Medicina, UNAM

México, D.F.

Abril de 2014



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

El presente trabajo se realizó en el **Laboratorio de Patogénesis Bacteriana del Departamento de Salud Pública, UNAM**, bajo la Dirección del **Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández**.

AGRADECIMIENTOS

A la **UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MÉXICO**, a través de la Facultad de Medicina, Departamento de Salud Pública, Laboratorio de Patogénesis Bacteriana.

Al PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS-UNAM.

Al PROGRAMA DE BECAS NACIONALES PARA ESTUDIOS DE POSGRADO de la **DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DGAPA)**, por la beca otorgada durante mis estudios de doctorado.

Al COMITÉ TÉCNICO DEL PROGRAMA DE APOYO A PROYECTOS DE INVESTIGACIÓN E INNOVACIÓN TECNOLÓGICA (PAPIIT), por el apoyo al Proyecto IN218011.

Al DEPARTAMENTO DE SALUD PÚBLICA, por la **ASIGNACIÓN PRESUPUESTAL**, otorgada al Dr. Ángel Manjarrez Hernández.

A mi Director de Tesis: **DR. H. ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ.**

A mi Comité Tutorial: **DRA. YOLANDA LÓPEZ-VIDAL, DRA. EMMA MELENDRO LOZANO y DR. ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ**, por su valiosa aportación de ideas y sugerencias durante mi doctorado.

A los Miembros de Jurado: **DR. AGUSTÍN PLANCARTE CRESPO, DR. JOSÉ LUIS PUENTE, DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO y DR. FERNANDO NAVARRO GARCÍA**, por la revisión de la tesis, sus valiosos comentarios y sugerencias.

ÍNDICE

1. RESUMEN	1
2. ABSTRACT	2
3. INTRODUCCIÓN	3
3.1 <i>E. coli</i> diarreagénicas.....	3
3.2 <i>E. coli</i> enteropatógena (EPEC).....	8
3.2.1 Modelo de patogénesis de EPEC.....	9
3.3 Mecanismos de protección mediados por IgA de leche materna.....	13
3.4 Inhibición a la adherencia bacteriana por IgA secretora (slgA).....	15
4. ANTECEDENTES	16
5. OBJETIVO	19
6. HIPÓTESIS	19
7. MATERIAL Y MÉTODOS	20
7.1 Cepas bacterianas.....	20
7.2 Anticuerpos.....	20
7.3 Muestras de leche	20
7.4 Métodos de preparación de las fracciones que se utilizarán en los ensayos de reconocimiento a células.....	21
7.4.1 Método de obtención de proteínas de superficie bacteriana.....	21
7.4.2 Preparación de la fracción de adhesinas.....	21
7.4.3 Método de obtención de proteínas de membrana externa (OMP).....	22
7.4.4 Purificación parcial de la proteína de 70 kDa de EPEC.....	22
7.4.5 Marcaje radioactivo de las bacterias.....	22
7.5 Preparación de los sueros utilizados en los ensayos.....	23
7.5.1 Preparación del suero anti-EPEC.....	23
7.5.2 Preparación del suero anti-70 kDa.....	23
7.5.2.1 Purificación de los anticuerpos anti-70 kDa.....	24

7.6 Metodología para los ensayos de adherencia de EPEC a células HEp-2.....	24
7.6.1 Cultivo celular.....	24
7.6.2 Ensayo de adherencia.....	24
7.6.3 Ensayo de inhibición a la adherencia bacteriana.....	25
7.6.4 Infección de células HEp-2 y detección de la lesión A/E.....	26
7.7 Metodologías para la detección de proteínas de EPEC que interactúan con las células HEp-2.....	27
7.7.1 Método de detección de proteínas de superficie y adhesinas de EPEC marcadas con metionina-[³⁵ S] que reconocen células epiteliales.....	27
7.7.2 Método de detección de proteínas de superficie y adhesinas de EPEC que reconocieron células HEp-2, detectadas por el suero anti-EPEC y slgA de leche materna.....	27
7.8 Método de identificación de proteínas transferidas por EPEC a las células HEp-2...	28
7.8.1 Crecimiento bacteriano, cultivo celular, condiciones de infección celular e inmunofluorescencia.....	28
7.8.2 Fraccionamiento celular y extracción de proteínas epiteliales.....	29
7.8.3 Ensayo de unión de proteínas a células HEP-2.....	30
7.8.4 Identificación de la proteína de 70 kDa de EPEC.....	30
8. RESULTADOS.....	31
8.1 Anticuerpos de slgA de leche materna reconocen proteínas en distintas cepas EPEC.....	31
8.2 Proteínas de EPEC que interactúan con células HEp-2 detectadas mediante el uso de anticuerpos slgA, suero anti-EPEC ó radio-ensayo.....	32
8.2.1 Obtención de una fracción de proteínas de superficie bacteriana.....	32
8.2.2 Inhibición a la adherencia de EPEC en células HEp-2 por proteínas de superficie bacteriana.....	33
8.2.3 Fracción enriquecida de adhesinas obtenida de E2348/69 inhibe la adherencia de EPEC a las células HEp-2.....	34
8.2.4 Diferentes estrategias para detectar proteínas de EPEC que se unan a las células epiteliales HEp-2.....	35

8.2.4.1 Proteínas de superficie bacteriana de EPEC se unen a células HEP-2.....	35
8.2.4.2 La fracción de adhesinas de EPEC reconocen células HEP-2.....	37
8.2.4.3 Cultivo de EPEC a 25°C	39
8.2.4.4 Anticuerpos purificados anti-70 kDa inhiben la adherencia de EPEC a células HEP-2.....	40
8.3 Proteínas transferidas por EPEC a células HEP-2 reaccionan con los anticuerpos sIgA de leche materna.....	41
8.3.1 Detección de las proteínas transferidas por EPEC a células HEP-2 diferentes fracciones celulares (citoplasmática, membrana y citoesquelética.....	42
8.3.2 Identificación de proteínas de EPEC en células HEP-2.....	46
8.3.3 Identificación de la proteína de EPEC de 70 kDa que se une a células HEP-2	49
8.3.4 Detección de una posible nueva proteína translocada de 115 kDa.....	52
9. DISCUSIÓN.....	54
10. REFERENCIAS.....	61

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Cepas EPEC productoras de la lesión A/E expresan tres proteínas de superficie, reconocidas por sIgA de leche materna.....	31
Tabla 2. Proteínas de superficie bacteriana inhiben la adherencia de EPEC a células HEp2.....	34
Tabla 3. Proteínas de una sub-fracción de adhesinas inhibieron la adherencia de EPEC en células HEp-2.....	35
Tabla 4. Proteínas de superficie bacteriana que se unieron a células HEp-2 en el ensayo de reconocimiento y detectadas por tres diferentes estrategias.....	36
Tabla 5. Proteínas de la fracción de adhesinas que se unieron a células HEp-2, detectadas por tres diferentes estrategias.....	38
Tabla 6. Efecto de la temperatura en la adherencia de EPEC a células HEp-2.....	39
Tabla 7. Anticuerpos específicos anti-70 kDa inhiben la adherencia de EPEC a células HEp-2.....	41
Tabla 8. Capacidad de los anticuerpos sIgA de inhibir la adherencia de EPEC a las células HEp-2.....	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1.- Patrones de adherencia de los diferentes patotipos de <i>E. coli</i> a las células epiteliales.....	7
Fig. 2.- Modelo de patogénesis de EPEC.....	10
Fig. 3.- Imagen de microscopía electrónica que muestra el fenotipo de adherencia localizada de EPEC a células HEP-2..	11
Fig. 4.- Imagen de microscopía electrónica de barrido donde se observa a EPEC infectando células HeLa.....	12
Fig. 5.- Microscopía electrónica de barrido de EPEC infectando células HeLa, donde se observa la formación de pedestal.....	13
Fig. 6.- Inmunotransferencia que muestra los controles del método de fraccionamiento bacteriano.....	33
Fig. 7.- Proteínas de superficie bacteriana de EPEC (cepa E2348/69) que se unieron a células HEP-2 durante el ensayo de reconocimiento.....	37
Fig. 8.- Proteínas de la fracción de adhesinas de EPEC (cepa E2348/69) que se unieron a células HEP-2 durante el ensayo de reconocimiento.....	38
Fig. 9.- Disminución de la expresión de la proteína de 70 kDa cuando la bacteria EPEC es crecida a 25°C.....	40
Fig. 10. Imágenes de inmunofluorescencia que muestra las bacterias adheridas a las células epiteliales cultivadas.....	42
Fig. 11.- Anticuerpos sIgA de leche materna reaccionan con proteínas que EPEC transfiere a la célula HEP-2.....	45
Fig. 12.- Identificación de intimina como blanco de sIgA en células infectadas con EPEC	47
Fig. 13.- Identificación de Tir en las fracciones de la célula HEP-2 infectadas con EPEC.	48
Fig. 14.- Identificación de EspB con anticuerpos sIgA en células infectadas con EPEC.....	49
Fig. 15.- Proteína de 70 kDa de EPEC se une a las células HEP-y es reconocida por la sIgA de leche materna.....	51
Fig. 16.- Electroforesis en gel de 2D mostrando la purificación de la proteína de 70 kDa..	52
Fig. 17.- Detección de un posible nuevo efector de EPEC inyectado en las células HEP-2.....	53

ABREVIATURAS

AA	Adherencia agregativa (del inglés A ggregative A dherence)
A/E	Lesión de adherencia y eliminación (del inglés A taching and E ffacing)
aEPEC	Cepas atípicas de EPEC
BFP	Fimbria tipo IV (del inglés B undle F orming P ilus)
CFA	Factor de colonización de antígenos
CT	Toxina del cólera (del inglés C holera T oxin)
DA	Adherencia difusa (del inglés D iffuse A dherence)
DAEC	<i>E. coli</i> de adherencia difusa (del inglés D iffusely A dherent <i>E</i> sch E richia <i>c</i> oli)
EAEC	<i>E. coli</i> enteroagregativa (del inglés E ntero a ggregative <i>E</i> sch E richia <i>c</i> oli)
EAF	Plásmido de virulencia EAF (del inglés E PEC A dherence F actor)
ECP	Pilus ECP (del inglés <i>E. coli</i> c ommon p ilus)
EHEC	<i>E. coli</i> enterohemorrágica (del inglés E nter h emorrhagic <i>E</i> sch E richia <i>c</i> oli)
EIEC	<i>E. coli</i> enteroinvasiva (del inglés E ntero i nvasive <i>E</i> sch E richia <i>c</i> oli)
EPEC	<i>E. coli</i> enteropatógena (del inglés E nter o phatogenic <i>E</i> sch E richia <i>c</i> oli)
EspB	Proteína EspB (del inglés <i>E. coli</i> S ecreted P rotein B)
EspC	Proteína EspC (del inglés <i>E. coli</i> S ecreted P rotein C)
ETEC	<i>E. coli</i> enterotoxigénica (del inglés E nter o toxigenic <i>E</i> sch E richia <i>c</i> oli)
Hsp-70	Proteína de choque térmico-70 (del inglés H eat- S hock P rotein Hsp-70)
HUS	Síndrome urémico hemolítico (del inglés H aemolytic U remic S yndrome)
LA	Adherencia localizada (del inglés L ocalized A dherence)
LAL	Similar a la adherencia localizada
LEE	Locus de eliminación del enterocito (del inglés L ocus of E nterocyte E ffacement)
LT	Enterotoxina termo-lábil (del inglés heat- L abile)
N-WASP	proteína N-WASP (del inglés N eural- W iskott- A ldrich s índrome p rotein)

PAI	Isla de patogenicidad (del inglés P athogenicity I sland)
SDS-PAGE	Electroforesis en geles de poliacrilamida (del inglés S odium D odecyl S ulfate P olyacrilamide G el E lectrophoresis)
slgA	Inmunoglobulina A secretora
ST	Enterotoxina termo-estable (del inglés heat- S t able)
Stx	Toxina Shiga (del inglés S higa- to xin)
tEPEC	Cepas típicas de EPEC
T3SS	Sistema de secreción tipo III (del inglés T ype I II S ecretion S ystem)
Tir	Proteína Tir (del inglés T ranslocated I ntimin R eceptor)

1. RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) se adhiere a la mucosa intestinal de tal forma que destruye las microvellosidades, altera el citoesqueleto y se adhiere íntimamente a la membrana de las células hospederas produciendo lesiones denominadas de adherencia y eliminación (attaching and effacing lesions, A/E). Sin embargo, poco se sabe sobre el proceso de adherencia y colonización vía fimbrias y/o adhesinas específicas que inician la interacción entre la bacteria y la mucosa intestinal, así como el anclaje de la bacteria sobre la superficie de los enterocitos. Previamente, demostramos que los anticuerpos tipo inmunoglobulina A secretora (sIgA) de leche materna inhibieron la adherencia de una cepa de EPEC a células cultivadas. El objetivo de la presente investigación fue identificar y caracterizar las proteínas de EPEC que interaccionen o medien la adherencia a células epiteliales, e identificar las proteínas de EPEC que reaccionan con los anticuerpos sIgA de leche materna en células HEP-2 infectadas. Con el fin de hacer esto se desarrolló un método *in vitro* con proteínas desprendidas de la bacteria para que interaccionen con células HEP-2. También se utilizó la inoculación de células HEP-2, como modelo de infección para investigar las proteínas que EPEC transfiere a las células, para este propósito se obtuvieron fracciones sub-celulares (citoplasmática, membrana y citoesqueleto), y se analizaron por inmunodetección (Western blotting) con anticuerpos sIgA de leche materna. En los ensayos de reconocimiento a células se detectaron primordialmente 4 proteínas (de masa molecular aproximada de 43, 70, 90 y 115 kDa) de EPEC las cuales mostraron capacidad de unirse a las células HEP-2, una de estas proteínas se identificó por su secuencia de aminoácidos como la proteína de choque térmico-70 (Hsp-70). La Hsp70 purificada a partir de la superficie bacteriana de EPEC fue capaz de adherirse a células HEP-2, indicando que puede ser parte del conjunto de proteínas que median la adherencia de EPEC a las células epiteliales. De las proteínas transferidas por EPEC a las células HEP-2, los anticuerpos sIgA reaccionaron con Tir y EspB en las fracciones citoplasmáticas y de membrana y con intimina principalmente en la fracción de membrana. Los anticuerpos sIgA también reconocieron a la proteína Hsp-70 de EPEC en la fracción de membrana de las células HEP-2 infectadas. La proteína EspC secretada al medio reaccionó fuertemente con los anticuerpos sIgA. Una proteína de 115 kDa de EPEC no relacionada con la proteína EspC se detectó en el citoplasma de las células HEP-2 infectadas, sugiriendo que es una nueva proteína translocada por EPEC. Los resultados indicaron que hay una respuesta fuerte de los anticuerpos

slgA contra Tir e intimina en el hospedero, las cuales son proteínas esenciales para que el patógeno productor de la lesión A/E medie la enfermedad.

2. ABSTRACT

Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) adheres to the intestinal mucosa in a way that destroys the microvilli, disrupts the cytoskeleton and intimately attaches to the host cell membrane to produce a characteristic attaching and effacing (A/E) lesions. However, little is known about the process of adherence and colonization via fimbriae and / or specific adhesins to initiate the interaction between the bacteria and the intestinal mucosa, as well as the bacterial anchorage onto the surface of enterocytes. Previously, we showed that secretory immunoglobulin A (slgA) antibodies isolated from human milk inhibited adhesion of an EPEC strain to cultured cells. The objective of this research was to identify and characterize proteins that interact or mediate EPEC adherence to epithelial cells, and identify EPEC proteins that are recognized by human slgA antibodies in infected HEp-2 cells. In order to do this, an *in vitro* method which comprises the interaction between the proteins released from the bacteria and HEp-2 cells was developed. Inoculation of HEp-2 cells, as a model of infection was also used to investigate EPEC proteins transferred into cells, for this purpose sub-cellular fractions (cytoplasmic membrane and cytoskeleton) were obtained, and probed with slgA antibodies from human milk and analyzed by Western blotting. In the HEp-2 cells recognition assay four EPEC proteins (approximate molecular mass of 43, 70, 90 and 115 kDa) which showed ability to bind to cells were detected, one of these resulted to be the Heat-shock protein 70 (Hsp-70). Hsp70 purified from the bacterial surface of EPEC was able to adhere to HEp-2 cells, indicating that it may be part of the set of proteins that mediate EPEC adherence to epithelial cells. From the proteins transferred by EPEC to HEp-2 cells, the slgA antibodies reacted with Tir and EspB in cytoplasmic and membrane fractions and with intimin in the membrane fraction mainly. SlgA antibodies also recognized the EPEC Hsp-70 protein in the membrane fraction of infected HEp-2 cells. The EspC protein secreted to the medium reacted strongly with the slgA antibodies. An EPEC 115 kDa protein, unrelated to the EspC protein was detected in the cytoplasm of infected HEp-2 cells, suggesting that this is a new protein translocated by EPEC. The results indicates that there is a strong host slgA antibody response to Tir and intimin, which are essential proteins for A/E pathogen mediated disease.

3. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli fue descubierta en 1885, es una bacteria anaerobia facultativa que forma parte de la microbiota intestinal humana. Esta bacteria coloniza el tracto gastrointestinal dentro de las primeras horas después del nacimiento y establece una relación de beneficio mutuo con el hospedero a lo largo de la vida (Lai *et al*, 2013). Sin embargo a través de la adquisición de islas de patogenicidad (PAI), profagos y plásmidos ciertas clonas de *E. coli* poseen la habilidad de colonizar específicos sitios anatómicos y causar enfermedad (Schmidt 2010; Lai *et al*, 2013).

Un importante paso en la colonización del tracto gastrointestinal humano por las bacterias es la adherencia de éstas a la superficie de la célula hospedera. Aunque la adherencia es esencial para mantener la microbiota normal del intestino, es crítica en la primera fase de todas las infecciones diarreicas, causadas por las cepas patógenas de *E. coli* (Torres *et al*, 2005).

3.1 *E. coli* diarreagénicas

Tradicionalmente las cepas de *E. coli* diarreagénicas se dividen en 6 patotipos (Clements *et al*, 2012): (i) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), (ii) *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), (iii) *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), (iv) *E. coli* enteroagregativa (EAEC), (v) *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y (vi) *E. coli* enteropatógena (EPEC); están surgiendo nuevos patotipos, tal es el caso de *E. coli* O104:H4, una cepa EAEC productora de la toxina termoestable (Stx), que causó un brote letal en Alemania en 2011 (Lai *et al*, 2013; Frank *et al*, 2011; Rohde *et al*, 2011).

ETEC. El mecanismo clásico de la patogénesis de ETEC es la colonización del intestino delgado, la misma que se encuentra mediada a través de los más de 25 factores de colonización (CFs) que se han identificado en cepas ETEC aisladas de humanos, los cuales permiten que la bacteria se adhiera a la mucosa. Entre los más comunes se encuentran CFA/I, CFA/II y CFA/IV (Croxen y Finlay 2010). Estudios recientes demostraron que el flagelo que se une transitoriamente con la adhesina EtpA, funciona como un factor de

adherencia de ETEC a células epiteliales. Los CFs y el flagelo están involucrados en la adherencia inicial a las células epiteliales y la adherencia íntima se le atribuye a las proteínas de membrana externa Tia y TibA (Dorsey *et al*, 2006).

La diarrea mediada por ETEC es debida a la secreción de la toxina termo-estable (ST) y/o a la toxina termo-lábil (LT) (Croxen y Finlay 2010). Las toxinas ST se clasifican en STa o STb basadas en su función y estructura. La toxina ST que está asociada con infecciones en humanos, se une a los receptores guanidilciclasa en las microvellosidades intestinales, estimulando el incremento del GMP cíclico intracelular. La toxina STb se asocia con cepas de ETEC porcinas, aunque también ha sido encontrada en cepas ETEC que infectan humanos. La toxina LT es estructural, funcional e inmunológicamente similar a la toxina del cólera (CT). Sin embargo la toxina CT es secretada extracelularmente, mientras que la toxina LT es atrapada en el periplasma bacteriano y liberada después de la lisis celular (Svennerholm, 2011; Dubreuil, 2012). La toxina LT es una enterotoxina termo-lábil que activa la adenilato-ciclasa en los enterocitos (Dubreuil, 2013) y ha sido asociada con el lipopolisacárido en la superficie bacteriana, facilitando la adherencia de la bacteria a la célula. (Arenas-Hernández *et al*, 2012). ETEC secreta una metaloproteasa llamada YghJ, que degrada la mucina en el intestino delgado facilitando su acceso a los enterocitos (Luo *et al*, 2014).

EHEC. Es causa potencial de diarrea asociada con alimentos contaminados. EHEC es responsable de la colitis hemorrágica y del síndrome urémico hemolítico (HUS), (por sus siglas en inglés, haemolitic uremic sndrome). Mientras que la diarrea con sangre sin complicaciones es provocada por la toxina Shiga (colitis hemorrágica), algunos pacientes progresan a síndrome urémico hemolítico (HUS), que puede provocar una lesión renal aguda y como consecuencia, la muerte (Page *et al*, 2013). El principal factor de virulencia de EHEC es la toxina Shiga (Stx), también conocida como verocitotoxina, (STEC). Existen dos subgrupos de Stx (Stx1 y Stx2); la toxina Stx2 es más prevalente en colitis hemorrágica y HUS que la toxina Stx1 (Croxen y Finlay, 2010). La toxina Stx1 es muy similar a la toxina

tipo 1 de *Shigella dysenteriae* (Pennington *et al*, 2012). El genoma de EHEC contiene la isla de patogenicidad LEE y su íntima adherencia a la célula hospedera ocurre por la interacción de la proteína intimina y su receptor Tir, al igual que EPEC. Esta adherencia puede ser aumentada por la interacción de intimina con nucleolina, que es un receptor de intimina localizado en la superficie celular y cuya expresión se incrementa por Stx2 (Robinson *et al*, 2006). EHEC sobrevive a la exposición del ácido gástrico en la mucosa intestinal durante su paso a través del estómago y utiliza el estímulo del pH bajo para inducir la expresión de intimina y el sistema de secreción tipo III, facilitando la adherencia a las células epiteliales y resultando en diarrea una vez que la bacteria ha alcanzado el tracto intestinal bajo (House *et al*, 2009).

EIEC. Comparte propiedades bioquímicas, genéticas y patógenas con *Shigella* (Lan *et al*, 2004), EIEC comprende 21 serotipos los cuales son definidos por su patrón de antígenos O, utiliza las células del epitelio intestinal para replicarse. Este patógeno se adapta a cambios del medio ambiente (pH gástrico, cambios de temperatura, disponibilidad de oxígeno, estrés oxidativo y osmolaridad) (Croxen *et al*, 2013). EIEC es una bacteria no móvil, al igual que unas cepas de *Shigella*, poseen un largo plásmido de 140 MDa, que codifica ciertos factores de virulencia. La primera fase de la patogénesis por EIEC comprende la invasión y penetración de las células epiteliales, seguida de lisis de la vacuola endocítica, multiplicación intracelular y posterior diseminación lateral de una célula otra, tal como lo hace *Shigella spp*, pero a diferencia de ésta no produce toxina Shiga, un factor importante que podría explicar la ausencia del síndrome urémico hemolítico por parte de las cepas EIEC (Nataro y Levine, 1994, Kaper *et al*, 2004).

EAEC. Es causa de diarrea persistente en niños donde estas cepas son endémicas y en adultos infectados con el virus de inmunodeficiencia adquirida (HIV). La clasificación de EAEC se basa principalmente en su patrón de adherencia, así como, en que algunas cepas colonizan preferentemente el intestino delgado, mientras que otras colonizan tanto el

intestino delgado como el colon (Okhuysen *et al*, 2010). Una característica común que define a las cepas EAEC es la capacidad de producir una apariencia de “ladrillos apilados” cuando la bacteria se incuba con células epiteliales mantenidas en cultivo (Nataro y Kaper 1998). Los determinantes del fenotipo de adherencia agregativa (AA) se encuentran contenidos en un plásmido de gran tamaño (pAA), que además contiene otros genes de virulencia y que están bajo el control de regulador AggR (Gioppo *et al*, 2000). La adherencia a la mucosa intestinal de EAEC está asociada a adhesinas fimbriales (AAF) y adhesinas afimbriales también conocidas como proteínas de membrana externa asociadas con adherencia agregativa (Estrada-García y Navarro-García 2012). EAEC posee varios factores de virulencia, tales como las toxinas Pet y EAST-1, que se encuentran codificadas en plásmido y las toxinas Pic y ShET1, que están codificadas en el cromosoma bacteriano de EAEC (Czeczulin *et al*, 1999; Henderson *et al*, 1999). Pet, es una proteína autotransportadora serin-proteasa, que induce el incremento de moco y produce exfoliación de las células del hospedero. La célula blanco de Pet es una proteína alfa-fodrina que se une a actina, y el anclaje de esta proteína resulta en reorganización de citoesqueleto de actina (Navarro-García *et al*, 1998).

DAEC. Este patotipo se caracteriza por un patrón de adherencia difuso en monocapas de células HEP-2 y células HeLa. Este patrón esta mediado por proteínas codificadas por una familia de operones que incluyen adhesinas fimbriales (Dr y F1485) y adhesinas afrimbriales (Afa), llamadas Afa-Dr (Servin *et al*, 2005). Las cepas DAEC que expresan algunas de las adhesinas Afa-Dr colonizan el intestino delgado y han sido implicadas en la diarrea en niños entre 18 meses a 5 años de edad. La patogénesis de DAEC parece estar mediada a través de la interacción de las adhesinas Afa-Dr con la célula hospedera (Croxen and Finlay *et al*, 2010). DAEC desencadena la activación de diferentes cascadas de transducción de señales en los enterocitos del intestino delgado, lo cual conduce al desarrollo de proyecciones celulares largas que envuelven a la bacteria (Kaper *et al*, 2004). Las adhesinas Afa-Dr interaccionan con el receptor DAF (del inglés, decay-accelerating

factor), el cual se encuentra en la superficie de las células epiteliales y urinarias. La unión a DAF resulta en la agregación de moléculas DAF debajo del sitio donde se adhirió la bacteria. Esto activa una cascada de señalización dependiente de Ca^{2+} , la cual resulta en una elongación y daño de las microvellosidades debido al rearrreglo de componentes del citoesqueleto (Servin *et al*, 2005). La interacción de las adhesinas Afa-Dr y DAF induce además la secreción de la interleucina 8 de los enterocitos, promoviendo la migración de neutrófilos polimorfonucleares (PMNs) a través del epitelio de la mucosa epitelial (Croxen y Finlay 2010).

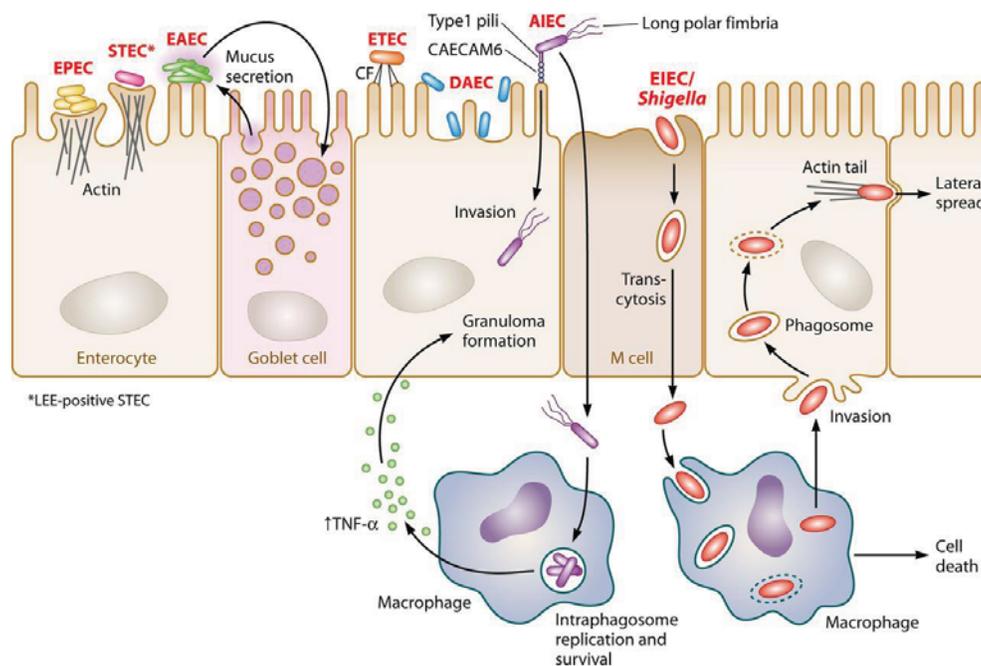


Fig. I. Patrones de adherencia de los diferentes patotipos de *E. coli* a las células epiteliales. EPEC (representado en amarillo) y *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC) (representado en rosa) son patógenos extracelulares que se adhieren al epitelio intestinal y forman la lesión A/E. Debido a la presencia de los BFP, EPEC forma microcolonias resultando en el patrón de adherencia localizada (LA). ETEC (representado en naranja) utiliza los factores de colonización (CFs) para adherirse a las células epiteliales. EAEC (representado en verde), forma biopelículas y las bacterias se adhieren a la célula epitelial en apariencia de “ladrillos apilados”. DAEC (representado en azul), se adhiere en forma dispersa sobre la superficie de las células intestinales, resultando el patrón de adherencia difusa. AIEC (*E. coli* adherente invasiva) (representado en morado) coloniza la mucosa de pacientes con enfermedad de Crohn’s e invaden las células epiteliales, se replican dentro de los macrófagos. EIEC (representado en rojo) penetra en el epitelio intestinal a través de las células M, penetra en los macrófagos, se libera de los mismos, seguida de una invasión basolateral a las células epiteliales adyacentes. Tomado de (Croxen *et al*, 2013).

3.2 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Es la mayor causa de diarrea en niños menores de 2 años en países en vías de desarrollo (Black *et al*, 2010). EPEC interactúa con la mucosa intestinal, especialmente con las células epiteliales, e induce cambios celulares en el hospedero (Moon *et al*, 1983). Esta bacteria pertenece a un grupo de patógenos con características específicas, llamado familia de patógenos A/E. Los patógenos A/E se caracterizan por colonizar el tracto intestinal de sus hospederos y por la formación de una lesión histopatológica denominada de adherencia y eliminación (A/E). De las *E. coli* diarreagénicas EPEC fue el primer patotipo en ser identificado. El término EPEC fue utilizado por primera vez en 1955 para describir un número de cepas relacionadas epidemiológicamente con una serie de brotes de diarrea infantil entre 1940-1950 en el Reino Unido. Originalmente definida por su serotipo, las cepas EPEC se clasifican ahora basadas en sus características patógenas (Croxen y Finlay 2013). Esta bacteria posee específicos determinantes de virulencia como el factor de adherencia de EPEC (EAF), un plásmido que codifica para los BFP (del inglés bundle-forming pili), los cuales son requeridos para el fenotipo de adherencia localizada y formación de microcolonias que presentan estas bacterias cuando se adhieren a las células epiteliales (Girón *et al*, 1991; Trabulsi *et al*, 2002; Humphries *et al*, 2010). Otro determinante de virulencia es la isla de patogenicidad LEE (del inglés locus of enterocyte effacement), en esta isla se encuentran codificada la adhesina intimina, componentes estructurales del sistema de secreción tipo III (T3SS), (involucrado en la translocación de proteínas “efectoras” a la célula hospedera), genes reguladores, chaperonas, translocadores y 7 proteínas efectoras (EspB, EspF, EspG, EspH, EspZ, Map y Tir) (Garmendia *et al*, 2005; Iguchi *et al*, 2009). El genoma de EPEC además codifica por lo menos 23 efectores que no se encuentran en la isla de patogenicidad LEE (Nle) (Iguchi *et al*, 2009; Deng *et al*, 2012; Croxen *et al*, 2013).

EPEC, al igual que los patógenos causantes de diarrea emplea una variedad de sofisticadas estrategias para colonizar el epitelio intestinal humano: resiste las defensas

no específicas del hospedero tales como la acidez del estómago, peristaltismo, exfoliación de las células de la mucosa y bacteriocinas, se adhiere al epitelio intestinal y por último lo coloniza (Souza dos Reis y Horn 2010).

Las cepas EPEC se dividen en dos grupos: típicas (tEPEC) y atípicas (aEPEC). Las cepas típicas se caracterizan por la presencia del plásmido EAF, mientras que este plásmido está ausente en las cepas atípicas (Trabulsi *et al*, 2002). Por definición las cepas EPEC carecen de los genes que codifican para la toxina Shiga (*stx*). Las cepas tEPEC (*eae⁺bfp⁺stx⁻*) producen el fenotipo de adherencia localizada (LA) y las cepas aEPEC (*eae⁺bfp⁻stx⁻*), producen un patrón de adherencia “similar a la adherencia localizada” (LAL), adherencia difusa (DA) y adherencia agregativa (AA). El fenotipo de adherencia LAL se encuentra asociado con el pilus ECP (del inglés *E. coli* common pilus), (Saldaña *et al*, 2009).

Los BFP contribuyen a la adherencia de la bacteria a la célula eucariótica pero parecen no ser necesarios para causar la enfermedad en humanos. Otras adhesinas (Paa, LpfA113, Iha, Ehx, ToxB, LdaG), presentes en las cepas aEPEC juegan probablemente el mismo papel que los BFP en la adherencia (Hernandes *et al*, 2009). Intimina es una proteína de 94 kDa, codificada por el gen *eae*, que se encuentra en todas las cepas que producen la lesión A/E y es requerida para la íntima adherencia de EPEC a las células epiteliales, el dominio N-terminal de esta proteína es altamente conservado entre los patógenos A/E, mientras que la región C-terminal muestra menos homología. Diferencias en la región C-terminal de intimina han sido utilizadas para la clasificación de los distintos sub-tipos; los subtipos α y β , son encontrados entre las cepas tEPEC y los subtipos α , β , γ , ζ , δ y ϵ ha sido encontrado principalmente en las cepas aEPEC (Tardelli y Gonzalez-Pedrajo 2010).

3.2.1 Modelo de Patogénesis de EPEC

El modelo de patogénesis de EPEC puede dividirse en tres estados: a) adherencia inicial, y colonización del intestino b) Translocación de proteínas bacterianas a las células eucarióticas mediante el T3SS que causa el rearreglo del citoesqueleto en los enterocitos y

c) la íntima adherencia de la bacteria a la célula eucarionte por intimina. Los pasos b y c juntos causan la formación de la lesión A/E (Chen y Frankel 2005).

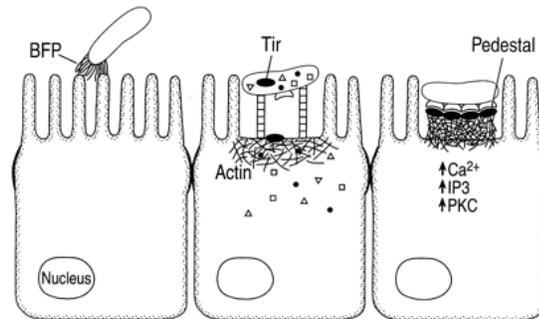


Fig. 2.- Modelo de patogénesis de EPEC. Tomado de (Lu y Walker 2001)

a) Adherencia inicial

La adherencia inicial de las tEPEC a la superficie del epitelio intestinal está mediada por los BFP (Girón *et al*, 1991). Los BFP son fimbrias de 7 nm de diámetro y 14 a 20 μ m de largo, cuya biogénesis requiere 14 genes codificados en el plásmido de virulencia de 50-70 MDa (EAF). En este plásmido también se encuentran codificados los genes del operón *per* (regulador codificado en el plásmido) que regula la síntesis del BFP y de las proteínas que secreta EPEC. (Ibarra *et al*, 2003).

Además de los BFP, se ha propuesto que otras adhesinas (fimbriales y no fimbriales), así como el flagelo podrían participar en la adherencia de la bacteria a la célula hospedera (Cleary *et al*, 2004; Saldaña *et al*, 2009).

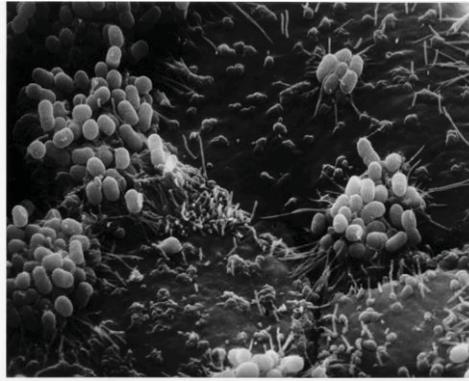


Fig. 3.- Imagen de microscopía electrónica que muestra el fenotipo de adherencia localizada de EPEC a células HEp-2. [Tomada de: <http://medschool.umaryland.edu/infeMSD/images.htm>]

b) Translocación de proteínas bacterianas a las células eucarióticas mediante el sistema de secreción Tipo III (T3SS)

Luego del contacto inicial, la bacteria transloca a la célula una serie de proteínas “efectoras” mediante el T3SS. La mayor parte de estas proteínas están codificadas en el cromosoma de EPEC, dentro de una isla de patogenicidad de 35 kb (LEE) (Nataro y Kaper 1998). No obstante, se han encontrado nuevos efectores involucrados en la patogénesis de EPEC codificados fuera del LEE que también se secretan y se translocan a la célula hospedera a través del T3SS donde afectan diferentes procesos de señalización (Dean *et al*, 2005; Croxen y Finlay 2013).

La isla de patogenicidad LEE está organizada en cinco operones policistrónicos (LEE1 a LEE5); estos operones forman tres dominios de virulencia que codifican a los siguientes genes: a) los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican proteínas componentes del T3SS (los genes *esc* y *sep*); b) LEE4 contiene genes que codifican las proteínas que forman el translocón como EspA, EspB y EspD; y c) en LEE5 se encuentran los genes necesarios para la adherencia íntima al enterocito: *tir* (*t*ranslocated *i*ntimin *r*eceptor), *cesT* y *eae* (intimina) (Clarke *et al*, 2003).

Las proteínas del T3SS forman el complejo de aguja (CA); este complejo atraviesa la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa de la bacteria y permite la secreción de proteínas. A través del CA pasan tres proteínas codificadas en el LEE conocidas como proteínas translocadoras. La primera de ellas, EspA, se ensambla directamente con EscF y se polimeriza en la punta o región distal del CA. La polimerización permite que la aguja molecular se extienda y forme un puente físico que posibilita el contacto entre la bacteria y la membrana de la célula (Sekiya *et al*, 2001). Evidencias ultraestructurales han demostrado que EspA forma un conducto cilíndrico en cuyo interior pasan las proteínas EspB y EspD. Estas proteínas forman un poro en la membrana de la célula eucariótica y completan el conducto llamado T3SS-translocón, que conecta y permite la comunicación molecular entre la bacteria y la célula y por el cual EPEC inyecta directamente a las proteínas efectoras. Un efector de gran importancia es Tir. La inyección de Tir en el citosol es un paso crucial durante la lesión A/E y la formación de los pedestales. Después de que Tir es translocado a la célula hospedera vía T3SS, se inserta en la membrana plasmática del eritrocito en donde adopta una topología de asa en la que los extremos amino y carboxilo se mantienen citosólicos (Campellone y Leong 2003), mientras que su región central permanece extracelular y actúa como un receptor para intimina (Kenny *et al*, 1997; Croxen y Finlay 2013).

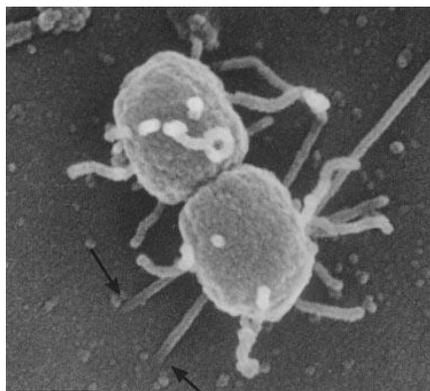


Fig. 4.- Imagen de microscopía electrónica de barrido donde se observa a EPEC infectando células HeLa, las flechas señalan el filamento del T3SS. Tomada de (Knutton *et al*, 1998)

b) Íntima adherencia de la bacteria a la célula eucarionte: Formación de la lesión A/E.

En la última etapa, el dominio extracelular de Tir interactúa con intimina (Kenny *et al*, 1997) y promueve la adherencia íntima de la bacteria a la célula. Esta interacción promueve el agrupamiento de diversas moléculas de Tir, el cual es fosforilado en la tirosina 474 por al menos dos cinasas del hospedero, Fyn y Abl. La forma fosforilada de Tir interactúa con la proteína adaptadora Nck. El dominio SH3 de Nck recluta y activa a la proteína N-WASP (Neural-Wiskott- Aldrich síndrome protein) y al complejo Arp 2/3 (Actin-related-protein 2/3). El reclutamiento de este complejo resulta en la nucleación de los filamentos de actina por debajo del sitio de adherencia de la bacteria y la formación de una estructura de pedestal característica de la infección por EPEC (Sal-Man *et al*, 2009).

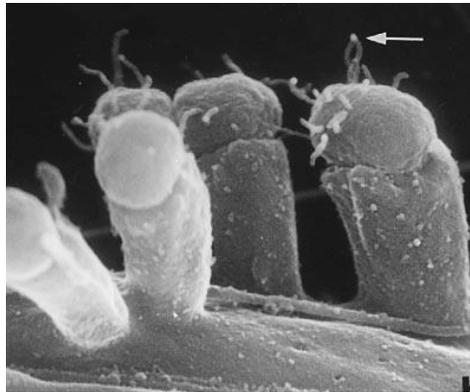


Fig. 5.- Microscopía electrónica de barrido de EPEC infectando células HeLa, donde se observa la formación de pedestal. Tomada de (Knutton *et al*, 1998)

3.3 Mecanismos de protección mediados por IgA de leche materna.

Extensivos estudios epidemiológicos han demostrado que la leche materna humana protege a los infantes contra infecciones agudas gastrointestinales y respiratorias (Hanson, 1999). La leche materna humana tiene anticuerpos principalmente del tipo IgA secretora (sIgA) y en menor proporción IgG e IgM, todos ellos reaccionan contra un gran

número de microorganismos. Una de las funciones protectoras de IgA es proporcionar una barrera inmunológica que protege contra sustancias extrañas. Los anticuerpos sIgA son transportados a la superficie de la mucosa a través de las células epiteliales por mecanismos mediados por receptores y funcionan para eliminar al patógeno del intestino inhibiendo su adherencia y colonización (Nagano *et al*, 2014).

Los anticuerpos IgA pueden impedir la adherencia de bacterias a células epiteliales humanas, así como la adherencia y penetración de virus (Mazanec *et al*, 1993; Brandtzaeg, 2013). La polivalencia de la sIgA (formación de dímeros y tetrámeros) aumenta su potencial para aglutinar a las bacterias y neutralizar toxinas, enzimas y virus (Gavilanes-Parra *et al*, 2002). La inmunoglobulina sIgA porta oligosacáridos que le confieren protección contra degradación por enzimas. Por otro lado, Schroten *et al*, demostraron que los oligosacáridos sialil-galactósidos que porta la región Fc inhibió la adherencia de un tipo de *E. coli* con fimbrias tipo S. Esto es que los anticuerpos sIgA son capaces de inhibir la adhesión de bacterias que poseen fimbria tipo S independientemente de la región Fab (la que reconoce específicamente al antígeno) del anticuerpo. Los efectos mediados por la región Fab, que resultaron de la inmunización materna, demostraron tener un papel menos importante en esta inhibición (Schroten *et al*, 1998). Cravioto *et al*, en 1991 demostraron que fracciones de oligosacáridos de leche materna humana inhibieron la adherencia de EPEC a las células epiteliales. El grado de protección conferida por los anticuerpos sIgA de la leche humana dependió de la cantidad de anticuerpos específicos presentes, y también estuvo relacionado con la cantidad de anticuerpos.

El sistema inmunológico de la madre produce anticuerpos sIgA, que se encuentran en la leche humana, contra una gran variedad de antígenos bacterianos o virales incluyendo *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae*, *Shigella* y *Salmonella*, rotavirus, y virus sincitial respiratorio. También se han encontrado anticuerpos sIgA contra *Giardia lamblia* y contra toxinas como la de *Clostridium difficile* (Gavilanes-Parra *et al*, 2002).

3.4 Inhibición de la adherencia bacteriana por sIgA.

La inhibición a la adherencia bacteriana es considerada uno de los mecanismos de defensa más importantes contra la invasión bacteriana a la mucosa. Se ha demostrado *in vitro*, que la sIgA limita la adherencia de bacterias a células epiteliales aisladas de mucosas bucales, intestinales, urinarias, genitales, nasales y bronquiales (Fernandes *et al*, 2001).

La sIgA interfiere con la adherencia bacteriana a las superficies del hospedero mediante la prevención específica y no específica (interacciones estereoquímicas). La unión de sIgA a adhesinas bacterianas pueden reducir la carga negativa de la superficie y la hidrofobicidad de la bacteria, limitando de esta manera el potencial de las interacciones iónicas e hidrofóbicas entre las bacterias y los receptores del hospedero. La reducción de la hidrofobicidad de la bacteria es probablemente debida a la abundante glicosilación de los componentes Fc y del componente de secreción el cual confiere propiedades hidrofílicas a la molécula de sIgA. Anticuerpos sIgA contra fimbrias de *gonococci* y miembros de la familia *Enterobacteriaceae* reducen la adherencia del *gonococci* a las células epiteliales (Tramont, 1977). La sIgA además puede alterar la adherencia mediante la aglutinación de bacterias facilitando su eliminación por las secreciones. Por otro lado, se ha demostrado que la sIgA reconoce específicamente carbohidratos de manosa de la lectina fimbrial tipo 1 de *E. coli* (Wold *et al*, 1990).

Se conoce hasta el momento que existen anticuerpos sIgA contra una variedad de microorganismos involucrados en enfermedades gastrointestinales. La adherencia de EHEC al epitelio intestinal es esencial para inducir la producción de anticuerpos sIgA en el intestino del ratón (Nagano *et al*, 2014). El calostro humano presenta una actividad inhibitoria de EIEC a células HEp-2 (Carbonare *et al*, 1995). Anticuerpos específicos contra el factor de colonización de antígenos (CFA) de ETEC son suficientes para la protección y profilaxis de la diarrea producida por ETEC (Freedman *et al*, 1998). En la leche humana se han encontrado anticuerpos contra antígenos de virulencia asociados a plásmidos de *Shigella*, lo cual sugiere un posible mecanismo de protección a infantes contra infecciones por *Shigella*. Cravioto *et al* en 1991, mostraron que sIgA purificada de leche materna inhibe la adherencia de una cepa de EPEC a células mantenidas en cultivo.

4. ANTECEDENTES

La colonización de los tejidos del hospedero por bacterias patógenas es un evento multifactorial que lo llevan a cabo adhesinas fimbriales y no fimbriales, las cuales pueden actuar al mismo tiempo o en diferentes estados durante el proceso infeccioso (Nougayrede *et al*, 2003). Con respecto a EPEC se han identificado y caracterizado varias adhesinas que participan en la colonización del intestino humano de las células epiteliales cultivadas (Nougayrede *et al*, 2003). La primera adhesina descrita de EPEC fue intimina (Jerse *et al*, 1990), una proteína de membrana externa que media una adhesión estrecha con la membrana celular vía su propio receptor traslocado (Tir) (Kenny *et al*, 1997). Los pili llamados BFP son los responsables de la formación de microcolonias bacterianas debido a la interacción bacteria-bacteria (Girón *et al*, 1991; Tobe y Sasakawa, 2001) y también se demostró que son un factor de virulencia en voluntarios. La adherencia inicial de las cepas de EPEC típicas a las células del hospedero esta mediada predominantemente por los BFP, mientras que los filamentos de EspA juegan un papel importante en la adherencia de las cepas de EPEC atípicas, las cuales carecen de BFP (Knutton *et al*, 1998; Cleary *et al*, 2004). Respecto a los receptores celulares para los BFP se reportó que median adherencia a las células del hospedero vía reconocimiento de fosfoetanolamina de las células (Khursigara *et al*, 2001). Hyland *et al*. (2008) reportaron que los BFP poseen propiedades parecidas a lectinas que pueden mediar la adherencia inicial de EPEC a receptores que tienen *N*-acetilactosamina en la superficie de la célula hospedera. Knutton *et al*. (1997) reportaron que después de 6 horas de infección las microcolonias ya no estaban presentes, sin embargo se observaron las asas de los BFP formando una compleja red tridimensional; Por lo tanto, se concluyó que la estructura de los BFP desaparece y conduce a la dispersión de las microcolonias. Tobe y Sasakawa (2001) reportaron datos similares que dicen que los BFP de EPEC expresados sobre las células epiteliales desaparecen con la expansión de la microcolonia después de 3 ó 4 horas de la infección. Por otro lado, también se demostró que los flagelos de EPEC tienen propiedades adhesivas que contribuyen a la adherencia de cepas móviles a células epiteliales y a la mucosa intestinal *in vitro*. Dicha adherencia se

sugirió debido a que una mutante en el gen *fliC* fue deficiente en la adherencia (Girón *et al*, 2002).

Un factor de adherencia adicional es el pilus de *E. coli* común (ECP), el cual está involucrado en la colonización de células epiteliales por cepas de *E. coli* comensales y patógenas (Rendón *et al*, 2007). En EPEC, los ECP han mostrado actuar como factores de adherencia accesorios, jugando un papel durante la adherencia celular y/o en interacciones bacteria-bacteria (Saldaña *et al*, 2009). Sin embargo, la importancia de los ECP en la patogénesis de EPEC no se ha determinado (Rendón *et al*, 2007). Por otro lado, Cleary y colaboradores en 2004 produjeron una cepa mutada en *bfpA* y *eaeA* (por bloqueo de la expresión de estos genes) la cual mostró muy poca adherencia pero tiempo después en la infección la adherencia bacteriana se incrementó, sugiriendo que EPEC expresa otros factores de adhesión que no han sido identificados y probablemente contribuyen a la abundante adherencia que es característica de EPEC. A pesar de la importancia de la intimina y los BFP en la adherencia íntima y la formación de microcolonias, respectivamente, otras adhesinas desconocidas probablemente contribuyen en la interacción eficiente entre EPEC y las células epiteliales durante el curso de una infección, al menos *in vitro* (Saldaña *et al*, 2009). Recientemente se reportó que una maltoporina de EPEC (LamB) media la adherencia de EPEC (E2348/69) a las células HEp-2 se observó que el antisuero anti-LamB y la $\Delta lamB$ redujeron la adherencia de esta cepa a las células epiteliales cultivadas (Subramanian *et al*, 2007).

La adherencia inicial a las células del hospedero es el primer paso de la infección por EPEC. La importancia de este paso en la infección reside en el hecho de que este primer contacto entre la bacteria y las células del intestino es la base de la especificidad del hospedero para una gran cantidad de agentes patógenos (Bardiau *et al*, 2009).

La contribución de la sIgA en defensa del epitelio de la mucosa juega un papel importante en la prevención de la adhesión del patógeno a la célula epitelial del hospedero, bloqueando y evitando una futura infección (Brandtzaeg, 2013). La leche materna humana es particularmente rica en anticuerpos sIgA (Newburg, 2005; Hanson,

2007; Honorio-Franca *et al*, 1997). Los anticuerpos purificados de sIgA obtenidos de calostro y leche madura de madres que vivían en áreas de alto riesgo de Sao Paulo, Brasil y ciudad de México inhibieron la adherencia de EPEC a células epiteliales humanas cultivadas, indicando que tales anticuerpos están dirigidos contra proteínas de superficie bacteriana. La actividad inhibidora se ha encontrado tanto en la fracción de sIgA como de oligosacáridos (Camara *et al*, 1994; Cravioto *et al*, 1991). Utilizando un modelo clásico *in vitro*, Silva y Giampaglia en 1992, mostraron que el calostro humano inhibe la adherencia de EPEC a las células HEp-2 y HeLa. Numerosos estudios han mostrado que el calostro humano y la leche materna contienen anticuerpos sIgA contra muchas proteínas de EPEC, incluyendo intimina, EspA, EspB (Parissi-Crivelli *et al*, 2000; Manjarrez-Hernandez *et al*, 2000).

La estrategia de utilizar anticuerpos de leche materna del tipo sIgA (que han demostrado bloquear la adherencia bacteriana) para buscar factores de adherencia de EPEC podría aportar datos útiles que permitan entender el mecanismo de adherencia y patogenicidad de EPEC. También se han utilizado previamente células epiteliales de humanos cultivadas en monocapa e infectadas con EPEC como modelo de infección *in vitro*. Con este modelo se encontró a la proteína Tir además de su interacción con intimina en la membrana citoplasmática (Kenny *et al*, 1997).

5. Objetivo

Identificar y caracterizar proteínas de EPEC que interaccionen o medien la adherencia a células epiteliales, e identificar las proteínas de EPEC que son reconocidas por los anticuerpos sIgA de leche materna en células HEp-2 infectadas.

6. Hipótesis

Las cepas EPEC expresan una variedad de proteínas que median la adherencia a las células epiteliales y algunas de ellas no han sido identificadas.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1 Cepas bacterianas

Se usó la cepa silvestre de EPEC E2348/69 (O127:H6) (Levine *et al.*, 1985) y las mutantes isogénicas que portan mutaciones en *tir* (CVD463) reportada previamente como SE896; *eae* (CVD206), donadas por el Dr. José Luis Puente; *escN* (CVD452), *espB* (UMD864), y *espC* (MAS111) (Elliot *et al.*, 1999; Donnenberg *et al.*, 1991; Stein *et al.*, 1996) respectivamente; *pMAR2* (JPN15) (Jerse *et al.*, 1990). La cepa JML174 es una HB101 que porta el gen *espC* clonado, donada por el Dr. Fernando Navarro-García.

7.2 Anticuerpos

Los anticuerpos IgA purificados del suero (utilizados como controles), se compraron de Caltag Laboratories, UK. Los sueros producidos en conejo contra EPEC, Tir y EspB se obtuvieron de la colección del Dr. J.A. Girón y el suero contra EspC se obtuvo del laboratorio del Dr. A. Manjarrez. Los anticuerpos de conejo Anti-calnexina (sc-11397) y anti- α tubulina (sc-5546) se compraron de Santa Cruz Biotechnology (Santa Cruz, CA).

7.3 Muestras de leche

La leche se colectó de madres mexicanas sanas a las cuales se les informó y se obtuvo su consentimiento. Las donantes no estaban recibiendo ningún medicamento que pudiera interferir con la lactancia. En este estudio, se incluyeron madres de un estatus socioeconómico bajo, quienes vivían en condiciones sanitarias pobres. Se desconoce si ellas previamente habían tenido infecciones con EPEC. La leche materna se colectó manualmente dentro de un frasco de vidrio estéril de 10 a 30 días después del nacimiento del bebé. Las muestras de leche de 10 mujeres se mezclaron y se congelaron a -20°C hasta su uso. Después de descongelarlas, se centrifugaron 3 veces a 12,000 x *g* para obtener una fracción clara.

7.4 Métodos de preparación de las fracciones que se utilizaron en los ensayos de reconocimiento a células

7.4.1 Método de obtención de proteínas de superficie bacteriana

Las bacterias se crecieron en caldo Casoy (soya y tripticaceína, OXOID), a 37°C por 12-16 horas, se colectaron por centrifugación a 1,500 x *g*, por 20 minutos. El botón bacteriano se resuspendió en medio de cultivo de células eucariontes Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco) y se mantuvo a 37°C por 1 hora, luego las bacterias se colectaron a 1,500 x *g*, por 30 minutos, se lavaron con solución salina de fosfatos (PBS) y la suspensión bacteriana se sonicó (en 0.5 ml de PBS) 10 veces (pulsos de 15 segundos por cada vez) a una intensidad de 20 Watts, en la escala de switch a "25", en una cama de hielo (Aparato; High Intensity Ultrasonic Liquid Processor, 50-Watt Model, Sonics Materials Inc. USA) (Volokhina *et al*, 2013). Posteriormente se centrifugó a 9,700 x *g*, por 10 minutos para eliminar las bacterias y residuos. El sobrenadante se ultracentrifugó a 100,000 x *g*, por una hora. El sobrenadante resultante contiene las proteínas de superficie bacteriana. Las proteínas de esta obtención se analizaron por electroforesis en geles de poliacrilamida de dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), bajo condiciones desnaturalizantes y en presencia de β-mercaptoetanol (Laemmli, 1970).

7.4.2 Preparación de la fracción de adhesinas

La fracción de adhesinas se obtuvo según el método descrito por Moch *et al*. (1987). Brevemente, las proteínas de superficie bacteriana se suspendieron en solución salina de fosfatos/EDTA 5 mM y se calentaron a 70°C por 1 hora, después se ultracentrifugó a 140,000 x *g*, por 2 horas, el botón resultante contiene en mayor cantidad la fracción de fimbrias y el sobrenadante la fracción enriquecida de adhesinas. El sobrenadante que contiene las adhesinas se dializó contra 50 mM de Tris-HCl (pH 7.4) (Moch *et al*, 1987) El contenido proteico de las fracciones obtenidas se analizó por electroforesis SDS-PAGE.

7.4.3 Método de obtención de proteínas de membrana externa (OMP)

Las proteínas de membrana externa se prepararon según el método de Fedorka-Cray *et al*, 1990, con modificaciones. Las bacterias se crecieron en 200 ml de DMEM a 37°C por 8 horas, se centrifugaron a 1,500 x *g*, por 30 minutos, al botón bacteriano se le agregó 1 ml de solución de HEPES 100 mM pH 7.4, las bacterias se sonicaron (en 0.5 ml) 3 veces (pulsos de 1 minuto cada vez) a una intensidad de 40 Watts, en la escala de switch a “25”, en una cama de hielo. El residuo celular se removió por centrifugación a 9,700 x *g* por 10 minutos a 4°C. Las membranas celulares bacterianas se colectaron por centrifugación del sobrenadante a 15,800 x *g*, por 30 minutos. El botón de membranas se suspendió en 400 µl de HEPES 10 mM (pH 7.4)-Sarkosyl 1%, y se incubó a temperatura ambiente con movimiento (agitación en vortex) por 30 minutos. Las proteínas de membrana externa (OMP) se colectaron por centrifugación a 15,800 x *g*, y el botón que contiene los OMP se resuspendió en 100 µl de HEPES y se almacenó a -20°C hasta su utilización.

7.4.4 Purificación parcial de la proteína de 70 kDa de EPEC

La proteína de 70 kDa se purificó a partir de la fracción de adhesinas (descrito anteriormente). Dicha fracción se dializó contra 50 mM Tris-HCl (pH 7.4) y se purificó mediante cromatografía de intercambio aniónico Mono Q HR 5/5 de alta resolución bajo las siguientes condiciones; amortiguador A (100 mM Tris-HCl, pH 7.3); amortiguador B (amortiguador A/0.5 M KCl); velocidad de flujo, 1 ml/min; formación del gradiente, 2 mM/ml. Todas las muestras de proteínas se resolvieron y analizaron mediante electroforesis en geles a poliacrilamida SDS-PAGE, finalmente la pureza de la proteína se analizó por electroforesis en dos dimensiones (2D-PAGE) .

7.4.5 Marcaje radioactivo de las bacterias

La cepa E2348/69 se creció en caldo Casoy a 37°C por 12-16 horas suplementado con metionina-[³⁵S] 0.4 mCi por ml (actividad específica: 1,140.0 Ci/mmol; NEN Research Product, Dupont, Wilmington, Del.). Las bacterias se colectaron y se lavaron 4 veces con

solución salina de fosfatos (PBS) pH 7.4 y se suspendieron en medio DMEM a una concentración de 3×10^8 CFU/ml y se incubaron por 2 horas. La incorporación de metionina-[^{35}S] fue entre 0.015 y 0.1 cpm/CFU. El botón bacteriano se guardó para la obtención de proteínas de superficie bacteriana.

7.5 Preparación de los sueros utilizados en los ensayos

7.5.1 Preparación del suero anti-EPEC

El suero anti-EPEC se preparó mediante la inmunización de conejos (Nueva Zelanda) con proteínas de membrana externa y de superficie de la cepa E2348/69, el homogenado (100 μg de proteínas) sin adyuvante se inyectó por vía subcutánea en el lomo de los conejos. Posteriormente se aplicaron refuerzos a las 3 y 6 semanas con el mismo homogenado y condiciones similares. Se tomaron muestras de sangre antes y después de la inmunización para evaluar los títulos de anticuerpos producidos por el conejo mediante una inmunodetección. Previa a la inmunización se tomó una muestra sanguínea de cada conejo y el suero obtenido se utilizó como control negativo.

7.5.2 Preparación del suero anti-70 kDa

Para obtener anticuerpos específicos contra la proteína de 70 kDa, se utilizó la fracción resultante de la purificación parcial de dicha proteína (descrita anteriormente), en la cual se observó solo un tipo de proteína en la región de 70 kDa, (analizado por electroforesis de dos dimensiones, 2D-PAGE). El suero se produjo inmunizando a conejos (Nueva Zelanda) por vía subcutánea con la proteína de 70 kDa de EPEC obtenida del un gel de poliacrilamida (SDS-PAGE). Se cortó y extrajo del gel la banda correspondiente a la proteína de 70 kDa. Los pedacitos del gel (SDS-PAGE) se homogenizaron en solución de PBS. El homogenado completo se inyectó en los conejos por vía subcutánea. Se aplicaron refuerzos a las 3 y 6 semanas mediante el mismo procedimiento.

7.5.2.1 Purificación de los anticuerpos anti-70 kDa

Concluido el proceso de inmunización los conejos se sangraron a blanco, la sangre obtenida se dejó coagular durante 3 horas a temperatura ambiente, el coagulo formado se removió con un aplicador de madera y se permitió su concentración durante toda la noche a 4°C. Los tubos se centrifugaron a 1,200 x *g* por 30 minutos a 4°C para recuperar el suero. La fracción gamaglobulina del suero se obtuvo por precipitación con sulfato de amonio, inicialmente al 50% (p/v) de saturación y posteriormente al 33% (p/v). Para eliminar el exceso de sulfato de amonio los precipitados obtenidos se dializaron contra PBS pH 7.4, a 4°C, efectuando dos cambios diarios durante 3 días (Harlow and Lane, 1988). Se continuó purificando los anticuerpos de clase IgG por cromatografía líquida empleando una columna de intercambio iónico (Q-sepharose). Con 20 mM Tris pH 8.0 como solución amortiguadora de inicio, los anticuerpos que se unieron a la matriz se eluyeron de la columna por incremento lineal de la concentración de NaCl de 0.0 a 0.5 M en el mismo amortiguador inicial (Harlow and Lane, 1988).

7.6 Metodología para los ensayos de adherencia de EPEC a células HEp-2

7.6.1 Cultivo celular

Las células HEp-2 se cultivaron en botellas de plástico para tejidos (Nunc. Inc.) a 37°C con 5% de CO₂ en medio DMEM que contenía 10 ó 20 % de suero fetal bovino (SFB). Las células se crecieron por 4-6 días y el medio se reemplazó cada 2 días hasta obtener una monocapa confluyente para luego ser colectadas con un gendarme de plástico (por raspado) en solución de lisis (10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 7.4, and 0.1 mg/ml PMSF).

7.6.2 Ensayo de adherencia

Para el ensayo de adherencia se utilizó la línea celular HEp-2. El ensayo se realizó mediante el método descrito por (Cravioto *et al*, 1979). La técnica consistió en despegar la monocapa celular con tripsina y sembrar 1.5 x 10⁵ células/ml en cada uno de los 24 pozos

de la placa, a los que previamente se les colocó una lenteja de plástico (de 13 mm diámetro) o de vidrio a la cual se adhieren las células. Las lentejas de vidrio se trataron previamente mediante lavados con solución de hipoclorito de sodio conteniendo 1% del detergente Decon, y lavados con agua corriente y destilada. Un día antes del ensayo, las bacterias se sembraron en tubos de 1 ml de medio Luria-Bertani (LB) y se incubaron a 37°C durante 18 horas. Al siguiente día se tomó 0.1 ml de cultivo bacteriano y se le agregó 10 ml de medio para células epiteliales DMEM sin antibiótico y se incubaron por una hora más a 37°C. Antes de inocular a las células se les cambió el medio y se les agregó 1.0 ml de DMEM fresco sin antibióticos y con 2% de SFB. A cada pozo se le agregó 30 µl de suspensión bacteriana y se incubó por 3 horas a 37°C con 3% de CO₂. Posteriormente las células de los pozos se lavaron con PBS, se fijaron con metanol/ácido acético, se tiñeron con colorante Giemsa al 1% durante 20 min, se lavaron con agua desionizada, se deshidrataron las células con acetona y xileno, y las lentejas se montaron en un portaobjetos con bálsamo de Canadá. Finalmente se observaron al microscopio de luz.

7.6.3 Ensayo de inhibición a la adherencia bacteriana

Para estudiar el efecto de la fracción de adhesinas en la adherencia de EPEC a células HEp-2, el ensayo se llevo a cabo en presencia de las proteínas de dicha fracción, se utilizaron las cantidades de 150 y 300 µg/ml en medio de cultivo celular con 2% de SFB. Las adhesinas se incubaron por 30 minutos con las células HEp-2 en los pozos de la placa, posteriormente las células se lavaron con PBS (una vez) y se agregó medio fresco conteniendo la suspensión bacteriana (en todo el experimento se usó un inóculo de 2×10^8 bacterias/ml). Después de un periodo de incubación de 3 horas, las células se lavaron, fijaron, tiñeron y montaron sobre un cubre objetos. El control del ensayo consistió en utilizar albumina sérica en cantidades similares. El grado de inhibición a la adherencia bacteriana se determinó mediante el conteo de todas las bacterias adheridas a 200 células HEp-2 seleccionadas al azar y se comparó este número con los controles (albumina sérica) realizados simultáneamente en las mismas placas de cada preparación. Las preparaciones se leyeron o evaluaron a doble ciego por dos observadores independientes. Cada

experimento se realizó por duplicado y se repitió 3 veces. La inhibición de la adherencia se expresó como el porcentaje total de adherencia comparado con el control experimental (ensayo de adherencia realizado en ausencia del supuesto inhibidor).

7.6.4 Infección de células HEp-2 y detección de la lesión A/E

La localización de la α -actinina se detectó en las células epiteliales infectadas, como se describió previamente (Johnson-Henry *et al*, 1995). Brevemente, las células HEp-2 se sembraron en los pozos de las placas que tenían lentes de vidrio, y se cultivaron durante la noche para obtener una monocapa semiconfluyente. Antes de la infección bacteriana el medio de cultivo celular (DMEM) se cambió por medio fresco sin antibióticos y con 2% de SFB. Entonces se infectaron las monocapas con 1×10^9 bacterias de *E. coli* por ml (cepa E2348/69) a una multiplicidad de infección de 100:1 y se incubaron por tres horas a 37°C en 5% de CO₂. Después se eliminaron los organismos no adherentes mediante el lavado de las monocapas con PBS. Se fijaron las monocapas con metanol frío al 100% a temperatura ambiente por 10 minutos. Después de haber sido lavadas tres veces con PBS, las células fijadas se incubaron con la inmunoglobulina monoclonal murina Ganti-actinina (Sigma, Oakville, Ontario, Canadá) a una dilución 1:100, como primer anticuerpo y se incubó por 1 hora a 37°C con movimiento suave. Se lavaron nuevamente las monocapas y se incubaron por una hora con la inmunoglobulina de conejo anti-murina conjugada con Isotiocinato de fluoresceína (Jackson Immuno Research Laboratories, Inc., West Grove, Pa.) como anticuerpos secundarios. Las lentes de vidrio se montaron con un medio especial para fluorescencia (Vectashield, Vector Laboratories, Inc.) y se examinaron en el microscopio por contraste de fase y fluorescencia (Microscopio Carl-Zeiss, Axiostar). El número de lesiones A/E medidas como el número de acumulaciones de actinina en las células epiteliales se determinó por microscopía de inmunofluorescencia por tres observadores independientes.

7.7 Metodologías para la detección de proteínas de EPEC que interactúan con las células HEp-2

7.7.1 Método de detección de proteínas de superficie y adhesinas de EPEC marcadas con metionina-[³⁵S] que reconocen células epiteliales HEp-2

El ensayo consistió en incubar las fracciones de proteínas de superficie y/o adhesinas bacterianas con las células HEp-2 a temperatura ambiente, en medio DMEM sin SFB, con agitación breve y por 1 hora. Cien microgramos de proteínas de superficie y/o similar cantidad de adhesinas (previamente marcadas con metionina-[³⁵S]) se incubaron con 100 µl de suspensión celular (5×10^5 células HEp-2 desprendidas por raspado). Después de este tiempo las células se centrifugaron a 1,000 x *g* por 5 minutos y se lavaron 3 veces con PBS que contenía Tween 20 al 2% para remover las proteínas que se unieron débilmente o inespecíficamente a las células epiteliales. El botón celular, que contiene las proteínas bacterianas marcadas que se unieron a las células se resuspendió en solución de electroforesis de Laemmli (60 mM Tris-HCl pH 6.8, 2% SDS, 10% glicerol, 5% β-mercaptoetanol, 0.01% bromofenol azul) y se calentó a ebullición. Las proteínas totales extraídas se separaron y analizaron por electroforesis (SDS-PAGE). Las proteínas bacterianas que se adhirieron o reconocieron a las células epiteliales durante el ensayo se detectaron mediante autoradiografía del gel después de la electroforesis.

7.7.2 Método de detección de proteínas de superficie y adhesinas de EPEC que reconocieron células HEp-2, detectadas mediante un suero anti-EPEC y anticuerpos IgA de leche materna

Se realizó el ensayo de reconocimiento entre proteínas de superficie bacterianas y células HEp-2 (descrito anteriormente), pero en estos ensayos las proteínas bacterianas no se radio-marcaron, sino que se detectaron mediante el uso de anticuerpos en una inmunotransferencia. Se utilizaron dos estrategias con diferentes tipos de anticuerpos para detectar a las proteínas bacterianas que hayan reconocido a las células HEp-2 durante el ensayo; en una estrategia se empleó un suero anti-EPEC producido en conejo

(descrito anteriormente) y en la otra se utilizaron anticuerpos sIgA de leche materna (descrito anteriormente). El suero anti-EPEC se utilizó a una dilución 1:100; los anticuerpos secundarios anti-IgG a una dilución 1:5000. Los anticuerpos sIgA de leche materna se utilizaron a una dilución de 1:50; los anticuerpos anti-IgA a una dilución 1:4000.

7.8 Método de identificación de proteínas transferidas por EPEC a las células HEp-2

7.8.1 Crecimiento bacteriano, cultivo celular, condiciones de infección celular e inmunofluorescencia

La cepa de EPEC se creció por 16 horas en caldo LB a 37°C, posteriormente el cultivo bacteriano se diluyó 1:100 con medio de cultivo para células epiteliales DMEM y se incubaron por 3 horas más, éste último cultivo es para activar a las bacterias y sean capaces de adherirse a las células durante el ensayo. A la monocapa de células HEp-2 (formada en los cubreobjetos de cada pozo de la placa) se le agregó 30 µl de cultivo bacteriano en fase logarítmica ($OD_{600nm} \sim 0.5$) y se incubaron por 3 ó 6 horas a 37°C en la incubadora de CO₂ (Manjarrez-Hernandez *et al*, 2000). Las bacterias adheridas a la superficie de las células HEp-2 se observaron mediante inmunofluorescencia. Para esto, se lavaron las monocapas celulares con PBS, las células se fijaron con 2% de formaldehído, se lavaron y se incubaron por 1 hora con un suero anti-EPEC (1:100) en presencia de 10% de suero de caballo en PBS. Después de lavar se agregó el segundo anticuerpo anti-conejo Alexa Fluor fluorescente conjugado (1:5000) en PBS y se incubó por 1 hora en la oscuridad. Finalmente el cubreobjetos con la monocapa celular se montó con un medio especial para fluorescencia (Vectashield). Las imágenes se analizaron usando un microscopio confocal laser scanning (Olympus FluoView FV1000 Confocal Laser Scanning Biological Microscope, objective lens 60 x NA 1.45).

7.8.2 Fraccionamiento celular y extracción de proteínas epiteliales

El fraccionamiento celular se llevó a cabo mediante una combinación de métodos ya establecidos. La monocapa de células HEp-2 infectadas se lavó con PBS frío, se desprendió suavemente (por raspado con un gendarme de plástico) y se lavó una vez más con solución de lisis (10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EGTA, pH 7.4, and 0.1 mg/ml PMSF). Las células se suspendieron en 200 µl de solución de lisis y se mantuvieron en hielo por 15 minutos para permitir que éstas aumenten de volumen. Las células se lisaron por congelamiento y descongelamiento, liberando al exterior a las proteínas citoplasmáticas; el homogenado se centrifugó a 16,000 x *g*, por 20 minutos a 4°C. El sobrenadante (fracción citoplasmática) se ultracentrifugó (41,000 x *g*, por 20 minutos) para remover contaminantes de membrana. El botón celular se lavó y las células se lisaron mecánicamente mediante el paso a través de una jeringa de insulina con aguja (6 veces) en 200 µl de solución de lisis conteniendo inhibidores de proteasas. Las bacterias, células HEp-2 no-rotas, núcleos celulares, y citoesqueleto se obtuvieron en un botón mediante una centrifugación a baja- velocidad (3,000 x *g*, por 15 minutos a 4°C). El sobrenadante se ultracentrifugó por 30 minutos a 41,000 x *g*, para obtener la fracción de membrana (botón) (Gauthier *et al*, 2000). El botón resultante de la centrifugación a baja velocidad se trató con 200 µl de la solución Triton X-100-DOC (20 mM HEPES [pH 7.4], 1 % (v/v) Triton X-100, 1 % (w/v) deoxicolato de sodio [DOC], 100 mM cloruro de sodio, 5 mM EDTA, y con inhibidores de proteasas) para solubilizar las proteínas de membrana, seguido por otra centrifugación a 14,000 x *g*, por 15 minutos. El material insoluble del botón se extrajo con 9 M de urea, 100 mM DTT, y 1 % (v/v) NP40 para obtener las proteínas del citoesqueleto vimentina y actina en el sobrenadante después de la centrifugación a 14,000 x *g*, por 15 minutos (Mahadevan *et al*, 1988). Las proteínas (marcadores celulares) tubulina y calnexina se usaron como un control en el fraccionamiento celular.

7.8.3 Ensayo de unión de proteínas a células HEp-2

La fracción de proteínas que contiene la proteína de 70 kDa (100 µg/ml) o la proteína EspC purificada (60 µg/ml) se probaron para evaluar la unión e internalización a células HEp-2. Las proteínas se diluyeron en DMEM y se agregaron a la monocapa celular (sin antibióticos o suero) a un volumen final de 3 ml por plato durante 2, 6 ó 12 horas en una atmósfera de CO₂ a 37°C. Después de la incubación, el medio se aspiró, las células se lavaron 3 veces con PBS, se desprendieron suavemente y se procesaron para el método de fraccionamiento celular descrito anteriormente, o se hizo una extracción de células completas con la solución de Laemmli. Las fracciones se analizaron por inmunodetección usando suero anti-70 kDa o anti-EspC.

7.8.4 Identificación de la proteína de 70 kDa de EPEC

Para la secuenciación del NH₂-amino terminal, la banda de la proteína de 70 kDa se cortó y extrajo del gel (SDS-PAGE), se enjuagó con agua destilada, se destiñó, se redujo, se carbamidometiló, se digirió con tripsina (Promega, MA) y se extrajo del gel como previamente se describió (Matsudaria 1993). Los péptidos se purificaron por cromatografía de fase-reversa en HPLC. Se aisló un péptido en forma pura y se secuenció por degradación de Edman en fase gaseosa (LF 3000, Beckman Instruments, Irvine, CA). La proteína de 70 kDa se identificó mediante una búsqueda en la base de datos BLAST usando la secuencia del péptido obtenido.

8. RESULTADOS

8.1 Anticuerpos de sIgA de leche materna reconocen proteínas en distintas cepas EPEC

Se analizó la respuesta de anticuerpos sIgA de leche materna en 20 diferentes cepas de EPEC (las cepas se aislaron de 20 muestras de niños con diarrea) las cuales fueron capaces de producir la lesión A/E en células HEp-2, también se analizó dicha respuesta en 20 cepas de *E. coli* no virulentas (aisladas de 20 muestras de heces de niños sanos) incapaces de producir la lesión A/E en las células cultivadas. La localización de la lesión A/E se realizó mediante la detección de la α -actinina acumulada en las células HEp-2 infectadas y se observó mediante contraste de fase e inmunofluorescencia (descrito en métodos). Los anticuerpos sIgA purificados reconocieron principalmente tres proteínas de 94, 80 y 70 kDa, expresadas únicamente por las 20 cepas EPEC; mientras que las cepas de *E. coli* no virulentas fueron incapaces de generar una respuesta a sIgA (Tabla 1).

Tabla 1. Cepas EPEC productoras de la lesión A/E expresan tres proteínas de superficie, reconocidas por sIgA de leche materna

Cepa	Serotipo	Respuesta de sIgA a		
		94 kDa	80 kDa	70 kDa
E2348/69	O127:H6	+	+	+
88255	OR:H6	+	+	+
B171	O11:NM	+	+	+
88259	O55:H6	+	+	+
29358	O11ab:NM	±	+	+
65570/0	O55:H6	+	+	+
E851/71	O142H:6	+	-	+
Sc80	O86:H34	+	±	+
47151	O111:NM	+	+	+
41141	O111ac:NM	+	+	+
65553	O114:H2	+	+	+
65893	O114:H2	+	+	+
65900	O114:H2	+	+	+
47146	O111ab:NM	+	+	+
203680	O119:H6	+	+	+
94645	O119:H6	+	+	+
E380/69	O114:H2	+	+	+
88263	O55:H6	+	+	+
66295	O126:NM	+	+	-
63961	O145:H45	+	+	+

±: bandas difusas inmunoteñidas débilmente en la inmunodetección

8.2 Proteínas de EPEC que interactúan con células HEp-2 detectadas mediante el uso de anticuerpos sIgA, suero anti-EPEC ó radio-ensayo

8.2.1 Obtención de una fracción de proteínas de superficie bacteriana

Para detectar las proteínas de EPEC que reconozcan células epiteliales, se realizó una preparación cruda de proteínas de superficie bacteriana por tratamiento mecánico de la bacteria mediante una leve sonicación. Durante el proceso de sonicación se determinó la intensidad, el tiempo y los pulsos necesarios para desprender o extraer las proteínas de la superficie bacteriana (cepa E2348/69) con el mínimo rompimiento de los compartimentos celulares (ver Métodos). Posteriormente se seleccionó la velocidad y tiempo de centrifugación para la obtención de las proteínas de superficie.

Una vez que se obtuvo la fracción de proteínas de superficie, esta se analizó por inmunodetección utilizando suero anti-bfp adsorbido (control positivo de fimbrias) y anticuerpos contra una proteína de membrana externa, anti-intimina (control de daño a la membrana celular) (Fig. 6a y 6b). Se utilizaron como controles de la obtención de proteínas de superficie la cepa JPN15 (cepa que no expresa las fimbrias llamadas bfp); y la cepa CVD206 (no expresa la proteína de membrana externa intimina).

Los resultados muestran que utilizando 5 pulsos (20 Watts) por 15 segundos (2 veces) podíamos recuperar la mayor cantidad de proteínas de superficie de la bacteria con un mínimo de contaminantes de membrana (Fig. 6a).

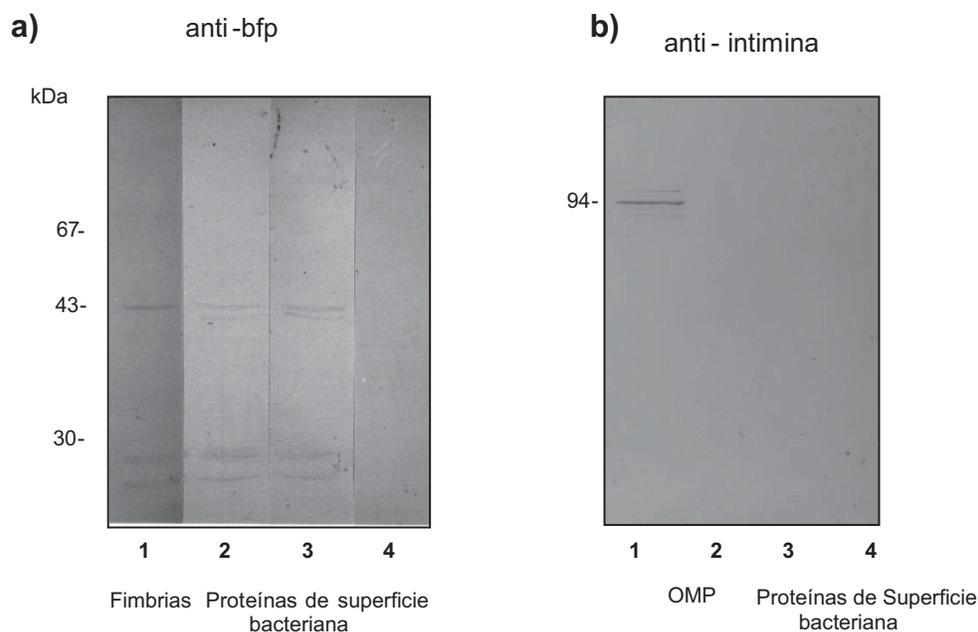


Fig. 6.- Inmunotransferencia que muestra los controles del método del fraccionamiento bacteriano (basado en sonicación y centrifugación) y obtención de las fracciones enriquecidas en; fimbrias y proteínas de membrana externa (OMP). Se utilizó (a) suero anti-bfp adsorbido y (b) anti-intimina. **(a)** Los bfp se detectaron en la fracción de fimbrias (carril 1), y en la obtención de proteínas de superficie bacteriana con 5 pulsos de 15 y 30 segundos (carril 2 y 3 respectivamente), obtenidas de la cepa E2348/69. No se observó ninguna banda en la obtención de proteínas de superficie obtenidas de la cepa JPN15 (bfp⁻) (carril 4). **(b)** La intimina se detectó en la fracción obtenida de proteínas de membrana externa (OMP) a partir de la cepa E2348/69 (carril 1); no se observaron bandas en la fracción de OMP de la cepa mutante CVD206 (int⁻) (carril 2), ó fracción de proteínas de superficie bacteriana de la cepa E2348/69 con 5 pulsos de 15" y 30" segundos (carril 3 y 4) respectivamente.

8.2.2 Inhibición de la adherencia de EPEC en células HEp-2 por proteínas de superficie bacteriana

Se realizó un ensayo de inhibición de la adherencia de la cepa E2348/69 en células HEp-2 utilizando 3 diferentes concentraciones de proteínas de superficie bacteriana: 0.2, 0.5 y 1.0 mg/ml. El número de bacterias que se adhirieron a las células en el control experimental sin proteínas de superficie bacteriana fue de 3,307 bacterias por 200 células HEp-2 (100% de adherencia). Las proteínas de superficie bacteriana inhibieron marcadamente la adherencia de EPEC a las células en todas las concentraciones usadas, el porcentaje de inhibición fue de 10.5 ± 3.8 , 51.4 ± 4.7 y $55.2\% \pm 6.0$ respectivamente (Tabla 2). Las proteínas de superficie extraídas de la cepa JPN15 inhibieron la adherencia de la

cepa E2348/69 a células HEp-2 en un porcentaje similar (11.2 ± 4.1 y $55.1\% \pm 3.0$) al causado por las proteínas de superficie de la cepa E2348/69, indicando que los bfp no están implicados en este efecto de inhibición. Estos ensayos de inhibición se realizaron tres veces y por duplicado.

Tabla 2. Proteínas de superficie bacteriana que inhiben la adherencia de EPEC en células HEp-2

Proteínas de Superficie Bacteriana	Bacterias adheridas /200 células	% de inhibición
-	3,307	0.0
0.2 mg/ml	2,962	10.5 ± 3.8
0.5 mg/ml	1,610	51.4 ± 4.7
1.0 mg/ml	1,482	52.2 ± 6.0

8.2.3 Fracción enriquecida de adhesinas obtenidas de E2348/69 inhibe la adherencia de EPEC en las células HEp-2

Se obtuvo una sub-fracción de adhesinas a partir de la fracción de proteínas de superficie bacteriana de EPEC. Esta subfracción de adhesinas se obtuvo por calentamiento de la fracción de proteínas de superficie según métodos ya establecidos (Moch *et al*, 1987; De Graaf y Roorda, 1982). Dicha subfracción enriquecida en adhesinas (cepa E2348/69) se probó para determinar si estas proteínas podían bloquear la adherencia de la bacteria a las células HEp-2. Encontramos que en contraste con la subfracción de adhesinas de las cepas de *E. coli* no adherentes, las adhesinas de EPEC inhibieron la adherencia de la bacteria a las células HEp-2. La incubación de las células HEp-2 con 150 µg/ml o 300 µg/ml de la fracción de adhesinas antes del ensayo de adherencia redujo el porcentaje de adherencia de la bacteria a las células HEp-2; el porcentaje de inhibición de la adherencia fue de 16.2 y 41.4% respectivamente (Tabla 3).

Tabla 3. Proteínas de una subfracción de adhesinas (de E2348/69) inhibieron la adherencia de EPEC en células HEp-2

	% de inhibición a la adherencia por proteínas de una fracción de adhesinas	
	150 µg/ml	300 µg/ml
Células HEp-2 incubadas con las proteínas antes del ensayo de adherencia	16.2 ± 6.1	41.4 ± 3.1
Células incubadas con las proteínas durante el ensayo de adherencia	27.6 ± 4.2	82.8 ± 2.6

8.2.4 Diferentes estrategias para detectar proteínas de EPEC que se unen a las células HEp-2 en el ensayo de reconocimiento

8.2.4.1 Proteínas de superficie bacteriana de EPEC se unen a células HEp-2

Se utilizaron 3 diferentes estrategias para detectar las proteínas de EPEC (fracción de proteínas de superficie) que reconozcan células HEp-2 durante un ensayo de reconocimiento: 1) Radio-ensayo, se marca radioactivamente a la bacteria con metionina- (S^{35}) y se obtiene la fracción de proteínas de superficie y adhesinas para realizar el ensayo de reconocimiento; 2) inmunodetección con suero anti-EPEC para detectar las proteínas que se hayan unido a las células HEp-2 durante el ensayo de reconocimiento. El suero anti-EPEC se produjo mediante la inmunización de conejos con proteínas totales de membrana y superficie; 3) inmunodetección con anticuerpos sIgA de leche materna (un combinado de leche proveniente de 10 diferentes madres) para detectar las proteínas que se hayan unido a las células HEp-2. Los resultados del ensayo de unión a células HEp-2 muestran, en los geles, varias bandas de proteínas de EPEC con diferentes masas moleculares (Fig. 7). Las proteínas que reconocieron a las células epiteliales por los 3 diferentes ensayos de reconocimiento tuvieron pesos moleculares aproximados de: 90; 43 y 38 kDa (Tabla 4). También se encontró una proteína de 70 kDa que fue detectada con

suero anti-EPEC y por anticuerpos sIgA, mientras que la proteína de 28 kDa solamente pudo ser detectada por el radio-ensayo (Tabla 4); (Fig. 7). Estos ensayos se realizaron tres veces y por duplicado.

Tabla 4. Proteínas de superficie bacteriana que se unieron a células HEp-2 en los ensayos de reconocimiento y detectadas por tres diferentes estrategias.

Radio-ensayo (S^{35})	Anti-EPEC	IgA de leche materna
90 kDa	90 kDa	90 kDa
-	70 kDa	70 kDa
43 kDa	43 kDa	43 kDa
38 kDa	38 kDa	38 kDa
28 kDa	-	-

Peso molecular aproximado (kDa) en los geles, SDS-PAGE.

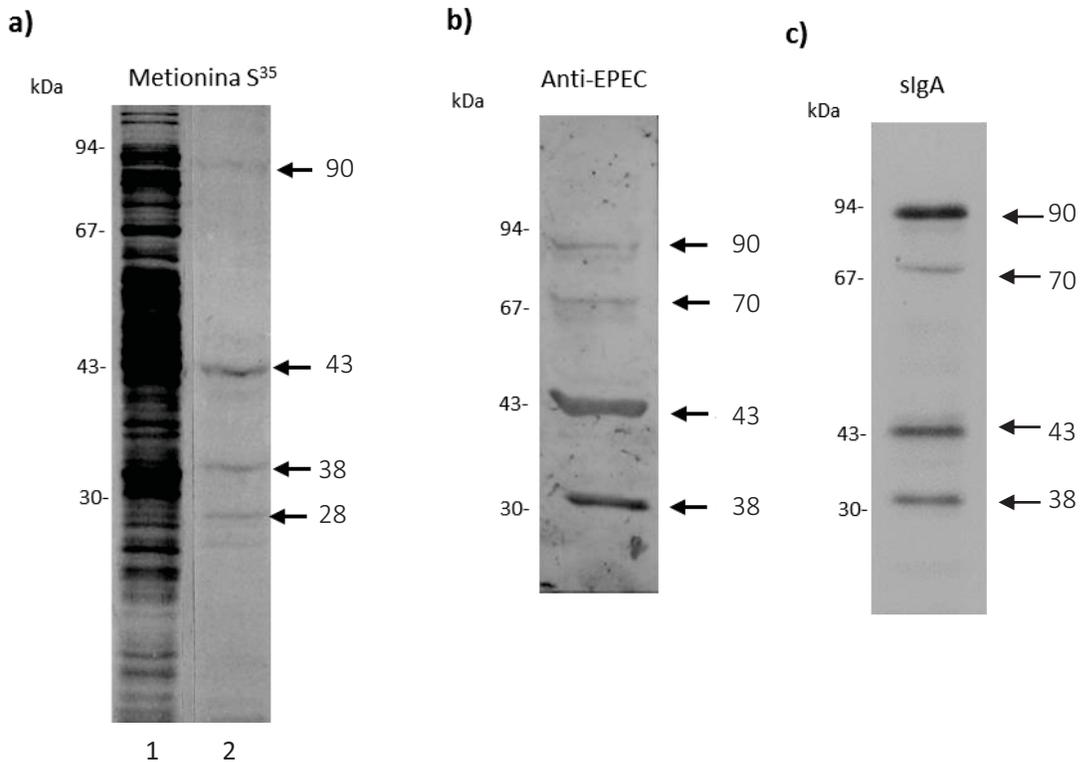


Fig. 7.- Proteínas de superficie bacteriana de EPEC (cepa E2348/69) que se unieron a células HEp-2 durante el ensayo de reconocimiento. a) Detectadas mediante autoradiografía del radio-ensayo utilizando metionina- (S^{35}) ; 0.4 mCi por ml (actividad específica: 1,140.0 Ci/mmol) y después de electroforesis (SDS-PAGE). Carril 1: proteínas de superficie totales antes del ensayo de unión. Carril 2: proteínas de superficie bacteriana que reconocieron células HEp-2. b) Inmunodetectadas con suero anti-EPEC dilución 1:100 y anti-IgG 1:5000. c) Inmunodetectadas con anticuerpos slgA de leche materna dilución 1:50 y anti-IgA 1:4000.

8.2.4.2 La fracción de adhesinas de EPEC reconoce células HEp-2

Se realizó el ensayo de reconocimiento a células HEp-2 con la fracción enriquecida de adhesinas de la cepa E2348/69. Varias proteínas de esta fracción se unieron a las células HEp-2 durante los ensayos de reconocimiento, dos de estas proteínas con una masa molecular aproximada de 90 y 43 kDa se detectaron con las tres diferentes estrategias; radio-ensayo, suero anti-EPEC y anticuerpos slgA. Dos proteínas de 115 y 70 kDa fueron reconocidas por el suero anti-EPEC y anticuerpos slgA, finalmente, una proteína de 38 kDa únicamente se pudo visualizar con los slgA (Tabla 5); (Fig. 8).

Tabla 5. Proteínas de la fracción de adhesinas que se unieron a células HEp-2 detectadas por tres diferentes estrategias

Radio-ensayo (S^{35})	Anti-EPEC	slgA
-	115 kDa	115 kDa
90 kDa	90 kDa	90 kDa
-	70 kDa	70 kDa
43 kDa	43 kDa	43 kDa
-	-	38 kDa

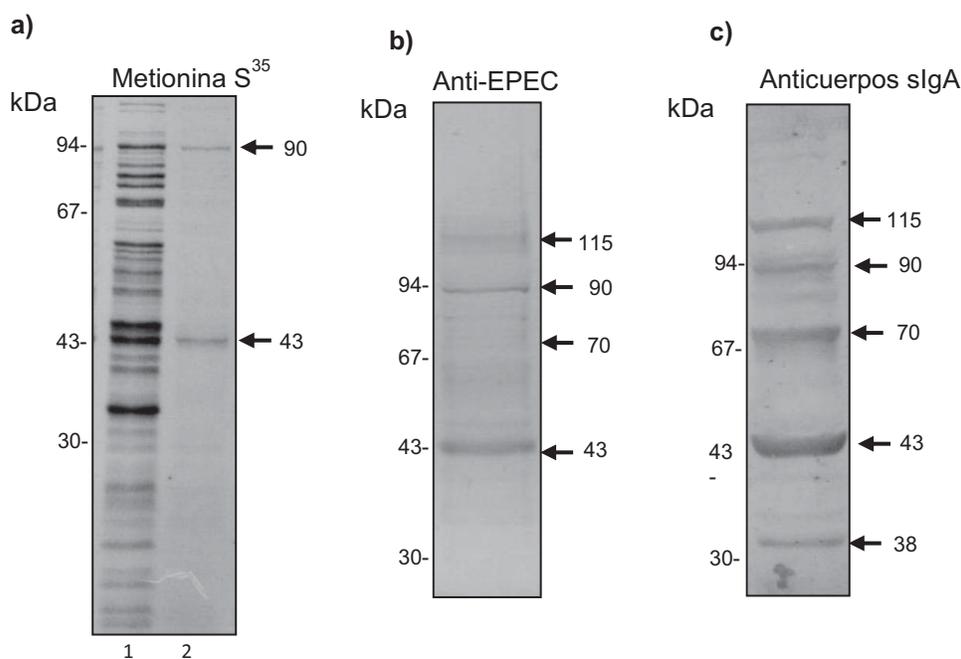


Fig. 8.- Proteínas de la fracción de adhesinas de EPEC (cepa E2348/69) que se unieron a células HEp-2 en el ensayo de reconocimiento. a) La fracción de adhesinas se obtuvo después de marcar a las bacterias con metionina- (S^{35}) ; 0.4 mCi por ml (actividad específica: 1,140.0 Ci/mmol). Carril 1, autoradiografía de electroforesis (SDS-PAGE) de la fracción de adhesinas totales antes del ensayo de unión. Carril 2, adhesinas que reconocieron células HEp-2. b) y c) Inmunotransferencia de las adhesinas que se unieron o reconocieron células HEp-2 detectadas mediante suero anti-EPEC dilución 1:100 y anti-IgG 1:5000 o mediante anticuerpos slgA de leche materna dilución 1:50 y anti-IgA 1:4000, respectivamente.

8.2.4.3 Cultivo de EPEC a 25°C

Cuando EPEC se cultivó a 25°C, las bacterias perdieron la habilidad para adherirse a las células HEp-2 (Tabla 6). Para conocer si la pérdida de la adherencia está relacionada con la reducción de la expresión de estas proteínas, se obtuvo una fracción de adhesinas después de haber cultivado las bacterias a 25°C. Posteriormente se realizó el ensayo de unión a células HEp-2 y se observó una marcada reducción de la expresión de la proteína de 70 kDa, mientras que no hubo modificación en la producción de las otras proteínas (43 y 90 kDa) (Fig. 9).

Tabla 6. Efecto de la temperatura en la adherencia de EPEC a células HEp-2

Temperatura a la cual Creció la bacteria (14 h)	Temperatura del ensayo de adherencia (3h)	% de adherencia
37°C	37°C	⇒ 100
25°C	37°C	⇒ 20.1
25°C	25°C	⇒ 20.1

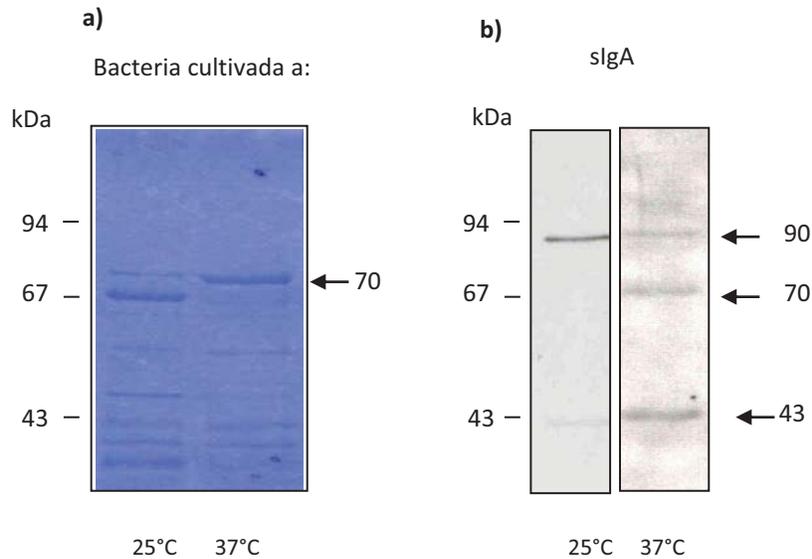


Fig. 9.- Disminución de la expresión de la proteína de 70 kDa cuando la bacteria EPEC (E2348/69) es cultivada a 25°C. a) Gel de acrilamida teñido con azul de Coomassie muestra las proteínas de la fracción de adhesinas, obtenidas de bacterias cultivadas a 25°C ó 37°C. La flecha muestra la banda de la proteína de 70 kDa. b) Inmunodetección muestra las proteínas de la fracción de adhesinas que reaccionaron con los anticuerpos sIgA, las adhesinas se obtuvieron de bacterias cultivadas a 25°C ó 37°C.

8.2.4.4 Anticuerpos purificados anti-70 kDa inhiben la adherencia de EPEC a células HEp-2

Para conocer si la proteína de superficie bacteriana de 70 kDa de EPEC, estaba involucrada en la adherencia a las células HEp-2, se produjeron anticuerpos anti-70 kDa mediante la inmunización de conejos con la proteína de 70 kDa. Los anticuerpos purificados inhibieron la adherencia de EPEC a las células. Los resultados mostraron que a 0.5 y 1.0 mg/ml. Los anticuerpos inhibieron la adherencia en un 62.2 ± 2.2 y $86.1\% \pm 3.0$ respectivamente (Tabla 7).

Tabla 7. Anticuerpos específicos anti-70 kDa inhiben la adherencia de EPEC a células HEp-2.

% de inhibición a la adherencia		
Anticuerpos anti-70 kDa	0.5 mg/ml	1.0 mg/ml
Células incubadas con los anticuerpos en el ensayo de adherencia	62.2 ± 2.2	86.1 ± 3.0

8.3 Proteínas transferidas por EPEC a células HEp-2 reaccionan con los anticuerpos sIgA de leche materna

En este estudio además se identificaron varias proteínas transferidas por EPEC mediante un ensayo de infección a células HEp-2, utilizando anticuerpos sIgA de leche materna. La estrategia que se eligió consiste en identificar antígenos de EPEC que interactúen específicamente con células epiteliales durante la infección, permitiendo de esta manera detectar a las proteínas antigénicas que la bacteria deposita naturalmente en las células HEp-2. Antes de examinar la interacción de EPEC con las células HEp-2, se verificó la adherencia de EPEC sobre la superficie celular mediante el ensayo de adhesión en células HEp-2 y tinción fluorescente (Fig.10).

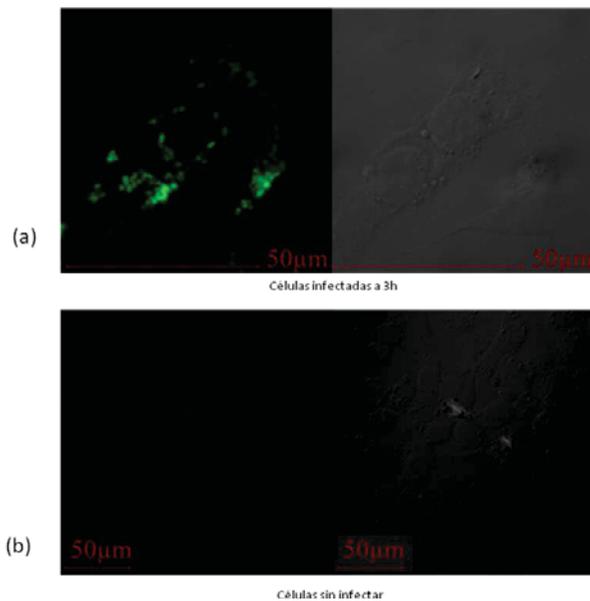


Fig. 10. Inmunofluorescencia que muestra imágenes de las bacterias adheridas a las células epiteliales cultivadas. (a) Bacterias (Cepa E2348/69) adheridas a la superficie de células HEp-2 después de 3 horas de infección, detectadas mediante anticuerpos anti-EPEC y anticuerpo secundarios conjugados Alexa Fluor 488 (verde). (b) células sin infectar tratadas de la misma forma que en (a).

8.3.1 Detección de las proteínas transferidas por EPEC a células HEp-2 en diferentes fracciones celulares (citoplasmática, membrana y citoesquelética)

Para investigar si la sIgA de leche reacciona contra proteínas de EPEC transferidas o entregadas dentro de las células epiteliales, se obtuvieron fracciones sub-celulares a partir de células infectadas y se analizaron por inmunodetección (Western blotting). Previamente, se encontró que las muestras de leche de madres de estatus socioeconómico bajo, dieron una reacción más fuerte de sIgA a extractos proteínicos de EPEC que las muestras de leche obtenidas de mujeres universitarias (Gavilanes *et al*, 2001). Para este estudio, se usaron las muestras de leche materna que dieron las reacciones más intensas de sIgA a las proteínas de EPEC. Los anticuerpos sIgA purificados, de madres de estatus socioeconómico bajo, inhibieron marcadamente la adhesión bacteriana (cepa E2348/69) a células HEp-2. Los valores de la inhibición producidos por

0.5 y 1.0 mg/ml de sIgA se resumen en la tabla 8. Estos ensayos se repitieron tres veces y se hicieron por duplicado.

Tabla 8. Capacidad de los anticuerpos sIgA de inhibir la adherencia de EPEC a las células HEp-2

Anticuerpos sIgA	N° de bacterias adheridas /200 células	% inhibición
Sin anticuerpos	718 ± 52	0.0
0.5 mg/ml	246.9 ± 18	63.1
1.0 mg/ml	106.26 ± 14	85.2

Las monocapas de células HEp-2 se infectaron con E2348/69 entre 1 y 6 horas, y se realizó un procedimiento secuencial de extracción de proteínas para preparar diferentes fracciones; citoplasmática, membrana y citoesquelética. Después de una hora de infección, los anticuerpos sIgA no reaccionaron con ninguna proteína (dato no mostrado); sin embargo, a 3 horas post-infección, se detectaron tres proteínas en la fracción citoplasmática que claramente reaccionaron con los anticuerpos sIgA; una banda prominente de 80 kDa y otras dos bandas de 38 y 115 kDa, Fig. 11 (a). La fracción de membrana mostró tres bandas de proteínas reactivas de aproximadamente 70, 80 y 90 kDa. En la fracción del citoesqueleto se observaron proteínas en el rango de 60-90 kDa que reaccionaron con los sIgA, Fig. 11 (a). A las 6 horas post-infección se encontraron esencialmente el mismo número de bandas inmuno-teñidas, con la excepción de una banda más de 38 kDa en las fracciones de membrana, (que ya encontraba en la fracción citoplasmática a las 3 horas), la cual sospechamos que se trataba de EspB, Fig. 11 (b). En contraste, la infección de células HEp-2 con la mutante en el T3SS (Δ escN) no mostró ninguna reacción a proteínas con los anticuerpos sIgA en la fracción citoplasmática, sin embargo en la fracción de membrana se observaron dos bandas de 70 y 94 kDa,

indicando que estas proteínas no son transferidas por el T3SS, Fig. 11 (c). Otras cepas adherentes de *E. coli* (uropatógena CFT073 y fecal 037231) que no pertenecen al patotipo de las EPEC y que carecen del T3SS no fueron capaces de reaccionar con los anticuerpos sIgA en las células HEp-2 infectadas con estas cepas a 3 ó 6 horas post-infección (dato no mostrado). El extracto de bacterias completas de EPEC, obtenidas por calentamiento a ebullición en solución amortiguadora de SDS (Laemmli 1970) mostró solo dos bandas de proteínas que reaccionaron con los anticuerpos sIgA, un patrón que es diferente del obtenido con células infectadas con EPEC Fig.11 (c).

Para demostrar que las fracciones celulares obtenidas contienen proteínas transferidas por la bacteria EPEC a las células HEp-2 durante el ensayo de infección, un botón bacteriano de EPEC fue sujeto al mismo método de fraccionamiento celular usado para las células HEp-2 infectadas. Brevemente, se obtuvo un botón bacteriano a las 3 horas de la infección de EPEC, crecidas en DMEM, y se fraccionó para obtener las supuestas fracciones celulares. La Fig. 11 (d) muestra muy poca reactividad a las proteínas bacterianas liberadas directamente por el método de fraccionamiento empleado; se observaron unas bandas pálidas con una masa molecular diferente de las proteínas que fueron transferidas por EPEC. Estos resultados indican que la fracción celular de HEp-2 no contiene contaminantes bacterianos relevantes. La Fig. 11 (e) muestra el control para el procedimiento del fraccionamiento celular; La calnexina, una proteína marcadora de membrana fue detectada solo en la fracción de membrana (Me); la α -tubulina, un marcador de citoesqueleto se detectó solo en la fracción de citoesqueleto (Ck). Ninguno de estos marcadores se observaron en la fracción citoplasmática.

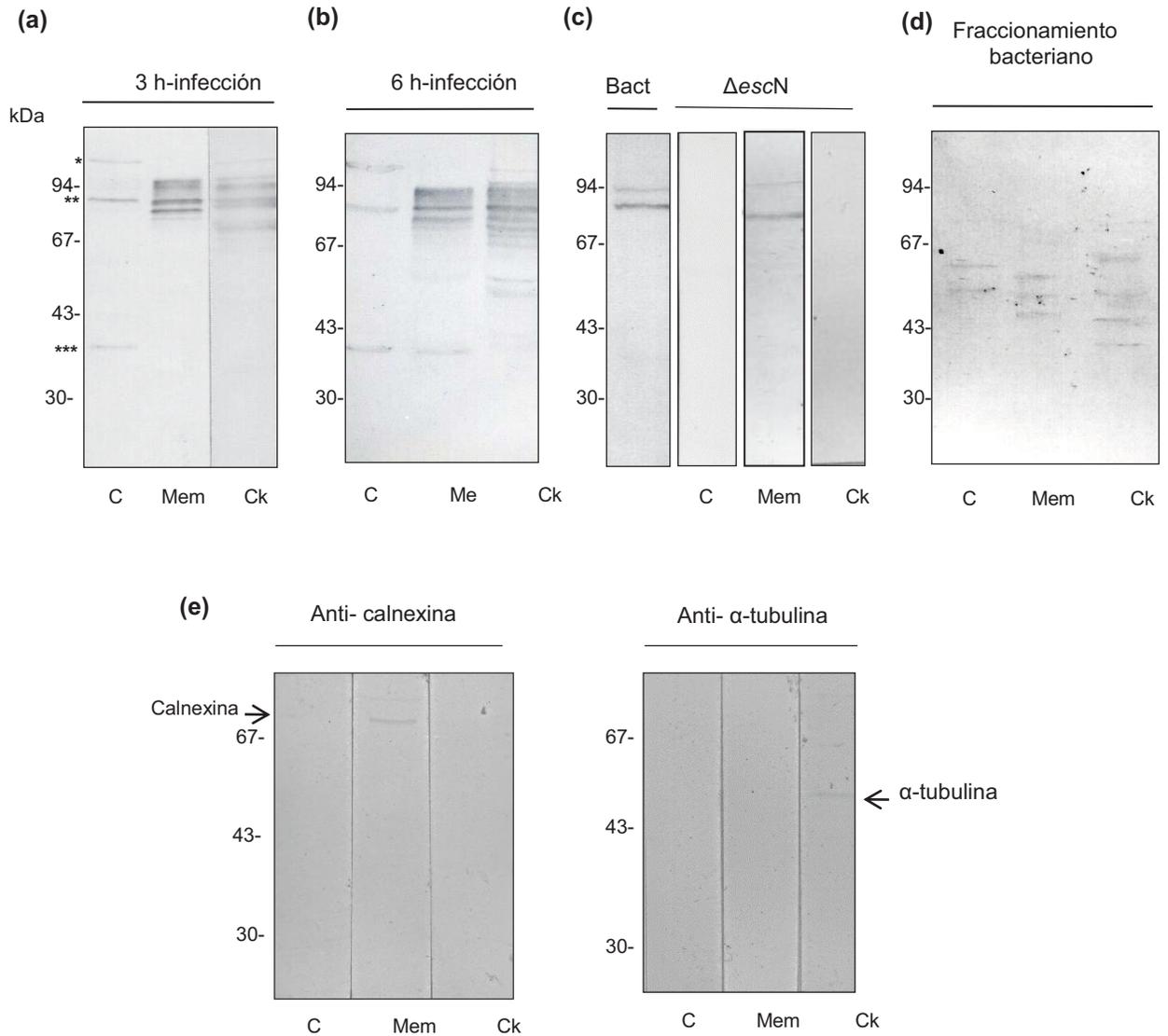


Fig. 11.- Los anticuerpos sIgA de leche materna reaccionaron con las proteínas que EPEC transfirió a las células HEP-2. (a) Células HEP-2 infectadas con E2348/69 por 3 horas ó (b) 6 horas y fraccionadas en las siguientes fracciones; citoplasmática (C), de membrana (Mem) y fracción de citoesqueleto (Ck) que reaccionaron con los anticuerpos sIgA en la inmunodetección. (c) (Bact) bacteria completa de EPEC extraída con solución de Laemmli; (Δ escN) células HEP-2 infectadas con la cepa mutante en sistema de secreción tipo 3 (T3SS), fraccionada y utilizada como control negativo. (d) Botón bacteriano de la cepa E2348/69 al que se le realizó el mismo método de fraccionamiento de las células HEP-2 infectadas (control del método). Las bandas de las proteínas se indican 115 kDa (*), 80 kDa (**) y 38 kDa (***). Control del procedimiento de fraccionamiento de las células HEP-2. Calnexina, una proteína marcadora de membrana se detectó solo en la fracción de membrana; α -tubulina, una proteína marcadora de citoesqueleto se detectó solo en la fracción citoesqueletica. Ninguna de estas dos proteínas se observó en la fracción citoplasmática.

8.3.2 Identificación de proteínas de EPEC en células HEp-2

Se sospechó que la proteína de 90 kDa de la fracción de membrana es intimina (una proteína de 94 kDa) y por lo tanto, para confirmar su identidad, se hicieron reaccionar las fracciones de las células HEp-2 infectadas con anticuerpos anti-intimina, Fig. 12 (b). Se utilizaron como controles las fracciones de membrana de células HEp-2 infectadas con una mutante en intimina Fig. 12 (d). La intimina también se encontró, aunque con menor intensidad, en la fracción de citoesqueleto de las células HEp-2 infectadas con EPEC, Fig. 12 (c). Estos datos indican que la proteína bacteriana de 90 kDa encontrada principalmente en la fracción de membrana de las células HEp-2 es intimina. La proteína Tir migra a 78 kDa en su forma bacteriana (no fosforilada) y a 90 kDa cuando es fosforilada por la célula del hospedero (Kenny *et al*, 1997). Se llevó a cabo un análisis más detallado para descubrir si la proteína de 80 kDa que reacciona con la slgA corresponde a Tir usando antisuero policlonal anti-Tir. Como se predijo, debido al tamaño molecular, los anticuerpos contra Tir y los anticuerpos slgA reaccionaron fuertemente con la misma proteína de 80 kDa en las fracciones citoplasmática, de membrana y de citoesqueleto derivadas de células HEp-2 infectadas con EPEC, Fig. 13 (a), (b). En apoyo a este resultado, las células HEp-2 infectadas con las mutantes en Tir (Δtir) o en T3SS ($\Delta escN$) no mostraron ninguna proteína reactiva con estos anticuerpos Fig. 13 (a), (b), (c). La banda de 38 kDa detectada por los anticuerpos slgA en todas las fracciones probadas fue identificada como EspB. No se observó ninguna banda de EspB en las células infectadas con la mutante en EspB ($\Delta espB$), Fig. 14 (a), (b), (c).

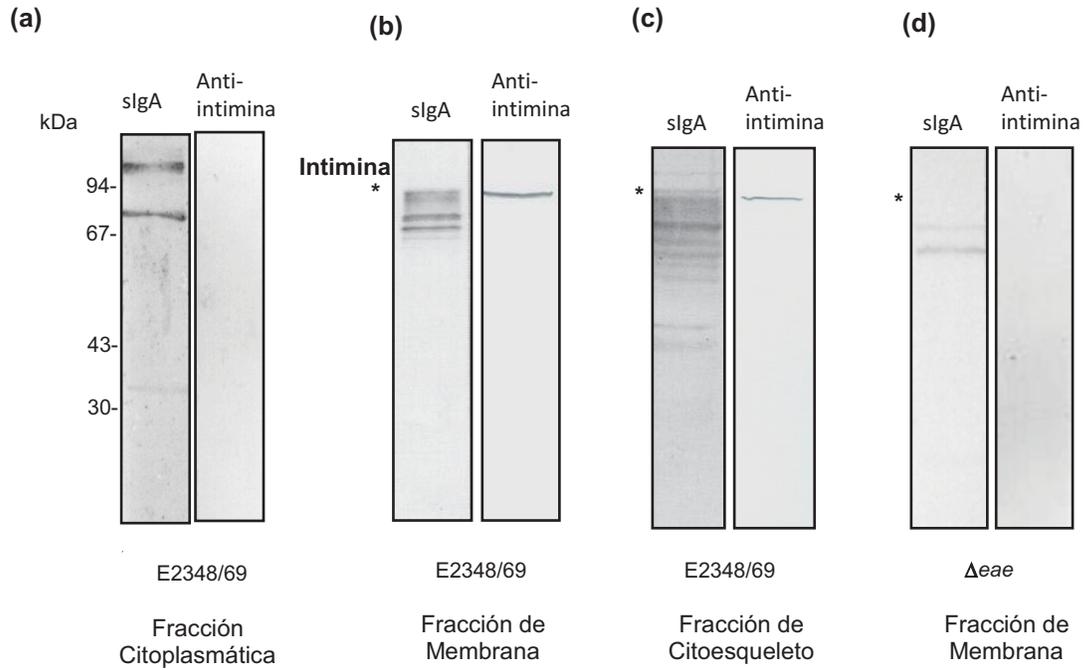


Fig. 12.- Identificación de intimina como blanco de la slgA en células infectadas con EPEC. Inmunodetección de las células HEp-2 infectadas con EPEC por 3 h. Fracciones celulares probadas con leche materna; (a) citoplasmática (b) de membrana (c) de citoesqueleto, dilución 1:50 o suero policlonal anti-intimina 280 dilución 1:200. (d) Células HEp-2 infectadas con la cepa mutante CVD 206 ($\Delta eaeA$) por 3 h. La fracción de membrana fue probada con leche materna y suero anti-intimina. La banda de la proteína intimina se indica con un asterisco.

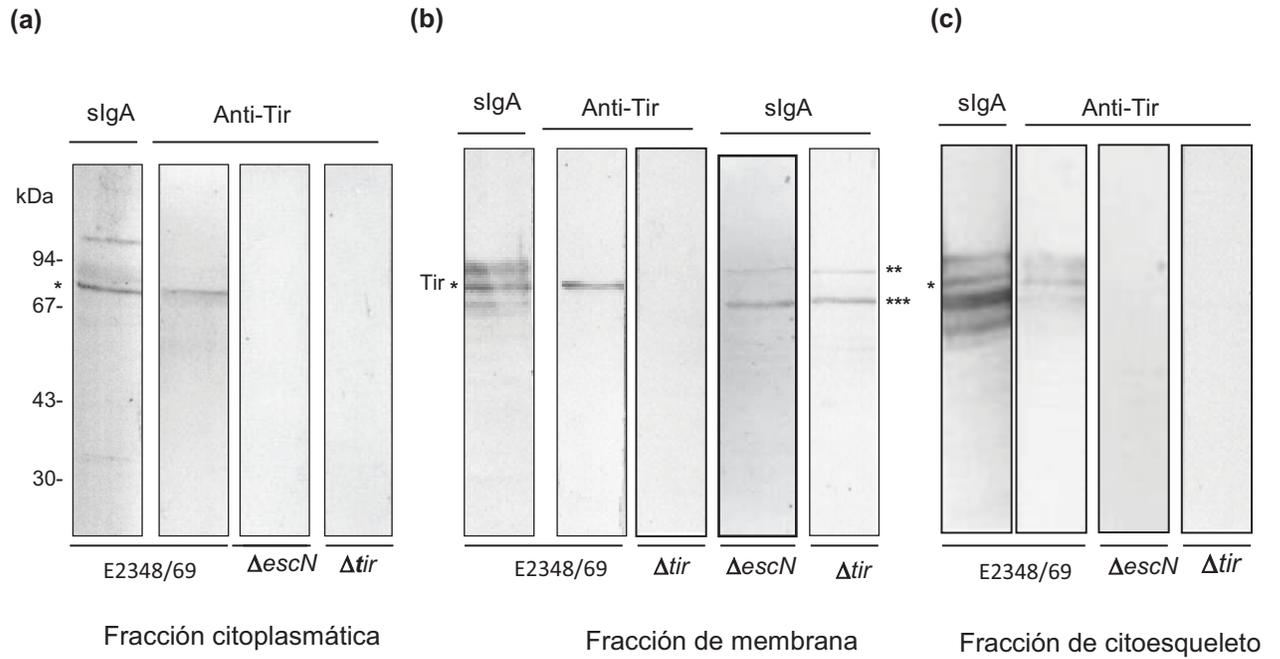


Fig. 13.- Identificación de Tir en las fracciones de la célula HEp-2 infectadas con EPEC. Inmunodetección de las células infectadas con EPEC, mutantes *escN* ($\Delta escN$) o *tir* (Δtir). (a) Fracción citoplasmática; (b) Membrana; (c) Fracción de citoesqueleto. Se indican con asteriscos las bandas que corresponden a las proteínas: Tir (*), intimina (**) y 70 kDa, (***). Se utilizó leche materna dilución 1:50 y antisuero policlonal anti-Tir dilución 1:4000.

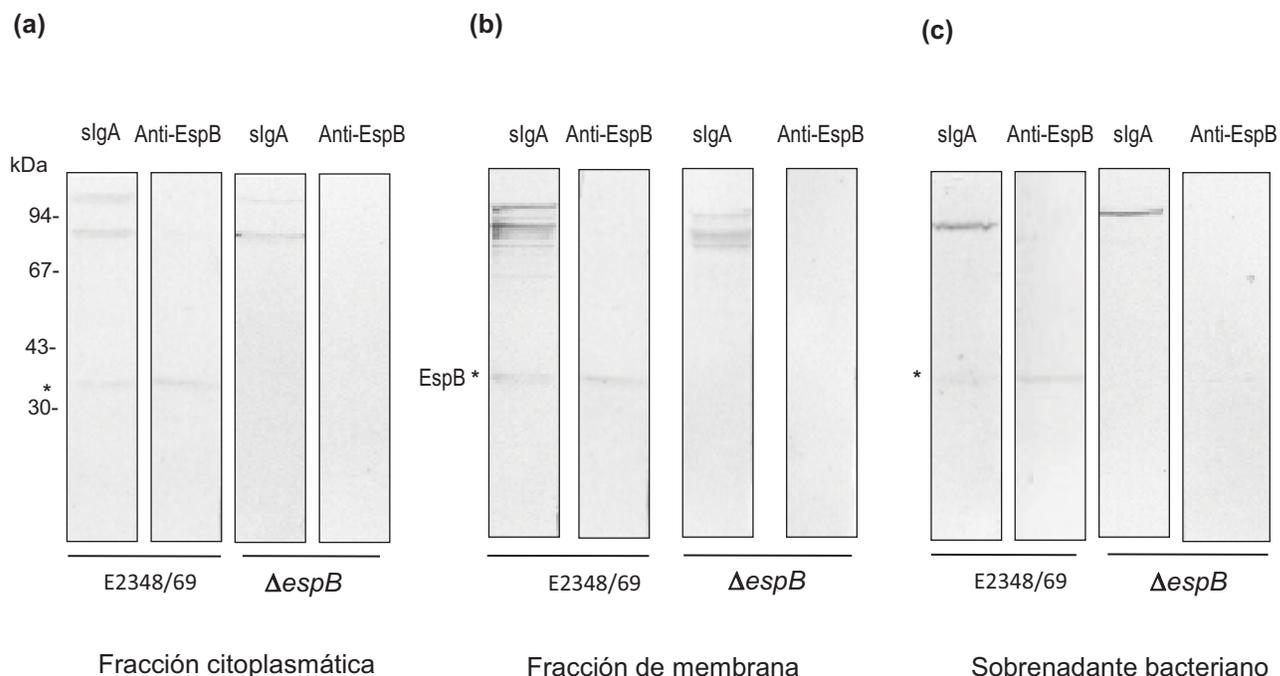


Fig. 14.- Identificación de EspB con anticuerpos slgA en células infectadas con EPEC. Las células HEp-2 fueron infectadas con la mutante en *espB* por 6 h. (a) Fracción citoplasmática; (b) membrana; (c) Cultivo de sobrenadante bacteriano (libre de bacterias) después de infectar las células por 3 h. Inmunoblot utilizando leche materna dilución 1:50 y antisuero policlonal anti-EspB dilución 1:1000. La banda correspondiente a la proteína EspB está indicada con asterisco (*).

8.3.3 Identificación de la proteína de EPEC de 70 kDa que se une a células HEp-2

La fracción de membrana de las células HEp-2 infectadas con EPEC mostró una proteína de 70 kDa que reaccionó con los slgA, Fig. 15 (a). Tir se detectó en esta fracción con un antisuero policlonal contra Tir para demostrar que la proteína de 70 kDa no es Tir, Fig. 15 (a). Debido a que la proteína de 70 kDa se detectó en una fracción de proteínas de superficie bacteriana, la proteína se aisló de la superficie celular de la bacteria mediante breve vibración sónica (sonicación) del botón bacteriano y centrifugación del sobrenadante (extracto crudo), Fig. 15 (b), (c), para identificar su secuencia de aminoácidos. La purificación de la proteína se evaluó y siguió mediante electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS (SDS-PAGE) y por inmunodetección usando los anticuerpos slgA. Esta suspensión cruda se disoció parcialmente por calentamiento a 70°C

seguido de ultracentrifugación, la proteína de 70 kDa se encontró en la fracción del sobrenadante, Fig. 15 (b), (c). La proteína de 70 kDa se continuó purificando a partir de la fracción del sobrenadante mediante cromatografía de intercambio-aniónico; la proteína eluyó de la columna con KCl entre las concentraciones de 290 y 350 mM, conteniendo como contaminante una pequeña cantidad de proteínas de bajo peso molecular (dato no mostrado). El análisis de la proteína por geles de electroforesis en dos dimensiones mostró un solo punto o mancha teñida con azul de Coomassie en la región de los 70 kDa, la cual reaccionó con los anticuerpos sIgA, Fig. 16 (a). El análisis de la secuencia de aminoácidos se realizó para determinar la identidad o naturaleza de esta proteína. La muestra de la proteína se electro-transfirió a una membrana de PVDF y sometió a digestión trípica (quimiotripsina), posteriormente los péptidos resultantes se separaron por HPLC y se secuenciaron por el método de degradación de Edman. Un péptido derivado de la proteína de 70 kDa mostró la secuencia de aminoácidos interna DAEANAEADRKFEELVQTXNQ, la cual alineó 100% con los aminoácidos 518-538 de la proteína de choque térmico 70 (Hsp70, heat shock protein) de *E. coli* O157:H7.

Se ha reportado que las proteínas Hsp60 y Hsp70 median la adherencia bacteriana (Hennequin *et al*, 2001; Huesca *et al*, 1998) por lo tanto, hay interés en saber si la proteína de EPEC Hsp70 soluble era capaz de unirse a células epiteliales. Para hacer esto, la fracción del sobrenadante de las proteínas de superficie de EPEC se incubó con la monocapa de las células HEp-2 por 2 horas a 37°C. La Fig. 16 (c) muestra que la proteína Hsp70 es capaz de unirse a las células HEp-2, lo cual sugiere que esta proteína tiene propiedades adhesivas. Al usar un antisuero policlonal anti-70 kDa, la Hsp70 también se detectó en la fracción de membrana cuando las células HEp-2 se infectaron con EPEC Fig. 16 (d).

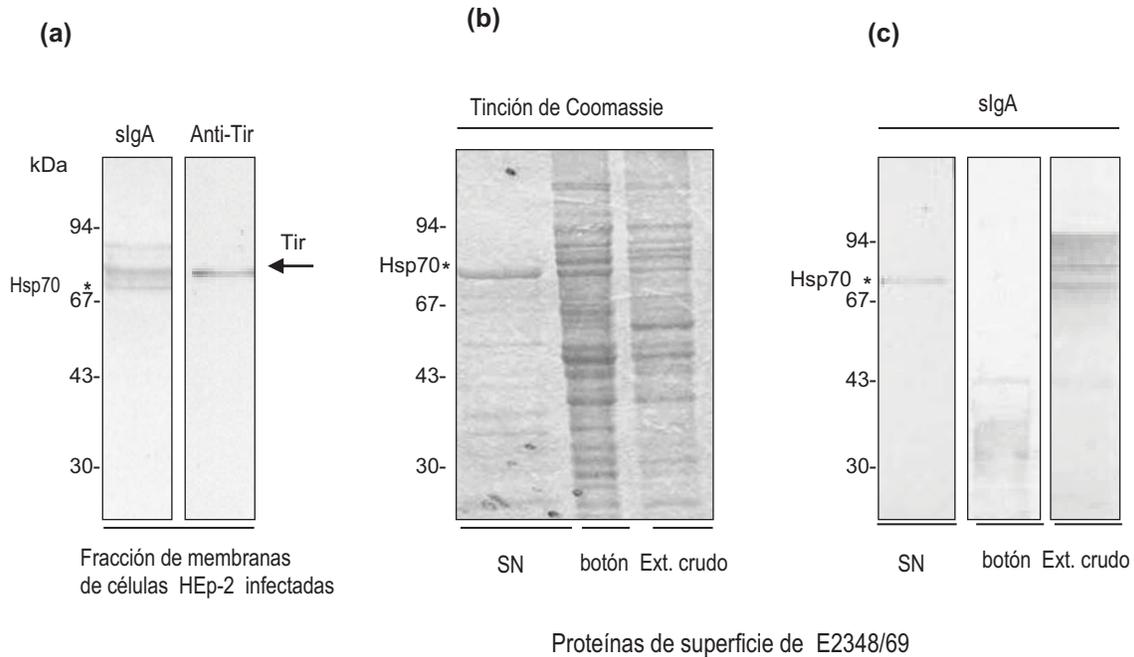


Fig. 15.- Una proteína de superficie de EPEC de 70 kDa se unió a las células HEp-2 infectadas (por 3 horas) con la cepa E2348/69 y fue reconocida por los slgA de leche materna. (a) La proteína de 70 kDa permaneció en la fracción de membrana de las células infectadas. Tir se detectó (arriba de la de 70 kDa) en la fracción de membrana de las células infectadas demostrando que la proteína de 70 kDa (*) no es Tir. (b) Extracción y aislamiento de la proteína de 70 kDa a partir de la superficie celular bacteriana (cepa E2348/69); Análisis por SDS-PAGE e inmunodetección de las fracciones obtenidas: proteínas de superficie bacteriana extraídas por sonicación breve: extracto crudo (Ext. crudo); sobrenadante (SN) y fracción de botón obtenidos después de disociar el extracto crudo por calentamiento a 70°C y ultracentrifugación. (c) Inmunodetección utilizando slgA de leche materna. (c) Las transferencias se probaron con slgA de la leche materna.

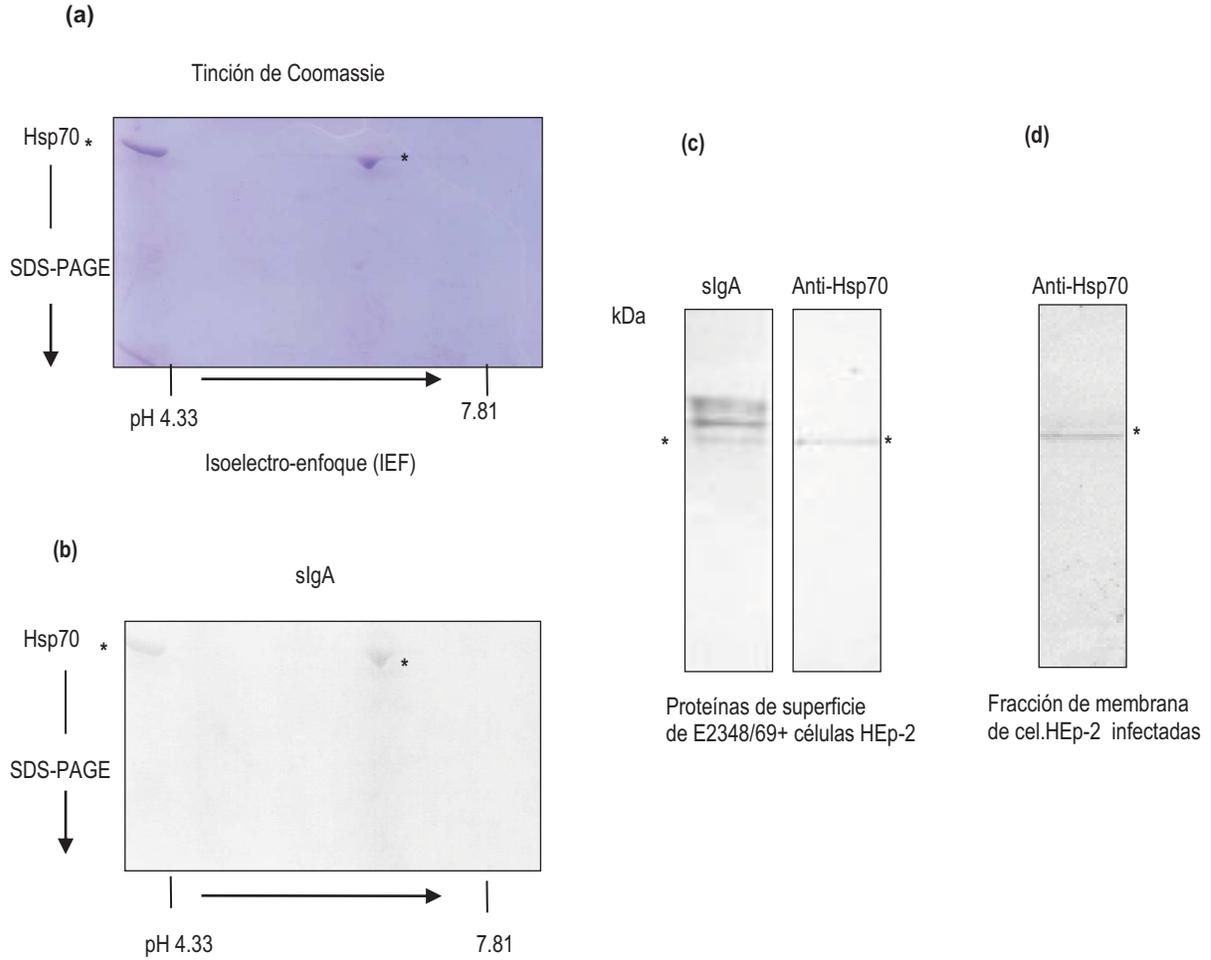


Fig. 16.- Electroforesis en gel de dos dimensiones (2D-PAGE) mostrando la purificación de la proteína de 70 kDa. (a) Tinción en azul de Coomassie y (b) Inmunodetección utilizando slgA de leche materna. Las células HEp-2 se incubaron con la fracción del sobrenadante de las proteínas de superficie bacteriana de EPEC (250 µg/ml) por 2 horas y la unión de la proteína de 70 kDa se detectó con slgA y suero anti-70 kDa. (c) y (d) Células HEp-2 infectadas con EPEC, la proteína de 70 kDa se detectó en la fracción de membrana con suero anti-70 kDa.

8.3.4 Detección de una posible nueva proteína translocada de 115 kDa

Una proteína de 115 kDa que reaccionó con la slgA se encontró en la fracción citoplasmática de células infectadas con EPEC a las 3 horas después de la infección, Fig. 17 (a). Para determinar si se trata de la proteína EspC de 110 kDa, se probó la fracción

citoplasmática con suero anti-EspC por inmunodetección. El suero específico anti-EspC no reaccionó con ninguna proteína en la fracción citoplasmática de células infectadas con EPEC, Fig. 17 (a). Para ver si la proteína EspC era reconocida por los anticuerpos sIgA después de ser secretada por EPEC, se infectaron células HEp-2 con E2348/69 o con la mutante isogénica $\Delta espC$ por 3 horas. El sobrenadante del medio de cultivo (DMEM) se colectó, se filtró para remover las bacterias, se concentró 10-veces y se probó con la sIgA de la leche materna o con el antisuero de conejo anti-EspC por inmunodetección. El antisuero específico anti-EspC y los anticuerpos sIgA reaccionaron con la misma proteína de 110 kDa en el sobrenadante de la E2348/69 pero no reaccionó con el sobrenadante de la mutante $\Delta espC$, Fig. 17 (b). Ninguno de los anticuerpos reaccionaron con la proteína de 115 kDa en este sobrenadante de cultivo, Fig. 17 (b).

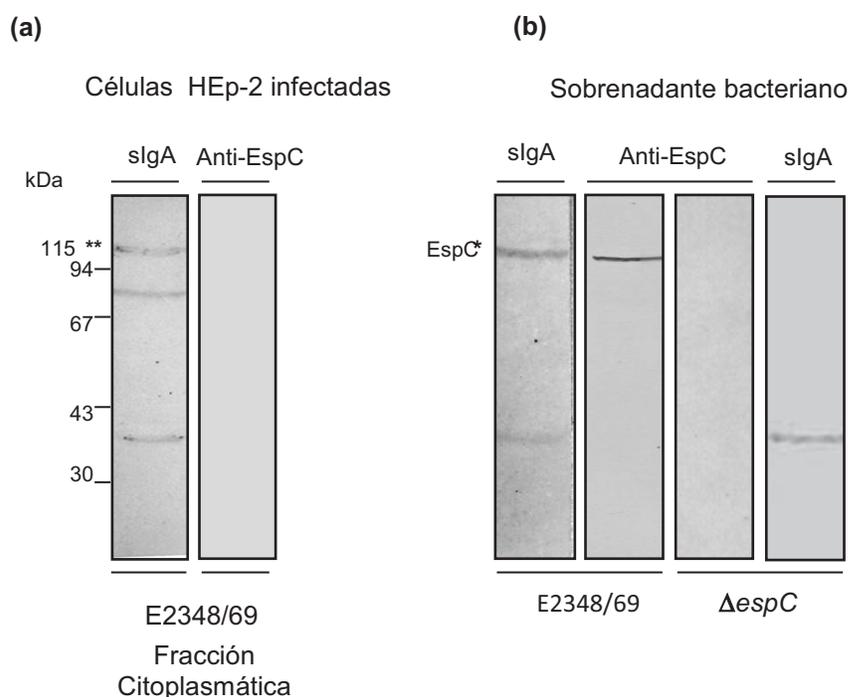


Fig. 17.- Detección de un posible nuevo efector de EPEC inyectado en las células HEp-2. (a) Fracción citoplasmática de la célula HEp-2 después de la infección con E2348/69 por 3 h. (b) Cultivo de sobrenadante de EPEC o $\Delta espC$ (concentrada 10 veces) ensayada con una mezcla de leche materna (1:50) y con antisuero anti-EspC (1:2000).

9. DISCUSIÓN

Aunque existen significantes progresos en el conocimiento de los factores de adherencia que utiliza EPEC para unirse a la célula hospedera, las adhesinas responsables de esta propiedad de la bacteria son parcialmente conocidas (Nougayrede *et al*, 2003).

En el presente estudio desarrollamos un método que nos permitió detectar al menos 5 proteínas de EPEC que interaccionan con las células HEp-2. Las masas moleculares aproximadas de dichas proteínas (supuestas adhesinas) son de 115, 90, 70, 43 y 38 kDa. Sin embargo, solo 3 de estas proteínas (90, 70 y 43 kDa) fueron detectadas por las 3 diferentes estrategias de detección que empleamos; 1) radio-ensayo, 2) anticuerpos anti-EPEC ó 3) anticuerpos sIgA de leche materna. No obstante no sabemos la identidad de cada una de las proteínas detectadas con las 3 diferentes estrategias, solamente conocemos sus masas moleculares aproximadas, que al compararlas sugerirían hablar de la misma molécula. A pesar de esto, es importante notar que las 3 diferentes estrategias de detección no difirieron mucho en cuanto a las supuestas adhesinas detectadas. Se esperaba básicamente resultados similares entre los diferentes sistemas de detección, a pesar de que representan estrategias diferentes. Para poder comparar los resultados entre los diferentes sistemas sería necesario identificar las proteínas detectadas en sus respectivos sistemas.

Pensamos que en este estudio, los anticuerpos sIgA de leche materna pueden ser de mayor utilidad en la búsqueda de proteínas de superficie de EPEC, que los anticuerpos anti-EPEC, ya que los sIgA se produjeron en respuesta a la infección intestinal bacteriana, lo cual involucra la interacción de antígenos potentes bacterianos con el epitelio asociado a folículo en el intestino del hospedero. El suero anti-EPEC se obtuvo al inmunizar conejos (vía subcutánea) con proteínas bacterianas de superficie y de membrana externa, por este motivo esperaríamos que sus principales blancos fueran diferentes a los blancos de los sIgA. Con el radio-ensayo esperábamos encontrar mayor número de proteínas detectadas (supuestas adhesinas) que en los otros dos sistemas, sin embargo no resultó así, en

general los 3 sistemas de detección mostraron resultados similares. Con el radio-ensayo fue más difícil distinguir entre los reconocimientos inespecíficos y las uniones estables específicas de las supuestas adhesinas bacterianas. Además, el fondo radioactivo contaminante es más fuerte y difícil de eliminar que el de la inmunotinción. Los tres sistemas de detección no difirieron mucho en sus resultados, esto probablemente se debió a que se realizaron sobre el mismo ensayo de reconocimiento en células HEP-2, el cual puede tener limitantes, por ejemplo que no todas las adhesinas (separadas de las bacterias) puedan interaccionar con las células HEP-2.

La proteína de 70 kDa parece estar realmente implicada en la adherencia de EPEC a células HEP-2, esta observación se vio apoyada por el hecho de que la expresión de dicha proteína en la bacteria se redujo cuando se creció a 25°C, temperatura a la cual EPEC pierde su capacidad de adherencia a células HEP-2 (datos no mostrados). Algunos factores de virulencia son regulados en coordinación con señales ambientales cuya base común es un sistema de regulación que controla la expresión de genes de virulencia. Por ejemplo, la transición de un ambiente de baja temperatura a temperatura corporal ha sido correlacionada con cambios dramáticos en la expresión de determinantes de virulencia en varios organismos (Mekalanos, 1992). Además la proteína de 70 kDa también se detectó en el modelo de infección de células HEP-2, donde se identificó junto con otras proteínas que la bacteria EPEC transfirió hacia las células epiteliales, dicha proteína se detectó cuando las bacterias se cultivaron a 37°C y no se observó a 25°C.

Por otro lado, descartamos a las proteínas de 90 y 43 kDa como posibles participantes en la adherencia de EPEC debido a que se observaron en cepas de *E. coli* poco adherentes, es posible que estas proteínas de 90 y 43 kDa sean un artefacto o producto de una reacción inespecífica difícil de eliminar, a pesar del lavado intenso durante el ensayo de unión con las células HEP-2. Además estas dos proteínas se detectaron en el ensayo de unión a pesar de ser obtenidas de bacterias crecidas a 25°C. Con los resultados obtenidos en el ensayo de reconocimiento, con proteínas desprendidas de la bacteria, pensamos que éste no es suficiente por sí solo para identificar a las

proteínas de adherencia de EPEC. Es necesario complementarlo con otros modelos o herramientas para poder detectar con mayor certeza las posibles adhesinas bacterianas. Se sabe que la adherencia bacteriana es un proceso muy complejo que depende de muchos factores y además requiere de la energía y movimiento de la propia bacteria (Nougayrede *et al*, 2003). Las proteínas o adhesinas desprendidas de las células bacterianas pueden reaccionar de manera diferente que cuando son parte de las bacterias mismas.

En consecuencia se decidió utilizar otro modelo que permitiese la interacción entre las células HEp-2 y las bacterias EPEC, el cual consistió en la infección de las células epiteliales cultivadas permitiendo que la bacteria transfiriese sus proteínas y efectores a la célula infectada, y posteriormente obtener fracciones celulares que contengan las proteínas transferidas por EPEC para finalmente identificarlas. La proteína Tir translocada a las células epiteliales se identificó mediante este modelo de infección (Kenny *et al*, 1997). En este modelo de infección, la IgA reaccionó claramente con 5 proteínas, las más prominentes fueron intimina y Tir. Los anticuerpos IgA reaccionaron predominantemente con Tir en las fracciones citoplasmática y de membrana y con intimina en la fracción de membrana. Estos resultados sugieren que la proteína intimina se adhiere abundantemente a las membranas de las células epiteliales, directamente o a través de Tir, intimina no ha sido considerada realmente como una proteína translocada (Frankel *et al*, 2001), sin embargo estos datos sugieren que intimina por sí misma se inserta directamente dentro de la membrana plasmática de las células o se une fuertemente a receptores celulares. Se ha reportado que intimina se une además de a Tir, a un receptor codificado por la célula del hospedero, se trata de la β_1 integrina (Frankel *et al*, 2001; Liu *et al*, 1999; Frankel *et al*, 1996) y a la nucleolina en las células HEp-2 (Sinclair *et al*, 2002). Es claro que los diferentes tipos de intimina presentes en las cepas de EPEC influyen un tropismo tisular en el intestino (Reece *et al*, 2001). La unión de intimina con Tir conecta la bacteria extracelular a el citoesqueleto de la célula hospedera (Gruenheid y Finlay, 2003). Una fuerte respuesta inmunitaria hacia Tir se ha reportada previamente (Li *et al*, 2000); los autores usaron suero obtenido de pacientes pediátricos con diarrea aguda causada por

E. coli enterohemorrágica (EHEC) O157:H7 y proteínas recombinantes de EHEC. Las proteínas intimina y Tir son esenciales para que EPEC altere y desorganice la barrera epitelial y para la formación de la lesión de adherencia y eliminación. Estos resultados nuevos indican que intimina y Tir también son antígenos potentes que inducen considerable producción de anticuerpos sIgA en el hospedero.

Los controles experimentales indican que las proteínas de EPEC detectadas en las fracciones subcelulares de células HEP-2 después de la infección con EPEC no se deben a contaminación bacteriana, puesto que el botón bacteriano sin células HEP-2 y sujeto al mismo proceso de fraccionamiento produjo solo bandas pálidas sin ninguna similitud a las proteínas transferidas por EPEC en las células HEP-2 Fig. 2 (d). En este estudio, el método de fraccionamiento usado para obtener las fracciones citoplasmática y de membrana mostró ser muy confiable, y está basado en disrupción mecánica y ultracentrifugación (Gauthier *et al*, 2000). Lo mismo se aplica para la extracción de elementos del citoesqueleto, el cual se basa en detergentes y alta concentración de urea (Mahadevan *et al*, 1988). Además, el hecho de que la cepa adherente uropatógena (CFT073) no dio ninguna respuesta de sIgA en las células HEP-2 infectadas indica que esta bacteria, la cual carece de T3SS, es incapaz de transferir proteínas en las células epiteliales. Estos anticuerpos de sIgA fueron capaces de reconocer un buen número de proteínas (mediante inmunodetección) de la cepa CFT073 cuando se extrajeron directamente del botón bacteriano.

La identificación de la proteína de 70 kDa, como una proteína de choque térmico (heat-shock protein, Hsp70), la cual reaccionó con la sIgA, fue inesperada en parte porque Hsp60 y Hsp70 son generalmente consideradas chaperonas, las cuales son encontradas como proteínas citoplasmáticas en la mayoría de procariontes. Una abundante cantidad de Hsp70 se encontró en la superficie de EPEC, la cual pudo fácilmente ser desprendida de la bacteria mediante una simple agitación (con vortex) de la suspensión bacteriana (dato no mostrado). Comparada con la respuesta de la sIgA hacia intimina y Tir, la reacción de sIgA hacia la Hsp70 de EPEC fue menos intensa en las células HEP-2 infectadas. Juzgando

por la intensidad de las bandas de la Hsp70 en el gel teñido con Coomassie (SDS-PAGE) e inmunodetección, ya sea la concentración de anticuerpos o su afinidad es muy baja. Las proteínas de choque térmico han sido extensamente estudiadas a nivel inmunológico y se han reportado como blancos importantes de la respuesta inmunitaria tanto humoral como mediada por células (Kaufmann 1990; Young *et al*, 1989). Por ejemplo, la familia de la Hsp70 de *Cryptococcus neoformans* parece ser una molécula blanco importante de la respuesta humoral en pacientes humanos con criptococcosis pulmonar (Kakeya *et al*, 1999). Nuestros resultados sugieren que la Hsp70 reconoce o se une a células HEp-2 y no podemos desechar la posibilidad de que esta proteína sea una adhesina accesoria que contribuya al proceso de adherencia de EPEC a las células del hospedero. La expresión de Hsp60 y Hsp70 en la superficie de la bacteria ha sido reportada por mediar incremento en la adhesión de organismos estresados, tales como *Helicobacter pylori*, *Clostridium difficile*, y *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Hennequin *et al*, 2001; Huesca *et al*, 1998; Ensgraber *et al*, 1992). De Jesus y colaboradores (2005) reportaron una correlación entre un aumento en la adhesión de EPEC a las células hospederas y un incremento en la expresión de la Hsp70 asociada a la superficie cuando EPEC se expuso a estrés con ácido o sales biliares. Además, el tratamiento de la bacteria con anticuerpos anti-Hsp70 eliminó el incremento en la adhesión bacteriana. Mamelak y colaboradores (2001) mostraron que la Hsp70 de procariontes puede funcionar como adhesina mediante unión específica a los glicoesfingolípidos sulfogalactosilceramida.

Hasta ahora, varias proteínas efectoras no-codificadas en la isla de patogenicidad LEE y translocadas por T3SS han sido identificadas (Garmendia *et al*, 2005; Dahan *et al*, 2005). Recientemente Deng y colaboradores (2012) confirmaron la existencia de 25 efectores y proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III de EPEC, previamente identificadas por técnicas convencionales de biología molecular y bioinformática, estos autores también identificaron varias nuevas proteínas secretadas por el sistema de secreción tipo III, incluyendo dos nuevos efectores, que mostraron ser translocados dentro la célula del hospedero.

En este estudio de proteínas de EPEC transferidas dentro células HEp-2 se detectó una proteína de 115 kDa que reaccionó con anticuerpos sIgA en la fracción citoplasmática de células infectadas. Esta proteína no es EspC puesto que no reaccionó con antisuero específico anti-EspC y tampoco fue detectada en células infectadas por la mutante ΔescN Fig. 2 (c), lo cual sugiere que esta proteína citoplasmática de 115 kDa es una proteína nueva translocada por EPEC a través del T3SS dentro de las células. Ninguno de los efectores recientemente descritos pueden ser esta proteína puesto que el tamaño de dichos efectores está entre 20 y 44.7 kDa. Un buen número de supuestos efectores algunos en potencia y otros comprobados se han identificado, principalmente en *Citrobacter rodentium*. Tobe y colaboradores (2006) han especulado que el repertorio de los genes que codifican para efectores en *E. coli* podría ser más grande que el actualmente reconocido. El intento para identificar la proteína de 115 kDa no resultó debido a que esta proteína se encontró en muy pequeña cantidad; no fue posible ver una banda proteínica después de teñirla con azul de Coomassie; la banda de 115 kDa se visualizó solo por inmunodetección. Pensamos que la proteína de 115 kDa es producida en muy bajos niveles y justamente después de que la bacteria se adhirió a las células eucariotas.

La proteína EspC autotransportadora de EPEC dio una fuerte respuesta a los anticuerpos sIgA entre las proteínas secretadas por EPEC durante el ensayo de infección. El papel patógeno de esta proteína en la infección de EPEC es desconocido aunque varias propiedades biológicas, tales como toxigenicidad, daño a las células epiteliales, unión e hidrólisis a varias proteínas del hospedero, se han atribuido a esta proteína (Mellis *et al*, 2001; Navarro-Garcia *et al*, 2004; Drago-Serrano *et al*, 2006). La EspC parece ser una proteína altamente inmunogénica puesto que suero humano colectado de un voluntario después de una infección experimental con EPEC fuertemente reconoció a la EspC (Jarvis *et al*, 1995). Se ha reportado que la internalización de EPEC dentro de células HEp-2 es lenta, y requiere del contacto de la bacteria con la célula hospedera junto con la producción del sistema de secreción tipo III (Vidal *et al*, 2008). Bajo estas condiciones experimentales, no fue posible detectar a la EspC dentro de la célula después de 3 horas

de la infección con EPEC. Vidal y colaboradores (2008) reportaron que la distribución de la EspC al citosol de la célula hospedera ocurrió después de 2 horas de la infección.

En conclusión, después de la infección de las células HEp-2 con EPEC, intimina y Tir mostraron ser los blancos principales de los anticuerpos sIgA de la leche humana, seguido por EspB. La proteína Hsp70 purificada a partir de EPEC fue capaz de reconocer o unirse a las células HEp-2 sugiriendo un posible papel en la adhesión de EPEC a las células epiteliales.

La caracterización de posibles nuevos factores de adherencia contribuirá a un mejor entendimiento de la patogénesis de EPEC, además de ser los “blancos” atractivos para nuevas terapias y desarrollo de vacunas.

10. REFERENCIAS

- Arenas-Hernández MM, Martínez-Laguna Y, Torres AG. 2012. Clinical implications of enteroadherent *Escherichia coli*. *Curr Gastroenterol Rep.* 14:386–394.
- Bardiau M, Szalo M, Mainil JA. 2010. Initial adherence of EPEC, EHEC and VTEC to host cells. *Vet Res.* 41:57. doi: 10.1051/vetres/2010029
- Brandtzaeg P. 2013. Secretory IgA: designed for anti-microbial defense. *Front Immunol.* 4:1-17. doi: 10.3389/fimmu.2013.00222
- Camara LM, Carbonare SB, Silva ML, Carneiro-Sampaio MM. 1994. Inhibition of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to HeLa cells by human colostrum: detection of specific sIgA related to EPEC outer-membrane proteins. *Int Arch Allergy Immunol.* 103:307-310.
- Campellone KG, Leong JM. 2003. Tails of two Tirs: actin pedestal formation by enteropathogenic *E. coli* and enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Curr Opin Microbiol.* 6:82-90.
- Carbonare SB, Silva ML, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MM. 1995. Inhibition of HEp-2 cell invasion by enteroinvasive *Escherichia coli* by human colostrum IgA. *Int Arch Allergy Immunol* 108:13-118.
- Clarke S, Haigh R, Freestone P, Williams PH. 2003. Virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*, a global pathogen. *Clin Microbiol Rev.* 16:365-378.
- Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S. 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal

epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150:527-538.

- Clements A, Young J, Constantinou K, Frankel G. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3:71–87.
- Cravioto A, Gross R, Scotland SM, and Rowe B. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol.* 3:95-99.
- Cravioto A, Tello A, Villafan H, Ruiz J, Del Vedovo S, Nesser JR. 1991. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. *J Infect Dis.* 163:1247–1255.
- Chen HD, Frankel G. 2005. Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. *FEMS Microbiol Rev.* 29:83-98.
- Croxen MA, Finlay BB. 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol.* 8:26-28.
- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26:823-880.
- Czeczulin JR, Whittam TS, Henderson IR, Navarro-Garcia F, Nataro JP. 1999. Phylogenetic analysis of enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 67:2692–2699.

- Dahan S, Wiles S, La Ragione RM, Best A, Woodward MJ, Stevens MP, Shaw RK, Chong Y, Knutton S, Phillips A, Frankel G. 2005. EspJ is a prophage-carried type III effector protein of attaching and effacing pathogens that modulates infection dynamics. *Infect Immun.* 73:679-686.
- Dean P, Maresca M, Kenny B. 2005. EPEC's weapons of mass subversion. *Curr Opin Microbiol.* 8:28-34.
- De Graaf FK, Roorda I. 1982. Production, purification and characterization of the fimbrial adhesive antigen F41 Isolated from calf enteropathogenic *Escherichia coli* strain B41M. *Infect Immun.* 36:751-758.
- De Jesus MC, Urban AA, Marasigan ME, Barnett Foster DE. 2005. Acid and bile-salt stress of enteropathogenic *Escherichia coli* enhances adhesion to epithelial cells and alters glycolipid receptor binding specificity. *J Infect Dis.* 192:1430-1440.
- Deng W, Yu HB, de Hoog CL, Stoynov N, Li Y, Foster LJ, Finlay BB. 2012. Quantitative proteomic analysis of type III secretome of enteropathogenic *Escherichia coli* reveals an expanded effector repertoire for attaching/effacing bacterial pathogens. *Mol Cell Proteomics.* 11:692–709.
- Donnenberg MS, Kaper JB. 1991. Construction of an eae deletion mutant of enteropathogenic *Escherichia coli* by using a positive-selection suicide vector. *Infect Immun.* 59:4310-4317.
- Dorsey FC, Fischer JF, Fleckenstein JM. 2006. Directed delivery of heat-labile enterotoxin by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.* 8:1516–1527.
- Drago-Serrano ME, Gavilanes-Parra S, Manjarrez-Hernandez HA. 2006. EspC, an autotransporter protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), displays protease activity on human hemoglobin. *FEMS Microbiol Lett.* 265:35–40.

- Dubreuil JD. 2012. The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. *Curr Issues Mol Biol.* 14:71-82.

- Dubreuil JD. 2013. Antibacterial and Antidiarrheal Activities of Plant Products against Enterotoxinogenic *Escherichia coli*. *Toxins* 5:2009-2041.

- Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Sonnenberg MS, Kaper JB. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol.* 28:1-4.

- Elliott SJ, Hutcheson SW, Dubois MS, Mellies JL, Wainwright LA, Batchelor M, Frankel G, Knutton S, Kaper JB. 1999. Identification of CesT, a chaperone for the type III secretion of Tir in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 33:1176-1189.

- Ensgraber M, Loos M. 1992. A 66-kilodalton heat shock protein of *Salmonella typhimurium* is responsible for binding of the bacterium to intestinal mucus. *Infect Immun.* 60:3072-3078.

- Estrada-Garcia T, Navarro-Garcia F. 2012. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathotype: a genetically heterogeneous emerging foodborne enteropathogen. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 66:281–298.

- Fedorka-Cray M, Huether M, Stine D, and Anderson G. 1990. Efficacy of a cell extract from *Actinobacillus (Haemophilus) pleuropneumoniae* serotype 1 against disease in swine. *Infect Immun.* 58:358-365.

- Fernandes RM, Carbonare SB, Carneiro-Sampaio MM, Trabulsi LR. 2001. Inhibition of enteroaggregative *Escherichia coli* adhesion to HEp-2 cells by secretory immunoglobulin A from human colostrum. *Pediatr Infect Dis J.* 20:672-678.
- Frank C, Werber D, Cramer J, Asker M, Faber M, der Heiden M, *et al.* 2011. Epidemic profile of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* O104:H4 Outbreak in Germany. *N Engl J Med* 365:1771–1780.
- Frankel G, Phillips AD, Novakova M, Field H, Candy DC, Schauer, DB, Douce G, Dougan G. 1996. Intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* restores murine virulence to a *Citrobacter rodentium eaeA* mutant: induction of an immunoglobulin A response to intimin and EspB. *Infect Immun.* 64:5315-5325.
- Frankel G, Phillips AD, Trabulsi LR, Knutton S, Dougan G, Matthews S. 2001. Intimin and the host cell-is it bound to end in Tir(s)? *Trends Microbiol.* 9:214-218.
- Freedman DJ, Tacket CO, Delehanty A, Maneval DR, Nataro J, Crabb JH. 1998. Milk immunoglobulin with specific activity against purified colonization factor antigens can protect against oral challenge with enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 177:662-667.
- Garmendia J, Frankel G, Crepin VF. 2005. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation. *Infect Immun.* 73:2573-2585.
- Gauthier A, de Grado M, Finlay BB. 2000. Mechanical fractionation reveals structural requirements for enteropathogenic *Escherichia coli* Tir insertion into host membranes. *Infect Immun.* 68:4344-4348.

- Gavilanes S, Manjarrez-Hernandez A, Chávez E, León L, Navarro A, Cravioto A. 2001. Proteins transferred from enteropathogenic *E. coli* into HEp-2 cells are recognized by sIgA antibodies from human milk, abstr. B-61, p. 54. *In Abstracts of the 101st General Meeting of the American Society for Microbiology*. American Society for Microbiology, Orlando, Florida.
- Gavilanes-Parra S, Manjarrez-Hernandez A, Cravioto A. 2002. Inmunoprotección por leche humana. *Revista Mexicana de Pediatría*. 69:111-119.
- Giron JA, Ho AS, Schoolnik GK. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 254:710-713.
- Girón JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol*.44:361-379.
- Gioppo NM, Elias WP Jr, Vidotto MC, Linhares RE, Saridakis HO, Gomes TA, Trabulsi LR, Pelayo JS. 2000. Prevalence of HEp-2 cell-adherent *Escherichia coli* and characterisation of enteroaggregative *E. coli* and chain-like adherent *E. coli* isolated from children with and without diarrhoea, in Londrina, Brazil. *FEMS Microbiol Lett*. 190:293–298.
- Gruenheid S, Finlay BB. 2003. Microbial Pathogenesis and cytoskeletal function. *Nature* 422:775-781.
- Hanson LA. 1999. Human milk and host defense: immediate and long-term effects *Acta Paediatr Suppl*. 88:42-46.
- Hanson LA. 2007. Feeding and infant development breast-feeding and immune function. *Proc Nutr Soc*. 66:384-396.
- Harlow E, Lane D. 1988. Antibodies a Laboratory Manual. Chapter 20. Cold Spring Harbor Laboratory, Box 100, Cold Spring Harbor, New York 11724.

- Henderson IR, Czeczulin J, Eslava C, Noriega F, Nataro JP. 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 67: 5587–5596.
- Hennequin C, Porcheray F, Waligora-Dupriet A, Collignon A, Barc MC, Bourlioux P, Karjalainen T. 2001. GroEL (Hsp60) of *Clostridium difficile* is involved in cell adherence. *Microbiology* 147:87-96.
- Hernandez RT, Elias WP, Vieira MA, Gomes TA. 2009. An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*, *FEMS Microbiol Lett.* 297:137–149.
- Honorio-França AC, Carvalho MP, Isaac L, Trabulsi LR, Carneiro-Sampaio MMS. 1997. Colostral mononuclear phagocytes are able to kill enteropathogenic *Escherichia coli* opsonized with colostral IgA. *Scand J Immunol.* 46:59-66.
- House B, Kus JV, Prayitno N, Mair R, Que L, Chingcuanco F, Gannon V, Cvitkovitch DG, Barnett Foster D. 2009. Acid-stress-induced changes in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 virulence. *Microbiology* 155:2907–2918.
- Huesca M, Goodwin A, Bhagwansingh A, Hoffman P, Lingwood CA. 1998. Characterization of a stress protein (hsp70) induced by acidic pH, a putative sulfatide binding adhesin, from *Helicobacter pylori*. *Infect Immun.* 66:4061–4067.
- Humphries RM, Armstrong GD. 2010. Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the small intestine epithelium. *Future Microbiol.* 5:1645–1661.
- Hyland RM, Sun J, Griener TP, Mulvey JL, Klassen JS, Sonnenberg MS, Armstrong GD. 2008. The bundlin pilin protein of enteropathogenic *Escherichia coli* is an N-acetyllactosamine-specific lectin. *Cell Microbiol.* 10:177–187.

- Ibarra JA, Villalba MI, Puente JL. 2003. Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the *bfp* and *per* operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 185:2835-2847.
- Iguchi A, Thomson N, Yshitoshi O, Saunders D, Tadasuke O, Henderson I, Harris D, Asadulghani M, Kurokawa K, Dean P, Kenny B, Quail M, Thurston S, Dougan G, Hayashi T, Parkhill J, Frankel G. 2009. Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 strain E2348/69. *J Bacteriol.* 191:347-354.
- Jarvis KG, Giron JA, Jerse AE, McDaniel TK, Donnenberg MS, Kaper JB. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 92:7996–8000.
- Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:7839-7843.
- Kakeya H, Udono H, Maesaki S, Sasaki E, Kawamura S, Hossain MA, Yamamoto Y, Sawai T, Fukuda M, *et al.* 1999. Heat shock protein 70 (hsp70) as a major target of the antibody response in patients with pulmonary cryptococcosis. *Clin Exp Immunol.* 115:485–490.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HLT. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2:123 –140.
- Kaufmann SHE. 1990. Heat shock proteins and the immune response. *Immunol Today* 11:129-136.

- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511-520.
- Khursigara C, Abul-Milh M, Lau B, Giron JA, Lingwood CA, Barnett Foster DE. 2001. Enteropathogenic *Escherichia coli* virulence factor bundle-forming pilus has a binding specificity for phosphatidylethanolamine. *Infect Immun.* 69:6573–6579.
- Knutton S, Adu-Bobie J, Bain C, Phillips AD, Dougan G, Frankel G. 1997. Down regulation of intimin expression during attaching and effacing enteropathogenic *Escherichia coli* adhesion. *Infect Immun.* 65:1644–1652.
- Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G. and Frankel G. 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J.* 17:2166–2176.
- Laemmli UK. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227:680-685.
- Lai Y, Rosenshine I, Leong JM, Frankel G. 2013. Intimate host attachment: enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* 15, 1796–1808.
- Lan R, Alles MC, Donohoe K, Martinez MB, Reeves PR. 2004. Molecular evolutionary relationships of enteroinvasive *Escherichia coli* and *Shigella* spp. *Infect Immun* 72:5080–5088.
- Levine MM, Edelman R. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol Rev.* 6:31-51.

- Liu H, Magoun L, Luperchio S, Schauer DB, Leong JM. 1999. The Tir-binding region of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* intimin is sufficient to trigger actin condensation after bacterial-induced host cell signalling. *Mol Microbiol* 34:67-81.
- Lu L, Walker WA. 2001. Pathologic and physiologic interactions of bacteria with the gastrointestinal epithelium. *Am J Clin Nutr.* 73(suppl):1124S–1130S.
- Luo Q, Kumar P, Vickers T, Sheikh A, Lewis W, Rasko D, Sistrunk J, Fleckenstein J. 2014. Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes a highly conserved mucin-degrading metalloprotease to effectively engage intestinal epithelial cells. *Infect Immun.* 82:509-521.
- Mahadevan LC, Heath JK, Leichtfried FE, Cumming DV, Hirst EM, Foulkes JG. 1988. Rapid appearance of novel phosphoproteins in the nuclei of mitogen-stimulated fibroblasts. *Oncogene* 2:249-257.
- Mamelak, D, Mylvaganam M, Whetstone H, Hartmann E, Lennarz W, Wyrick P, Raulston J, Han H, Hoffman P, Lingwood C. 2001. Hsp70s contain a specific sulfogalactolipid binding site: differential glycone influence on sulfogalactosyl ceramide binding by recombinant prokaryotic and eukaryotic hsp70 family members. *Biochemistry* 40:3572-3582.
- Manjarrez-Hernandez HA, Gavilanes-Parra S, Chavez-Berrocal E, Navarro-Ocaña A, Cravioto A. 2000. Antigen detection in enteropathogenic *Escherichia coli* using secretory immunoglobulin A antibodies isolated from human breast milk. *Infect Immun* 68:5030-5036.
- Matsudaira P. 1993. *A practical guide to protein and peptide purification for the microsequencing* San Diego, Academic Press, Inc.
- Mazanec M, Nedrud J, Kaetzel C, Lamm M. 1993. A three-tiered view of the role of IgA in mucosal defense. *Immun Today* 14:430-435.

- Mekalanos JJ. 1992. Bacterial mucosal vaccines. *Avd Exp Med Biol.* 327:43-50.
- Mellis JL, Navarro-Garcia F, Okeke I, Frederickson J, Nataro JP, Koper JB. 2001. EspC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. *Infect Immun.* 69:315-324.
- Moch T, Hoschützky H, Hacker J, Kröncke KD, Jann K. 1987. Isolation and characterization of the alpha-sialyl-beta-2, 3-galactosyl-specific adhesin from fimbriated *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci USA.* 84:3462–3466.
- Moon HW, Whipp SC, Argenzio RA, Levine MM, Giannella RA. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect Immun.* 41:1340-1351.
- Nagano K, Taguchi K, Tokoro S, Tatsuno I. 2014. Adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to the intestinal epithelia is essential for inducing secretory IgA antibody production in the intestine of mice. *Biol Pharm Bull.* 37(3):409-416.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11: 142-201.
- Nataro J, Levine M. 1994. *Escherichia coli* disease in humans. En C. L. Gyles CAB International Wallingford Oxon Ox 10 8DE U.K. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. Pag. 285-333.
- Navarro-Garcia F, Eslava C, Villaseca JM, López-Revilla R, Czeczulin JR, Srinivas S, Nataro JP, Cravioto A. 1998. *In vitro* effects of a high-molecular weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 66:3149–3154.

- Navarro-Garcia F, Canizalez-Roman A, Sui BQ, Nataro JP, Azamar Y. 2004. The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a mechanism different from that of Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 72:3609–3621.
- Nougayrede JP, Fernandes PJ, Sonnenberg MS. 2003. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells. *Cell Microbiol*. 5:359-372.
- Okhuysen PC, Dupont HL. 2010. Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC): a cause of acute and persistent diarrhea of worldwide importance. *J Infect Dis*. 202:503–505.
- Page AV, Liles WC. 2013. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *Med Clin North Am*. 97:681-695.
- Parissi-Crivelli A, Parrisi-Crivelli JM, Giron JA. 2000. Recognition of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants by human colostrum and serum antibodies. *J Clin Microbiol*. 38:2696-2700.
- Pennington H. 2012. *Escherichia coli* O157. *Lancet* 376:1428–35.
- Reece S, Simmons CP, Fitzhenry RJ, Matthews S, Phillips AD, Dougan G, Frankel G. 2001. Site-directed mutagenesis of intimin alpha modulates intimin-mediated tissue tropism and host specificity. *Mol Microbiol*. 40:86–98.
- Rendón MA, Saldaña Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper JB, Puente JL, Girón JA. 2007. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 104:10637–10642.

- Robinson CM, Sinclair JF, Smith MJ, O'Brien AD. 2006. Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli* type O157:H7 promotes intestinal colonization. *Proc. Natl Acad Sci USA*. 103:9667–9672.
- Rohde H, Qin J, Cui Y, Li D, Lomen NJ, Hentschke M, *et al.* 2011. Open-source genomic analysis of Shiga-toxin-producing *E. coli* O104:H4. *N Engl J Med*. 365:718–724.
- Saldaña Z, Erdem A, Schuller S, Okeke I, Lucas M, Sivananthan A, Phillips A, Kaper J, Puente JL, Giron J. 2009. The *Escherichia coli* common pilus and the bundle-forming pilus act in concert during the formation of localized adherence by enteropathogenic *E. coli*. *J Bacteriol*. 191:3451-3461.
- Sal-Man NE, Biemans-Oldehinkel E, Finlay BB. 2009. Structural microengineers: pathogenic *Escherichia coli* redesigns the actin cytoskeleton in host cells. *Structure* 17:15-19.
- Schroten H, Stapper C, Plogmann R, Kohler H, Hacker J, Hanisch FG. 1998. Fab-independent antiadhesion effects of secretory immunoglobulin A on S-fimbriated *Escherichia coli* are mediated by sialyloligosaccharides. *Infect Immun*. 66:3971-3973.
- Silva ML, Giampaglia CMS. 1992. Colostrum and human milk inhibit localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Acta Paediatr Scand* 81:226-227.
- Sekiya K, Ohishi M, Ogino T, Tamano K, Sasakawa C, Abe A. 2001. Supermolecular structure of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion system and its direct interaction with the EspA-sheath-like structure. *Proc Natl Acad Sci USA*. 98:11638-11643.

- Servin, A. L. 2005. Pathogenesis of Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 18: 264–292.
- Sinclair JF, O'Brien AD. 2002. Cell surface-localized nucleolin is a eukaryotic receptor for the adhesin intimin-gamma of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Biol Chem.* 277:2876–2885.
- Sousa dos Reis R, Horn F. 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli*, *Samonella*, *Shigella* and *Yersinia*: cellular aspects of hostbacteria interactions in enteric diseases. *Gut Pathogens* 2:8. doi:10.1186/1757-4749-2-8.
- Stein M, Kenny B, Stein MA, Finlay BB. 1996. Characterization of EspC, a 110-kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J Bacteriol.* 178:6546-6554.
- Subramanian K, Shankar RB, Meenakshisundaram S, Lakshmi BS, Williams PH, Balakrishnan A. 2008. LamB-mediated adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEP-2 cells. *J App Microbiol.* 105:715-722.
- Svennerholm AM. 2011. From cholera to enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine development. *Indian J Med Res.* 133:188-194.
- Tardelli Gomes TA, Gonzalez-Pedrajo B. 2010. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), p 66–126. In Torres AG (ed), *Pathogenic Escherichia coli in Latin America*. Benthem Science Publishers, Oak Park, IL.
- Tobe T, Sasakawa C. 2001. Role of bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli* in host cell adherence and in microcolony development. *Cell Microbiol* 3:579–585.

- Tobe T, Beatson SA, Taniguchi H, Abe H, Bailey CM, Fivian A, Younis R, Matthews S, Marches O, Frankel G, Hayashi T, Pallen MJ. 2006. An extensive repertoire of type III secretion effectors in *Escherichia coli* O157 and the role of lambdoid phages in their dissemination. *Proc Natl Acad Sci USA*. 103:14941–14946.
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Arenas-Hernández Arenas-Hernández *Proc Natl Acad Sci USA*. 76:4350-4354.
- Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 8:508–513.
- Tramont EC. 1977. Inhibition of adherence of *Neisseria gonorrhoeae* by human genital secretions. *J Clin Invest*. 59:117-124.
- Tórres AG, Zhou X, Kaper JB. 2005. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun*. 73:18-29.
- Volokhina EB, Grijpstra J, Beckers F, Lindh E, Robert V, Tommassen J, Bos MP. 2013. Species-Specificity of the BamA Component of the Bacterial Outer Membrane Protein-Assembly Machinery. *Plos one* 8:e85799.
- Wold AE, Mestecky J, Tomana M, Kobata A, Ohbayashi H, Endo T, Eden CS. 1990. Secretory immunoglobulin A carries oligosaccharide receptors for *Escherichia coli* type 1 fimbrial lectin. *Infect Immun*. 58:3073-3077.
- Young RA, Elliott TJ. 1989. Stress proteins, infection and immune surveillance. *Cell* 59:5-8.