



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES ZARAGOZA

**Análisis transcripcional de la
toxina shiga (*stx*) en EHEC**

Tesis que para obtener el título de:

Biólogo

Presenta:

Guadalupe Itzel Rodríguez Guerra

Director de tesis: Dr. Miguel Ángel De la Cruz

Villegas

Director interno: Dr. Hugo López Muñoz

Ciudad de México. 17 de octubre de 2017





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.

**If I have seen
by standing
shoulders**

Isaac N

n further it is
ng on the
of Giants.

Newton

AGRADECIMIENTOS

A mi familia. Papá, no tengo palabras para agradecerte todo lo que haz echo por mi, por ti soy la mujer que soy ahora, porque me enseñaste a ser fuerte, a valerme por mi misma y a no depender de nadie, solo de tí. Porque me enseñaste que la flor más bella era aquella que florecia en la adversidad y que no habia reto lo suficientemente grande para mi, porque tuviste la confianza y el amor de dejarme ir sola y vivir lejos para crecer.

Mamá, tu eres la parte amorosa y comprensiva de la familia, porque cuando me sentia sola me llamabas en la noche y te quedabas platicando conmigo, nunca te faltó una palabra de aliento y a pesar de todas las adversidades que pasamos, nunca dejaste de confiar en mi ni de darme tu apoyo. ¡Te quiero!

Ale, tu me chocas y me caes mal. Pero espero mucho de tí, eres muy inteligente y se que eres capaz de lograr todo lo que te propongas, gracias por cuidar de mamá y papá mientras no estaba en casa, por cuidar de los bebes michis, por apoyarme y creer en mí. No puedo esperar a verte convertida en una gran profesionista.

A Zuri, Josmar, Marijo, Patito Aponte, Pato Iveth, Yahir ... ¡Gracias! Porque hicieron de mi prepa algo genial, porque aprendí mucho de ustedes y siempre seran especiales para mí.

A mis compañeros del Laboratorio de Oncología y diferenciación celular de la UMIEZ, Marquito, Jaz, Sergio, Angel, Isaac, Edgar, Ana, Leo... Fue un año difícil y pesado por la carga de trabajo, pero estando a su lado lo hicieron divertido y llevadero. Los quiero

A mis compañeros del Laboratorio de Microbiología Molecular del Hospital de Pediatría, Jessy, Ceci, Gaby, Carlos, Jorge, en fin, a todos, por su apoyo, enseñanzas y amistad. ¡Gracias!

A mis amigos de papalote, Maribel, Mariela, Yaz, Lalo, Jimena, Gonzalo, en fin, ¡de todos! Porque gracias a ustedes aprendí que el amor por el conocimiento se debe compartir y que se aprende muy facil jugando.

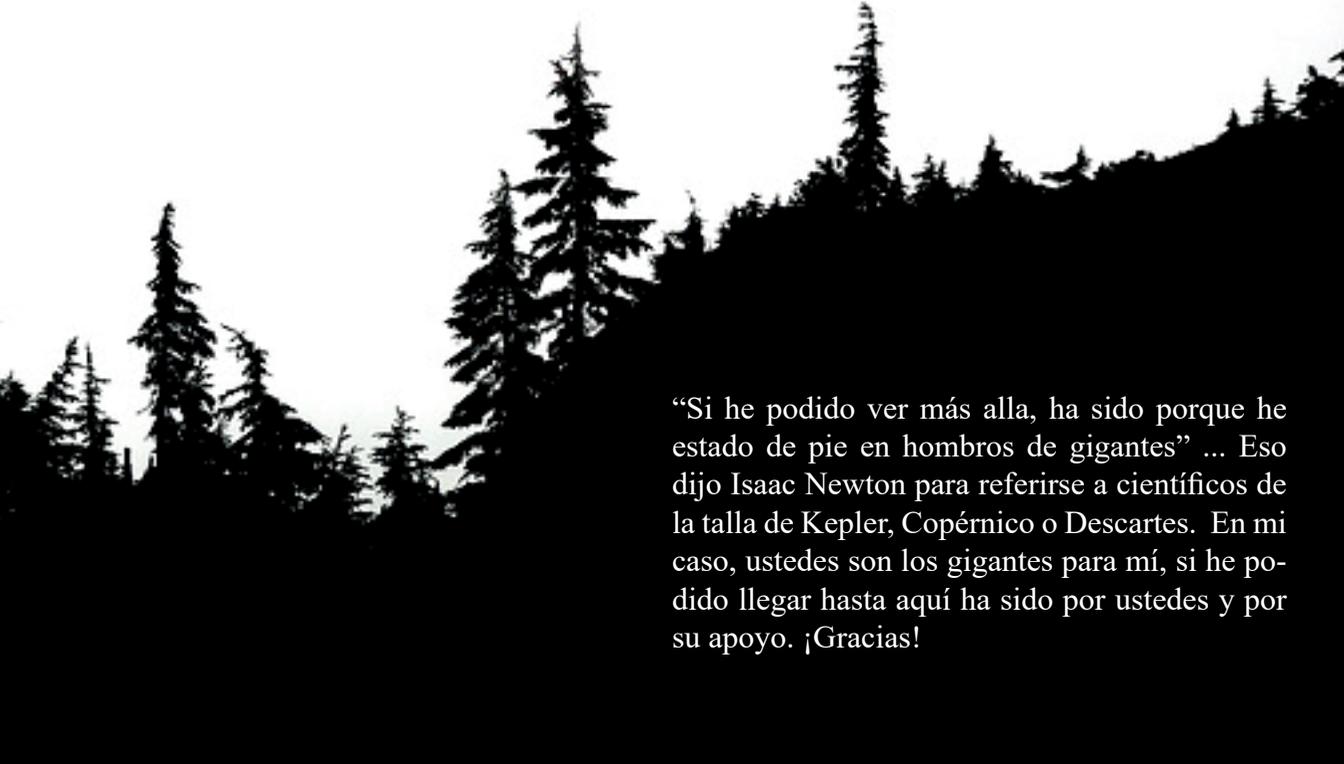
A todos mis profesores, a aquellos que despertaron en mí el amor por la vida y la ciencia, aquellos que lograron que despertara mi curiosidad por aprender y me apasionara por descubrir cosas. Especialmente a Raymundo, Patricio, Aguilera, Irma, Ezequiel, Bendito y Mireya. Gracias a sus enseñanzas, la universidad fue un poco más sencilla

A mis sinodales y tutores, gracias por hacerme ver mis errores y apoyarme en la culminación de este proyecto.

Al Dr. Miguel Angel de la Cruz, por permitirme formar parte de su equipo de trabajo, por confiar en mí y por sus grandes enseñanzas en el laboratorio

Al Dr. Miguel Angel Ares, por ser un gran profesor, por apoyarme con las técnicas y la teoría necesarias para la realización de este proyecto.

A todos, ¡GRACIAS!

A black and white photograph showing the dark silhouettes of several tall evergreen trees against a bright, clear sky. The trees are of varying heights and are scattered across the lower half of the frame, creating a natural, forest-like background.

“Si he podido ver más allá, ha sido porque he estado de pie en hombros de gigantes” ... Eso dijo Isaac Newton para referirse a científicos de la talla de Kepler, Copérnico o Descartes. En mi caso, ustedes son los gigantes para mí, si he podido llegar hasta aquí ha sido por ustedes y por su apoyo. ¡Gracias!

Tabla de contenido

Introducción.....	IV
1. Marco Teórico	1
1.1 Enterobacterias	1
1.2 <i>Escherichia coli</i>	4
1.2.1 Clasificación.....	6
1.2.2 Patotipos	9
1.3 <i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	13
1.3.1 Características generales	13
1.3.2 Cuadro clínico.....	16
1.3.3 Tratamiento clínico	18
1.3.4 Transmisión y prevención	21
1.4 Factores de virulencia	22
1.4.1 Liposacárido y cápsula	22
1.4.2 Islas de patogenicidad	24
1.4.3 Adhesinas y otros factores de adherencia	29
1.4.4 Plásmido pO157	31
1.5 Toxinas Bacterianas	34
1.5.1 Toxina shiga	35
1.6 Reguladores transcripcionales	43
1.6.1 Sistemas de dos componentes	43
1.6.2 Sistema CpxRA	44
1.6.3 Sistema RcsAB	45
1.6.4 Proteasa Lon	46

2. Planteamiento del problema.....	49
3. Hipótesis	50
4. Objetivos	51
5. Diseño Experimental	52
6. Resultados	63
8. Análisis de resultados	80
9. Conclusiones95
11. Glosario	100
12. Referencias	107

Abreviaturas

A/E	Adhesión y borrado
Cm	Cloranfenicol
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difuso adherente
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica
GB3	Globotriaciceramida
HUS	Síndrome Urémico Hemolítico
Km	Kanamicina
LB	Luria – Bertani
LEE	Locus de Eliminación de Enterocito
Ler	Regulador maestro ler
LPS	Liposacárido
ORF'S	Marcos de lectura abiertos
PAI	Isla de patogenicidad
PCR	Reacción de la cadena de la polimerasa
SST3	Sistema de secreción tipo 3
Stx	Toxina shiga
Tir	Receptor translocador intimina
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena

Indice de figuras.

Figura 1: Morfología y partes de *E. coli*.

Figura 2: Detalle de la membrana de Enterobacterias.

Figura 3: Serotipificación de *E. coli*.

Figura 4: Esquema patológico de *E. coli* diarreogénicas.

Figura 5: Pared celular de Enterobacterias.

Figura 6: Modelo de una isla de patogenicidad bacteriana.

Figura 7: Histopatología de una lesión de adherencia y esfaceración (A/E) característica de EHEC.

Figura 8: Interacciones moleculares en una lesión de adherencia y esfaceración (A/E) característica de EHEC.

Figura 9: Genes que regulan la patogenicidad de EHEC.

Figura 10: Mecanismo de acción de Stx.

Figura 11: Regulación de la expresión de la toxina Shiga.

Figura 12: Esquema de la regulación de SST3 por medio del profago Stx. Modelo de la interacción de EHEC en epitelio.

Figura 13: Electroferograma para observar integridad del RNA purificado.

Figura 14: Grafica comparativa de la expresión de la toxina shiga en distintos medios de cultivo.

Figura 15: Electroferograma para observar integridad del RNA purificado.

Figura 16: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, particularmente en el sistema de dos componentes CpxRA.

Figura 17: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, particularmente en el sistema de dos componentes RcsAB.

Figura 18: Electroferograma para observar integridad del RNA purificado.

Figura 19: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, particularmente en el sistema de dos componentes CpxRA

Figura 20: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, particularmente en el sistema de dos componentes RcsAB.

Figura 21: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio,- medio mínimo.

Figura 22: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio,- medio DMEM LG

Figura 23: Vía de represión de virulencia de EHEC dependiente de Lon.

Figura 24: Vía regulatoria del sistema RcsAB.

Figura 25: Diversidad de sustratos y funciones biológicas de la proteasa Lon.

*A lo largo del texto, habrá ocasiones en las que algunas abreviaturas de proteínas se encuentren en **minúsculas y cursivas**, En estos casos, se refiere al **gen** que codifica para esa proteína en particular.

Introducción

Escherichia coli enterohemorrágica (EHEC) es una cepa patógena de *Escherichia coli* causante de importantes brotes de diarrea hemorrágica a nivel mundial. Se caracteriza por poseer varias particularidades que aumentan su potencial patógeno, gracias a una infección de fagos poseen un gen para la producción de una toxina, que se asemeja a la neurotoxina necrótica de la bacteria *Shigella dysenteriae*. La principal manifestación de la actividad de Stx son los daños ocasionados al epitelio intestinal, sin embargo, también puede causar daño en las células endoteliales glomerulares en un pequeño número de pacientes, lo que da lugar a insuficiencia renal.

En este trabajo se investigó el rol de dos sistemas de dos componentes: RcsAB (Regulation of capsule sintesis), CpxRA (Conjugative pilus expression) y la proteasa Lon a nivel transcripcional de la toxina shiga. Para esto se determinó en primer lugar los medios de cultivo donde la expresión de la toxina fuera mayor, y a partir de derivadas mutantes se cuantificó la expresión de *stx* por medio de PCR en tiempo real.

Se encontró que, en medio mínimo, medio LB y medio DMEM LG fueron las condiciones donde hubo mayor expresión de la toxina. En las derivadas mutantes, es la cepa $\Delta cpxA$ la única en reducir la expresión de la toxina, a diferencia de las cepas $\Delta cpxR$ y $\Delta cpxRA$, indicando que esta represión es dependiente a $\Delta cpxA$ para el sistema CpxRA.

En el caso del sistema RcsAB se encontró que $\Delta rcsA$ expresa mayores niveles de expresión de la toxina comparada a $\Delta rcsB$. Los datos obtenidos en esta investigación indican que para el sistema CpxRA la represión puede ser causada por regulación postransduccional vía Lon, al igual que la sobreexpresión de la toxina en RcsAB.

El proceso de regulación proteica mediado por Lon es muy complejo, es una combinación de regulación a nivel transcripcional y proteólisis que puede ser constitutiva o condicional. Condicional porque depende de las condiciones ambientales y constitutiva porque involucra la conformación estructural sujeta a condiciones específicas de co-factores o sustratos

La proteólisis de factores regulatorios ha demostrado tener un rol importante controlando las redes transcripcionales en bacterias. No se puede descartar la regulación de señales transcripcionales a partir de fragmentos proteolíticos mediados por proteasas como Lon.

Marco Teórico

Enterobacterias

La familia de las enterobacterias es un grupo heterogéneo y extenso de bacilos gramnegativos cuyo hábitat natural es el intestino de ser humano y otros animales. La familia comprende muchos géneros (*Escherichia*, *Shigella*, *Serratia*, *Proteus* y otros más). La familia Enterobacteriaceae son bacilos anaerobios o aerobios facultativos, fermentan una amplia gama de hidratos de carbono, poseen una estructura antigénica compleja y producen diversas toxinas así como otros factores de virulencia.

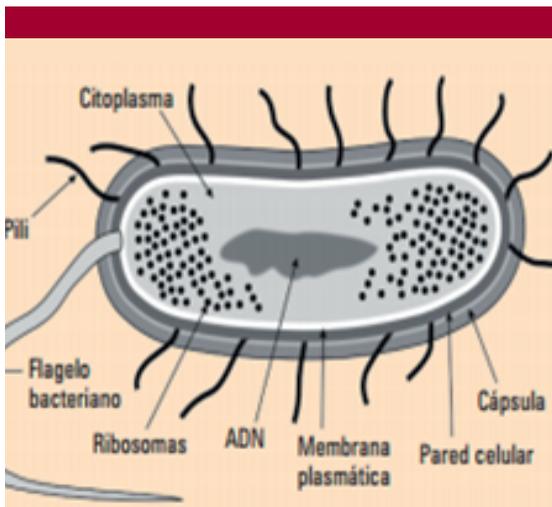


Figura 1: Morfología y partes de *E. coli*. Tomado de Jawetz 2016

Las características de esta familia son: Bacterias gramnegativas, ya sea móviles con flagelos peritricos o no móviles; se multiplican en medios con peptona sin que se agregue extracto de carne u otros complementos. Proliferan adecuadamente en medios aerobios o anaerobios, a menudo produciendo gas; son catalasa positiva, oxidasa negativa (excepto *Plesiomonas*) y tienen un contenido de DNA de CG de 39 a 59% (Jawetz et al., 2016).

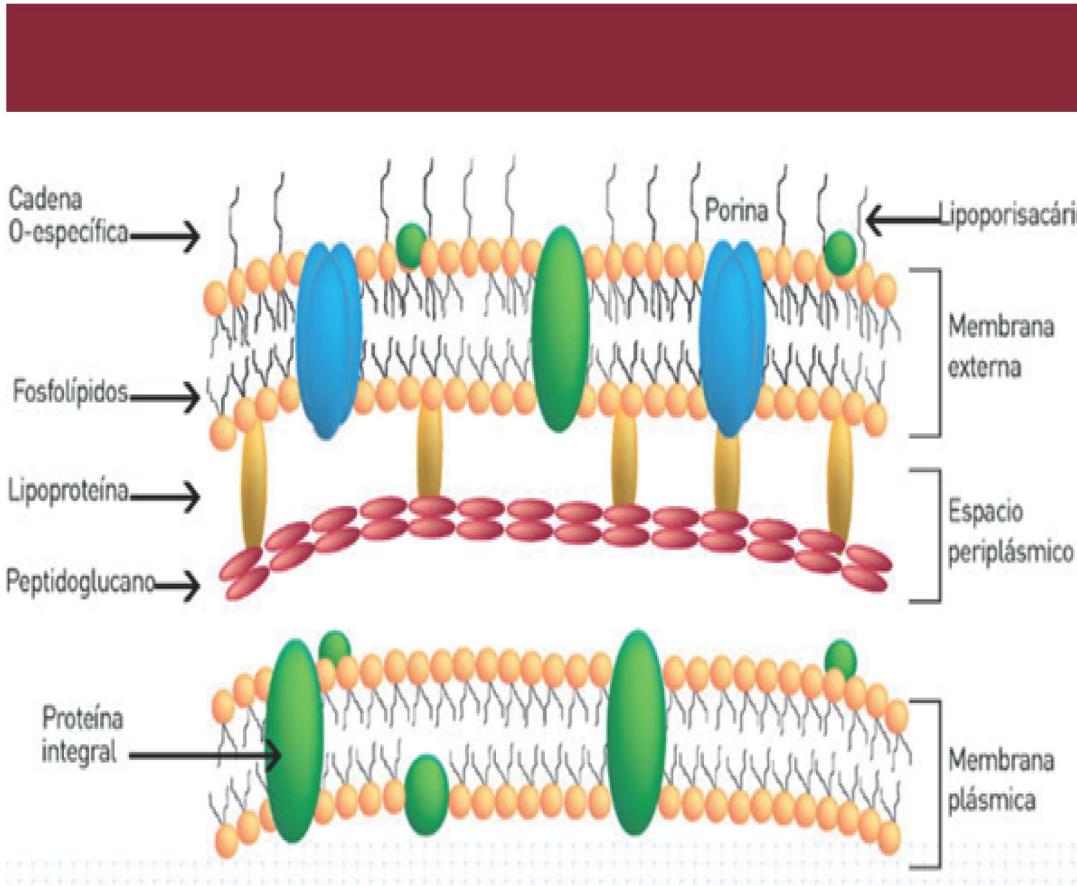


Figura 2: Detalle de membrana de Enterobacterias. Tomado de Garcia 2010.



En la figura una se esquematiza de manera general la morfología y partes de *E. coli*, mientras que en la figura dos se muestra el detalle de una membrana típica de las enterobacterias.

La membrana interna (o citoplasmática) consiste en una doble capa de fosfolípidos que regula el paso de nutrientes, metabolitos y macromoléculas. La capa siguiente, o capa externa, consiste en un peptidoglucano delgado junto con un espacio periplásmico que contiene una elevada concentración de proteínas.

La membrana externa compleja consiste en otra doble capa de fosfolípidos que incluyen lipopolisacáridos (LPS) (en la parte más externa, son un importante factor de virulencia de estas bacterias), lipoproteínas (que están fijadas al peptidoglucano), proteínas porinas multiméricas (que facilitan el paso de diversas sustancias, incluidos los antibióticos betalactámicos) y otras proteínas de la membrana externa. Entre estas proteínas hay algunos organelos complejos que irradian hacia el exterior: los flagelos, estructuras que se utilizan para la locomoción y que provienen de una estructura basal localizada en la membrana interna, las fimbrias (o pili comunes), con importante función como adhesinas y los pili sexuales, estructuras presentes en las bacterias que contienen plásmidos conjugativos y que las bacterias utilizan para mediar la transferencia conjugativa de ADN del plásmido (García, 2010).

Escherichia coli (***E. coli***)



TAXONOMÍA

Dominio: Bacteria
Filo: Proteobacteria
Clase: Gammaproteobacteria
Orden: Enterobacteriales
Familia: Enterobacteriaceae
Género: Escherichia
Especie: *Coli*

Theodore von Escherichia la describe por primera vez en 1885, mientras se dedicaba a investigar la microbiota en el intestino infantil a partir de sus heces, para establecer su rol en la digestión y la enfermedad.

Desde su descubrimiento *E. coli* ha sido el caballo de batalla de los bacteriólogos, esto en gran parte porque es fácil de cultivar, manipular y caracterizar. En el caso de nuestra especie, *E. coli* actúa como un comensal formando parte de la microbiota intestinal, ayudando así a la absorción de nutrientes y desarrollándose una relación de mutuo beneficio.



Esta y otras bacterias son necesarias para el correcto funcionamiento del proceso digestivo, además de ser responsables de producir vitamina B y K. Es un microorganismo anaerobio facultativo que se mueve por acción de flagelos que se distribuyen por todo el cuerpo de la bacteria, no produce esporas, fermenta la glucosa y a la lactosa (Rosenberg & Schleifer, 2007).

E. coli es una bacteria con una gran versatilidad en su genoma, tiene la capacidad de intercambiar material genético por medio de elementos genéticos móviles, tales como plásmidos y bacteriófagos como respuesta de adaptación a entornos nuevos y adversos. Inclusive puede adquirir elementos genéticos tales como trasposones (Tn), plasmidos, bacteriofagos e islas de patogenicidad (PAI), que codifiquen factores virulentos, que en pacientes inmunodeprimidos pueden llegar a ser fatales (Croxen et al., 2013).

CLASIFICACIÓN

En 1944 Kauffman propone un esquema de clasificación que aún se ocupa en la actualidad con el fin de diferenciar los tipos comensales de los patógenos. Este esquema de clasificación usa la identificación serológica de sus antígenos O (lipopolisacárido), H (flagelares) y K (envoltura y cápsula, termoestables y termolábiles). Los serotipos de *E. coli* son determinados por combinaciones específicas de los antígenos O y H (Nataro & Kaper, 1998).

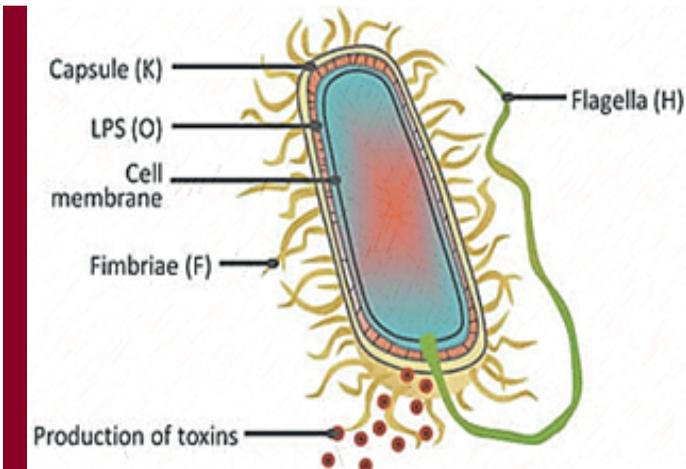


Figura 3: Serotificación de *E. coli*.

Tomado de www.ecl-lab.com/en/ecoli/index

Antes de la identificación de factores de virulencia específicos en cepas de *E. coli*, la serotipificación fue el medio predominante por el cual se diferenciaron las distintas cepas patógenas de esta bacteria.



La serotipificación de *E. coli* requiere de gran número de antisueros. Como hay pocos laboratorios que la realizan, se prefiere identificar las cepas mediante sus factores de virulencia empleando ensayos in vitro, por ejemplo pruebas de adherencia en células Hep-2 y ensayos de toxigenicidad en células. También se pueden realizar ensayos in vivo, como el asa ligada o la prueba de Sereny, así como estudios inmunológicos y pruebas de biología molecular, para poner de manifiesto la presencia de fragmentos de genes involucrados en el mecanismo de patogenicidad y que sirvan de marcadores moleculares (Rivero, 2002).

Con base en su mecanismo de patogenicidad y cuadro clínico, las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se clasifican en seis grupos: enterotoxigénica (ETEC); enterohemorrágica, también conocidas como productoras de toxina Vero o toxina semejante a Shiga (EHEC o VTEC o STEC); enteroinvasiva (EIEC); enteropatógena (EPEC); enteroagregativa (EAEC) y adherencia difusa (Nataro & Kaper, 1998).



En el cuadro 1, se muestra un breve resumen de distintas características de los grupos patógenos de *E. coli*.

Grupo	Síntomas Clínicos	Epidemiología	Serogrupos más comunes	Factores de patogenicidad
ETEC	Diarrea aguda acuosa.	Niños menores de 2 años.	O8:H9, O25:H11	ST y LT.
EHEC	SUH, CH, dolor abdominal y vómito.	Niños y adultos que la adquieren por comer carne mal cocida.	O157:H7 O26:H11, O103:H2, O113:H21	Stx, A/E, intimina, pO157.
EIEC	Diarrea con moco y sangre, cuadro disentérico.	Niños menores de 6 meses.	O28:H, O144:H, O152:H	Invasividad, plásmido 140 MDa.
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito y fiebre.	Niños mayores de 6 meses hasta 2 años.	O55, O86, O142	A/E, plásmido EAF ded 50 a 70 MDa.
EAEC	Diarrea líquida verde con moco, sin sangre.	Récien nacidos y niños menores de 2 años.	O44:H18	Fimbria AAFI, proteínas pit y pec
DAEC	Diarrea hemorrágica.	Niños de 1 a 5 años.	O126:H17	Fimbria F1845, OMP.

Cuadro 1: Resumen de las características de los patótipos de E.coli. (Nuria Margall, 1999).



PATOTIPOS

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Se caracteriza por provocar normalmente diarrea acuosa en zonas del mundo con deficientes condiciones de sanidad e higiene. ETEC se adhiere al intestino delgado mediante antígenos del factor de colonización y produce enterotoxinas. Las ETEC son importantes en lactantes, principalmente en niños menores de dos años, y en particular durante los primeros seis meses de vida.

El cuadro clínico se caracteriza por diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito (Eslava et al., 1998; Donneberg, 1994).

***E. coli* enteroinvasiva (EIEC)**

Es inmóvil, no fermenta la lactosa. Invade el epitelio intestinal causando diarrea sanguinolenta en niños y adultos. Libera el calcio en grandes cantidades impidiendo la solidificación ósea, produciendo artritis y en algunos casos arterioesclerosis. Los síntomas característicos en personas infectadas por EIEC son diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos solo presentan diarrea, esta en ocasiones es indiferenciable de la que produce ETEC.



Las cepas EIEC se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada, convirtiéndose en un patógeno importante en niños mayores de seis meses (Snyder et al, 1998).

***E. coli* enteropatogénica (EPEC)**

EPEC fue el primer grupo que se identificó serológicamente y se asoció con casos de diarrea en infantes, siendo la adherencia su principal factor de patogenicidad.

El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de la microvellosidad, con polimerización de actina, que lleva a la alteración del citoesqueleto en el sitio de la unión de la bacteria, debido al aumento de los niveles de calcio intracelular y de proteína cinasa C, ha sido denominado adherencia y esfacelamiento (A/E) (Knutton et al., 1987).



***E. coli* enteroagregativa (EAEC)**

Solo encontrada en humanos. Son llamadas enteroagregativas porque tienen fimbrias con las que aglutinan células en los cultivos de tejidos. El sitio blanco de daño de EAEC puede ser la mucosa del intestino grueso y delgado, con un periodo de incubación de menos de ocho horas y puede durar hasta 18 o 20 días (Cobeljic et al., 1996).

***E. coli* difusoadherente (DAEC)**

Se adhiere a la totalidad de la superficie de las células epiteliales y habitualmente causa enfermedad en niños inmunológicamente no desarrollados o malnutridos. Los serogrupos O predominantes son O75, O15 y O126. Cursa con enfermedad diarreica aguda. Las deposiciones son acuosas, sin sangre ni leucocitos. No se conocen el período de incubación, otras manifestaciones ni la duración.

En la figura 4 se muestra a manera de resumen los mecanismos moleculares por los cuales cada cepa patógena coloniza a su hospedero

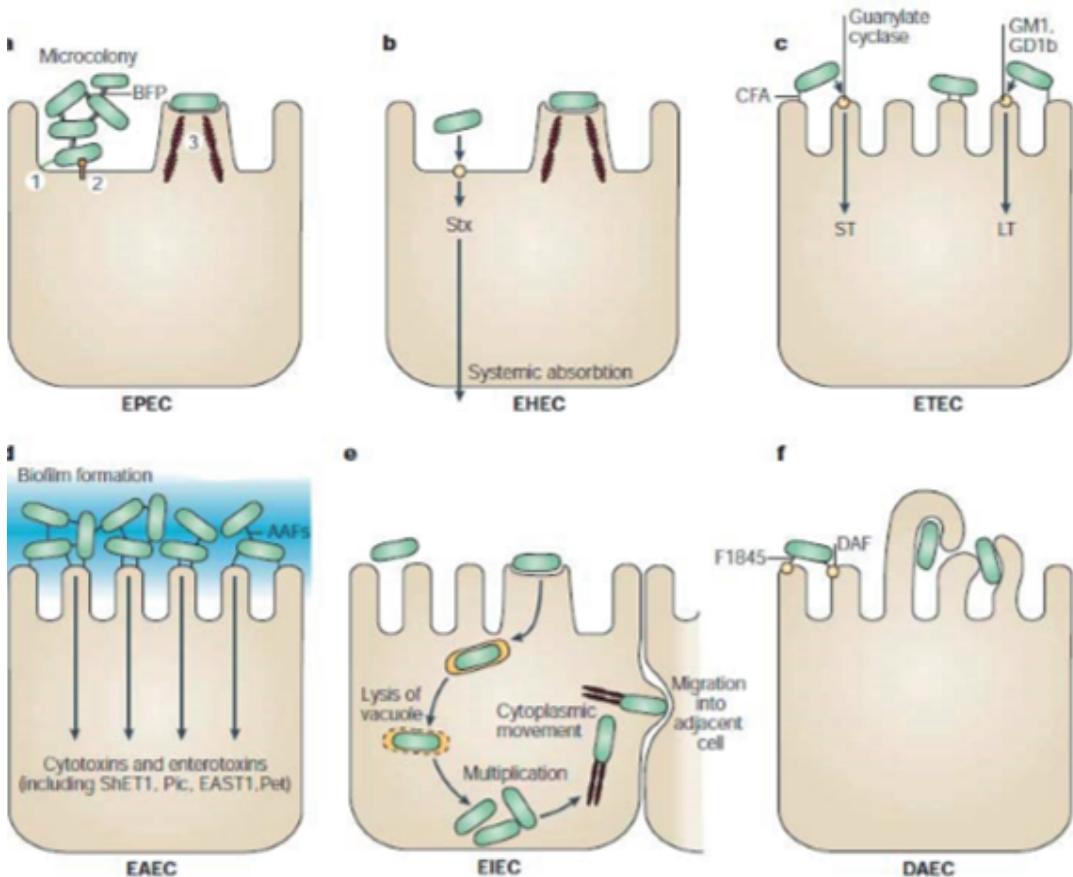


Figura 4: Esquema patológico de *E. coli* diarreogénicas. Cada una tiene características únicas, aquí se esquematiza la interacción de cada patótipo con la célula diana. Tomado de Matthew et al. 2013



E. coli Enterohemorrágica

CARACTERÍSTICAS GENERALES

Las bacterias *E. coli* enterohemorrágica, cuentan con una variedad de particularidades que aumentan su potencial patógeno: en primer lugar, se pueden adherir a las células de epitelio de la pared del intestino gracias a una proteína de envoltura (Adhesina); en segundo lugar, son capaces de producir una toxina semejante a la toxina Shiga (Stx) de *Shigella dysenteriae*.

La transmisión de este organismo puede ocurrir de formas muy variadas, pero principalmente por medio de la ingestión oral directa o indirecta de restos fecales. El reconocimiento de EHEC como una distinta clase patogénica de *Escherichia coli* fue resultado de dos observaciones epidemiológicas clave:

La primera, fue reportada en 1938 por Riley y colaboradores, quienes investigaban dos brotes de una enfermedad gastrointestinal caracterizada por un severo dolor abdominal y diarrea acuosa que pasaba a ser diarrea hemorrágica. Esta enfermedad fue designada como colitis hemorrágica (CH). La serotificación de muestras de estos pacientes con colitis hemorrágica resultó ser O157:H7, un serotipo raro, que había sido aislado previamente.



La segunda observación clave, fue hecha por Karmali y colaboradores, también en 1983, donde se reportó la asociación de casos esporádicos de síndrome Uremico-hemolítico o SUH con una toxina secretada por *E. coli* aislada de los pacientes que presentaban la enfermedad. Esta toxina había sido reportada previamente por Konowalchuk en 1977, el demuestra que esta toxina es capaz de inducir muerte en la línea celular Vero (Verotoxina) (Allocati et al. 2013).



En 1938 hubo un brote de colitis hemorrágica (CH) y fue asociada con el consumo de hamburguesas mal cocidas consumidas en una famosa cadena de restaurantes de comida rápida. EHEC es termo sensible, por lo que para su prevención se recomienda la cocción adecuada de los alimentos, especialmente de carnes (Frias, 1996).



Al mismo tiempo, O'Brien reporta que los extractos de algunas cepas de *E. coli* presentaban actividad citotóxica en la línea celular HeLa, y que esta actividad podía ser neutralizada con un posterior tratamiento a las células con un preparado anti toxina de *Shigella dysenteriae* (Toxina Shiga o Stx). Posteriormente O'Brien demuestra que esta toxina similar a Shiga y la toxina reportada por Konowalchuk (Verotoxina) eran una misma, producida por el patotipo O157:H7 que describió Riley en 1938.

Fueron estos antecedentes que permiten a Karmali concluir que la Verotoxina/Toxina similar a Shiga era el factor común de virulencia entre el Síndrome Uremicohemolítico y la colitis hemorrágica, y que era a responsable del daño al tejido intestinal y renal en ambos casos. Esta es considerada una de las más significantes contribuciones a la microbiología (Allocati et al. 2013).



CUADRO CLINICO

EHEC está relacionada a dos patologías: Síndrome Urémico hemolítico y Colitis Hemorrágica. La colitis hemorrágica es un padecimiento caracterizado por diarrea de inicio brusco acompañada de dolor abdominal, las evacuaciones líquidas son acompañadas por una descarga hemorrágica. El síndrome urémico hemolítico (SUH) es un desorden multisistémico caracterizado por presentar insuficiencia renal aguda, anemia hemolítica microangiopática y trombocitopenia grave, con microangiopatía de selectiva localización renal y manifestaciones de lesión isquémica en otros órganos como sistema nervioso central, retina, miocardio, páncreas e intestino (Riley et al. 2011).

Esto da lugar a un cuadro clínico englobado en la denominación genérica de microangiopatía trombótica. El síndrome Urémico hemolítico es una de las principales causas de daño renal en niños. En la infancia típicamente es precedido por un cuadro de dolor abdominal y diarrea acuosa y/o sanguinolenta. Pueden asociarse vómitos y fiebre. Las manifestaciones neurológicas incluyen convulsiones, ataxia, letargia y coma. El aparato gastrointestinal puede sufrir infarto, intususcepción, perforación, prolapso rectal, apendicitis o hepatomegalia (Voyer et al., 2007).

Estas manifestaciones son atribuidas a toxinas bacterianas, en este caso a Stx, que produce lesiones en pequeños vasos sanguíneos que afectan fundamentalmente al riñón, pero también pueden afectar al sistema nervioso central y al aparato gastrointestinal (Griffin, 1990).



La incubación de EHEC dentro del hospedero tarda usualmente de 3 a 4 días antes de presentar síntomas iniciales, donde comienza como una diarrea acuosa, dolor abdominal, puede presentarse fiebre e incluso vómitos. Después de 1 o 2 días la diarrea se convierte en una diarrea hemorrágica sin secuelas aparentes, aunque en pacientes menores a 10 años la enfermedad puede progresar hasta Síndrome hemolítico.

E. coli también puede causar otras patologías, como infección en vías urinarias, donde es la causa más frecuente de infección para mujeres jóvenes. Los signos y síntomas consisten en polaquiuria, disuria, hematuria y piuria, dolor en la fosa rena (región lumbar unilateral) que se relaciona con una infección urinaria alta. Ninguno de estos síntomas es específico para *E. coli*. Es la meningitis neonatal otra patología relacionada a EHEC, no frecuente pero devastadora, la morbilidad entre los sobrevivientes es alta. Los tipos y distribución de los patógenos están relacionados con la edad gestacional, la edad posnatal y región geográfica. La confirmación del diagnóstico es difícil. Los signos clínicos son a menudo sutiles funciones lumbares, y los cultivos del cefaloraquideo pueden verse comprometidos por la exposición a antibióticos.

Pruebas moleculares como la PCR son prometedoras para la detección de este patotipo particular de *Escherichia coli*, ya que permiten amplificar y caracterizar los genes de las toxinas en cepas aisladas (Pratz, 1996).



TRATAMIENTO CLÍNICO

El uso de antibióticos es particularmente peligroso para la infección causada por EHEC, esto se debe a que algunos causan lisis bacteriana, permitiendo la liberación de toxinas en mayor cantidad. Al liberarse las toxinas, al menos en ensayos in vitro se ha demostrado que esto mata otras bacterias pertenecientes a la flora intestinal. También se incrementa la absorción de toxinas, lo cual agrava el cuadro clínico de la enfermedad (Nataro & Kaper 2004).

El síndrome uremico-hemolítico es la primera causa de insuficiencia renal aguda en niños menores de cinco años. Puede causar la muerte o dejar secuelas para toda la vida como insuficiencia renal crónica, hipertensión arterial y alteraciones neurológicas.

Los tratamientos actuales para la infección por EHEC pueden incluir diálisis, hemofiltración, transfusión de paquetes de eritrocitos, entre otras intervenciones. En casos severos puede ser necesario un trasplante renal (Croxen et al., 2013).



El paciente con diagnóstico de SUH debe ser siempre internado. El tratamiento consiste en:

1. Corrección de trastornos hidroelectrolíticos y del estado ácido-base.
2. Transfusión en caso de anemia y/o trombocitopenia grave (75% de los casos).
3. Inicio precoz de la alimentación por vía oral.
4. Manejo de la hipertensión corrigiendo la sobrecarga hídrica y en algunos casos mediante la utilización de agentes antihipertensivos como enalapril, propranolol, nifedipina, etc.
5. No se deben utilizar agentes que inhiban la motilidad intestinal ya que prolongan la duración de la diarrea y aumentan el riesgo de padecer SUH.
6. Los antibióticos en general no son útiles para el tratamiento y aumentan la gravedad del cuadro.
7. Ante la sospecha de SUH se debe evitar la sobrehidratación hasta haber realizado el diagnóstico de certeza.

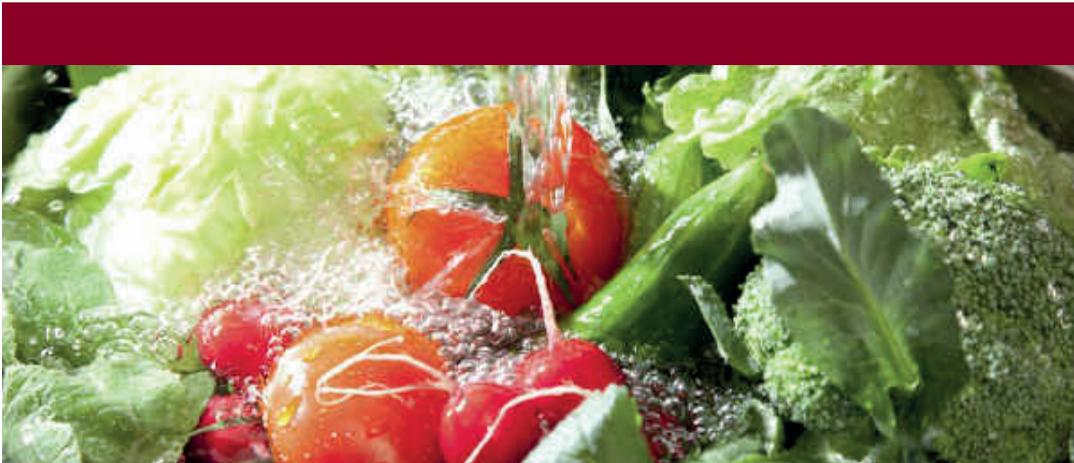


En cuanto a la evolución de la enfermedad: el 50-75% de los pacientes deben ser sometidos a diálisis peritoneal intermitente o hemodiálisis, recuperándose sin secuelas luego de 2 a 3 semanas. La tasa de letalidad es alrededor del 3%; el 20% al 30% sufren formas persistentes de nefropatías o formas seculares de insuficiencia renal y del 10% a 15% requieren trasplante renal. El compromiso cardíaco es raro, pero puede conducir a la insuficiencia cardíaca debido a cardiomiopatía o miocarditis (Pratz, 1996; Rivero, 2004).

A pesar de la variedad de estrategias para el tratamiento de EHEC, no hay uno específico, pues los tratamientos actuales solo buscan limitar los síntomas y prevenir complicaciones sistémicas.

TRANSMISIÓN Y PREVENCIÓN

El ganado bovino es considerado como el principal reservorio de EHEC. Generalmente el contagio es por contacto directo con heces fecales de estos animales. La dosis infectiva es sumamente baja, solo 100 bacterias pueden producir la enfermedad. El contagio al hombre frecuentemente se debe al consumo de alimentos cárnicos y lácteos contaminados, deficientemente cocidos o sin pasteurizar. También se da por el contacto directo con los animales o con sus heces, consumo de agua, frutas o verduras contaminadas (Rivero, 2002).



Uno de los métodos de prevención más comunes es lavar y desinfectar los alimentos antes de consumirlos.



Factores de virulencia

EHEC posee una amplia variedad de factores de virulencia además de los factores generales que comparte con toda la familia Enterobacteriaceae, como son el liposacárido (LPS) y la cápsula. Las cepas de EHEC también poseen factores de virulencia especializados como las adhesinas y las exotoxinas entre otros.

Es importante conocer a detalle esos factores de virulencia, y como afectan al hospedero, para comprender la patogénesis de la enfermedad.

LIPOSACÁRIDO Y CÁPSULA

El liposacárido (LPS) es el principal antígeno de la pared celular y está formado por tres componentes:

El polisacárido somático o más externo, seguido de una región central polisacáridica compartida por todas las enterobacterias y por último el lípido A. La actividad del LPS depende del componente lípido A que se libera durante la lisis celular. Muchas manifestaciones sistémicas de las infecciones por bacterias se inician por el LPS.

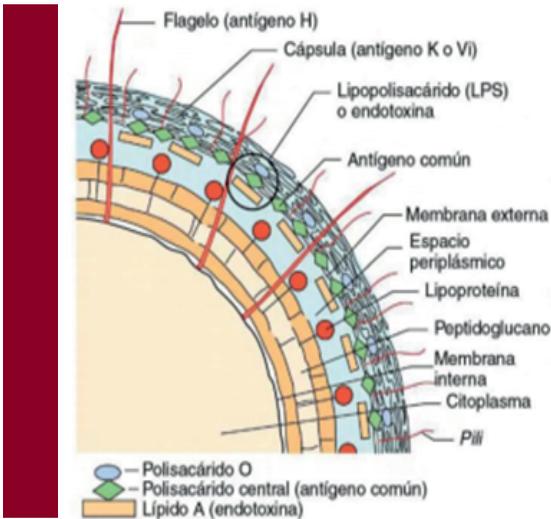


Figura 5: Pared celular de Enterobacterias. La parte de la pared de las enterobacterias se compone del liposacárido, que es el principal antígeno de la pared celular, conformado por el polisacárido O, central y lípido A.

Tomado y modificado de Murray P. 2008

La formación de la cápsula protege de la fagocitosis mediante los antígenos capsulares hidrofílicos, los cuales repelen la superficie hidrofóbica de la célula fagocítica. Sin embargo, el papel protector de estos termina cuando se generan anticuerpos anticapsulares específicos.



ISLAS DE PATOGENICIDAD (PAI)

En años recientes, grandes bloques de genes encontrados en el cromosoma bacteriano se han denominado islas de patogenicidad (PAI), a fin de describir regiones únicas asociadas con la virulencia.

Son llamadas “islas” por el hecho de que las regiones PAI normalmente tienen características fundamentales, tales como contenido de guanina y citosina, uso de codones y genes tRNA distintos al resto del genoma del organismo hospedero actual. Esto sugiere que la transferencia de genes de una especie ajena en algún punto del pasado distante es el origen probable.

Muchas PAI tienen homólogos sorprendentemente similares en bacterias patogénicas para plantas y animales. Las PAI contienen el paquete completo que se requiere para el despliegue del rasgo patogénico, incluso aquellos de máxima complejidad que implican de 20 a 30 genes. En los organismos que despliegan sistemas de secreción tipo III como EHEC, todos los genes para el aparato de inyección, para las proteínas secretadas y para los elementos reguladores están incluidos en la PAI.

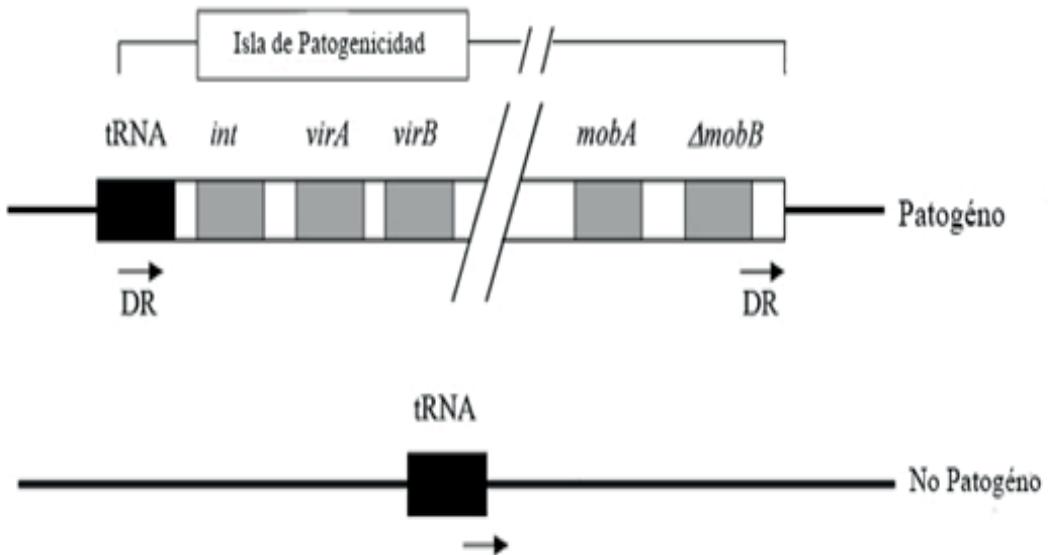


Figura 6: Modelo de una isla de patogenicidad bacteriana. Cada caja representa genes asociados a la patogenicidad. La línea delgada representa las regiones no patógenas. Tomado de Nataro y Kaper 1998.

El tamaño cromosómico de EHEC O157:H7 es de 5,5 Mb. Esto incluye a 4,1 Mb que son altamente conservados en todas las cepas de *E. coli*. El restante es específico para EHEC O157:H7 (Perna 2001). Además, la comparación de EHEC O157:H7 con *Escherichia coli* no patógena K12 muestra que se han perdido 0.53 Mb, lo que sugiere pérdida de material genético como parte de la evolución de EHEC (Dobrindt, 2003).

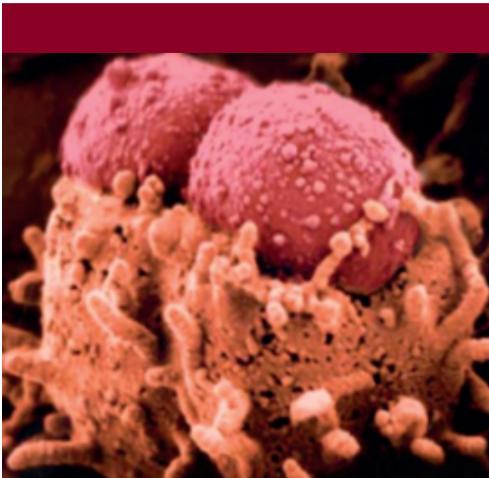


Figura 7: Histopatología de una lesión de adherencia y esfacelación (A/E) característica de EHEC. Se puede notar el típico pedestal al unirse la bacteria y la célula hospedera. Tomado de S.J Elliot 2000.

Uno de los signos característicos de la infección por EHEC, son las lesiones de adherencia y esfacelación (A/E), las cuales son atribuidas a una isla de patogenicidad (PAI) de 35kb denominada “Locus de eliminación de enterocitos” o LEE por sus siglas en inglés. LEE consiste en 41ORFs (Open reading frames) funcionalmente organizados en 5 operones llamados *LLE1*, *LEE2*, *LEE3*, *LEE4*, *LEE5*. *LEE1*, *LEE2* y *LEE3* contienen todos los genes necesarios para la formación de un SST3 (Sistema de Secreción tipo 3) funcional y diversas proteínas efectoras (Elliott, 2000).



En la figura 7 se muestra a detalle una lesión de adherencia y esfacelación de EHEC en células epiteliales del intestino.

El SST3, otro factor de virulencia importante en EHEC, es un organelo que inyecta proteínas bacterianas en la célula hospedera. A través de este sistema de secreción/inyección de proteínas, los patógenos translocan factores de virulencia (efectores) directamente en la células del huesped, lo que permite la infección por desestabilización de los mecanismo de defensa de las células (Brien, 2011).

LEE es regulada gracias a la interacción entre la bacteria y el ambiente dentro del hospedero; En el operón *LEE1* se codifica a Ler, que es una proteína que es el principal regulador transcripcional de la isla de patogenicidad LEE. Es una proteína de 15KDa y se ha demostrado que es esencial para la formación de lesiones A/E de EHEC en el hospedero. *LEE5* alberga información para Tir, que es una proteína transmembranal que actúa como receptor de intimina, también importante para las lesiones A/E (Sperandio et al., 2000).



Existen otros dos reguladores importantes para LEE; GrIA (Global Regulator LEE Activator) y GrIR (Global Regulator LEE Repressor), los cuales fueron descritos en 2004 por Deng y colaboradores (Deng et al. 2004). Estos reguladores son codificados por el operón *griAR* localizado entre el gen *rorf3* y el operón *LEE2* de LEE (Barba et al., 2005). Ambos reguladores tienen roles importantes en LEE (activador y represor respectivamente). GrIA se une al promotor de *LEE1* regulando positivamente la expresión de Ler. Mientras que GrIR regula negativamente a GrIA, al unirse y prevenir que GrIA se una a *LEE1* (Creasey et al., 2003).

La regulación de la expresión genética de LEE es un proceso altamente complejo y coordinado, dependiente de las condiciones ambientales, interacción de genes, interacción de proteínas del organismo y del hospedero así como de varios reguladores y vías reguladoras, ya sea de manera indirecta o directa.



ADHESINAS Y OTROS FACTORES DE ADHERENCIA

La primera interacción importante entre un microorganismo patógeno y su hospedador implica la adherencia a la superficie de una célula eucariota.

En su forma más sencilla, la adherencia requiere de la participación de dos factores: una adhesina para el microbio invasor y un receptor sobre la célula hospedadora. Además de lograr una unión entre la bacteria y el hospedero, la capacidad toxigénica de las cepas de EHEC es necesaria para que el paciente desarrolle colitis hemorrágica.

En la infección por EHEC se producen lesiones tipo “pedestal”, esto como consecuencia del fenómeno de adherencia y esfacelación (A/E), donde participan genes cromosomales y plasmídicos que inducen y/o regulan la expresión de los factores de virulencia de la bacteria. Estas lesiones se caracterizan por la unión íntima a la superficie de la célula huésped con una alteración del citoesqueleto de actina.

Estas lesiones se relacionan con el gen cromosomal *eae* que codifica para una proteína de membrana externa (OMP) de 94 kilodaltones (kDa), llamada intimina. Es esta proteína la que permite que ocurra la unión íntima de la bacteria y las células epiteliales del hospedero.

En la figura 8 se muestra un esquema a manera de resumen de las reacciones moleculares que ocurren durante la formación de las lesiones A/E típicas de EHEC.

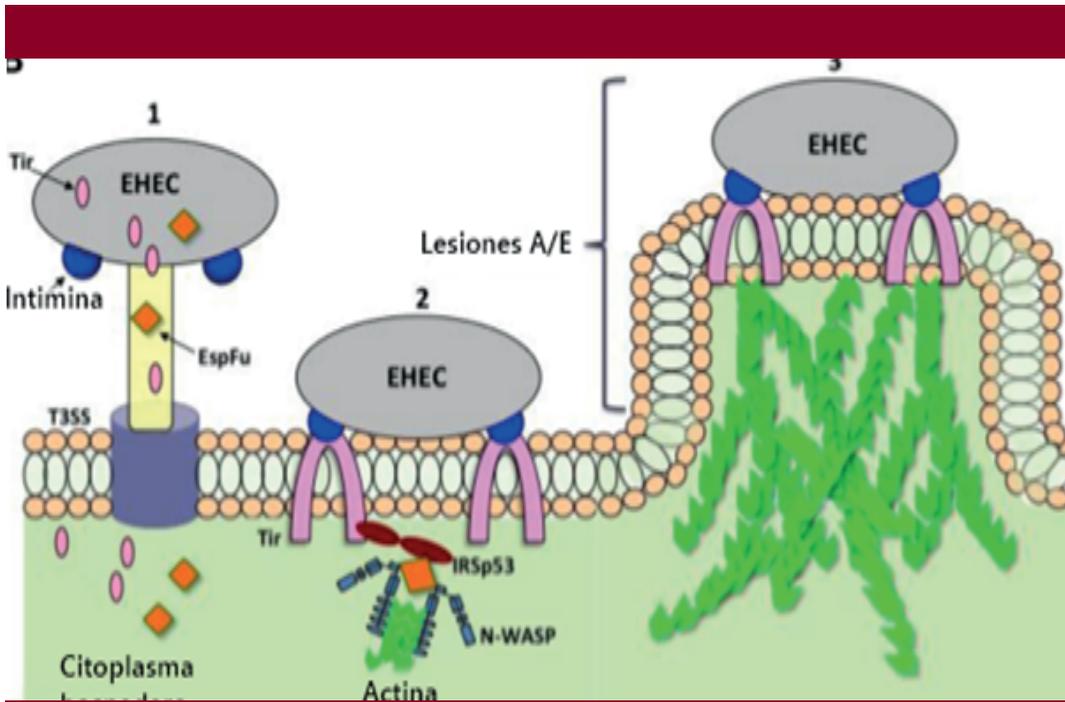


Figura 8: Interacciones moleculares en una lesión de adherencia y esfacelación (A/E) característica de EHEC. Al encontrar las condiciones adecuadas en el tracto intestinal del hospedero, EHEC comienza la transcripción de LEE para el montaje del SST3 lo que le permite traslocar sus propias proteínas (Tir) a las células del hospedero, Causando reareglos en el citoesqueleto bacteriano. Lo cual resulta en la unión íntima de la bacteria y la célula hospedera causando lesiones A/E. Tomado de Sperandio y Nguyen 2012.



PLASMIDO pO157

Un plásmido es DNA extracromosomal que es capaz de replicarse de manera independiente al DNA cromosomal. Son elementos móviles que proveen al organismo gran variedad de ventajas, como resistencia a antibióticos o metales pesados, además de factores de patogenicidad.

En EHEC el plásmido pO157, de 60 megadaltones (MDa), es capaz de conferirle a EHEC más factores de virulencia, este está altamente conservado en EHEC O157:H7, y puede variar en tamaño, desde 93 a 104 Kb (Schmidt et al., 1993).

Existe un fragmento de 4 Kb que codifica para la enterohemolisina una potente citotoxina capaz de liberar el grupo hemo en la hemoglobina (Donneberg, 1994). La enterohemolisina pertenece a la familia de toxinas RTX, el gen que codifica para esta proteína es *ehxA*, no se sabe con certeza su papel en la patogénesis de EHEC, pero se cree que libera hierro para que EHEC pueda aumentar su crecimiento (Schmidt et al., 1994).

Además de la enterohemolisina, poco se sabe sobre el plásmido pO157, aunque se ha reportado que cepas de EHEC sin el, pierden capacidad de adherencia en células Vero *in vitro* (Sanger, 1996). También se sabe que en este plásmido se encuentra un segmento genético aparentemente intacto que codifica para un sistema de secreción tipo II (Creasey et al., 2003).



Toxinas Bacterianas

Muchas bacterias patógenas albergan plásmidos o bacteriófagos que codifican toxinas importantes. Una toxina es una sustancia venenosa producida por células vivas de organismos biológicos, las toxinas microbianas son determinantes importantes de la virulencia responsable de patogenicidad microbiana y/o evasión de la respuesta inmune del hospedador.

Bacterias como *Escherichia coli* que colonizan el tracto gastrointestinal de mamíferos estén expuestas a interactuar con gran cantidad de virus y bacteriófagos. Muchos bacteriófagos inyectan su material genético y utilizan a la bacteria para replicarse en un proceso conocido como lisogenia. Es en este estado lisogénico donde el genoma del fago es replicado por la bacteria infectada.

Los bacteriófagos han evolucionado para ser capaces de iniciar su replicación y escapar de huésped utilizando el estrés o la respuesta SOS de la bacteria. La integración de los genomas del fago y su posterior degradación son importantes en la evolución de muchos géneros bacterianos.



Algunas toxinas, tales como neurotoxinas botulínicas, son las toxinas más potentes naturales conocidas. Sin embargo, las toxinas microbianas también tienen usos importantes en investigación médica. Aplicaciones potenciales de estudio de toxinas incluyen el combate de la virulencia microbiana, el desarrollo de nuevas drogas contra el cáncer y otros medicamentos, además de su uso como herramienta en neurobiología y biología celular.

El principal factor de virulencia de EHEC es la toxina Shiga (Stx). Su síntesis está relacionada con la presencia del bacteriófago stx, que está insertado en el genoma de EHEC. La toxina Shiga Stx actúa a nivel de síntesis de proteínas ya que se une a la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales o renales del hospedero, causando muerte celular al inhibir completamente la síntesis de proteínas. La toxina también aumenta la liberación de citosinas, se le atribuye a estas proteínas el desarrollo del Síndrome Urémico Hemolítico (Allocati et al., 2013).

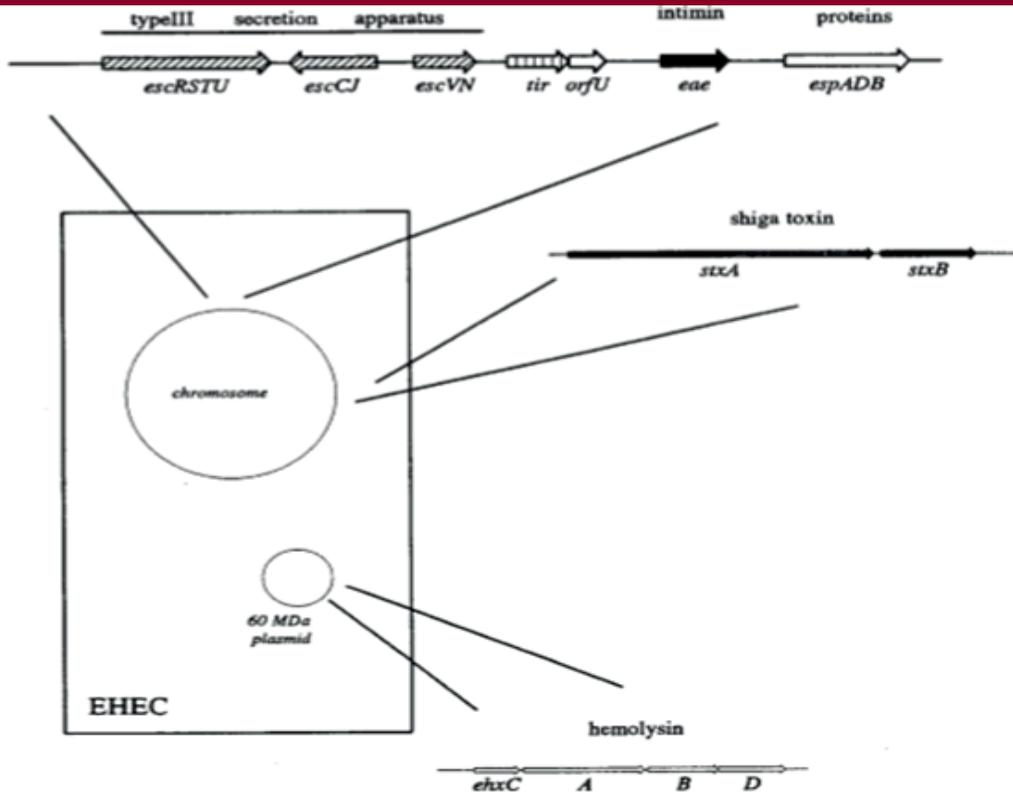


Figura 9: Genes que regulan la patogenicidad de EHEC. Tomado de Nataro y Kaper 1998. En la parte superior se muestra el detalle de la isla de patogenicidad LEE, despues el profago *stx* y al final el plasmido pO157.



TOXINA SHIGA (Stx)

El mayor factor de virulencia de EHEC es la toxina Shiga, además de ser la que caracteriza a este grupo patogénico de *Escherichia coli*. Esta potente citotóxina es la responsable de gran parte de la sintomatología de EHEC y de sus posibles complicaciones que pueden llevar a la muerte del paciente. Dentro de la familia de esta toxina existen dos grupos principales: Stx1 y Stx2.

Las toxinas son llamadas Shiga por Kiyoshi Shiga, quien fue el primero en describir el origen bacteriano de la disentería causada por *Shigella dysenteriae*. También son conocidas como Verotoxinas, esto relacionado a su toxicidad en células Vero (Allocati et al., 2013).

Estas toxinas actúan inhibiendo la síntesis proteica dentro de células blanco de manera similar a la ricina producida por *Ricinus Communis*. Después de entrar a la célula, la proteína funciona como N-glicosidasa, deteniendo así la síntesis de proteínas (Sandving, 2000).



La toxina tiene dos subunidades designadas como A y B uniéndose de manera no covalente. La subunidad A de Stx es una N-glicosidasa que escinde el enlace N-glicosídico de un residuo de adenina específico del ARNr 28S en la subunidad 60S ribosomal inhibiendo la síntesis de proteínas. Mientras que la subunidad B es un pentámero que se une a glicolípidos específicos de células eucariotas, al receptor altamente específico Gb3 (globotriaosylceramida).

Este receptor se encuentra en células del epitelio intestinal del ser humano, por lo que se le atribuye el daño de EHEC (aunque se han encontrado estos receptores en cerebro y riñón). Posteriormente la subunidad A es internalizada y clivada en dos partes, A1 se une al ribosoma impidiendo la síntesis de proteínas.

El bacteriófago *stx* también introduce variaciones diferentes en las cepas, incluyendo la expresión de diferentes variantes de la toxina Shiga. Todas estas variantes pertenecen a una familia de exotoxinas A1B5 (formada por una fracción enzimática y 5 de unión). Las variantes Stx2 difieren de las Stx1 en su actividad biológica, reactividad inmunológica y en el receptor al que se unen. Además Stx1 es idéntica a la producida por *Shigella dysenteriae* con una única diferencia en un aminoácido en la subunidad A, mientras que Stx2 solo comparte el 55% de la secuencia de aminoácidos de Stx1. Stx2 es más potente en humanos y es la que más comúnmente se asocia a HUS.

Ambos grupos pueden ser encontrados en distintas cepas de EHEC, ya sea solo uno o una combinación de ambos. En la figura 10 se esquematiza en mecanismo de acción de la toxina en las células del hospedero.

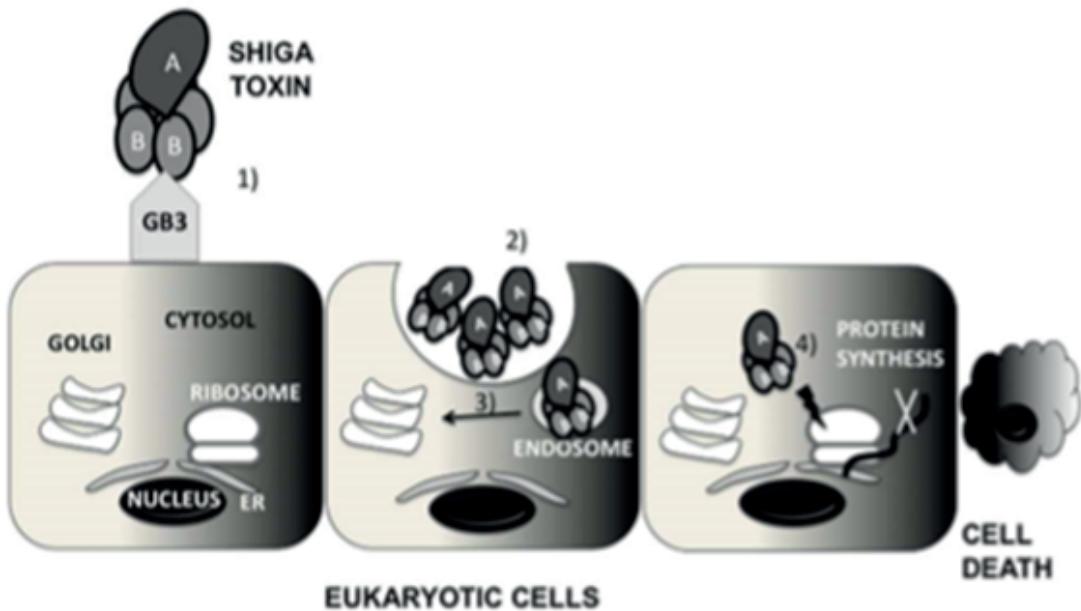


Figura 10: Mecanismo de acción de Stx. Esta toxina está constituida por un pentámero de subunidades B unidos a una unidad catalítica A, las subunidades B se unen al receptor GB3 y stx es internalizada por endocitosis, llega a ribosoma inactivando síntesis de proteínas, causando muerte celular. Tomado de Allocati 2013.



En EHEC O157:H7 *Stx* es codificada por dos bacteriófagos convertidores de toxina en el cromosoma bacteriano: 933W y 933J. El gen *stx* está localizado ya sea de manera intacta o parcial en profagos de la familia lambda, los cuales están integrados al cromosoma bacteriano. La activación de la fase lítica del ciclo del fago lleva a la producción de la toxina, la cual es liberada con la lisis bacteriana.

Los genes que codifican para *Stx1* y *Stx2* están localizados en los últimos genes del fago, donde la expresión de *StxAB* está bajo control del ciclo del fago. *Stx2* solo se produce cuando el fago entra en su ciclo lítico, mientras que *Stx1* depende por el ciclo del fago y un promotor regulado por hierro.

El fago lambda permanece quiescente debido a la unión de un represor (*ci*) en ambos lados de su operón inhibiendo la actividad de los promotores del fago (*PR* y *PL*). Para entrar en fase lítica, el bacteriófago que codifica *StxAB* toma ventaja de la respuesta SOS bacteriana que produce y activa a *RecA* que se une al represor del fago (*ci*), permitiendo así la actividad de los promotores del fago, lisando a la célula y liberando la toxina.

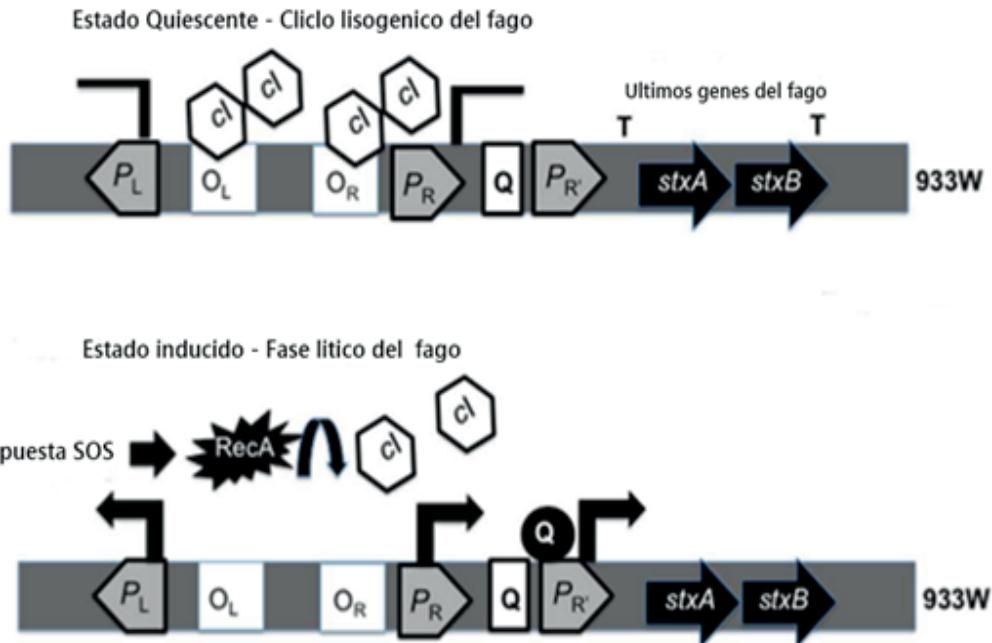


Figura 11: Regulación de la expresión de la toxina Shiga. En la parte superior se muestra el estado quiescente del fago (Estado lisogénico) y en la inferior el estado inducido (Estado lítico). Tomado de Xu 2012.



Es evidente que la presencia del bacteriófago stx en EHEC le confiere ventajas en la colonización y permanencia en el tracto gastrointestinal mediante la producción de la toxina Shiga.

La inducción de la respuesta SOS bacteriana en el tracto gastrointestinal del hospedero permitirá que la toxina sea liberada, esto permite la sobreexpresión y reacomodo de nucleolina y otros receptores en la superficie de las células epiteliales promoviendo la colonización de EHEC.

Además se sabe que el bacterifago stx es capaz de reprimir a LEE por medio de ler. Se cree que esta es una estrategia para que este sistema crítico de colonización sea dependiente de stx y de esta manera se pueda asegurar la colonización bacteriana al hospedero (Xu et al., 2012).

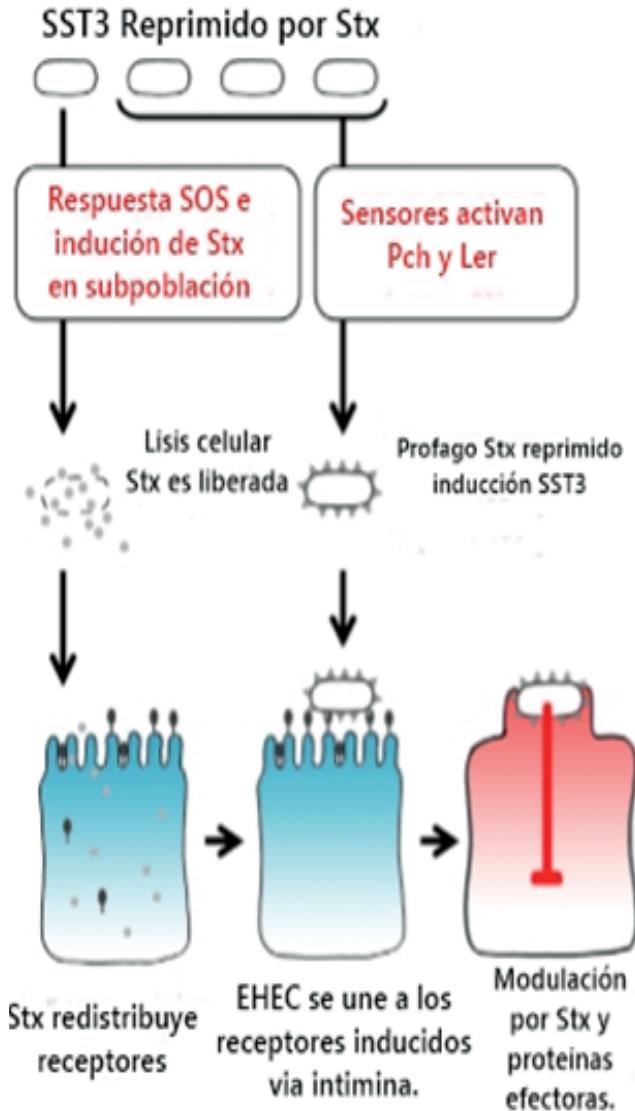


Figura 12: Esquema de la regulación de SST3 por medio del profago Stx. Modelo de la interacción de EHEC en epitelio. La respuesta SOS de estrés resulta en inducción del profago stx en una subpoblación liberando a Stx para redistribuir receptores en la célula hospedera permitiendo la activación de Ler y de LEE permitiendo la expresión de SST3 (Xu, 2012).



Reguladores Transcripcionales

Sistemas de dos componentes (TCS)

Los sistemas de dos componentes representan uno de los mecanismos de señalización predominantes en bacterias. Estos sistemas permiten a la bacteria hacer frente a cambios rápidos en las condiciones celulares o ambientales. TCS típicamente consisten en una cinasa sensor (SK) y un regulador de respuesta (RR) (Gao et al., 2009).

La detección de un estímulo en específico da como resultado una autofosforilación de la SK activando a su RR. A la vez, RR podrá activar factores de transcripción para genes específicos. La respuesta del sistema de dos componentes termina cuando RR es desfosforilada por actividad intrínseca de la cinasa sensor (Stock et al, 2000; Gao, 2009).



Sistema de dos componentes CpxRA (Conjugative pilus expression)

Unos de los sistemas conocidos para *Escherichia coli* es el sistema de dos componentes Cpx. Este regula la respuesta al estrés al monitorear y mantener la integridad de la célula. Este sistema consiste en CpxA como cinasa sensor (SK), CpxR como regulador de respuesta (RR) y una proteína accesoria periplasmática CpxP, esta proteína accesoria tiene la capacidad de inhibir la actividad del sistema al dar un feedback loop. Esto quiere decir que en altas concentraciones de CpxP, se detendrá la expresión del sistema. (Fleischer 2007).

CpxA es una proteína que tiene actividad como cinasa y fosfatasa, y su autofosforilación es inhibida por CpxR. Este sistema de dos componentes es inducido por varios estímulos, incluyendo la presencia de proteínas mal plegadas, pH alcalinos, sales, cambios en la composición lipídica del ambiente e incluso a la unión de la bacteria a superficies abióticas (Otto, 2002).

Esta vía también tiene un efecto directo en la transcripción de los genes de la virulencia y de los reguladores de la virulencia en diferentes patógenos.



Sistema RcsAB (Regulation of capsule sintesis)

La encapsulación por exopolisacáridos (EPS) protege a las bacterias de condiciones ambientales no favorables para su ciclo de vida. La producción de EPS además representa un factor esencial para la virulencia de gran variedad de bacterias patógenas. Es el sistema RcsAB el encargado de controlar la producción de EPS en especies como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *Salmonella typhi* (Bernhard, 2000).

Se ha demostrado que bacterias mutantes en RcsAB son capaces de sobrevivir en condiciones normales, pero en presencia de estrés inducido por clopromazina, las mutantes en este sistema no pueden recuperarse, lo que demuestra que si bien, este sistema no es esencial para la vida, lo es para que la bacteria pueda recuperarse de ciertos factores de estrés ambiental.

Este sistema implica dos proteínas y una accesoria de apoyo. El regulador RcsB es activado al ser fosforilado por RcsC, su sensor cognado. La activación de la síntesis de EPS requiere de cofactor RcsA, que junto a RcsB forma un heterodímero que se une en un sitio específico llamado “caja RcsAB” (Bernhard, 2000).



La proteína RcsB es activada al ser fosforilada por el receptor transmembranal RcsC. La proteína RcsA es limitada por la inducción de la biosíntesis de EPS, no es posible encontrarla en células a menos que haya sido inducida su proliferación ya que en condiciones normales es rápidamente degradada por la proteasa Lon.

La presencia de RcsB es fundamental para la biosíntesis capsular, donde RcsA puede ser remplazada por una sobreexpresión de RcsB. RcsA puede actuar como un coinductor de la biosíntesis de EPS al facilitar la unión de RcsB al DNA.

Proteasa Lon

Es una serina proteasacitoplasmática dependiente de ATP que media la degradación selectiva de proteínas mutantes o anormales, así como las de vida corta, como las antitoxinas. Es requerida para la homeostasis celular y para sobrevivir a daños en el DNA y a estrés ambiental. Es capaz de degradar polipéptidos hasta pequeñas cadenas de 5 a 10 aminoácidos. Sus sustratos endógenos incluyen las proteínas reguladoras RcsA y Sula, el activador transcripcional SoxS y antitoxinas CcdA, HipB, y MazE (Melderer, 2009).



También incrementa la síntesis del polisacárido de la cápsula al incrementar la expresión de genes cps (colonic acid capsular polysaccharide) y es un regulador positivo de RcsA.

Lon no ha sido estudiada particularmente para EHEC, aunque en otras bacterias gramnegativas esta proteína está relacionada con las estructuras flagelares. Es una proteasa celular que media la degradación selectiva de proteínas anormales o reguladoras, incluyendo antitoxinas.

Planteamiento del problema



¿Porqué estudiar la toxina shiga en EHEC?

Cada año, centenares de miles de personas se enferman a causa de variedades patogénicas de *E. coli*, y cientos de ellas fallecen. En los últimos años ha habido un aumento de los brotes de EHEC y se han registrado millares de casos esporádicos de colitis hemorrágica, algunos de los cuales provocan el síndrome urémico hemolítico (SUH) que puede llegar a ser mortal. Los brotes de EHEC han tenido un efecto significativo en los sistemas de atención sanitaria y en la producción y el comercio agropecuarios en muchos países del mundo

La toxina Shiga (Stx) es el factor de virulencia más importante de EHEC. Hay muy pocos reportes acerca del control transcripcional de la toxina shiga, específicamente las condiciones de cultivo que afectan su expresión y los reguladores transcripcionales que controlan su transcripción. Usando diferentes medios de cultivo bacterianos y una serie de mutantes derivadas de la cepa de referencia de EHEC EDL933, los datos que se generen en este trabajo nos permitirán conocer aspectos relevantes acerca de los mecanismos moleculares que regulan la expresión de la toxina shiga.



Hipótesis

La toxina Shiga (Stx) de EHEC se expresará diferencialmente en las condiciones de cultivo examinadas, y también se identificarán reguladores transcripcionales que afectarán tanto positiva como negativamente la expresión de la toxina shiga.



Objetivo

Analizar la regulación transcripcional de la toxina Shiga (Stx) de EHEC.

Objetivos particulares

Determinar la expresión transcripcional de la toxina shiga de EHEC bajo diferentes medios de cultivo.

Analizar el efecto de reguladores transcripcionales en la transcripción de la toxina shiga de EHEC.

Diseño Experimental



Crecimiento Bacteriano

Se trabajó con la cepa de referencia de EHEC EDL933 (silvestre) y derivadas mutantes en reguladores transcripcionales.

Cepa	Características.
EHEC EDL933	Cepa silvestre de EHEC, patógena.
EHEC Δ <i>cpxR</i>	Cepa patógena mutada de EHEC en el gen <i>cpxR</i> con resistencia a Km (Kanamicina)
EHEC Δ <i>cpxA</i>	Cepa patógena mutada de EHEC en el gen <i>cpxA</i> con resistencia a Km (Kanamicina)
EHEC Δ <i>cpxRA</i>	Cepa patógena mutada de EHEC en el gen <i>cpxR</i> y <i>cpxA</i> con resistencia a Km (Kanamicina)
EHEC Δ <i>rcaA</i>	Cepa patógena mutada de EHEC en el gen <i>rcaA</i> con resistencia a Km (Kanamicina)
EHEC Δ <i>rcaB</i>	Cepa patógena mutada de EHEC en el gen <i>rcaB</i> con resistencia a Km (Kanamicina)
EHEC Δ <i>lon</i>	Cepa patógena mutada de EHEC en el gen <i>lon</i> con resistencia a Km (Kanamicina)

Inicialmente, se determinó la expresión de la toxina shiga por medio de PCR en tiempo real (qPCR) en la cepa silvestre usando diferentes medios de cultivo.



Medios de cultivo

Medio	Composición (500 mL)
Medio Mínimo	En 500 mL de agua destilada se agregan 0.1864 g de KCl, 0.4955 g de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 0.0435 g de K_2SO_4 , 0.068 g de KH_2PO_4 , 7.87 g de TRIS HCL, 6.25 ml de Glicerol al 40%, 1 g de casaminoácidos y 200 μl de MgCl_2 25mM. Esterilizar y ajustar pH a 7.2.
Medio T	Suspender 7.5 g de polvo en 0.5 litros de agua destilada. Mezclar bien y distribuir. Esterilizar en autoclave a 121°C durante 15 minutos.
Medio DMEM LG	Medio comercial Gibco™ DMEM bajo en glucosa (LG)
Medio DMEM HG	Medio comercial Gibco™ DMEM rico en glucosa (HG)
Medio TSB	Agregar 15 g de la fórmula (DIFCO laboratories Detroit Michigan USA) en 100 ml. La fórmula contiene: 7.5 g de digerido pancreático de tejido animal, 1.5 g de digerido de soya, 0.75 g de dextrosa, 2.5 g de NaCl. y 0.75 g de Na_2PO_4 .
Medio CFB	Agregar 5 g de casaminoácidos, 0.75 g de extracto de levadura, 2.5 ml MgCl_2 (25mM), 500 μl MnSO_4 . Esterilizar y ajustar pH a 7.2.
Medio BB	Agregar 14 g de la fórmula (BD Becton Dickinson and company Sparks MD) en 500 ml de agua destilada desionizada, ajustar pH a 7. La fórmula contiene: 5 g de digerido pancreático de tejido animal, 0.5 g de dextrosa, 1 g de extracto de levadura, 2.5 g de NaCl, 0.05 g de NaHSO_3 .
Medio LB	Se agregan 5 g de triptona, 2.5 g de extracto de levadura y 5 gramos de NaCl en 450 mL de agua destilada, se ajusta pH a 7.5 y se completa el volumen a 500 mL con agua destilada para posteriormente esterilizar. Para Agar LB, se agrega agar bacteriológico a una concentración 1.5%.



A partir de cepas semillas guardadas en ultracongelador, se crecieron las bacterias en agar LB para posteriormente tomar una colonia e inocularla en 15 ml de medio LB y dejarla creciendo en agitación 12 horas a 37° C. Después se subcultivó en 5 ml de los diferentes medios de cultivo, agregando 100 µl del cultivo crecido toda la noche en 5 ml del medio de cultivo correspondiente. Se dejó crecer 6 horas en agitación a 37° C. También se contó con un tubo de medio LB como control de esterilidad.

Extracción de RNA bacteriano

Una vez pasadas las 6 horas, se centrifugaron los cultivos obteniéndose una pastilla y se procedió a la extracción de RNA con la técnica de fenol ácido. Dicha técnica consiste en agregar 500 µl de solución de lisis (agua, SDS 10%, Acetato de Sodio 1M y EDTA 0.5M) a la pastilla bacteriana. Se vortexeó vigorosamente durante 30 segundos y posteriormente se incubó por 30 segundos en hielo, repitiéndose 3 veces. Después se pasaron las bacterias a 500 µl de Fenol previamente incubado a 65° C, vortexeándose 30 segundos e incubándose en el equipo Thermomixer 5 minutos 65°C a 1500 rpm. Nuevamente se vortexeó 30 segundos y se centrifugó a 14 000 rpm a 4° C, recuperándose la fase acuosa, y se le añadirá 1 ml de etanol absoluto frío y se incubó a -70° C al menos 30 min para precipitar RNA. Se centrifugó la mezcla a 14 000 por 10 min, se decantó y después se realizó un lavado con etanol al 70% frío.



Se añadió 400 μ l de solución de lisis nuevamente, y se vortexeó 30 segundos. Se centrifugó 14 000 rpm por 10 minutos, se decantó y se realizaron 2 lavados con etanol frío, el primero con etanol absoluto y el segundo con etanol al 70%. Se secó el RNA en el equipo SPEEDVAC, y se hidrató en 20 μ l de H₂O DEPC.

Cuantificación de RNA y Electroforesis en gel de agarosa

Una vez extraído el RNA se cuantificó por medio del equipo NanoDrop. Se realizó una dilución de 1000 μ g de RNA / 1 μ l de H₂O DEPC (15 μ l en total). Después se analizó la integridad de RNA (1000 μ g) por medio de un gel de agarosa-cloro al 1%. La electroforesis se realizó en un amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X a voltaje constante 100V. Los geles se tiñieron con Bromuro de Etidio y se visualizaron en un transiluminador con lámpara de UV.



Tratamiento DNAasa TURBO

Posteriormente, se realizó un tratamiento con DNasa TURBO de Ambión. Este consistió en agregar a cada muestra de RNA 2 μ l de Buffer de reacción, seguido de 1 μ l de enzima DNAasa para después incubar durante 30 min en equipo Thermofisher a 37° C. Una vez pasado este tiempo, se añadieron 2 μ l de inactivador de la DNAasa y se agitó por golpeteo durante 5 min, transcurrido este tiempo se centrifugó a temperatura ambiente a 10 000 rpm durante 5 min, se recuperó el sobrenadante y se mantuvo a 4°C.

Síntesis de cDNA (Retrotranscripción)

Se preparó una master mix para la síntesis de cDNA, de acuerdo a las instrucciones del estuche comercial RevertAis First Strand cDNA Synthesis Kit de Thermo Scientific agregándose como templado 1000 ng de RNA por reacción en un volumen final de 20 μ l.



Condiciones de reacción por muestra (1000 ng RNA)
1 μ l primer
4 μ l Buffer
1 μ l Ribolock
2 μ l dNTP's
1 μ l Revertaid

PCR en tiempo real (qPCR)

Tomando el cDNA generado como templado, se realizó PCR en tiempo real. Se utilizaron 2 pares de primers para evaluar dos genes: *stx* (toxina shiga) y *rrsH* (gen ribosomal 16S; normalizador).

Las secuencia del primer para *stx*-5'-RT: GGC GGA TTG TGC TAA AGG TA.
para *stx*-3'-RT: TTT GCA GTA ACG GTT GCA GA.

La secuencia del primer para *rrsH* -5'-RT: TAC GCA TTT CAC CGC TAC AC.
para *rrsH*-3'-RT: TGC ATC TGA TAC TGG CAA GC.



Condiciones por reacción (Thermofisher Kit qRTPCR)
1.5 µl de H ₂ O (Kit)
0.5 µl de primer 3'
0.5 µl de primer 5'
5 µl de SYBRGREEN
2.5 µl de cDNA
Volumen final 10 µl por pozo

Se analizó la expresión del gen *stx* y del normalizador *rrsH* de la cepa silvestre en los diferentes medios de cultivo. Cada ensayo se hizo por triplicado.

Se seleccionó la condición óptima en la que se encontró mayor expresión para el crecimiento posterior de la cepa silvestre y derivadas mutantes en dicho medio de cultivo. Los medios de cultivos seleccionados para este fin, fueron: Medio mínimo y Medio DMEM LG.



Analisis transcripcional de *stx* en Medios de cultivo seleccionados

Se tomó una colonia de cada una de las cepas mencionadas anteriormente, (EHEC EDL933 WT y derivadas mutantes) y se inocularon en 15 mL de Medio LB, las derivadas mutantes fueron inoculadas en el medio con una concentración final de 30 µg/mL de su respectivo antibiótico (Km y Cm). Se dejaron crecer en agitación 12 horas a 37° C. Pasado este tiempo, se midió Densidad Optica de cada uno de los cultivos tomando 800 µl y poniéndolos en celdas para su lectura a 600 nm en espectrofotómetro. La lectura de cada muestra permitió realizar un cálculo para ajustar la OD de cada muestra a 0.05 en un volumen de 15 mL. El volumen se completó con el medio a probar (Medio mínimo y Medio DMEM LG) para cada una de las muestras. Se dejó crecer 6 horas en agitación a 37° C.

Después de esto se realizó la extracción del RNA bacteriano, seguido de su cuantificación y análisis de integridad en gel de agarosa cloro 1%, al comprobar la integridad y concentración de RNA para cada una de las muestras, se realizó el tratamiento con DNAasa TURBO de ambión, a partir del RNA tratado, se generó el cDNA por medio de PCR para generar el template para el análisis transcripcional de *stx* por medio de qRT PCR de la misma manera que se escribió anteriormente (gen normalizador *rrsH* y *stx* por triplicado).



Los datos arrojados por el termociclador fueron tratados en una base de datos en bruto en excel, donde se sacó promedio y desviación estándar a cada grupo de genes para después ser analizados y generar gráficas con el programa GraphPrism 7.

Se realizó una cuantificación relativa de los datos, es decir, se determinó el cambio de la expresión de la toxina a partir de la comparación con el gen normalizador *rshH*.

Las unidades de expresión relativa fueron obtenidas por el método matemático propuesto por Kenneth J. Livak y Thomas D. Schmittgen en 2001, el cual consiste en la aplicación de la siguiente fórmula:

$$\text{CT gen a evaluar} - \text{CT gen normalizador} = \Delta \text{CT}$$

CT: Se refiere al promedio de "Ciclo de amplificación" o "Threshold cycle" en inglés. Es decir, el número del ciclo en el cual el termociclador detectó fluorescencia. Después se aplica la fórmula:

$$2^{-\Delta \text{CT}}$$

Esta fórmula se utiliza para normalizar los datos obtenidos y facilitar su análisis.



Los datos obtenidos a partir de la aplicación del modelo matemático $2^{-\Delta CT}$ fueron graficados con ayuda del software GraphPrism 7, con barras de error de desviación estandar y en escala logaritmica, comparando expresión relativa de cada grupo de genes.

The image features a dark gray background with a large, bold, light gray word centered in the middle. In the top-left corner, there is a square divided into two parts: a smaller, lighter gray square in the top-left and a larger, dark maroon square in the bottom-right. In the bottom-right corner, there is a square divided into two parts: a smaller, bright red square in the bottom-left and a larger, dark maroon square in the top-right.

Resultados



Analisis de expresión de la toxina shiga (*stx*) en diferentes medios de cultivo

La cuantificación de RNA por medio de NanoDrop arrojó los siguientes resultados

Medio de cultivo	260/280	260/230	ng/ μ l
Medio mínimo	2.01	1.98	720.7
Medio T	2.02	2.03	1195.8
DMEM LG	1.98	2.05	770.5
DMEM HG	2.03	1.99	896.8
Medio TSB	1.99	2.03	1277.5
Medio CFA	2.02	2.04	958.5
Medio BB	1.09	2.05	1056.3
Medio LB	2.06	1.98	1172.2

Es con estos resultados donde se recuperó 1000 ng de RNA para el tratamiento con DNAsa previo a la RT PCR.



Después del tratamiento con DNAsa, se realizó un ensayo de integridad de RNA en el de agarosa, el cual se muestra en la figura 13.



En *Escherichia coli*, el patrón de migración del RNA en gel de agarosa muestra 2 unidades ribosomales; 16S y 32S. Al notarse las dos bandas en las muestras se comprobó la integridad del RNA.



En la figura 14 se muestra la expresión de la toxina Shiga en los distintos medios de cultivo. Esto fue calculado por el método de $2^{-\Delta_{CT}}$.

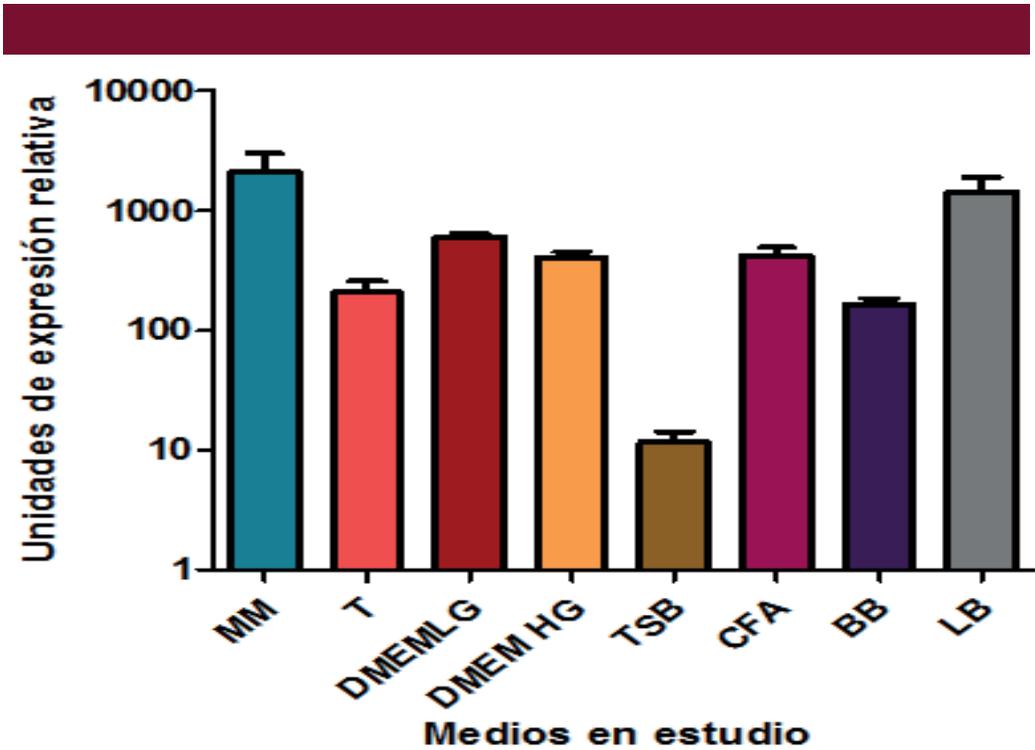


Figura 14: Grafica comparativa de la expresión de la toxina shiga en distintos medios de cultivo; Medio Mínimo (MM), Medio T (T), Medio DMEM Low Glucose (DMEM LG), Medio DMEM High glucose (DMEM HG), Medio Tryptic Soy Broth (TSB), Medio CFA, , Medio BB (Brucella Broth) , Medio LB (Luria Bertani).



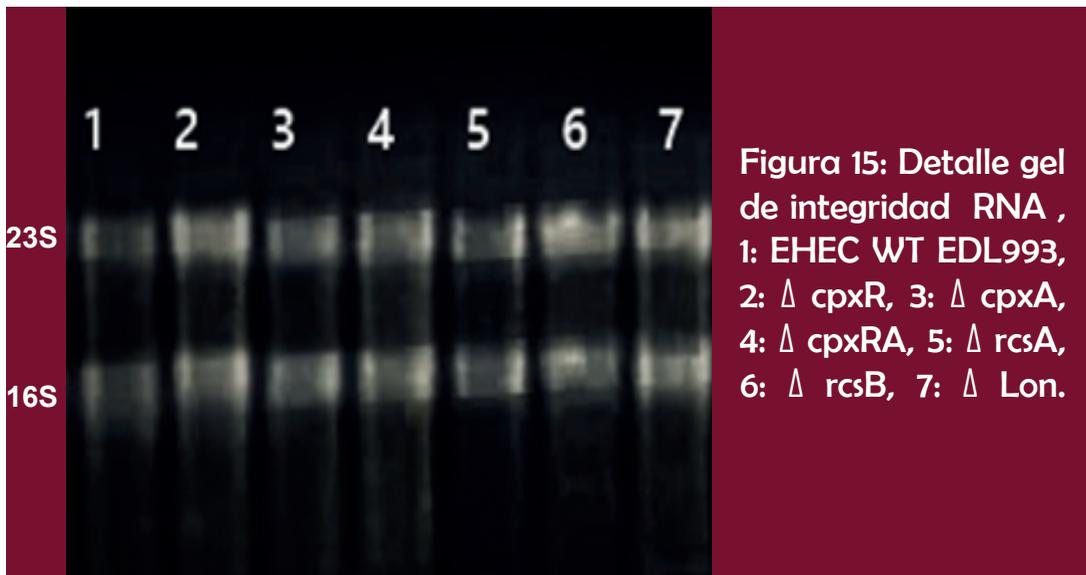
Es a partir de estos resultados que se eligieron los medios mínimo y DMEM LG para el análisis transcripcional de las mutantes elegidas. Ya que fueron las condiciones en donde se encontró mayor expresión de *stx*.

Analisis de expresión de la toxina shiga (*stx*) en diferentes mutantes de EHEC (Medio mínimo)

La cuantificación de RNA por medio de NanoDrop arrojó los siguientes resultados

Cepa de EHEC	260/280	260/230	ng/ μ l
EHEC EDL933	2.07	1.99	1049.4
EHEC Δ <i>cpxR</i>	2.06	2.06	900.5
EHEC Δ <i>cpxA</i>	2.07	2.05	1070.4
EHEC Δ <i>cpxRA</i>	2.08	1.99	847.9
EHEC Δ <i>rcsA</i>	2.06	1.98	980.9
EHEC Δ <i>rcsB</i>	2.02	2.04	928.1
EHEC Δ <i>lon</i>	2.05	2.03	958.1

El ensayo de integridad de RNA en el de agarosa se muestra en la figura 15. Al notarse las dos bandas en las muestras se comprobó la integridad del RNA:





Una vez demostrada la integridad del RNA, se procedió a realizar el cDNA para posteriormente realizar PCR en tiempo real.

Para la interpretación de estos resultados, resultó conveniente dividirlos por sistemas (Sistemas reguladores de dos componentes). Al final se presenta la gráfica (Figura 20) donde se compara la totalidad de los experimentos.

Al ser Lon una proteasa regulada por ambos sistemas, resulta conveniente agregarla a las gráficas de cada uno de los sistemas, así como la cepa silvestre (wild-type) para tener referencia del comportamiento, ya que la cepa silvestre es el grupo control.



M

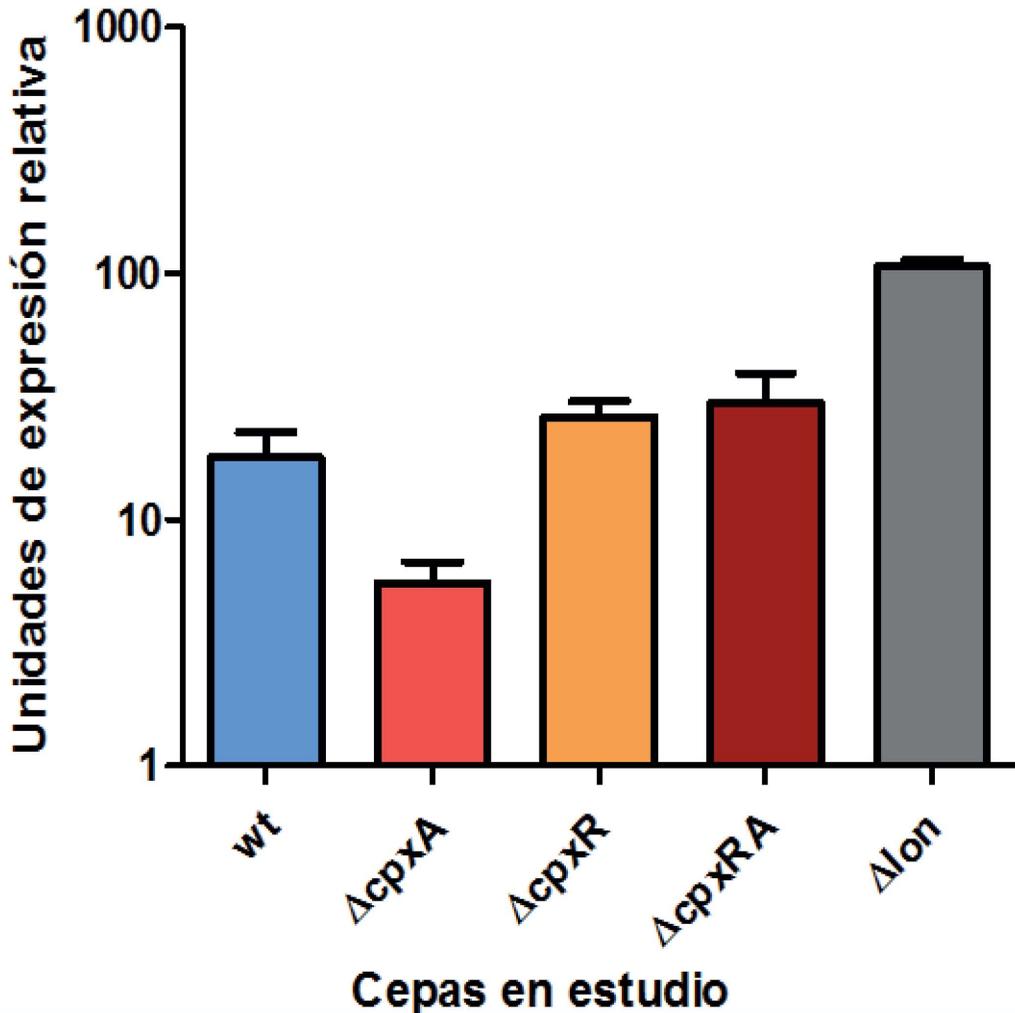


Figura 16: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, particularmente en el sistema de dos componentes CpxRA en medio mínimo.



Expresión de la toxina shiga (*stx*) en el sistema de dos componentes CpxRA (Medio mínimo)

El sistema de dos componentes CpxRA sensa gran variedad de estímulos, como cambios de pH, sobreexpresión y mal plegamiento de proteínas de membrana.

La gráfica muestra que, al tomar la cepa WT como referencia, es notorio que la mutante en *cpxA* reduce la expresión de *stx*, inclusive en comparación a las demás mutantes. En cambio, la mutante en *cpxR* y la doble mutante *cpxRA* no muestra tal reducción en la expresión de *stx*. Este dato es importante, ya que pudiese indicar que esta vía de represión es dependiente a CpxR.

La mutante en Lon es donde se presenta la mayor expresión de *stx*, lo cual demuestra la importancia de esta proteasa para la regulación negativa de la expresión de la toxina.

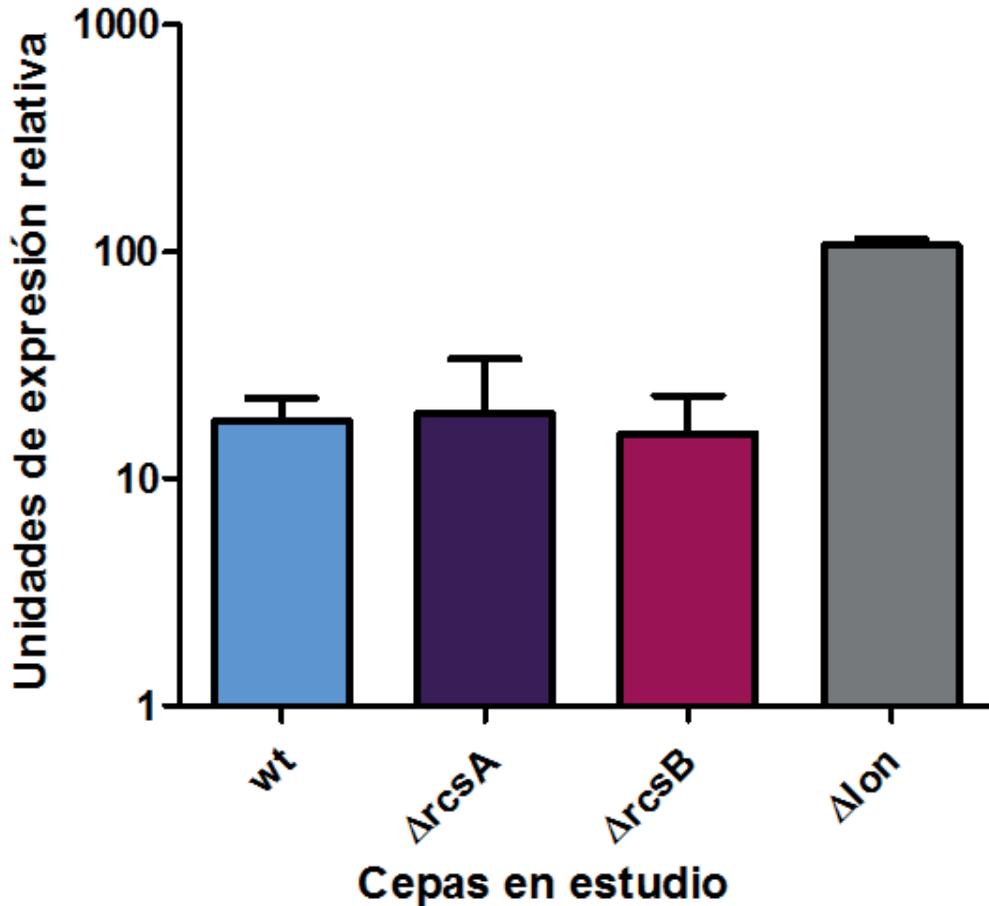


Figura 17: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, particularmente en el sistema de dos componentes RcsAB en medio mínimo.



Expresión de la toxina shiga (*stx*) en el sistema RcsAB (Medio mínimo)

El sistema RcsAB es el encargado de regular genes relacionados con la síntesis de polisacáridos de la capsula bacteriana. A pesar de estar descrito como un sistema de 2 componentes, su regulación es compleja, pudiendo participar más proteínas que actuen como reguladores accesorios.

En este caso, no aparenta haber una diferencia notable entre ambas mutantes, se nota ligeramente una expresión mayor de toxina en la mutante en *rcaA*, mientras que la mutante en *rcaB* es ligeramente menor a cepa de referencia WT.

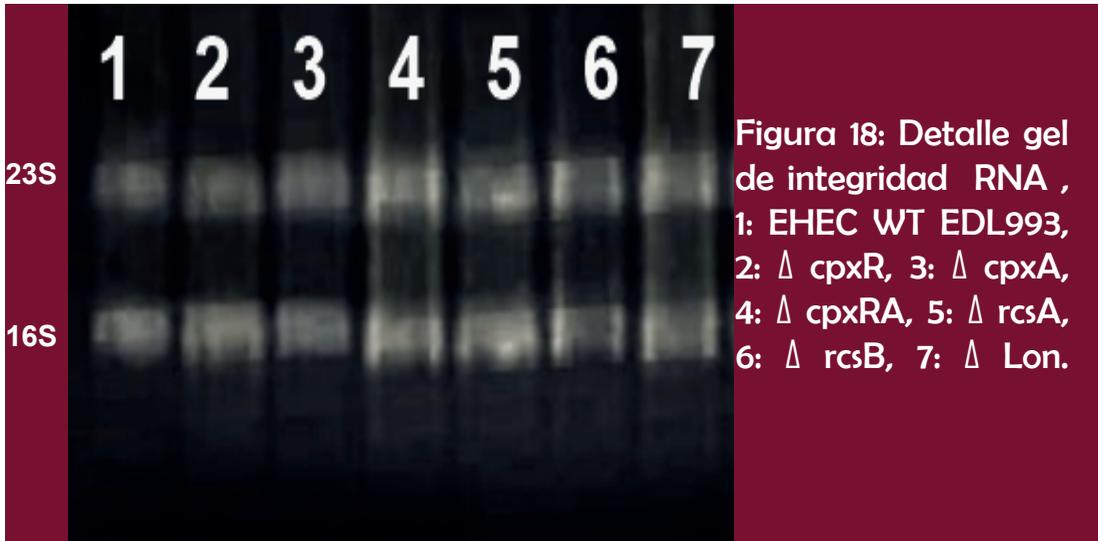


Analisis de expresión de la toxina shiga (*stx*) en diferentes mutantes de EHEC (DMEM LG)

La cuantificación de RNA por medio de NanoDrop arrojó los siguientes resultados

Cepa de EHEC	260/280	260/230	ng/ μ l
EHEC EDL933	2.08	2.06	991.1
EHEC Δ <i>cpxR</i>	2.06	2.04	925.8
EHEC Δ <i>cpxA</i>	2.09	2.07	1040.7
EHEC Δ <i>cpxRA</i>	2.09	2.05	957.8
EHEC Δ <i>rcsA</i>	2.04	1.99	1025.5
EHEC Δ <i>rcsB</i>	2.03	2.02	980.5
EHEC Δ <i>lon</i>	2.07	2.07	936.1

El ensayo de integridad de RNA en el de agarosa se vio de la siguiente manera:



Una vez demostrada la integridad del RNA, se procedió a realizar el cDNA para posteriormente realizar PCR en tiempo real.

Para la interpretación de estos resultados, de igual manera que en el ensayo anterior resulta conveniente dividirlos por sistemas (Sistemas reguladores de dos componentes), al final se presenta la gráfica (Figura 18) donde se compara la totalidad de los experimentos.

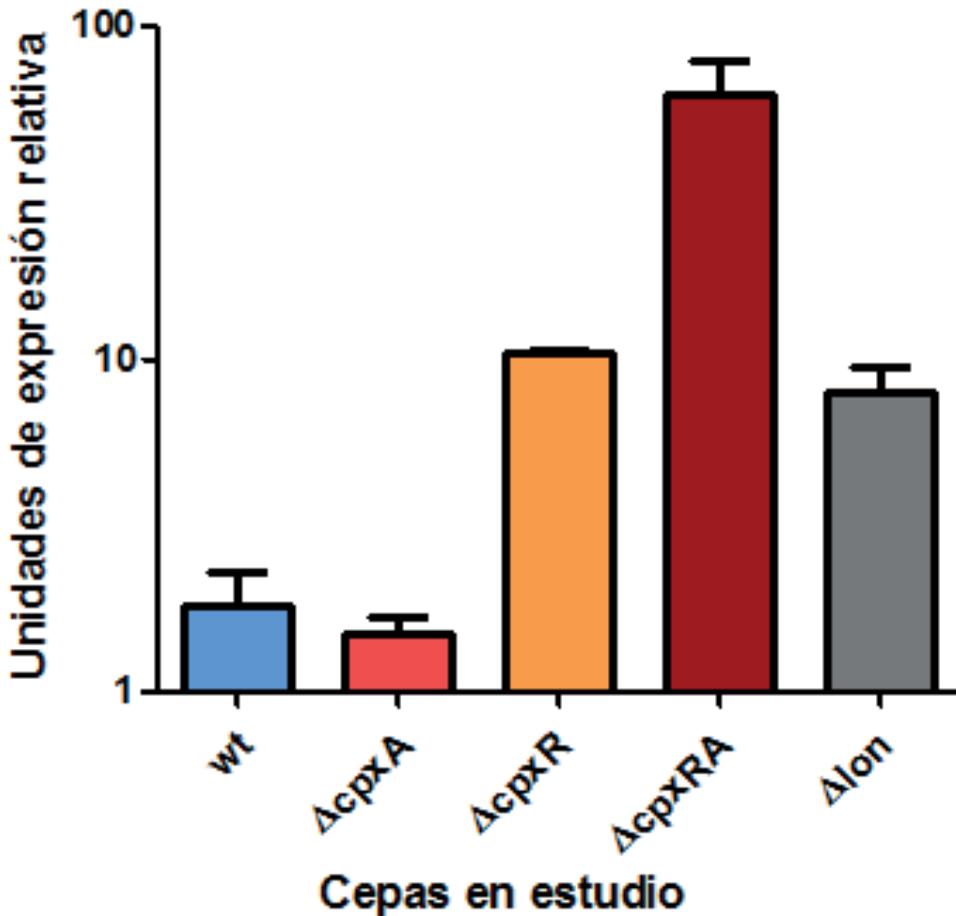


Figura 18: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, particularmente en el sistema de dos componentes CpxRA en medio DMEM.



Expresión de la toxina shiga (*stx*) en el sistema de dos componentes CpxRA (DMEM LG)

La grafica muesra que, al tomar la cepa WT como referencia, es notorio que, al igual que con el medio minimo la mutante en *cpxA* reduce la expresión de *stx*, inclusive en comparación a las demás mutantes.

En esta condición se nota mayor diferencia de la expresión de la toxina entre las mutantes *cpxR* y *cpxRA*. Además, la expresión de la toxina shiga en la mutante en Lon se ve superada por la mutante en CpxRA. Esto puede atribuirse a las diferencias nutrimentales provistas por cada medio de cultivo.

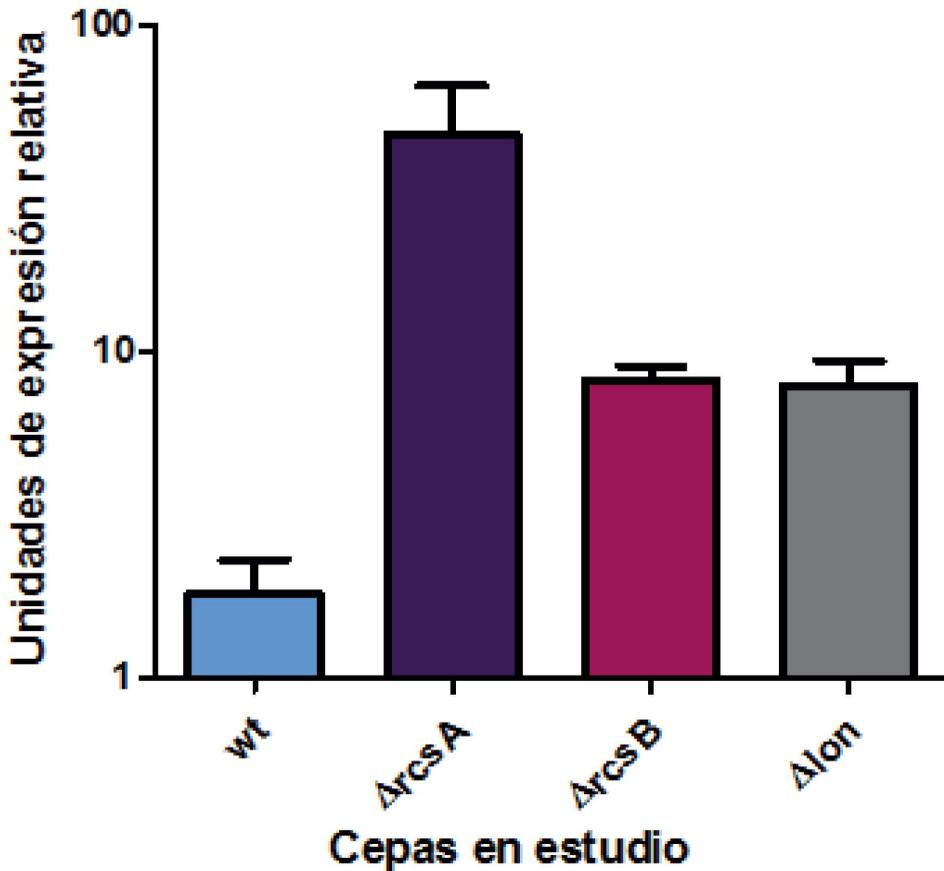


Figura 19: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, particularmente en el sistema de dos componentes RcsAB en medio mínimo.



Expresión de la toxina shiga (*stx*) en el sistema de dos componentes RcsAB (DMEM LG)

En este caso, es la mutante en RcsA la que muestra la mayor expresión de la toxina shiga, y esta diferencia es más marcada a comparación de aquellas tratadas con medio mínimo. La mutante en la proteasa Lon queda en segundo lugar de expresión de la toxina y se muestra una menor expresión en la cepa silvestre a comparación de medio mínimo.

Una vez más se demuestra que la distintas condiciones de los medios de cultivo, hacen que se exprese de manera distinta la toxina.

Comparación de la expresión de la toxina shiga (*stx*) en ambos medios de cultivo

A continuación se muestran la totalidad de las mutantes y su expresión de *stx* en comparación al medio mínimo y medio DMEM LG.

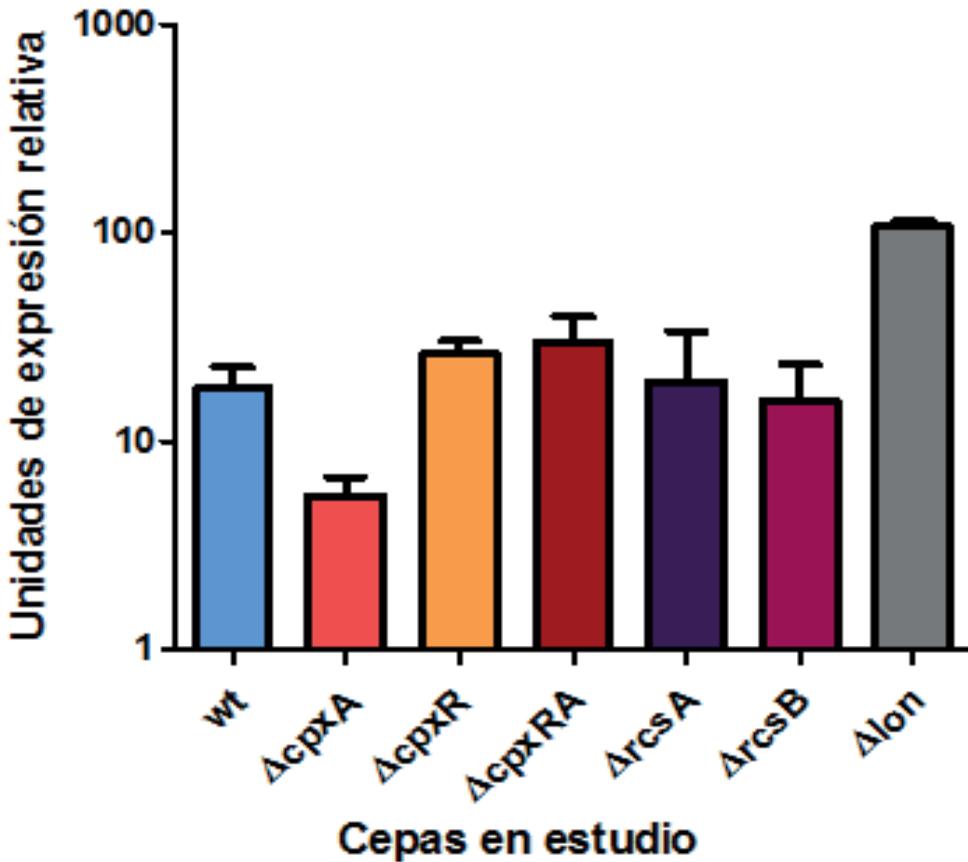


Figura 20: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, medio mínimo.

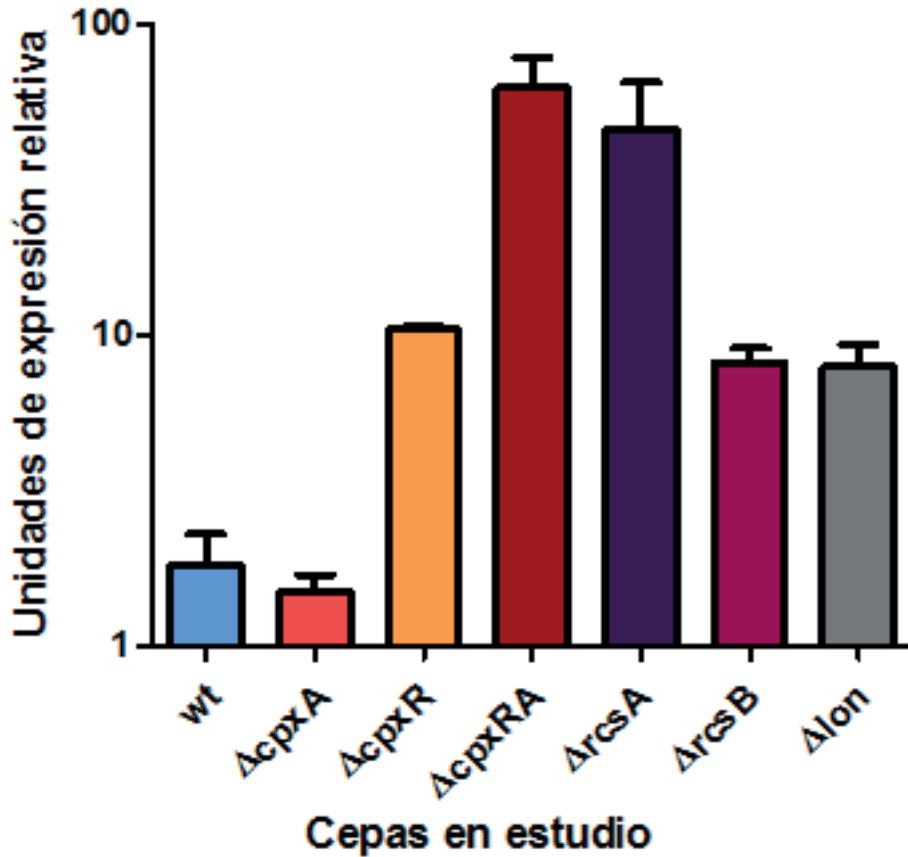


Figura 21: Expresión de la toxina shiga en las distintas cepas de estudio, medio DMEM LG.

Análisis de resultados



La toxina shiga (*stx*) se expresó diferencialmente en las distintas condiciones de cultivo

Como se muestra en la Fig. 14, es el medio TSB (Trypticase Soy Broth) donde se encuentra la menor expresión de *stx*. Este medio tiene la característica de ser nutrimentalmente rico y complejo. Es gracias a sus elementos que se utiliza como promotor de crecimiento bacteriano, siendo un estándar para la farmacopea estadounidense como un medio para pruebas de esterilidad.

Al ser *stx* un gen que se sabe puede activarse por vías de respuesta a estrés ambiental y daño al DNA, es de esperarse que en medios ricos y complejos como el TSB, la expresión del gen sea poca. Eso sucede de igual manera con los siguientes medios en mostrar la menor expresión de la toxina, caldo brucella y triptona. Son estos 3 medios bastante ricos y complejos en nutrientes, particularmente ricos en proteínas.

Es con el uso de medio mínimo donde se nota la mayor expresión de la toxina shiga. Un medio mínimo es aquel donde se contienen los nutrientes indispensables para el crecimiento de una colonia, por lo general sin la presencia de aminoácidos, que son a menudo utilizados por los microbiólogos y genetistas para cultivar microorganismos de tipo silvestre.



Se puede atribuir a estrés nutrimental la mayor expresión de la toxina shiga en las bacterias crecidas en este medio de cultivo, siendo esto solo un factor más, ya que la regulación transcripcional de toxinas bacterianas es muy compleja.

Poco se sabe del medio mínimo como condición de cultivo para la expresión de genes de virulencia en bacterias patógenas. Se evaluó junto con el medio LB debido a que es el siguiente en orden de mayor expresión de la toxina.

Es con este estudio que se reporta por primera vez una mayor expresión de una toxina patógena en comparación con otros medios de cultivo, incluido LB y DMEM, los cuales son medios estándar para el estudio de factores de virulencia en bacterias patógenas.

Es con el medio DMEM (Dulbecco Modified Eagle Medium), donde después del medio mínimo y LB, se tiene mayor expresión de stx. Es común que muchos estudios de virulencia de *Escherichia coli* patógena se hagan en este tipo de medio, ya que es con DMEM con el que se hacen las pruebas de adherencia y toxicidad para EHEC, debido a que este es el medio adecuado para el crecimiento de células VERO, con las cuales se hacen ensayos de adhesión célula/bacteria.



El DMEM es un medio complejo, formulado a partir de 4 componentes principales: una parte de sales inorgánicas, otra de aminoácidos, una de vitaminas y, por último, una de componentes varios donde se incluye un colorante indicador de pH (rojo fenol) y glucosa.

Es interesante cómo a pesar de que el medio DMEM es complejo y rico nutrimentalmente, parece mostrar condiciones adecuadas para la expresión de la toxina shiga.



En $\Delta cpxA$, es la sobreexpresión de la proteasa Lon la responsable de la baja expresión de *stx*.

Los resultados demuestran que en la cepa $\Delta cpxA$ se reduce la expresión de *stx* a diferencia de las demás. Comparándola con la cepa silvestre, la cepa $\Delta cpxA$ reduce la expresión de la toxina 3.25 veces.

En cambio, en las cepas $\Delta cpxR$ y $\Delta cpxRA$ no muestra reducción en la expresión de *stx*. Comparadas a la cepa silvestre, $\Delta cpxR$ aumenta la expresión de la toxina 1.45 veces y la doble mutante $\Delta cpxRA$ muestra un aumento en la expresión de la toxina de 1.6 veces. Este dato es interesante porque sugiere que esta vía de represión es dependiente a CpxR.

Se sabe que las cepas $\Delta cpxA$ tienen a perder capacidad en patogenicidad. Macritchie en 2008 reportó que $\Delta cpxA$ pierde su capacidad de adherencia a las células VERO. A diferencia de $\Delta cpxR$ y $\Delta cpxRA$, las cuales no perdieron dicha capacidad.

Se sabe que CpxR puede ser fosforilada alternativamente por acetilfosfato producido por las enzimas AckA y Pta, causando altos niveles de CpxR fosforilada en ausencia de CpxA. Esto puede explicar los altos niveles de expresión de *stx* en ausencia de CpxA.

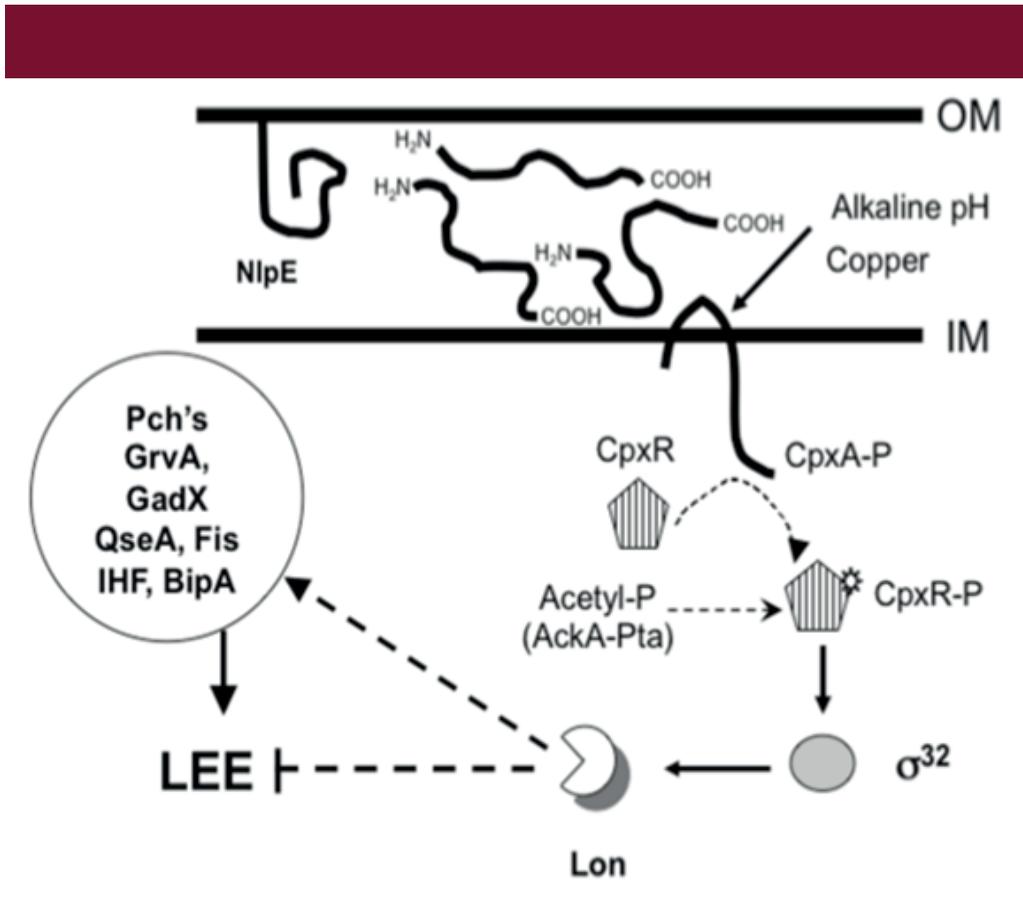


Figura 22: Vía de represión de virulencia de EHEC dependiente de Lon. Lon es la proteasa encargada de degradar factores de virulencia promotores de LEE. El sistema de dos componentes CpxRA es el encargado de regular positivamente la expresión de la proteasa, al ser CpxA la cinasa sensor en la mutante en CpxA, se encuentra una sobreexpresión de Lon, inhibiendo así la virulencia (De la Cruz, 2016).



No es la ausencia de CpxA la responsable de la baja expresión de *stx* en su respectiva mutante, sino la sobreproducción de CpxR fosforilada, ya que la fosforilación de CpxR es regulada vía feedback loop por CpxA. Al no estar CpxA presente, la fosforilación de CpxR no es controlada, activando así continuamente a la proteasa Lon, inhibiendo la expresión de otros factores de virulencia. De la Cruz ha propuesto que la mutante en CpxA vía Lon es capaz de reprimir la virulencia de EHEC al degradar a Ler y GrlA, inhibiendo la expresión de LEE (Fig. 22).

Los resultados de las bacterias que crecieron en medio DMEM se comportan de manera parecida, aunque la diferencia entre $\Delta cpxR$ y $\Delta cpxRA$ es más notoria.

Además, De la Cruz y colaboradores han reportado que Lon es requerida para la represión de LEE en las $\Delta cpxA$, reforzando así la idea de que, en mutantes en CpxA, la baja expresión de la toxina es dependiente de Lon (De la Cruz et al., 2016).

La reducción de la expresión de la toxina shiga en la mutante en Lon de las bacterias crecidas en DMEM LG, en comparación a aquellas que estuvieron en medio mínimo, puede atribuirse a la diferencia nutricional de cada medio, ya que en medio mínimo las bacterias se encuentran en mayor estrés al contar con apenas los recursos necesarios para su división.



En el sistema RcsAB, es la mutante en RcsA quien expresa mayormente a *stx*.

El sistema RcsAB, aunque es definido como un sistema de dos componentes, su regulación es compleja e incluye a otras proteínas accesorias como por ejemplo RcsC, RcsF y Lon, por mencionar algunas.

La función de este sistema es regular la síntesis de la cápsula. Esta le sirve a las bacterias de cubierta protectora resistiendo la fagocitosis. También se utiliza como depósito de alimentos y como lugar de eliminación de sustancias de desecho. Las cápsulas bacterianas son especialmente diversas, aparentemente esto se debe a la variedad de condiciones presentadas en los distintos hospederos que cada bacteria coloniza. Aunque el ácido colánico no ha sido identificado como un factor de virulencia bacteriano en mamíferos, se sabe que *Escherichia coli* utiliza RcsB como un factor regulador de síntesis en cápsulas importantes para la virulencia (Majdalani, 2006).

Experimentos genéticos sugieren que RcsB es el regulador primario, mientras que RcsA actúa como una proteína auxiliar. La sobreexpresión de RcsB es suficiente para activar genes en ausencia de RcsA. En mutantes en RcsB no se encuentra expresión de genes *cps*.

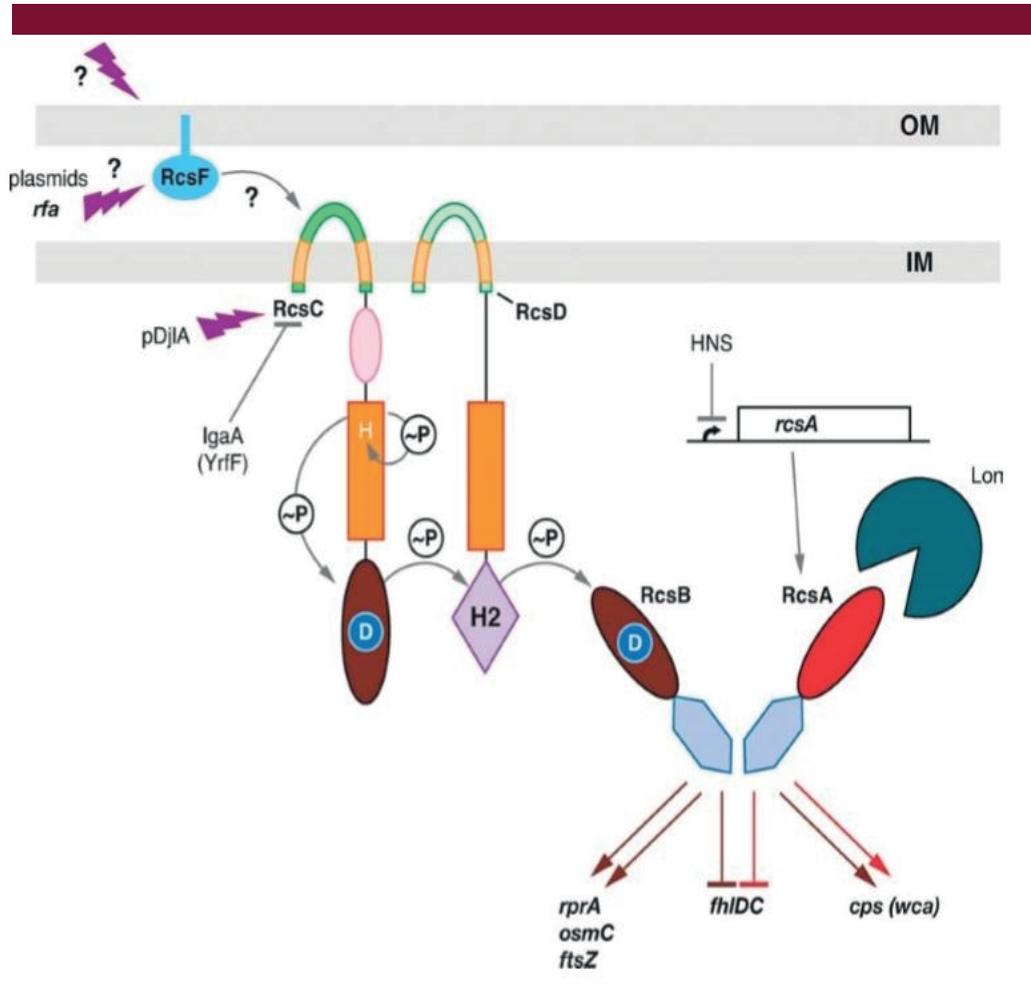


Figura 23: Vía regulatoria del sistema RcsAB. RcsC transfiere fosfato a un dominio receptor en RcsD y de ahí a un aspartato en el regulador de respuesta RcsB, al mismo tiempo comienza la síntesis de RcsA para que ambas (RcsA y RcsB) formen un dímero, que al mantenerse activo regula positivamente genes capsulares.



Para el sistema RcsAB en medio mínimo, es la mutante en *rcaA* quien expresa mayores niveles de expresión de la toxina shiga. En medio DMEM ocurre lo mismo, la mutante en *rcaA* expresa mayormente la toxina en comparación a $\Delta rcaB$.

Es interesante que la ausencia de RcsA dispare la expresión de la toxina shiga 5.6 veces más que la cepa $\Delta rcaB$ en medio DMEM, cuando se sabe que RcsA no es requerida para la expresión de genes capsulares e inclusive muchos autores se refieren a esta como una proteína accesoria (Brill, 1988; Bereswill, 1997; Majdalani, 2006).

En una cepa silvestre de EHEC, RcsA es el factor limitante para la activación de *cps* (Colanic acid capsular polysaccharide), el cual es el operón encargado de la producción de polisacáridos involucrados en la síntesis de la cápsula bacteriana. Al activarse la vía regulatoria RcsAB, RcsA es degradada rápidamente por Lon (1 min. aprox.). Las mutantes en Lon presentan una sobreexpresión de RcsA, es por eso que estas cepas presentan un fenotipo mucoide, debido a la sobreexpresión de genes capsulares.



La proteólisis de factores regulatorios tiene gran importancia para la expresión de factores de virulencia.

Lon es conocida como la proteasa principal encargada del control de calidad de proteínas celulares. Ella degrada proteínas mal plegadas y evita la agregación de estas. Además, degrada factores inestables incluyendo a SulA (Inhibidor de la respuesta SOS), RcsA (Activador transcripcional de la síntesis capsular), entre otros (Gottesman, 1997).

La proteólisis de factores regulatorios ha demostrado tener un rol importante controlando las redes transcripcionales en bacterias.

Las respuestas de estrés pueden ser activadas por autoproteólisis de represores globales, como LexA en la respuesta SOS (Walker et al 2000). Durante el desarrollo bacteriano, los precursores de proteínas reguladoras son procesadas para llegar a su forma activa, respondiendo a receptores altamente específicos, esto con el fin de degradar otras proteínas en fragmentos proteolíticos determinados que pudiesen actuar como reguladores postraduccionales (Baker & Sauer 2006).

Entonces, tal como en el caso del sistema en CpxRA, no es la falta de RcsA quien permite la sobreexpresión de *stx*. Probablemente Lon sea la responsable de los cambios de la expresión de la toxina en ambos sistemas.



La proteasa Lon tiene un papel diverso y antagónico en distintas cascadas metabólicas.

La proteasa Lon fue identificada por primera vez en *E. coli*, y junto con ella se empezaron a encontrar proteínas homólogas a Lon, tanto en procariotas y eucariontes. Lon degrada proteínas inestables que están involucradas en una gran variedad de procesos biológicos, además tiene un papel importante en el control de calidad de las proteínas al degradar aquellas mal plegadas, evitando la formación de agregados proteicos que puedan desestabilizar el metabolismo celular.

El mecanismo por el cual Lon reconoce sustratos no se comprende completamente todavía. A pesar de esto, se sabe que Lon reconoce preferencialmente ciertos aminoácidos o dominios de algunos sustratos (los primeros 24 aminoácidos UmuD, el dominio amino terminal de SoxS y MarA) (M. Gonzales; 2000). Más allá de estos, no se han encontrado preferencias para la activación de la proteasa Lon en comparación a otras.

Lo que se ha encontrado, es que la discriminación de sustratos parece ser mediada a partir de la estructura proteica, la característica en común que tienen todas las proteínas degradadas por Lon, es que poseen una estructura no globular.

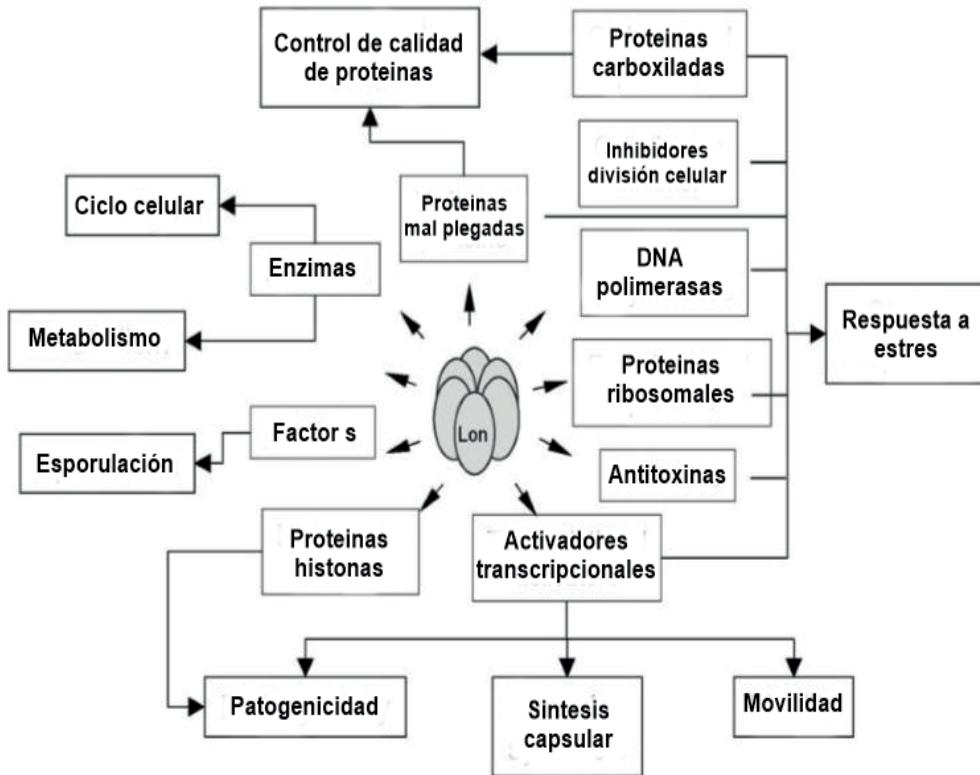


Figura 24: Diversidad de sustratos y funciones biológicas de la proteasa Lon. Todos estos procesos biológicos son regulados de manera directa gracias a la proteólisis de proteínas realizada por Lon (Tsilibaris, 2006).



Es en el medio mínimo donde la mutante en Lon presenta la mayor expresión de toxina shiga (6 veces más en comparación a la cepa silvestre) ¿Por qué la ausencia de la proteasa incrementa de tal manera la expresión de la toxina? Pedersen reporta que, en algunos casos, las condiciones de crecimiento (temperatura y medio de cultivo) pueden determinar la proteasa predominante, por ejemplo, Lon tiene un rol en la degradación de la antitoxina MazE (del sistema toxina antitoxina MazEF) bajo condiciones de privación de aminoácidos, mientras que en condiciones normales, MazE es degradada bajo condiciones normales por CplAP (Pedersen et al., 2003).

El medio mínimo no contiene aminoácidos, lo cual coincide con la activación de Lon reportada por Pedersen en esta condición. Todas las proteínas inestables son degradadas por su proteasa correspondiente. Si la privación de aminoácidos da preferencia a la proteólisis mediada por Lon sobre otras proteasas, esto podría explicar la sobreexpresión de la toxina en esta condición. Al estar Lon ausente para degradar proteínas inestables puede haber mayor estrés intracelular debido a la acumulación de estas, pudiendo así activar vías de respuesta SOS y aumentar la expresión de la toxina shiga.

En cambio, en DMEM que es un medio rico en aminoácidos, la ausencia de Lon no ejerce un cambio tan dramático en la expresión de la toxina (4 veces más en comparación a la cepa silvestre). Además de que la mutante Lon queda desplazada al 5to lugar en cuanto a expresión de *stx*.



La gestión interna de proteínas por la proteasa Lon, siempre ha sido considerada como su función principal, pero se ha demostrado que Lon va más allá de esto, además de regular la transcripción de factores sigma, Lon también regula metilasas, antitoxinas, proteínas semejantes a histonas y enzimas biosintéticas.

Lon tiene una función dual; tiene un rol esencial en el control de calidad de proteínas al destruir aquellas que estén mal plegadas y también participa en circuitos metabólicos, mediando la disponibilidad y cantidad de sustratos específicos.

Conclusiones



El presente trabajo generó las siguientes conclusiones:

- »→ La toxina shiga (*stx*) se expresó diferencialmente en las distintas condiciones de cultivo. La expresión fue mayor en medio mínimo, Luria Bertani y DMEM LG respectivamente. Con este trabajo se reporta por primera vez el medio mínimo como condición nutricional favorable para la expresión de la toxina shiga. Fue en medio TSB donde se obtuvo menor expresión de la toxina. A partir de esto se puede suponer que la expresión de la toxina tiene relación con la disponibilidad de nutrientes en el ambiente de crecimiento bacteriano, a menor disponibilidad de nutrientes se tiene mayor estrés intracelular promoviendo la transcripción de la toxina shiga.

- »→ Para el medio mínimo, fueron las mutantes en Lon, CpxRA, CpxR y RcsA respectivamente aquellas que aumentaron la transcripción de la toxina en comparación a la cepa silvestre. Las que redujeron a expresión fueron RcsB y CpxA.



- »→ Para el sistema RcsAB en medio mínimo, es la mutante en *rcaA* quien expresa mayores niveles de expresión de la toxina shiga. En medio DMEM ocurre lo mismo, la mutante en *rcaA* expresa mayormente la toxina en comparación a Δ *rcaB*.

- »→ El proceso de regulación proteica mediado por Lon es muy complejo, es una combinación de regulación a nivel transcripcional y proteolisis que puede ser constitutiva o condicional. Condicional porque depende de las condiciones ambientales y constitutiva porque involucra la conformación estructural sujeta a condiciones específicas de co-factores o sustratos.

w

Glosario



Arterioesclerosis: La arterioesclerosis es una afección en la cual placa se acumula dentro de las arterias. Placa es una sustancia pegajosa compuesta de grasa.

Ataxia: Dificultad de coordinación de los movimientos, característica de ciertas enfermedades neurológicas.

Bacilo: La palabra bacilo se usa para describir cualquier bacteria con forma de barra o vara, y pueden encontrarse en muchos grupos taxonómicos diferentes tipos de bacterias. Aunque muchos bacilos son patógenos para el ser humano, algunos no hacen daño, pues son los encargados de producir algunos productos lácteos como el yogur (lactobacilos).

Capsula bacteriana: La cápsula bacteriana es la capa con borde definido formada por una serie de polímeros orgánicos que en las bacterias se deposita en el exterior de su pared celular. Generalmente contiene glicoproteínas y un gran número de polisacáridos diferentes, incluyendo polialcoholes y aminoazúcares.

Disuria: En medicina, específicamente en urología, la disuria se define como la difícil, dolorosa e incompleta expulsión de la orina.



Exotoxina: La exotoxina es una toxina (sustancia tóxica) sintetizada y liberada en el organismo huésped por bacterias todavía vivas. Esto lo diferencia de la endotoxina, liberadas sólo cuando la bacteria se destruye. Las exotoxinas las producen, principalmente, las bacterias Gram positivas entre las que destacan diferentes bacilos patógenos como la difteria y el tétanos. Las exotoxinas son generalmente más virulentas que las endotoxinas.

Factor sigma: Los factores sigma o factores σ son proteínas que se encuentran en procariontes como subunidades de la ARN polimerasa. Le permiten reconocer las secuencias promotoras del ADN para iniciar la transcripción. Los factores sigma más comunes son los factores σ_{70} y σ_{54} .

Factor de virulencia: Los factores de virulencia son moléculas producidas por un patógeno, que influye específicamente en las funciones del hospedante, para permitir al patógeno crecer. Los factores que se usan en los procesos vitales generales, como metabolismo o componentes celulares bacterianos, pueden ser vitales a la habilidad del patógeno a sobrevivir en el anfitrión, pero no son considerados “factores de virulencia” desde que han perdido funciones específicas por influencia directamente del hospedante

Hematuria: La hematuria es la presencia de sangre en la orina, una afectación frecuente en medicina humana. El color de la orina puede variar desde el color rojo sangre (o rojo vivo) hasta el color café (popularmente descrito como de bebida cola), dependiendo de si esta sangre es fresca o ha sido transformada en hemoglobina ácida por efecto del pH urinario.



Hemofiltración: En medicina, la hemofiltración es una terapia de reemplazo renal similar a la hemodiálisis que es usada casi exclusivamente en las instalaciones de cuidado intensivo. Es una terapia lenta y continua en la cual las sesiones duran usualmente entre 12 a 24 horas. Durante la hemofiltración, la sangre de un paciente es pasada a través de un conjunto de tuberías (un circuito de filtración), vía una máquina, a una membrana semipermeable (el filtro) donde son removidos los residuos y el agua. Se agrega líquido de reemplazo y la sangre es devuelta al paciente.

Hepatomegalia: La hepatomegalia es un aumento patológico del tamaño del hígado. Puede ser originada por diversas enfermedades. Hay que diferenciar este término respecto de “hipertrófica hepática”, que es el aumento de tamaño del hígado pero solo a expensas de los componentes normales del órgano.

Homólogo: Que es semejante a otra cosa por tener en común con ella características referidas a su naturaleza, función o clase.

Isla de patogenicidad: Una isla de patogenicidad es una fracción del ADN genómico de un microorganismo patógeno que le faculta como virulento. Suele estar contenido en plásmidos, y su origen es una transferencia horizontal de material genético. Suele albergar las secuencias codificantes de adhesinas, factores de evasión de las defensas del hospedador, toxinas, enzimas degradativas de componentes celulares, etc.



Morbilidad: Morbilidad es la proporción de seres vivos que se enferman en un sitio y tiempo determinado.

Operón: Un operón se define como una unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interactúan las proteínas codificadas por sus genes. Este complejo está formado por genes estructurales que codifican para la síntesis de proteínas (generalmente enzimas), que participan en vías metabólicas cuya expresión generalmente está regulada por otros 3 factores de control, llamados: Factor promotor, Operador y Gen regulador.

Peptona: Las peptonas son polipéptidos formados durante la degradación enzimática de proteínas. Son la principal fuente de nitrógeno en el medio orgánico para el cultivo de bacterias.

Pili: En bacteriología, los pili (singular pilus, que en latín significa pelo) son estructuras en forma de pelo, más cortas y finas que los flagelos que se encuentran en la superficie de muchas bacterias. Los pili corresponden a la membrana citoplasmática a través de los poros de la pared celular y la cápsula que asoman al exterior.

Piuria: La piuria es un signo urinario, caracterizado por la presencia de pus en la orina y que refleja una infección en algún órgano o punto del sistema nefro-urinario.



Plásmido: Los plásmidos son moléculas de ADN extracromosómico generalmente circular que se replican y transmiten independientes del ADN cromosómico. Están presentes normalmente en bacterias, y en algunas ocasiones en organismos eucariotas como las levaduras.

Polaquiuria: La polaquiuria es un signo urinario, componente del síndrome miccional, caracterizado por el aumento del número de micciones (frecuencia miccional) durante el día, que suelen ser de escasa cantidad y que refleja una irritación o inflamación del tracto urinario. Suele acompañarse de nicturia y de otros síntomas del síndrome miccional como tenesmo vesical y disuria.

Porina: Las porinas son proteínas con estructura barril β formadas por láminas β . Pertenecen a las proteínas integrales de membrana, que son las que se ubican a través de una membrana celular y funcionan como poros a través de los cuales las moléculas se pueden difundir.

Profago: Término relacionado con el concepto de infección. Un profago es el estado del genoma de un virus atemperado cuando se replica en sincronía con el genoma del hospedador, dando inicio a un ciclo lisogénico y que no destruye la célula hospedadora. Este ADN podrá mantenerse así durante varias generaciones (tiempo durante el que la célula hospedadora será inmune a infecciones del mismo virus) hasta que se induzca su separación del ADN celular, momento en el comenzará un ciclo lítico.



Toxina: Una toxina (del griego clásico τοξικόν [toxikón], que significa ‘flecha’) es una sustancia venenosa producida por células vivas de animales, plantas, bacterias u otros organismos biológicos; para destacar su origen orgánico, se habla a veces también de biotoxina. Las toxinas pueden ser pequeñas moléculas, péptidos, o proteínas capaces de causar enfermedad cuando entran en contacto con, o son absorbidos por, tejidos del cuerpo, interactuando con macromoléculas biológicas como enzimas o receptores celulares.

Transposón: Un transposón o elemento genético transponible es una secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, un fenómeno conocido como transposición. En este proceso, se pueden causar mutaciones y cambio en la cantidad de ADN del genoma. Anteriormente fueron conocidos como “genes saltarines” y son ejemplos de elementos genéticos móviles.

Trombocitopenia: Es cualquier trastorno en el cual hay una cantidad anormalmente baja de plaquetas, que son partes de la sangre que ayudan a coagularla. Esta afección algunas veces se asocia con sangrado anormal.



Virulencia: La virulencia es el grado de patogenicidad de un serotipo, de una cepa o de una colonia microbiana en un huésped susceptible. Virulencia deriva del latín virulentus que significa «lleno de veneno» y designa el carácter patogénico y nocivo de un microorganismo, como una bacteria, hongo, protozoo, microalga o virus, o en otras palabras, la capacidad de un microbio de causar enfermedad.



Referencias

Allocati N. et al., (2013). Escherichia coli in Europe: An Overview. *International Journal of Environmental Research and Public Health*.

Barba V. et al., (2005). A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement encoded regulators Ler and GrlA. *Journal of Bacteriology*.

Bearson B. et al., (2008). The role of the QseC quorum-sensing sensor kinase in colonization and norepinephrine-enhanced motility of Salmonella enterica serovar Typhimurium. *Microbio Pathogenic*.

Bernhard W. et al. (2000). The RcsAB Box: Characterization of a new operator essential for the regulation of exopolysaccharide biosynthesis in bacteria. *Journal of Biological Chemistry*.

Brien M. et al. (2011). A mouse models of Escherichia coli O157:H7 infection and shiga toxin injection. *Journal of Biomedicine ad Biotechnology*.

Croxen M. et al., (2013). Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic Escherichia coli. *Microbiology Reviews* , 82

Creasey E. et al., (2003). Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE encoded proteins of enteropathogenic Escherichia coli. *Journal of microbiology*



Clarke M. et al., (2006). The QseC sensor kinase: a bacterial adrenergic receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*

Cobeljic M. et al., (1996). Enteroaggregative *Escherichia coli* associated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol Infect.*

De la Cruz et al., (2016) The Two-Component System CpxRA Negatively Regulates the Locus of Enterocyte Effacement of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Involving σ_{32} and Lon protease. *Front. Cell. Infect. Microbiology.*

Dobrindt U. et al., (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA assays. *Journal of Microbiology.*

Donneberg J. et al. (1994). The role of the *eae* gene of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in intimate attachment in vitro and in a porcine model. *Journal of Clinical Investigation.*

Doreasey S. et al., (2003). Yeast two-hybrid system survey of interactions between LEE encoded proteins of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Microbiology.*



Elliott S. et al., (2000). “The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*” . *Infection and Immunity*.

Eslava C. et al. (1998). Cepas de *Escherichia coli* relacionadas con la diarrea. *Diagnóstico de laboratorio de infecciones gastrointestinales*.

Fleischer R. et al., (2007) Purification, reconstitution, and characterization of the CpxRAP envelope stress system of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry*

Frias C. (1996). Tesis Doctoral. *Estudio Epidemiológico de Escherichia Coli enterohemorrágica*. Barcelona, España: Universidad Autónoma de Barcelona.

Gao et al., (2009). Biological insights from structures of two- component proteins. *Annu. Rev. Microbio.*

Garcia A. (2010). Enterobacterias: Actualización. *Microbiología Clínica*.

Griffin P. (1990). *Escherichia coli* O157:H7-associated colitis: a clinical and histological study of 11 cases. *Gastroenterology Epidemiologic* 142–149.



Hughes D. (2009). The QseC adrenergic signaling cascade in enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC). *PLoS Pathog.*

Hunke S. et al., (2012). Signal integration by the Cpx- envelope stress system. *FEMS Microbiol. Lett.*

Jawetz M. et al. (2016). *Microbiología Médica* (27 ed.) Estados Unidos, Maryland. Mc Graw Hill.

Knutton S. et al., (1987). Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect Immun.*

Lim et al. (2010). A Brief Overview of *Escherichia coli* O157:H7 and Its Plasmid O157. *Journal of Microbiology Biotech*

Malkow R. et al., (2007). *The Prokaryotes. Volume 6: Proteobacteria: Gamma Subclass.* New York: Springer Link

Nataro & Kaper, (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.*

Melderer L. (2009). Regulation and quality control by lon dependent proteolysis. *Research in microbiology.*



Otto K. (2002). Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx- signaling pathway. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*.

Perna N. et al., (2001). Genome sequence of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Nature*.

Pedersen et al., (2001). RelE a global inhibitor of translation, is activated during nutritional stress. *Proct. Natl. Acad. Sci. USA*

Pogliano L. et al. (1997). Regulation of *Escherichia coli* cell envelope proteins involved in protein folding and degradation by the Cpx two-component system. *Genes Dev*.

Pratz C. et al. (1996). Colitis Hemorrágica por *Escherichia coli* Enterohemorrágica. Presentación de 9 casos. *Enferm Infec Microbiol Clin*.

Riley F. (2011). The epidemiologic, clinical, and microbiologic features of hemorrhagic colitis. *Annu Rev Microbiol*.

Rosenberg & Schleifer, (2000). "The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*" . *Infection and Immunity*.



Rivero A, (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de E. coli. *Salud Publica de México*, 464 672.

Sandving S, (2000). Entry of ricin and shiga toxin into cells: molecular mechanism and medical perspectives. *European molecular biology*.

Sanger M. et al., (1996). Novel form of actin-based motility transports bacteria on the surface of infected cells. *Cell Motil Cytoskeleton*.

Schmidt H. et al., (1994). The large-sized plasmids of enterohemorrhagic Escherichia coli O157 strains encode hemolysins which are presumably members of the E. coli α -hemolysin family. *FEMS Microbiol*.

Schmidt H. et al., (1993). Molecular analysis of the plasmid-encoded hemolysin of Escherichia coli O157:H7 strain. *Infect Immun*.

Sherman P. et al., (1993). Expression and characterization of eaeA gene on EHEC O117:H7. *Infect Immun*.

Snyder et al., (1998). Outbreak of invasive Escherichia coli gastroenteritis on a cruise ship. *Am J Trop Med Hyg*.



Sperandio L. et al., (2005). Transcriptional autoregulation by quorumsensing Escherichia coli regulators BandC (QseBC) in enterohaemorrhagic E. coli (EHEC). *Mol. Microbiol.*

Sperandio L. et al., (2000). "Activation of enteropathogenic Escherichia coli (EHEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler,". *Molecular Microbiology*.

Stock et al., (2000). Two- component signal transduction. *Annu. Rev. Biochem.*

Voyer et al., (2007). Aspectos epidemiológicos del síndrome urémico hemolítico. *Cuadernos de Pediatría*.

Weng J. (2004). Dissectingvirulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Genetics Journal*.

Xu et al., (2012). Lysogeny with Shiga Toxin 2-Encoding Bacteriophages Represses Type III Secretion in Enterohemorrhagic Escherichia coli. *PLoS pathogens*.

