

11261
UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE MEDICINA
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO



IDENTIFICACION DEL RECEPTOR CELULAR AL
QUE SE ADHIERE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENA

TESIS DE POSTGRADO
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS
P R E S E N T A
Q.F. SANDRA ROSA DEL PILAR GAVILANES PARRA

MEXICO, D. F.

1997

**TESIS CON
FALLA DE ORIGEN**



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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

**El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Salud Pública de
la Facultad de Medicina, UNAM, bajo la Dirección del
Dr. Angel Manjarrez y del Dr. Alejandro Cravioto**

Con todo mi amor a la memoria de mi padre, de quien guardo los más bellos recuerdos.

A mi madre con el más inmenso amor y admiración.

A mis hermanas y sobrinos con inmenso cariño.

INDICE

	Página
Lista de figuras	i
Lista de tablas	ii
Resumen	1
Sección 1: INTRODUCCION	2
1.1. Adherencia bacteriana	3
1.1.1 <i>Membranas celulares eucarióticas como sustrato para la adherencia bacteriana</i>	5
1.1.2 <i>Mucosa Intestinal</i>	5
1.1.3 <i>Receptores de superficie celular</i>	6
1.1.4 <i>Expresión de receptores en la superficie celular</i>	7
1.1.5 <i>Papel de los carbohidratos en la adherencia bacteriana</i>	7
1.1.6 <i>Lectinas como moléculas que intervienen en el reconocimiento celular</i>	8
1.2. Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	9
1.2.1. <i>Clasificación de E. coli</i>	10
1.2.1.1. <i>E. coli enterotoxigénica (ETEC)</i>	10
1.2.1.2. <i>E. coli enterohemorrágica (EHEC)</i>	11
1.2.1.3. <i>E. coli enteroinvasiva (EIEC)</i>	12
1.2.1.4. <i>E. coli enteroagregativa (EAgg)</i>	12
1.2.1.5. <i>E. coli adherente difusa (EADC)</i>	13
1.2.1.6. <i>E. coli enteropatógena (EPEC)</i>	13

Sección 2:	MATERIALES Y METODOS	17
2.1.	Aparatos	17
2.1.1.	<i>Electroforesis</i>	17
2.1.2.	<i>Centrifugación</i>	17
2.1.3.	<i>Varios</i>	17
2.2.	Materiales	18
2.2.1.	<i>Reactivos</i>	18
2.2.2.	<i>Células</i>	19
2.2.3.	<i>Medios de cultivo</i>	19
2.3.	Métodos	19
2.3.1.	<i>Cultivo bacteriano</i>	19
2.3.2.	<i>Cultivo celular</i>	20
2.3.3.	<i>Ensayo de adherencia a células Hep-2</i>	20
2.3.4.	<i>Obtención de membranas a partir de células HEp-2</i>	21
2.3.5.	<i>Preparación del moco intestinal</i>	22
2.3.6.	<i>Preparación de vellosidades intestinales</i>	22
2.3.7.	<i>Electroforesis en geles de poliacrilamida</i>	23
2.3.8.	<i>Electroelución de las proteínas de 32-33 kDa</i>	25
2.3.9.	<i>Cuantificación de proteínas</i>	25
2.3.10.	<i>Electroforesis en geles de dos dimensiones</i>	26
2.3.11.	<i>Electrotransferencia</i>	27
2.3.12.	<i>Tinción de la membrana de nitrocelulosa con Ponceau S</i>	28
2.3.13.	<i>Ensayo de adherencia a proteínas transferidas</i>	29
2.3.14.	<i>Eliminación de lípidos de las vellosidades intestinales</i>	29
2.3.15.	<i>Desglucosilación y oxidación de azúcares de las vellosidades</i>	30
2.3.16.	<i>Efecto de inhibición bacteriana por las proteínas de 32-33 kDa</i>	30
2.3.17.	<i>Análisis estadístico</i>	31
2.3.18.	<i>Obtención de proteínas asociadas a superficie bacteriana (EPEC)</i>	31

2.3.19.	<i>Ensayo de reconocimiento de las proteínas de 32-33 kDa por las proteínas asociadas a superficie bacteriana</i>	31
Sección 3: RESULTADOS		33
3.1.	Modelo para el estudio de la adherencia bacteriana	33
3.1.1.	<i>E. coli enteropatógena reconoce proteínas de membrana de células mantenidas en cultivo</i>	34
3.1.2.	<i>Cepas de E. coli reconocen proteínas de membrana de vellosidades de intestino humano y de cerdo</i>	34
3.1.3.	<i>Cepas de E. coli reconocen proteínas del moco que cubre la superficie celular del intestino</i>	42
3.2.	Tasa de adherencia	42
3.3.	Efecto del pH y temperatura en el proceso de adherencia	43
3.4.	Evidencia de que las proteínas que reconoce EPEC son integrales de membrana	46
3.5.	Caracterización de las proteínas de 32-33 kDa	48
3.5.1.	<i>Punto isoeléctrico de las proteínas de 32-33 kDa</i>	48
3.5.2.	<i>Eliminación de lípidos de las proteínas de las vellosidades intestinales humanas</i>	48
3.5.3.	<i>Desglicosilación y oxidación de azúcares de las proteínas de vellosidades intestinales humanas</i>	48
3.6.	Proteínas de superficie de <i>E. coli</i> reconocen a las proteínas de 32-33 kDa	51
3.7.	Ensayos de inhibición a la adherencia bacteriana utilizando las proteínas de 32-33 kDa	52
Sección 4. DISCUSION		58
REFERENCIAS		67
AGRADECIMIENTOS		77

LISTA DE FIGURAS

		Página
Figura 1	Reconocimiento de EPEC a proteínas separadas electroforéticamente y transferidas nitrocelulosa.	36
Figura 2	Reconocimiento de EPEC a proteínas de vellosidades intestinales humanas.	37
Figura 3	Cepas de <i>E. coli</i> con diferentes patrones de adherencia reconocen a las proteínas de 32-33 kDa.	39
Figura 4	Tasa de adherencia de <i>E. coli</i> .	44
Figura 5	Estudio comparativo de cinética de adherencia de EPEC a las proteínas de 32-33 kDa en células HEp-2 y vellosidades humanas.	45
Figura 6	a) Detección de las proteínas de 32-33 kDa como proteínas integrales de membrana celular. b) Demostración de que productos bacterianos liberados al medio de cultivo no reconoce a las proteínas de 32-33 kDa.	47 47
Figura 7	Electroforesis en geles de dos dimensiones de las proteínas De 32-33 kDa.	49
Figura 8	Desglucosilación , oxidación de azúcares, digestión con proteinasa K y delipidización de las vellosidades intestinales humanas e incubadas con la cepa E2348/69.	50
Figura 9	Autorradiografía en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de apéndices de superficie bacteriana que se unen a la proteínas de 32-33 kDa previamente inmovilizadas en nitrocelulosa.	53
Figura 10	Inhibición a la adherencia de EPEC a células HEp-2 con las proteínas de 32-33 kDa.	54
Figura 11	Inhibición a la adherencia de <i>E. coli</i> adherente difusa a células HEp-2 con las proteínas de 32-33 kDa .	55
Figura 12	Inhibición a la adherencia de <i>E. coli</i> enteroagregativa a células HEp-2 con las proteínas de 32-33 kDa.	56

LISTA DE TABLAS

		Página
Tabla 1	Adherencia de cepas de <i>E. coli</i> a las proteínas provenientes de vellosidades intestinales humanas.	40
Tabla 2	Reconocimiento a proteínas de membrana de células HEp-2 por cepas mutantes de <i>E. coli</i> .	41
Tabla 3	Reconocimiento a proteínas de membrana de células HEp-2 por <i>S. Typhimurium</i> , <i>S. dysenterae</i> y <i>V. cholerae</i> .	41
Tabla 4	Inhibición de la adherencia de <i>E. coli</i> a células HEp-2 por las proteínas de 32-33 kDa.	57

RESUMEN

En el presente estudio se desarrolló un método que permitió detectar proteínas de vellosidades intestinales humanas que funcionan como estructuras de unión (receptores) principalmente para *E. coli* enteropatógena (EPEC). El método utilizado consistió en obtener membranas de células mantenidas en cultivo y de vellosidades intestinales humanas, separar las proteínas por electroforesis (SDS-PAGE), electrotransferirlas a membranas de nitrocelulosa e incubarlas en presencia de bacterias previamente marcadas con metionina-[S³⁵]. Las proteínas más prominentes y consistentes reconocidas por *E. coli* con patrón de adherencia localizado, tuvieron un peso molecular aproximado de 32-33 kDa. Polipéptidos adicionales de 50-70, 105-130 y de 180-200 kDa también fueron reconocidos por éstas cepas aunque su unión a la bacteria no fue muy consistente como con las proteínas de 32-33 kDa. Cepas con adherencia difusa y agregativa también reconocieron a las proteínas de 32-33 kDa, aunque con menor magnitud que las cepas de adherencia localizada. La relevancia de estas proteínas fue observada con experimentos de inhibición en células HEp-2, en los cuales se mostró que las proteínas aisladas de 32-33 kDa bloquearon principalmente la adherencia bacteriana del patrón localizado. La delipidización de las vellosidades intestinales no inhibió la adherencia bacteriana, sin embargo la desglicosilación y oxidación de azúcares de las membranas de vellosidades decrementó en alto grado la adherencia de *E. coli* a las proteínas de 32-33 kDa, indicando que probablemente la bacteria se une a porciones de carbohidratos que se encuentran en dichas proteínas. Por otro lado, proteínas desprendidas de EPEC por sonicación reconocieron a las proteínas de 32-33 kDa, el peso molecular de estas probables adhesinas fue de 19, 27-30 y 150 kDa.

Los resultados sugieren que proteínas tipo lectinas provenientes de *E. coli*, actúan como ligando a un sitio de unión (receptor) en la célula eucarionte, ésta interacción que se encuentra mediada por carbohidratos podría jugar un papel importante en la colonización bacteriana de la mucosa intestinal.

Sección 1: INTRODUCCION

Escherichia coli es el mayor constituyente de la flora intestinal normal del organismo. Sin embargo ciertas cepas son consideradas responsables de diarrea infantil (Robins-Browne *et al*, 1987). Los primeros reportes sobre la capacidad de cepas de *E.coli* para causar diarrea severa en niños aparecieron en la literatura médica a mediados de los años 40. Bray en Inglaterra y Varela, Aguirre y Carrillo en México describieron, en forma totalmente independiente, la presencia de cepas de *E. coli* como germen único en coprocultivos obtenidos de infantes con diarreas severas en ambos países. La publicación de un esquema de tipificación serológica para antígenos somáticos y flagelares de *E. coli* permitió clasificar a las bacterias aisladas de individuos con diarrea como pertenecientes a un grupo reducido de serotipos (combinaciones antigénicas somático-flagelares) asociados con enfermedades diarreicas. Estos serotipos, denominados originalmente como enteropatógenos, son los que en forma continua se han aislado en todo el mundo hasta la actualidad. Los estudios recientes de genética poblacional indican que la prevalencia mundial de estos serotipos se debe a una selección clonal de bacterias adaptadas para colonizar preferentemente el intestino humano (Cravioto *et al*, 1996).

La asociación constante de estos serotipos de *E. coli* con procesos diarreicos, han permitido plantear medidas de control a través de la búsqueda de los mecanismos comunes de patogenicidad que comparten la mayoría de tales serotipos. Estos mecanismos corresponden fundamentalmente a tres tipos: 1) adhesivos, que permiten a las bacterias acercarse, adherirse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del intestino; 2) producción de proteínas bacterianas (toxinas) que estimulan la secreción de agua y electrolitos al interactuar con mecanismos bioquímicos de las células del hospedero e 3) invasión y replicación dentro del citoplasma de células epiteliales del intestino para evadir los mecanismos de protección del hospedero (Cravioto *et al*, 1992).

La manera como *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) causa enfermedad parece

estar relacionada con la habilidad que tienen para adherirse íntimamente a la membrana celular del enterocito, después de haber esfacelado las microvellosidades del intestino (Knutton *et al*, 1987). Se ha demostrado, mediante microscopía electrónica que esta lesión involucra un contacto estrecho entre la envoltura bacteriana y la membrana plasmática de la célula blanco (Knutton *et al*, 1987). La adherencia íntima de EPEC provoca cambios en el citoesqueleto de la célula, caracterizado por acumulaciones de filamentos de actina justo debajo del lugar donde se adhiere la bacteria (Moon *et al*, 1983). Recientemente se demostró que la adherencia de EPEC a células HEp-2 causa una elevación significativa de los niveles de calcio intracelular (Baldwin *et al*, 1991), liberación de inositol-fosfato (Foubister *et al*, 1994) y estimulación de la actividad de proteincinasas (Baldwin *et al*, 1990), lo cual produce un incremento en la fosforilación de proteínas en la célula hospedera (Manjarrez-Hernández *et al*, 1992). Se desconoce el efecto que pueda tener tal incremento de fosforilación en la célula misma, sin embargo es posible que produzca alteraciones en el transporte de iones resultando en una hipersecreción intestinal (Law, 1994). Tal es el caso de algunos compuestos como ésteres de forbol, lectinas y la hormona angiotensina que estimulan la fosforilación de proteínas y a la vez producen diarrea en modelos animales (Baldwin *et al*, 1990). Esto nos hace suponer que EPEC está utilizando un receptor que posee la célula eucarionte cuya naturaleza es aún desconocida.

1.1. Adherencia bacteriana

La adherencia bacteriana a las células del hospedero es la fase inicial en muchas enfermedades infecciosas (Westerlund and Korhonen, 1993). El proceso de infección requiere de la expresión de moléculas específicas que permiten la adherencia, colonización y la invasión por parte de la bacteria a la célula eucarionte (Sansonetti, 1993). Una vez que los patógenos han alcanzado la superficie de la mucosa, pueden ocurrir varios eventos dependiendo de su capacidad invasiva, la naturaleza de las toxinas que producen y su

habilidad para resistir las defensas del hospedero (Sansonetti, 1993).

La adherencia corresponde a una interacción específica entre un ligando expresado en la superficie bacteriana (llamado adhesina) y un receptor en la superficie de la célula epitelial (Finlay, 1990). La adherencia es una característica de las bacterias gram-negativas, las cuales poseen en su superficie estructuras supramoleculares conocidas como fimbrias o pilis (Sansonetti, 1993). Estas estructuras sirven como soporte de las adhesinas además de participar en la presentación de la adhesina misma a su receptor. Las adhesinas son por lo general lectinas, las cuales son proteínas que reconocen residuos de azúcares que poseen las glicoproteínas o glicolípidos que se encuentran en la superficie de la célula epitelial (Sansonetti, 1993). Muchos microorganismos patógenos han aprendido a utilizar los glicoconjugados de la superficie celular como receptores para su adherencia, un proceso que facilita la invasión y colonización del hospedero (Rostand and Esko, 1997). Recientes estudios sugieren que algunos proteoglicanos participan en la adherencia celular y la señalización intracelular (Ronstand and Esko, 1997).

La especificidad de las lectinas bacterianas por el carbohidrato que se encuentra en la célula epitelial puede depender no solamente de la estructura primaria de la lectina sino también de la relación de la lectina con los otros constituyentes de la superficie bacteriana, de tal forma que las proteínas estructurales de la fimbria pueden afectar los sitios de combinación de la lectina (Ofek and Doyle, 1994). La especificidad de la lectina es definida por el carbohidrato de la célula eucarionte el cual podría ocupar parte o todos los sitios de combinación de la lectina bacteriana (Ofek and Doyle, 1994). Así la especificidad puede ser determinada utilizando el carbohidrato para realizar un ensayo de inhibición a la adherencia. Las estructuras de los receptores en las células animales puede ser obtenida utilizando enzimas tales como glicosidasas, galactosa oxidasa o con agentes químicos tales como peryodato que modifican los carbohidratos (Ofek *et al*, 1985).

Para una mejor identificación del carbohidrato que sirve como sitio de adherencia en la superficie de la célula eucariótica, el receptor debe ser aislado y caracterizado.

1.1.1. *Membranas celulares eucarióticas como sustrato para la adherencia bacteriana*

Las membranas celulares animales poseen una bicapa lipídica que está compuesta por glicerofosfolípidos, esfingolípidos, glicolípidos y esteroides, además de proteínas integrales constitutivas tales como glicoproteínas, que son proteínas cubiertas de carbohidratos y se encuentran intercaladas en la estructura de la bicapa. Otras glicoproteínas solamente se mantienen unidas a la superficie de la membrana plasmática mediante interacciones iónicas, puentes de hidrógeno o efectos hidrofóbicos. A estas glicoproteínas asociadas a la superficie membranal se les denomina componentes periféricos o extrínsecos (Lichtenberg *et al*, 1983). Cambios fundamentales en las glicoproteínas y glicolípidos de las membranas celulares se han asociado con alteraciones en el comportamiento celular tal como adhesión celular e inhibición por contacto. Estos estudios fueron realizados en células mantenidas en cultivo donde una disminución en la adhesión intercelular e inhibición por contacto acompañados por cambios en las glicoproteínas de la membrana han sido demostrados que ocurren durante la mitosis y después de una transformación viral (Weiser, 1973). Estos cambios que ocurren en las glicoproteínas de membrana pueden además determinar el comportamiento celular (Weiser, 1973).

1.1.2. *Mucosa intestinal*

Los enterocitos comprenden cinco tipos de células epiteliales: dos tipos de células absortivas, unas que cubren la vellosidad ileal y la superficie colónica y otras que se encuentran sobre los folículos linfoides; las células de Paneth; las células de goblet secretoras de moco y las células enteroendócrinas. El área apical de las células absortivas poseen vellosidades compuestas de cientos de microvellosidades. El glicocálix es producido por las vellosidades y se encuentra cubierto por el moco que es secretado por las células de

goblet (Polotsky *et al.*, 1994). Tanto las microvellosidades como el glicocáliz expresan una variedad de glicoproteínas que juegan el papel de receptores para las bacterias entéricas y sus toxinas. Las placas de Peyer son folículos linfoides que se encuentran en el intestino delgado; algunas de las células epiteliales que cubren las placas de Peyer son las células M (de membrana) especializadas. Las células M carecen de microvellosidades, realizan pinocitosis activa y transportan macromoléculas desde la luz intestinal a los tejidos subepiteliales (Abbas *et al.*, 1995).

1.1.3. *Receptores de superficie celular*

Los constituyentes de superficie de las células animales son importantes para controlar muchas actividades celulares, tales como desarrollo, diferenciación, comunicación intracelular y reconocimiento de partículas, también como activación de células. Cuando una membrana celular constitutiva media una o más de esas actividades por una combinación específica con un agente biológico particular (ligando), este se convierte en un receptor. Los criterios que caracterizan a un receptor son dos: 1) Disponibilidad para interactuar específicamente con ligando y 2) que esta interacción debe permitir una respuesta biológica relevante (Cuatrecasas, 1974). Las reglas generales de esta interacción son las mismas para todos los receptores y sus ligandos, como por ejemplo entre un antígeno y anticuerpo, una lectina y su carbohidrato específico o una enzima y su sustrato. En contraste, las consecuencias biológicas son numerosas, dependiendo del tipo de célula, la naturaleza del ligando y del receptor (Cuatrecasas, 1974).

1.1.4. Expresión de receptores en la superficie celular

En las células existe un cambio dinámico en la producción y expresión de algún constituyente de la membrana celular. Los cambios pueden ocurrir en las células que están expuestas a la acción de drogas, algunas de las cuales pueden afectar la biosíntesis y expresión de los constituyentes de la membrana celular. Tales cambios pueden ocurrir en los residuos de carbohidratos de los glicolípidos y glicoproteínas (Gahmberg and Andersson, 1982). Sin embargo, la proximidad de otros constituyentes de la superficie celular pueden interferir con la habilidad de la unión de los receptores a sus ligandos (Gahmberg and Anderson, 1982).

1.1.5. Papel de los carbohidratos en la adherencia bacteriana

Las evidencias sugieren que en muchos casos los carbohidratos (referidos como azúcares) son los marcadores primordiales para el reconocimiento celular. Estos compuestos pueden ser monosacáridos (los cuales son azúcares simples tales como glucosa y fructuosa), oligosacáridos y polisacáridos, los cuales están compuestos de cadenas de monosacáridos (Sharon and Lis, 1993). De tal forma que estas unidades de monosacáridos que poseen los oligosacáridos pueden servir como punto de adherencia para otras células, bacterias, virus, toxinas, hormonas y muchas otras moléculas (Sharon and Lis, 1993). Cientos de estructuras de glicolípidos y glicoproteínas que se encuentran en las células eucarióticas han sido identificadas como receptores celulares.

El virus de la influenza y muchos otros patógenos humanos poseen proteínas de superficie que se unen a oligosacáridos que se encuentran en las células humanas (Zopf and Roth, 1996). Las interacciones no covalentes proteína/carbohidrato en sitios individuales aunque altamente específicas son débiles. Una fuerte adherencia entre el patógeno y la

célula resulta de un largo número de interacciones individuales de proteína/carbohidrato (Zopf and Roth, 1996).

El efecto protector de fracciones no-inmunoglobulínicas de la leche materna contra las infecciones gastrointestinales, respiratorias y del tracto urinario durante el primer año de vida ha sido atribuida a los oligosacáridos presentes en la leche materna (Zoph and Roth, 1996). En determinadas concentraciones los oligosacáridos de la leche inhiben la unión del virus de la influenza y de la fimbria S de *E. coli* enteropatógena a su célula blanco (Zoph and Roth, 1996).

1.1.6. Lectinas como moléculas que intervienen en el reconocimiento celular

Las lectinas son proteínas que median las interacciones célula-célula por combinación con su carbohidrato complementario en la superficie de la célula eucarionte. Ellas juegan un papel en el control de varios procesos normales y patológicos en los organismos vivos (Sharon and Lis, 1989). Esta es una unión estereoquímica entre una molécula que acarrea información biológica (lectina), y otra que es capaz de "receptar" tal información y transmitirla al interior de la célula eucarionte. Este reconocimiento celular esta basado en el concepto fundamental de complementariedad entre la "llave y su cerradura", el cual fue formulado por Emil Fischer en 1897 para describir la interacción entre una enzima y su sustrato (Sharon and Lis, 1993). De tal forma la adherencia bacteriana es mediada por las lectinas que se encuentran en la superficie de las bacterias que se unen a su azúcar complementario en la célula hospedera; así la bacteria depende de sus lectinas para adherirse al hospedero como el primer paso para el proceso de infección (Sharon and Lis, 1993). Diferentes bacterias pueden unirse a diferentes partes del mismo carbohidrato. Ocasionalmente, solamente una cara del oligosacárido puede ser expuesto en una célula particular y como resultado la célula se unirá únicamente a un tipo de bacteria y

no a otro. La habilidad de los azúcares que se encuentran en la superficie del hospedero de servir como sitios de adherencia depende no solamente de la presencia de éstos carbohidratos sino también de la accesibilidad y su modo de presentación al ligando (Sharon and Lis, 1993).

1.2. Generalidades de *Escherichia coli*

Theodor Escherich un pediatra germano trabajando en Austria, en 1885 describió unos bacilos cortos, delgados que crecían cuando la heces de los infantes eran cultivados en medio de cultivo artificial. Escherich denominó a estos organismos *Bacterium coli commune*, la cual es conocida en la actualidad como *Escherichia coli* (Lior, 1994). Kauffmann en 1944 fue el primero en clasificar a *E. coli* por métodos serológicos, describió 20 grupos "O" basados en la aglutinación de cultivos hervidos. Knipschildt en 1945 serotipificó otros 5 antígenos "O" y en 1947 Kauffman publicó un esquema antigénico que consistió de 25 antígenos "O", 55 antígenos "K" y 19 antígenos "H". Durante sus investigaciones Kauffman observó que algunas cepas de aislamiento fresco no aglutinaban en antisueros preparados con antígenos hervidos. La inhibición de la aglutinación podría haber sido destruida por calentamiento de la suspensión bacteriana. De esta forma el esquema antigénico de *E. coli* se ha extendido y hasta la fecha se conocen 167 antígenos somáticos "O", que facilitan su identificación (Lior, 1994).

El hábitat primario de *E. coli* es el tracto gastrointestinal, y principalmente el intestino delgado de mamíferos y aves. También se encuentra en el agua y en la tierra, procedente del hábitat primario generalmente por contaminación fecal.

Escherichia coli pertenece a la familia Enterobacteriaceae, no es la única especie del género *Escherichia*, pero sí la más grande, otras especies del género incluyen *E. adecarboxylata*, *E. blattae*, *E. fergusonii*, *E. hermanii* y *E. vulneris*. *E. coli* es un bacilo

gram-negativo, anaerobio facultativo, utiliza carbono y nitrógeno para sus necesidades energéticas y metabólicas. De tal manera que este microorganismo se puede multiplicar efectivamente en un medio que contiene solamente glucosa, amonio y sales minerales. (Bettelheim, 1994). Algunas especies de este microorganismo se encuentran formando parte de la flora normal intestinal, pero existen especies que causan infecciones intestinales y del tracto urinario, que causan enfermedades por varios mecanismos, resultando en síndromes que difieren clínica y epidemiológicamente (Kenneth. and Falkow, 1994).

1.2.1. Clasificación de *Escherichia coli*

En la actualidad *Escherichia coli* ha sido identificada como uno de los agentes más importantes causantes de una gran variedad de enfermedades entéricas, cada una asociada con las principales categorías de *E. coli* o "patotipos". (Elliot and Nataro, 1995). Un patotipo se define como una variante de un organismo, el cual posee varios factores de virulencia que le permiten mediar un mecanismo específico de patogenicidad. Los patotipos entéricos clásicos de *E. coli* incluyen a *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAggEC), *E. coli* adherente difusa (DAEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) (Elliot and Nataro, 1995).

1.2.1.1. *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Es el segundo grupo más grande asociado con diarrea y fue descrito en la India por Sack (1980). Las infecciones por *E. coli* enterotoxigénica afectan tanto a humanos como a cerdos, pero de manera independiente (Lior, 1994).

ETEC causa enfermedad debido a que coloniza el intestino delgado y elabora dos tipos de toxinas: una toxina termolábil (LT) que se une a la proteína G, la cual activa la adenilato ciclasa incrementando el AMP cíclico y una toxina termoestable (ST) que activa a la guanilato ciclasa produciendo un incremento de los niveles de GMP cíclico en la célula hospedera. De tal forma que un cambio en los niveles de GMP cíclico afecta un gran número de procesos celulares tales como actividad de bombas iónicas, lo cual produce un cambio electrolítico en las células de la mucosa intestinal causando diarrea. (Salyers and Witt, 1994). ETEC produce un grupo de apéndices estructuralmente distintos que se encuentran en la superficie de ETEC llamados factor de colonización de antígenos (CFA), los cuales promueven la colonización del intestino (Gaastra and Graaf 1982). ETEC puede expresar un gran número de CFAs, entre las más frecuentes CFA/I, CFA/II y CFA/IV. El término factor putativo de colonización (PCF) ha sido utilizado para los CFAs cuyo papel en la colonización intestinal no ha sido demostrado (Wenneras, 1993), (Salyers and Whitt, 1994).

1.2.1.2. *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Recientemente EHEC ha sido reconocida como una causa de diarrea severa, principalmente el serotipo 0157:H7. Las cepas EHEC poseen el gen *eaeA* que codifica para la proteína intimina, el cual es similar al gen *eaeA* de EPEC produciendo la lesión característica de adherencia y esfacelamiento al igual que lo hace EPEC. La principal diferencia entre las cepas de EPEC y EHEC es que las cepas de EHEC producen una toxina igual a la denominada Shiga-like toxin (SLT) (Salyers and Whitt, 1994). Así la diarrea con sangre y el síndrome urémico hemolítico asociados con las infecciones de EHEC son probablemente debidas a la producción de SLT. El gen que codifica para la SLT se encuentra en un bacteriófago, similar al gen de la toxina diftérica. Una característica de las

cepas de EHEC, importante para la transmisión de la enfermedad, es que la cepa 0157:H7 parece colonizar el tracto intestinal de corderos y luego la ingestión por humanos de la carne contaminada podría iniciar la infección por esta bacteria (Nataro and Levine, 1994).

1.2.1.3. *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

EIEC se asemeja en gran parte a *Shigella* spp, con la cual comparte antígenos somáticos. EIEC es una bacteria no móvil, al igual que algunas especies de *Shigella*, las cepas invasivas poseen un largo plásmido de 140 MDa, la cual codifica ciertos factores de virulencia (*Escherichia coli* in domestic animals and humans). En el laboratorio estas cepas invaden las células HeLa. EIEC invaden las células de la mucosa y se disemina lateralmente de una célula a otra como lo hace *Shigella* spp, pero a diferencia de esta no produce toxina Shiga, un factor importante que podría explicar la ausencia de síndrome urémico hemolítico HUS por parte de las cepas de EIEC (Nataro and Levine, 1994).

1.2.1.4. *E. coli* enteroagregativa (EAggEC)

E. coli enteroagregativa (EAggEC), ha sido clasificada recientemente como una clase de *E. coli* productora de diarrea. Estudios realizados por Tickoo *et al* demostraron que estas cepas colonizan el intestino grueso y delgado de conejos, causando diarrea. EAggEC se adhiere en forma de acúmulos tanto a las células HEp-2 mantenidas en cultivo como al vidrio de la preparación (Vial *et al*, 1988). Estudios realizados en Chile, India, Brazil y México han demostrado una fuerte asociación de cepas enteroagregativas con diarrea en niños y especialmente con diarrea persistente por más de 14 días (Lior, 1994). Baudry *et al* (1990), describió una sonda de DNA para la detección de EAggEC, un fragmento de 1.0 kb

derivado de un plásmido de 55-65 MDa (Vial *et al* 1988). Baldwin *et al* (1992) reportó que las cepas no hemolíticas de EAggEC producen una toxina termo-lábil que se relaciona antigénicamente con la hemolisina de *E. coli*. Savarino *et al* en 1991 demostró que EAggEC secreta una toxina termoestable (EAST1) codificada en un largo plásmido. El papel de la toxina EAST1 no está bien determinado. (Nataro and Levine, 1994).

1.2.1.5. *E. coli* adherente difusa (DAEC)

E. coli adherente difusa pertenece al serogrupo de EPEC que fue descrito por Skaletsky *et al* en 1984 y denominada EPEC de clase II por Nataro *et al* en 1985. DAEC ha sido asociada con diarrea aguda y diarrea crónica. Estas cepas se adhieren a las células HEP-2 de una manera uniforme cubriendo toda la superficie celular (Elliot and Nataro, 1995). Se han identificado dos tipos de adhesinas, una proteína de 100 kDa codificada en un plásmido en la cepa O126:H7 y una fimbria codificada en el cromosoma bacteriano aislada de la cepa serogrupo O75. Existen dos reportes recientes que asocian a DAEC con diarreas en niños mayas y de Bangladesh y aunque se ha demostrado que estas cepas producen diarrea en voluntarios, hasta la fecha el mecanismo patógeno aún no ha sido caracterizado (Yamamoto *et al*, 1996), (Giron *et al*, 1991. a.).

1.2.1.6. *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

El término *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), fue utilizado por primera vez por Neter *et al.* en 1955 para describir cepas de *Escherichia coli* aisladas de diarrea infantil. (Law, 1994). Levine *et al.* en 1978, demostraron que dos cepas aisladas de diferentes serogrupos carecían de propiedades enterotóxicas y enteroinvasivas. Mediante estudios

realizados con biopsias de intestino de niños infectados se demostró que EPEC se adhiere a la mucosa del intestino. A diferencia de otras *E. coli*, las cepas EPEC presentan la capacidad de adherirse en forma de microcolonias a células epiteliales mantenidas en cultivo (Sckalestky *et al.*,1984). A este tipo de adherencia se le ha llamado localizada para diferenciarla de la adherencia difusa y agregativa. Baldini *et al* en (1983), reportaron que la adherencia localizada se encuentra relacionada con la presencia de un plásmido de 60 MDa denominado pMAR2. Las cepas curadas del plásmido pierden la capacidad de adherirse en forma localizada (Donnenberg and Kaper, 1992). Las cepas de *E. coli* que poseen adherencia localizada tienen un plásmido de 55 a 70 MDa denominado "Factor de adherencia de EPEC" (EAF). Por otro lado Girón *et al*, en (1991) describieron unos pilis de aproximadamente 3 mm de diámetro que no lo expresaban las cepas curadas del plásmido EAF. A estas estructuras se las llamó pilis formadores de haces (BFP), los cuales fueron purificados de EPEC (cepa B171 serotipo 0111:NM), esta fimbria tiende a agregarse formando haces que pueden ser visualizadas por microscopía electrónica. Los anticuerpos dirigidos contra las BFP inhiben parcialmente la adherencia localizada que presentan las cepas enteropatógenas (Girón *et al* 1991. b.). La secuencia amino terminal de las BFP demuestra que existe cierta homología con el pili Tcp de la toxina de *Vibrio cholerae* y con otros miembros de la familia de los pilis tipo IV (Law 1994).

Muchos reportes confirman que EPEC es capaz de inducir alteraciones del citoesqueleto en las células epiteliales en modelos animales y en humanos infectados con EPEC (Donnenberg and Kaper, 1992). Los enterocitos afectados exhiben una pérdida de las microvellosidades y un rearrreglo de elementos del citoesqueleto, con acumulación de los filamentos de actina, actinina, ezrina y talina debajo del sitio donde la bacteria se adhiere íntimamente a la célula (Knutton *et al*, 1989). El efecto ha sido llamado de adherencia y esfacelamiento (A/E), que fue descrito primera vez por Staley en 1969 (Law, 1994). La lesión A/E ha sido observada además en EHEC, *Helicobacter pylori*, *Citrobacter freundii* y *Hafnia alvei* (Law, 1994).

El rearrreglo del citoesqueleto parece ser iniciado por la activación de tirosinasas de la célula hospedera después de la infección con EPEC; la inducción de la actividad de estas tirosinacinasas se encuentra mediada por productos del gen *cfm* de EPEC (Rosenshine *et al*, 1992), estos productos probablemente interactúan con los receptores de la célula epitelial para inducir la fosforilación de tirosina de varias proteínas celulares (Kenny and Finlay, 1997). La intimina una proteína que se encuentra en la membrana externa de EPEC está involucrada en la adherencia íntima de la bacteria a la superficie de la célula eucariótica (Rosenshine and Finlay, 1993). EPEC también causa un incremento en la concentración de calcio libre intracelular en células infectadas (Baldwin *et al*, 1991), producción del inositol-fosfato (Foubister *et al*, 1994) y estimulación de la actividad de proteinquinasas (Baldwin *et al*, 1990), lo cual produce un incremento en la fosforilación de proteínas de la célula hospedera (Manjarrez-Hernández *et al*, 1992). Existe una fuerte asociación entre las vías de transducción de señales celulares explotadas por la infección de EPEC y la producción de la lesión de adherencia y esfacelamiento que destruye las microvellosidades del enterocito. Sin embargo se desconoce el efecto que pueda tener tal incremento de fosforilación de proteínas celulares en el transporte de iones y en la permeabilidad celular (Law, 1994). Se sabe que algunos ésteres de forbol, lectinas y la hormona angiotensina estimulan la fosforilación de proteínas y a la vez producen diarrea en modelos animales (Baldwin *et al*, 1990).

La naturaleza del receptor de EPEC es aún desconocida, sin embargo, se ha demostrado que fracciones de oligosacáridos de leche materna pueden inhibir la adherencia a células HEp-2 (Cravioto *et al*, 1991). Chart *et al* (1991) encontraron que el ácido linoleico es capaz de producir inhibición en células HEp-2. No obstante existe la posibilidad de que estos compuestos inhiban la adherencia en una forma indirecta, esto es, por interacciones con compuestos adyacentes no involucrados directamente en la adhesión pero que afectan la unión bacteria-célula por un efecto estérico.

Se tienen evidencias de que carbohidratos median la adherencia de EPEC a la

mucosa intestinal, sin embargo se desconoce si estos carbohidratos están unidos a proteínas o a ácidos grasos que a su vez forman parte de la superficie celular.

El objetivo del presente trabajo es identificar el receptor o estructuras de unión a las cuales EPEC se adhiere.

Sección 2: MATERIAL Y METODOS

2.1. Aparatos

2.1.1. Electroforesis

PAGE 1D. Separador de geles (1 y 1.5 mm de espesor); placas de vidrio de 16x18 cm; cámara de electroforesis vertical HOEFER Scientific Instruments, Modelo N° SE600; fuente de poder LKB, Modelo 2103; refrigerante BRL, Modelo RB-200.

PAGE 2D. Tubos capilares (1.0x7.5 mm); cámara de electroforesis vertical HOEFER Scientific Instruments, Modelo N° SE600; secador de geles BIO-RAD, Modelo 543, refrigerante BRL, Modelo RB-200.

2.1.1. Centrifugación

Centrífuga de mesa EPPENDORF, Modelo 5415 C; centrífuga (Dupont), Modelo SORVALL RT 6000 D, rotor SORVALL H 1000 B; ultracentrífuga (Dupont), Modelo SORVALL RC M120 EX, rotor S120AT2-0139.

2.1.3. Varios

Electroelución. Electroelutor (BIO-RAD), Modelo 422.

Electrotransferencia en semi-seco. Cámara de electrotransferencia (Pharmacia), Modelo Novablot LKB Multiphor II.

Contador de centelleo. Beckman LS 7000.

Sonicación. Sonicador (SONICS), Modelo VC50T.

Cromatografía. Aparato de Cromatografía líquida (FPLC); columna de cromatografía Superosa 12, HR10/30, Pharmacia LKB.

2.2. Materiales

2.2.1. Reactivos

Electroforesis grado PAGE. Acrilamida, N, N'- Methylene-bis-acrilamida, Duodecil Sulfato de Sodio, (Sigma Chemical Company); TEMED (LKB); persulfato de amonio (GIBCO BRL). azul de comassie R-250 (GIBCO BRL), anfolinas pH 3.5-10 y pH 5.0-7.0 (LKB).

Membranas para electrotransferencia. Nitrocelulosa (0.45 μ m) GIBCO BRL.

Radioisótopos. Metionina [S^{35}] 0.4 mCi, NEN Research Products, Dupont Wilmington, Delaware.

Reactivos químicos. *m*-peróxido de sodio (Sigma Chemical Company).

Reactivos inmunológicos. Anticuerpos anti-fibronectina humana No.Producto F3648. Inmunoglobulina anticonejo tipo IgG producida en cabra y acoplada con peroxidasa (Affinity Purified Antibody to Rabbit IgG (H+L) Goat).

Proteínas.

(1) Inhibidores de proteasas: Leupeptina, aprotinina, inhibidor de tripsina (Sigma Chemical Company).

(2) Enzimas: Endoglicosidasa H (Sigma), glycopeptidase F peptide N-glycosidase (Sigma).

(3) Marcadores de peso molecular para electroforesis en geles de poliacrilamida: Fosforilasa b (94,000 daltones), albúmina sérica (67,000 daltones), ovalbúmina (43,000 daltones), anhidrasa carbónica (30,000 daltones), inhibidor de tripsina (20,100 daltones), o-lacto albúmina (14,400 daltones). Pharmacia.

2.2.2 Células

(1) Cepas bacterianas. Las cepas bacterianas de *Escherichia coli* que se utilizaron en el presente estudio fueron obtenidas de niños con diarrea, menores de cinco años. Las cepas fueron proporcionadas por el Biólogo Armando Navarro y el Dr. Alejandro Cravioto y serotipificadas en el Laboratorio de Salud Pública de la Facultad de Medicina U.N.A.M.

(2) Líneas celulares. HEP-2 (carcinoma de laringe humano); Caco-2 (adenocarcinoma de colon humano).

(3) Muestras. Las muestras de intestino delgado de niño fueron obtenidas de autopsias y proporcionadas por el Departamento de Patología del Instituto Nacional de Pediatría; también fueron utilizadas muestras de intestino delgado de cerdo.

2.2.3. Medios de cultivo

Medio sintético. ($\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$ 1g, glucosa 5g, NaCl 5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g, K_2HPO_4 1 g, H_2O 1000 ml, pH 7.2)

Medio de cultivo celular. Medio Eagle Dulbecco (DMEM).

2.3. Métodos

2.3.1. Cultivo bacteriano

Las cepas bacterianas se crecieron en medio casoy líquido (3g casoy en 100 ml de agua desionizada) por 8 horas a 37°C, posteriormente se tomó dos gotas de la suspensión bacteriana y fueron sembradas en medio sintético con manosa al 1%, se dejaron crecer por 12 horas.

Marcaje radioactivo de bacterias. Las cepas de *E. coli* se crecieron en medio sintético a 37°C en presencia de metionina-[S³⁵] 0.4 mCi por ml (actividad específica, 1140.0 Ci/mmol). Las bacterias fueron cosechadas y lavadas cuatro veces con solución salina de fosfatos pH 7.4 (PBS) y resuspendida en el mismo medio a concentración de 3x10⁸ CFU/ml. La incorporación de metionina-[S³⁵] fue entre 0.015 y 0.1 cpm/CFU.

2.3.2. Cultivo celular

Las células Hep-2 y Caco-2 fueron cultivadas en frascos de plástico a 37°C en medio Eagle Dulbecco (DMEM), suplementado con suero fetal bovino al 10 y 20%, respectivamente. Las células se mantuvieron en una atmósfera de 5% de CO₂. El medio fue reemplazado cada dos días y las células fueron colectadas cuando alcanzaron un 80% de confluencia.

2.3.3 Ensayo de adherencia a células Hep-2

Las cepas fueron crecidas durante un período de 18 h a 37°C, en 1 ml de caldo triptona al 1%, conteniendo 1% de D-manosa. La turbidez que se obtuvo después de esta incubación fue comparable al estándar de McFarland, 6 x 10⁸ unidades formadoras de colonia/ml (UFC/ml). Se empleó la técnica descrita por Cravioto *et al* (1979). La prueba se desarrolló colocando una lenteja de vidrio de 1 cm de diámetro en cada uno de los 24 pozos de una placa de polipropileno, a las cuales se les agregó una suspensión de células HEp-2 a una concentración de 2.5 x 10⁶/ml, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 h para formar una monocapa con 80% de confluencia.

Después de este tiempo el medio de cultivo se eliminó de los pozos y se lavó con

PBS pH 7.2; posteriormente se agregó 1×10^8 bacterias en 1.0 ml de medio de cultivo celular (medio esencial mínimo de Eagle), se incluyó un control positivo y un pozo con la cepa HB101, negativa a la adherencia. La placa se incubó por 3 h a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, después de este período de incubación se descartó el medio y se lavó tres veces cada pozo con 1 ml de BBS, con la finalidad de eliminar las bacterias no adheridas a las células; las células se fijaron con 1 ml de metanol dejándolo actuar durante 20 minutos y posteriormente se tiñeron con el colorante de Giemsa durante 20 minutos, se lavaron tres veces con 1 ml de agua desionizada, para eliminar el exceso de colorante. La lenteja con células se deshidrató pasándola por acetona, acetona-xileno y xileno, la preparación se colocó en un portaobjetos fijándola con bálsamo de Canadá para observarla posteriormente en microscopio de luz.

2.3.4. *Obtención de membranas a partir de células HEp-2*

Las células HEp-2 fueron obtenidas a partir de cultivos celulares. El medio de cultivo se desechó y la monocapa celular se lavó tres veces con PBS frío (NaCl 8.5g, Na₂HPO₄ 1.07g, NaH₂PO₄ 0.3g, pH 7.2). La monocapa se desprendió raspándola con un gendarme de plástico y las células fueron colectadas por centrifugación a 500 g por 5 minutos a 4°C y lavadas dos veces con PBS frío y una vez con solución de lisis (10 mM HEPES, 1 mM MgCl₂, 1 mM EDTA, pH 7.4). El botón obtenido se resuspendió en solución de lisis, dejándolo en reposo a 4°C durante 20 minutos para permitir que aumente el volumen intracelular. Las células enteras fueron lisadas al ser pasadas a través de una aguja de 27x13 mm. Las células enteras y los núcleos fueron removidos por centrifugación a 500 g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue centrifugado a 45,000 g por 1 h a 4°C. El botón resultante que contiene las membranas fue resuspendido en PBS y guardado en alícuotas a -20°C hervidas por 5 minutos en solución de Laemmli (Magee *et al*, 1987).

2.3.5. Preparación del moco intestinal

Los segmentos de intestino delgado fueron lavados con PBS frío que contiene inhibidores de proteasas (PMSF 1.0 mM, EDTA 1.0 mM, leupeptin 25 µg/ml), luego fueron lavados suavemente con PBS conteniendo 1 mM de DTT para remover su contenido. Posteriormente el tubo intestinal fue abierto a todo lo largo para exponer la mucosa, el epitelio fue raspado con una espátula y colectado en PBS con inhibidores de proteasas. La suspensión fue homogenizada por agitación en un vortex, las células y las partículas pequeñas fueron removidas por centrifugación a 15,000 g por 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue colectado y utilizado como preparación de mucosa cruda (Willemssen and Graaf, 1992). Los inhibidores de proteasas fueron proporcionados por Sigma Chemical Co (St. Louis, Mo).

2.3.6. Preparación de las vellosidades intestinales

Las vellosidades fueron preparadas por el método de Saxon *et al.*(1994). El siguiente procedimiento fue llevado a cabo a 4°C. Una porción de intestino delgado fresco (10 cm aproximadamente), fue lavado suavemente con PBS conteniendo 1mM de DTT para remover su contenido. Posteriormente el tubo intestinal fue abierto a todo lo largo para exponer la mucosa, el epitelio fue raspado con una espátula y colectado en PBS conteniendo 25 mg/ml leupeptina, 25 mg/ml aprotinina, 1mM PMSF y 1mM EDTA. EL epitelio celular fue resuspendido en 20 ml de solución A (5 mM EDTA, HEPES-Tris 1 mM pH 7.5), conteniendo 1mM PMSF y 1mM DTT, posteriormente fue homogeneizado suavemente pasándolo a través de una aguja (17x13 mm) con jeringa (20 veces). Después el homogenizado se centrifugó a 500g durante 15 minutos, el botón obtenido se resuspendió en 20 ml de solución A y nuevamente fue centrifugado a 800g durante 15 minutos.

Posteriormente las vellosidades obtenidas fueron resuspendidas en un pequeño volumen de solución B (0.8 mM EDTA, 0.09 M NaCl, 1 mM HEPES-Tris, pH 7.5), conteniendo 1mM PMSF, 1mM DTT y fue filtrado a través de una malla de nylon de 60 mm de abertura para remover los agregados. Las vellosidades fueron recuperadas por centrifugación a 800g durante 10 minutos. El botón se lavó una vez más con solución B fresca y se resuspendió en 10ml de PBS guardándose en alícuotas a -20°C o hirviéndose por 5 minutos en solución de Laemmli. La pureza de la preparación y la presencia de vellosidades intactas fue confirmada mediante microscopio de luz.

2.3.7. Electroforesis en geles de poliacrilamida

Las proteínas de membrana celular fueron separadas esencialmente por el método descrito por Laemmli, (1970), denominado Electroforesis en geles de Poliacrilamida en Duodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE). Las membranas celulares fueron hervidas por 5 minutos en solución de Laemmli (SDS 0.12g, β -mercaptoetanol 5%, azul de bromofenol 0.05 %, glicerol 10 %, Tris-HCl 0.063 M, pH 6.8), para solubilizar las proteínas y liberarlas de la bicapa lipídica, reducir los puentes de cisteína y abrir o desdoblar las proteínas para la separación electroforética óptima. Las soluciones que se utilizaron para preparar 30 ml y realizar la SDS-PAGE son las siguientes:

Gel separador

Acrilamida-bis Acrilamida (30:0.8)	11.0	ml
Solución pH 8.8	3.75	ml
SDS al 10%	0.3	ml
Persulfato de amonio al 10%	1.5	ml
Agua desionizada	13.45	ml
TEMED	0.015	ml

Gel concentrador

Acrilamida-bis Acrilamida (30:0.8)	1.250	ml
Solución pH 6.8	2.50	ml
SDS al 10%	0.1	ml
Persulfato de amonio al 10%	0.5	ml
Agua desionizada	5.75	ml
TEMED	0.075	ml

Solución amortiguadora de corrida

Tris	3.0	g
Glicina	14.4	g
SDS	5.0	g
Agua desionizada	1000	ml

La electroforesis se realizó a un amperaje constante de 40 mA para el gel concentrador y 60 mA para el gel separador.

Después de la separación SDS-PAGE a un porcentaje de 11-12.5% de poliacrilamida los geles fueron ya sea teñidos en azul de Coomassie (Azul de Coomassie 0.1%, metanol 30%, ácido acético 10%) o electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa.

2.3.8. Electroelución de las proteínas de 32-33 kDa

Se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE para separar las proteínas de las vellosidades intestinales. Posteriormente se tiñó el gel con azul de coomassie (R-250) al 0.05% en agua para localizar las proteínas de interés, después de desteñirlo con agua se cortó con un bisturí y se extrajo la porción del gel que contenía las bandas de proteínas de 32 y 33 kDa. Los pedazos del gel de aproximadamente 1.5 mm se colocaron en tubos de vidrio que contenían las membranas de diálisis. Como solución electrodo se utilizó 0.025M de TRIS base, 1.92M de glicina y 1% de SDS (pH 8.3). La electroelución se realizó a un miliamperaje constante de 15 miliamperios (mA) por cada membrana de diálisis durante 3 horas. El aparato empleado fue el Electroelutor de Bio-Rad Modelo 422.

2.3.9. Cuantificación de proteínas

Para determinar la cantidad de proteínas totales se utilizó el método de Bradford (Bradford, 1976). Se tomaron una serie de muestras de proteínas y el contenido de proteína de las muestras fue determinada de la curva estándar obtenida de la absorbancia a 570 nm de concentraciones conocidas de albúmina sérica bovina (BSA). La curva estándar se

mantuvo lineal entre 20 y 150 µg en 100 µl de proteína.

Para determinar la cantidad de proteínas de 32-33 kDa electroeluidas, se utilizó el método de Wong (Wong *et al*, 1985). Se realizó una electroforesis (SDS-PAGE), se tiñeron las bandas con azul de Coomassie, se cortaron y se maceraron, el azul de Coomassie se eluyó con metanol al 80% a temperatura ambiente toda la noche. La absorbancia se midió a 585 nm y determinada de la curva estándar de concentraciones de BSA.

2.3.10. *Electroforesis en geles de dos dimensiones*

Se utilizó la técnica de O'Farrell *et al* (1975). La primera dimensión se corrió en tubos de 1.5 mm de diámetro por 13 cm de longitud, se preparó una solución de gel desgasificada Acrilamida-bisacrilamida (27:1.35), urea 5.7 g, CHAPS 0.1 g, anfolinas 0.4 ml (pH 3.5-10), 0.1 ml (pH 5-7). Se desgasifica antes de agregar 0.1 ml de Nonidet P-40 (detergente no iónico) y finalmente se induce la polimerización agregando 20 ml de TEMED y 0.1 g/ml de persulfato de amonio al 10%. Los tubos se llenaron con la solución del gel y después que polimerizó, se colocaron en la cámara de electroforesis, se recorrió a 200 voltios durante una hora para formar el gradiente. Se utilizó 0.02 N de hidróxido de sodio como solución catiónica y ácido ortofosfórico al 0.085% como solución aniónica. Una vez que se inyectó la muestra se dejó correr por 19 horas a un voltaje de 500 voltios y la última hora se aumentó a 1000 voltios para que el isoelectroenfoco sea más definido a final de la electroforesis. La muestra (100 µl) se mezcló con 10 µl de solución C-MIX (50 mg SDS, 150 mg DTT, 0.5 ml de anfolinas, 0.4 ml Triton X-100), en presencia de 50 mg de urea, la preparación de la muestra no se debe calentar. En la segunda dimensión se realiza una electroforesis en SDS-PAGE al 11% como se explica en el inciso 4, cuando el gel plano ha polimerizado se encuentra listo para recibir el gel tubular que contiene las proteínas separadas por enfoque isoelectrico en la primera dimensión. El gel tubular se

colocó horizontalmente sobre el gel concentrador de la segunda dimensión, se le agregó solución de Laemmli y se dejó correr a 40 mA. Después de la electroforesis el gel se tiñó con azul de Coomassie.

2.3.11. *Electrotransferencia*

La electrotransferencia de proteínas se llevo a cabo utilizando el método electroforético horizontal en semi-seco (Harlow and Lane, 1988). El método está basado en la transferencia de las proteínas separadas en los geles de poliacrilamida a membranas de nitrocelulosa, mediante una solución electrodo (Tris 50 mM, glicina 380 mM, SDS 0.1%, metanol 20%) y una cámara de electrotransferencia (Pharmacia LKB, Multiphor).

De la siguiente manera:

1) Se cortan seis hojas de papel absorbente (Whatman 3 mm o equivalente) y una hoja de nitrocelulosa del mismo tamaño del gel. Es importante evitar que el papel sobresalga el borde del gel para que la transferencia sea eficiente.

2) Se sumergen cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa en agua destilada por dos minutos. Posteriormente sumergir el papel absorbente y la membrana de nitrocelulosa en solución de transferencia.

3) En la parte inferior del aparato (ánodo) ensamblar el gel, nitrocelulosa y papel filtro en el siguiente orden:

- tres hojas de papel filtro absorbente empapados con solución de transferencia
- una membrana de nitrocelulosa empapada en solución de transferencia
- gel de poliacrilamida empapado en solución de transferencia

- tres hojas de papel filtro absorbente empapados con solución de transferencia.

4) Se evita la formación de burbujas de aire removiendo cuidadosamente sies que estas se han formado. Poner cuidadosamente el electrodo superior (el cátodo) sobre el sandwich de papel, membrana y gel recién formados.

5) La transferencia se realizó a miliamperage constante (mA) de acuerdo con la siguiente regla 1.0 mA/cm^2 , unidades de transferencia por 1.5 horas aproximadamente.

6) El gel de poliacrilamida se tiñó con azul de coomassie para verificar la transferencia.

7) La membrana de nitrocelulosa se tiñó con Ponceau S para verificar la eficiencia de la transferencia de las proteínas.

2.3.12. *Tinción de la membrana de nitrocelulosa con Ponceau S*

- 1.- Lavar la membrana de nitrocelulosa con PBS después de la transferencia.
- 2.- Agregar Ponceau S diluído a la membrana e incubarla por 5-10 minutos a temperatura ambiente con agitación.
- 3.- Transferir la membrana de nitrocelulosa a un recipiente con PBS y enjuagarlo por 1-2 minutos con varios cambios de PBS.
- 4.- Una vez marcada la posición de las proteínas transferidas a la membrana, se destiñe totalmente enjuagándola con PBS o agua.

Ponceau S

Ponceau S	2 %
Acido Tricloroacético	30 %
Acido sulfosalicílico (Sigma)	30 %

2.3.13. Ensayo de adherencia a proteínas transferidas

Una vez que las proteínas de vellosidades intestinales fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (ver electrotransferencia) se procedió a bloquear dichas membranas con leche semidescremada al 5% por 2 horas utilizando agitación leve. La solución bloqueadora se cambió 3 veces durante este tiempo. Las bacterias previamente crecidas y marcadas con metionina-[S³⁵] se incubaron por una hora con las membranas de nitrocelulosa a una concentración bacteriana aproximada de 10⁸ bacterias/ml, la incubación se realizó a temperatura ambiente y con ligero movimiento. Después de esta incubación las membranas de nitrocelulosa fueron lavadas seis veces con PBS. Finalmente las membranas de nitrocelulosa secas, fueron expuestas a una película de autorradiografía en completa oscuridad. Las bacterias que reconocieron las proteínas intestinales fueron detectadas después de revelar la autorradiografía.

2.3.14. Eliminación de lípidos de las vellosidades intestinales

Los lípidos fueron removidos de las vellosidades mediante dos extracciones con una solución de cloroformo-metanol-agua 4:8:3 (vol/vol/vol) según la técnica descrita por Svennerholm *et al* (1990). Las fracciones de membranas delipidadas se centrifugaron a 10,000 g por 10 minutos y luego resuspendidas en PBS.

2.3.15. *Desglicosilación y oxidación de azúcares de las vellosidades intestinales*

Las proteínas de vellosidades transferidas a las membranas de nitrocelulosa fueron incubadas con Endo-glicosidasa F (PNGase Sigma Chemical Co.), según el método de Fage and Chrispeels, (1985). Para la oxidación de azúcares se utilizó *meta*-periyodato de sodio a una concentración de 100 mM en una solución de 100mM de acetato de sodio, pH 5.2. Las vellosidades intestinales fueron oxidadas por esta solución después de realizar la electroforesis y electrotransferencia de las proteínas. Las tiras de nitrocelulosa fueron incubadas toda la noche en la oscuridad en medio ambiente con la solución de *meta*-periyodato de sodio. Después de la incubación, las preparaciones se lavaron con PBS y se realizó el ensayo de adherencia para detectar la presencia de bacterias.

2.3.16. *Efecto de inhibición bacteriana por las proteínas de 32-33 kDa*

Las proteínas de 32-33 kDa electroeluidas (5.0 y 10.0 µg/ml aproximadamente) se incubaron previamente con las cepas de *E. coli* por 30 minutos a temperatura ambiente antes de realizar el ensayo de adherencia descrito anteriormente. Los controles consistieron en proteínas de vellosidades intestinales que recibieron el mismo proceso de aislamiento que las proteínas de 32-33 kDa.

Para determinar el grado de inhibición bacteriana se contaron las bacterias adheridas a 200 células HEp-2 seleccionadas al azar. Cada experimento se realizó por duplicado y se repitió 3 veces. La inhibición de la adherencia se expresó como el porcentaje total de células comparadas con el control del experimento.

2.3.17. *Análisis estadístico*

Los resultados fueron expresados como la media de una desviación estándar. Las diferencias entre los dos grupos fueron determinados mediante la prueba de *t* de Students de dos colas. ($P < 0.05$).

2.3.18. *Obtención de proteínas asociadas a superficie bacteriana de EPEC*

Las cepas de EPEC, crecidas en medio sintético durante la noche (16 horas), fueron lavadas tres veces con PBS. El botón bacteriano final se resuspendió en 0.5-1 ml de medio sintético (dependiendo del tamaño del botón), se desprendieron las proteínas de superficie bacteriana por efecto mecánico complementado con una breve sonicación (tres veces a 25 watts por intervalos de 30 segundos a 4°C. (Brinton, 1959). Se verificó que el tratamiento de sonicación no rompiera la bacteria, esto se realizó mediante tinción de la bacteria y observación de estas al microscopio óptico después de haber sido sonicadas por diversos periodos de tiempo. La suspensión sonicada fue centrifugada a 10,000 g por 20 minutos. El sobrenadante conteniendo las proteínas de superficie de EPEC fue colectado y filtrado a través de una membrana de 0.22 μm .

2.3.19. *Ensayo de reconocimiento de las proteínas de 32-33 kDa por las proteínas asociadas a superficie bacteriana.*

Las proteínas de superficie bacteriana obtenidas por sonicación y marcadas con metionina [S^{35}] se incubaron por una hora a 37°C con las proteínas de 32-33 kDa previamente transferidas a las membranas de nitrocelulosa, se lavó tres veces con PBS para

eliminar las proteínas de superficie no adheridas, luego se cortaron las bandas de la nitrocelulosa que supuestamente tendrían las proteínas de superficie bacteriana que reconocieron a las proteínas de 32-33 kDa, se las colocó en un tubo eppendorf se le agregó 0.5 ml de sarkosyl, se calentó por 5 minutos para desprender todo lo adherido a la nitrocelulosa, se tomaron como muestras que se corrieron en un gel de poliacrilamida, se tiñieron con azul de Commassie, se secó el gel en un secador de geles, y luego los resultados se analizaron por medio de una autorradiografía.

Sección 3: RESULTADOS

3.1. Modelo para el estudio de la adherencia bacteriana

Se estableció un modelo *in vitro* que permitió detectar proteínas provenientes de células epiteliales que interactúan con cepas de *E. coli*. En esencia el método consistió en la obtención de las membranas celulares, separación electroforética de las proteínas y transferencia de las mismas a membranas de nitrocelulosa sobre las cuales, fueron incubadas bacterias marcadas radioactivamente con metionina-[S³⁵]. Finalmente las proteínas que fueron reconocidas por las bacterias fueron detectadas por autorradiografía.

Después de investigar las condiciones óptimas para el desarrollo del modelo de adherencia se logró estandarizar la metodología de la siguiente manera:

- 1) Se corrieron aproximadamente 50 µg de proteínas de membrana citoplásmica por carril en un gel de 20x30 cm al 11.0% de poliacrilamida.
- 2) El gel fue transferido a una membrana de nitrocelulosa a 200 mA por 2 horas.
- 3) Se encontró que la leche semidescremada al 5% es el mejor bloqueador para cubrir los sitios libres en la membrana de nitrocelulosa y de esta manera se evitó la unión inespecífica de las bacterias a la nitrocelulosa.
- 4) La cantidad de bacterias más apropiada para incubar con las membranas de nitrocelulosa fue de 1×10^8 bact./ml.
- 5) La incorporación de la marca radioactiva, metionina-[S³⁵], por bacteria que dio mejores resultados fue de 0.015 a 0.1 cpm/CFU.
- 6) El tiempo de incubación de las bacterias con las membranas de nitrocelulosa, más adecuado para poder detectar las bandas limpias, y sin fondo inespecífico radioactivo fue de 1 hora, a temperatura ambiente y en medio sintético. Durante este tiempo la incubación se mantuvo en movimiento ligero (casi imperceptible).

3.1.1. *E. coli enteropatógena reconoce proteínas de membrana de células mantenidas en cultivo*

Encontramos que las membranas de células HEp-2 y Caco-2 (estas últimas diferenciadas) contenían varios polipéptidos que fueron reconocidos por cepas de EPEC. Las más prominentes y consistentes fueron dos proteínas de peso molecular aparente de 32 y 33 Kilodaltones (kDa) (Fig. 1). En algunos casos polipéptidos adicionales de peso molecular aproximado de 50-70, 105-130 y 180-200 kDa también fueron reconocidos por las mismas cepas, aunque la detección fue débil y variable. La intensidad de bandas de las proteínas de 32 y 33 kDa fue mayor cuando las bacterias fueron incubadas con las proteínas de células Caco-2 en comparación con las HEp-2. Esto probablemente se debe a que las células Caco-2 diferenciadas tienen más membrana citoplásmica debido a la formación de las microvellosidades. Por otro lado, las bacterias no reconocieron ninguna proteína en la fracción citosólica proveniente de los dos tipos celulares.

3.1.2. *Cepas de E. coli reconocen proteínas de membrana de vellosidades de intestino delgado humano y de cerdo.*

El reconocimiento de proteínas provenientes de vellosidades de intestino humano y de cerdo por cepas de *E. coli*, fue estudiado utilizando el mismo modelo de electrotransferencia de proteínas a membranas de nitrocelulosa.

Se encontró que únicamente las cepas que tienen la habilidad de adherirse a células HEp-2 en cultivo fueron capaces de reconocer principalmente las proteínas de 32 y 33 kDa (Fig. 1). Estas proteínas fueron reconocidas consistentemente por cepas de EPEC de distintos serotipos 0127:H6, 0119:H6, OR:H6, 0142:H6, 0111:NM, 0115:H⁻, 0157:H7, 077:H18, 055:H6. Además, otras proteínas con peso molecular similar al encontrado en las

células HEP-2 y Caco-2 fueron reconocidas por distintas cepas de EPEC en las vellosidad tanto de intestino humano como de cerdo. Dichas proteínas tienen un peso molecular aproximado de 50-70, 105-130 y 180-200 kDa, el reconocimiento en este caso fue débil y variable (Fig 2 A).

Cuando la preparación de vellosidades fue mantenida a temperatura ambiente por una hora, algunas bandas de 17, 20 y 25 kDa aparecieron, mientras que las bandas de 32, 33 y 50-70 kDa disminuyeron en intensidad después de incubarlas con las bacterias marcadas (Fig 2 B). Por lo tanto, es probable que los polipéptidos de 17, 20 y 25 kDa sean producto de degradación de proteínas más grandes.

Figura. 1.- Adherencia de *E. coli* enteropatógena (EPEC) a proteínas separadas electroforéticamente y transferidas a nitrocelulosa. Geles (SDS-PAGE) de proteínas obtenidas de vellosidades humanas (M.V.H.) y de las líneas celulares Hep-2 y Caco-2. **(A)** Tinción con azul de coomassie mostrando la distribución de las proteínas entre las fracciones membranales (P) y citosólicas (S). **(B)** Autorradiografía mostrando la adherencia de la bacteria marcada radioactivamente a proteínas obtenidas de vellosidades y células Hep-2 y Caco-2.

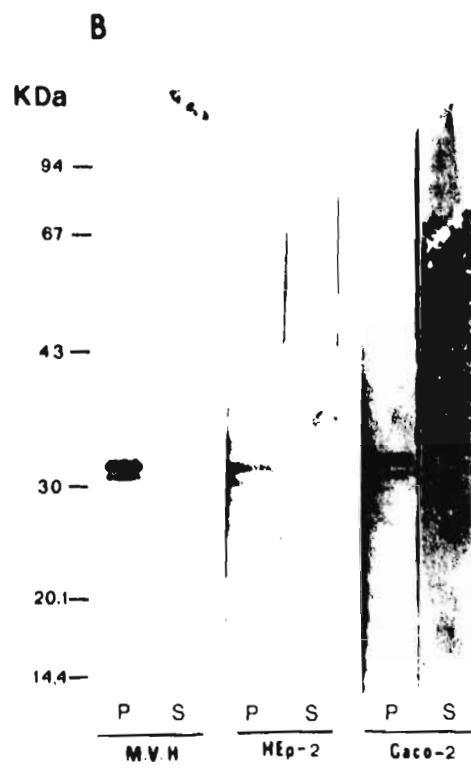
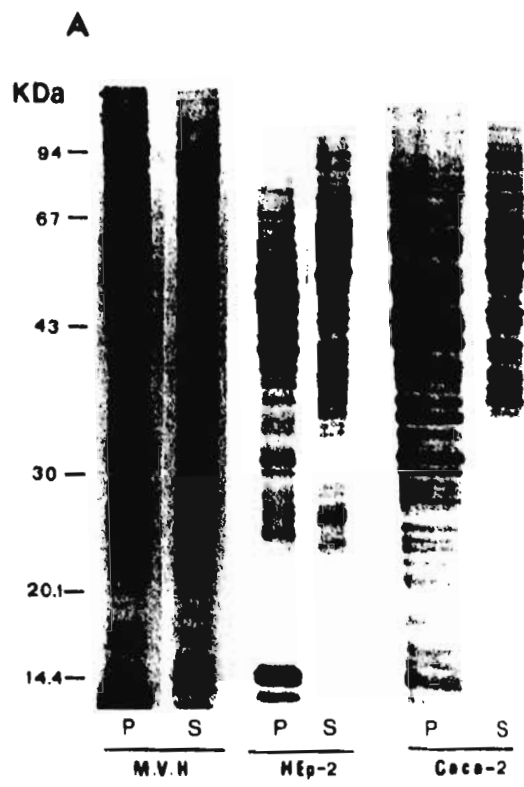
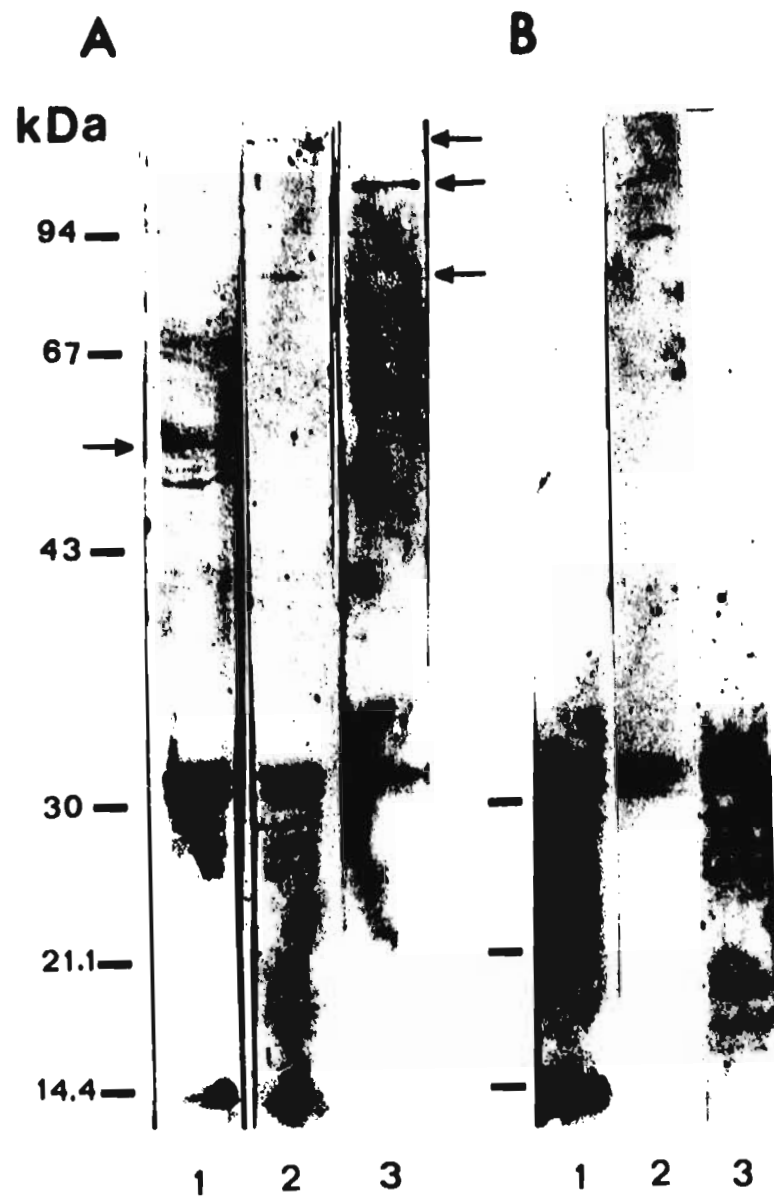


Figura. 2.- Autorradiografía que demuestra el reconocimiento de cepas EPEC a fracciones de vellosidades intestinales humanas separadas por SDS-PAGE. **A)** Cepas de diferentes serotipos. Carril 1. B171 (0111:HMN), Carril 2. 88255 (OR:H6), Carril 3, 2036/80 (0119). **B)** Unión de EPEC (cepa E2348/69) a: fracciones de vellosidades intestinales (carril 1); fracción de moco intestinal (carril 2); fracción membranal de vellosidades sin inhibidores de proteasas (carril 3). Las flechas señalan la posición de las bandas de alto peso molecular reconocidas por las diferentes cepas de EPEC.



Cepas de *E. coli* que tienen patrón de adherencia a células HEp-2 distinto al localizado denominado adherencia difusa y agregativa también reconocieron las proteínas de 32 y 33 kDa. Sin embargo, la intensidad de las bandas es mucho menor en comparación con el grupo de cepas con patrón de adherencia localizada. Las cepas agregativas mostraron la intensidad más baja (Fig 3).

Después de los resultados iniciales con cepas prototipo de diferentes patrones de adherencia a células HEp-2, se realizaron ensayos adicionales con 20 cepas de *E. coli* aisladas de niños con diarrea y caracterizadas por su capacidad para adherirse mediante patrones definidos a células HEp-2 (los resultados se resumen en la tabla 1). Nuevamente, detectamos que sin importar su patrón de adherencia, todas las cepas con esta capacidad reconocieron las proteínas de 32 y 33 kDa obtenidas de vellosidades humanas y de cerdo, mientras que las 4 cepas no adherentes no reconocieron dichas proteínas. Las proteínas de 32 y 33 kDa fueron detectadas en las vellosidades provenientes de intestino delgado (duodeno y yeyuno) de infantes, 1-12 meses y adultos de 40-60 años.

Las cepas mutantes JPN15, MAR20, que no poseen el plásmido EAF (del inglés *E. coli* adherence factor), el cual está asociado con la adherencia localizada de cepas EPEC y CVD206 la cual carece del gen *eae* que codifica para la adherencia íntima, reconocieron las proteínas de 32 y 33 kDa, existiendo la posibilidad de que no solo estos genes están involucrados en la adherencia bacteriana (Tabla 2).

Al realizar experimentos utilizando *Salmonella typhimurium* y *Vibrio cholerae* cuya adherencia a células HEp-2 fue negativa e inespecífica respectivamente, no reconocieron a las proteínas de 32 y 33 kDa. Por otro lado el género *Shigella* que es el más cercano y parecido a *E. coli*, reconoció solamente la proteína de 32 kDa y su adherencia a células HEp-2 fue escasa (Tabla 3).

Figura. 3.- Cepas de *E. coli* con diferentes patrones de adherencia reconocen las proteínas de 32-33 kDa provenientes de vellosidades de intestino humano. Adherencia localizada (LA), adherencia difusa (DA) y adherencia agregativa (AggA). *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) serotipo 0157:H7 y una cepa no adherente (NA) HB101.

KDa

203—

105—

70—

43—

29—

18—

LA

DA

A₈₈A

EHEC

NA



TABLA 1

**ADHERENCIA DE CEPAS DE *E. coli* A LAS
PROTEINAS PROVENIENTES
DE VELLOSIDADES INTESTINALES HUMANAS**

CEPA	SEROTIPO	PATRON DE ADHERENCIA	ADHERENCIA A LAS PROTEINAS			
			33 Y 32 kDa	60 - 80 kDa	100 - 130 kDa	180 - 200 kDa
E2348-69	O127:H6	AL	+	+	+	+
203680	O119:	AL	+	-	+	+
88255	OR:H6	AL	+	+	+	+
E851	O142:H6	AL	+	+	-	-
B171	O111:NM	AL	+	+	-	-
87365	O40:H18	AD	+	-	-	-
88126	O130:H26	AD	+	-	+	+
88128	O15:H29	AD	+	-	+	-
88160	O19:H4	AD	+	-	+	-
55784	O2:NM	AD	+	-	+	-
JPN10	O44:H18	AAGg	+	-	+	+
090053	O44:H18	AAGg	+	-	-	-
090052	O44:H18	AAGg	+	-	-	-
17.2	O3:H-	AAGg	+	-	-	-
E70324/8	O49766:H10	AAGg	+	-	+	-
380	OR:ND	NA	-	-	-	-
HB101	OR:ND	NA	-	-	-	-
88270	O157:H7	NA	-	-	-	-
89515	O20:H16	NA	-	-	-	-
89502	O?:H-	NA	-	-	-	-

AL Adherencia Localizada
AD Adherencia Difusa
AAGg Adherencia Agregativa
NA No Adherente

TABLA 2

Cepas Mutantes	Adh. a Células HEP-2	Proteínas de		Proteínas de alto peso molecular
		32 kDa	33 kDa	
CVD 206	<i>eae A</i>	+	+	-
MAR 20	sin plásmido EAF	+	+	110 - 125 kDa, 180 kDa
JPN 15	sin plásmido EAF	+	+	110 - 115 kDa

Reconocimiento a Proteínas de Membrana de Células HEP-2 por cepas mutantes de *E. coli*
 + Presente - Ausente

TABLA 3

Otras Bacterias	Adh. a Células HEP-2	Proteínas de	
		32 kDa	33 kDa
ETEC	+/-	+	+
<i>S. alphymurium</i>	-	-	-
<i>S. dysenteriae</i>	+/-	+	-
<i>V. cholerae</i>	inespecifica	-	-

Reconocimiento a Proteínas de Membrana de Células HEP-2 por otros miembros de la familia Enterobacteriaceae y Vibrionaceae.

3.1.3. Cepas de *E. coli* reconocen proteínas del moco que cubre la superficie celular del intestino

La fracción del moco crudo aislado del intestino delgado contiene las proteínas de 32 y 33 kDa pero en una cantidad muy baja. Estas proteínas representan aproximadamente el 5% de la cantidad detectada en la vellosidad intestinal (células epiteliales).

Para realizar esta comparación, se utilizó la misma cantidad de proteínas totales provenientes de cada fracción (microvellosidades y moco) en los ensayos de adherencia.

3.2. Tasa de adherencia

La concentración óptima de las proteínas de 32-33 kDa, para realizar el ensayo de adherencia sobre la nitrocelulosa fue establecido incrementando la cantidad de dichas proteínas. Las proteínas de 32-33 kDa previamente inmovilizadas sobre la nitrocelulosa se incubaron con 1×10^8 bacterias/ml marcadas radioactivamente, a 37°C por una hora. Se encontró que el grado de adherencia de la cepa de EPEC (E2348/69) fue dependiente de la concentración de la proteína. Así, a mayor concentración de la proteína de 32-33 kDa mayor fue la cantidad de bacterias unidas a las mismas (cuantificadas en cuentas por minuto en el contador de centelleo). Se eligió la concentración aproximada de 2 µg por carril de las proteínas de 32-33 kDa (previamente electroeluidas), para calcular la tasa de adherencia de las distintas cepas a dichas proteínas, para lo cual se utilizaron cepas de *E. coli* que mostraron adherencia localizada (E2348/69), difusa (55784) y agregativa (JPN10) (Fig. 4). Las proteínas de 32-33 kDa transferidas a membranas de nitrocelulosa, se incubaron con las bacterias a una concentración de 1×10^8 CFU/ml a diferentes intervalos de tiempo de 10, 20, 40, 60, 90 y 120 minutos. Se encontró que la tasa de adherencia de las cepas localizada,

difusa y agregativa a las proteínas de 32-33 kDa fue lineal, aproximadamente de 800, 200 y 71 bacterias por minuto, respectivamente (fig. 5).

Cuando se realizó un estudio comparativo de cinética de adherencia bacteriana entre las proteínas de 32-33 kDa provenientes de células HEp-2 y vellosidades humanas, se observó que a los 10 minutos EPEC reconoció dichas proteínas en vellosidades humanas, mientras que en células HEp-2 no se observó reconocimiento bacteriano, sino hasta los 20 minutos (Fig. 5). El reconocimiento de EPEC a las proteínas de 32-33 kDa de vellosidades humanas fue mucho mayor que a las células HEp-2 (Fig 5).

3.3. Efecto del pH y temperatura en el proceso de adherencia

El reconocimiento bacteriano a las proteínas de 32 y 33 kDa fue independiente tanto del pH como de la composición iónica utilizada en el ensayo de adherencia. El pH utilizado en los experimentos fue de 4.2, 7.0 y 10.0. Aunque la unión a las proteínas fue independiente de la temperatura durante el desarrollo del ensayo, la adherencia bacteriana se redujo un 40% cuando la bacteria fue crecida a temperatura ambiente (24°C), el crecimiento de la bacteria en medio mínimo esencial (MEM) no interfirió en el reconocimiento a las proteínas de 32 y 33 kDa.

Figura 4.- Tasa de adherencia de cepas de *E. coli* con patrones de adherencia localizada (O), difusa (Δ) y agregativa (\diamond), a las proteínas de 32-33 kDa previamente inmovilizadas en membranas de nitrocelulosa. Cada punto fue determinado de la media de tres ensayos.

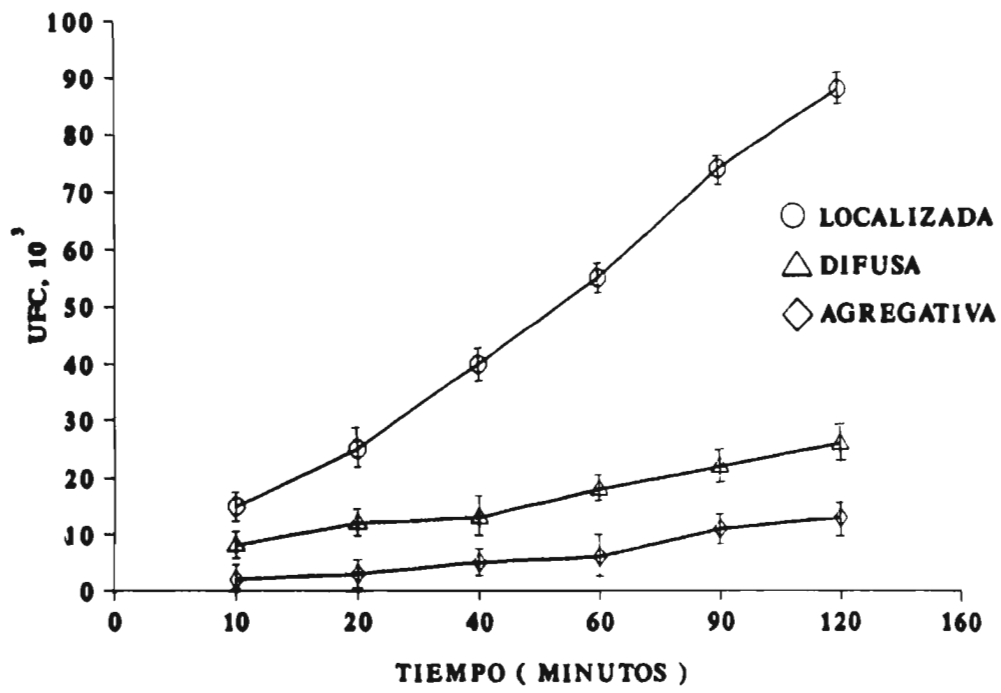
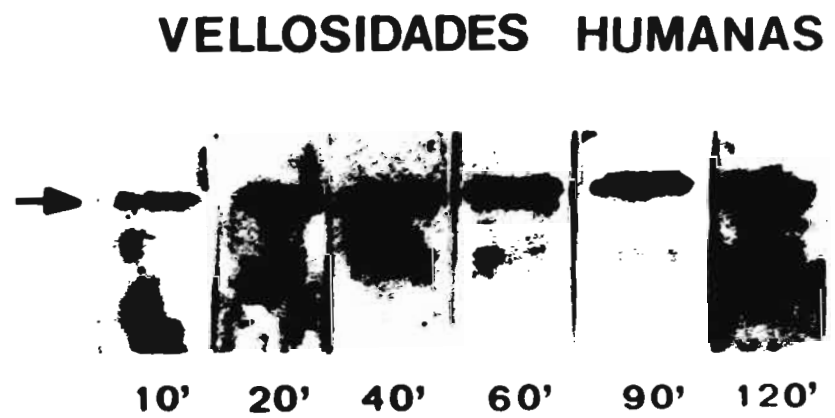
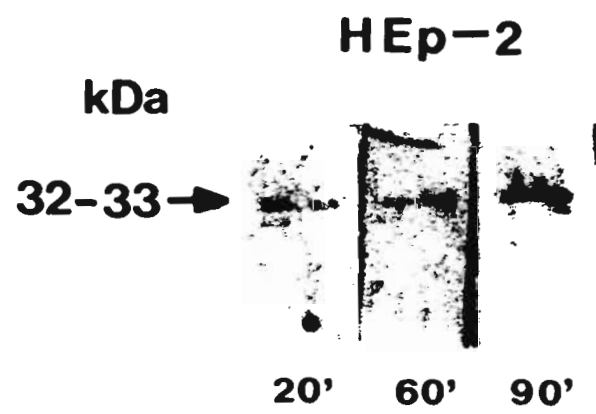


Figura 5.- Estudio comparativo de cinética de adherencia de EPEC (cepa E2348/69) a las proteínas de 32-33 kDa, provenientes de células HEp-2 y vellosidades humanas.



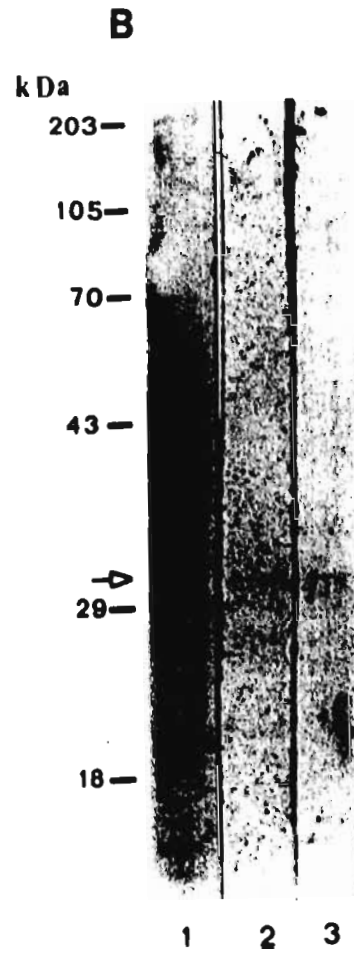
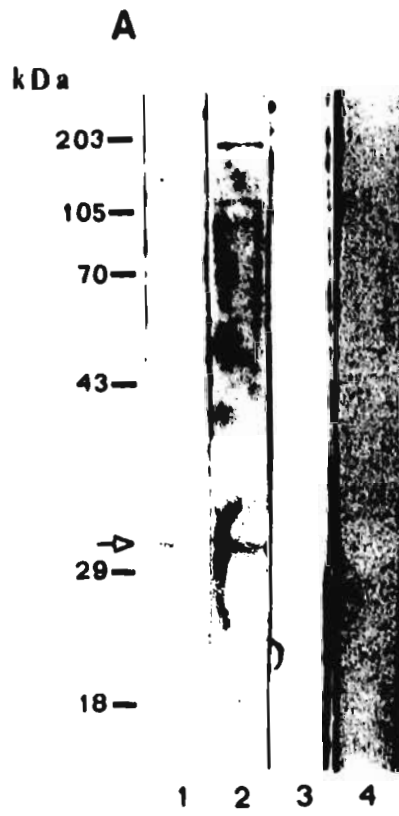
3.4. Evidencia de que las proteínas que reconoce EPEC son integrales de membrana

Las proteínas de 32 y 33 kDa no fueron removidas cuando las membranas de células HEp-2 se incubaron con soluciones isosmóticas a pH altamente alcalinos que liberan proteínas periféricas, lo cual indica que estas proteínas probablemente se encuentran intercaladas en la bicapa lipídica de la membrana celular (Fig. 6 A). También se utilizó un método completamente distinto para separar proteínas integrales de las periféricas utilizando la división de fases con Triton X-114. Las proteínas de 32 y 33 kDa no fueron encontradas en la fase acuosa donde generalmente se localizan las especies hidrofílicas, como las proteínas periféricas (Fig. 6 A).

Posteriormente se intentó solubilizar las proteínas con diversos detergentes como Tritón X-100, CHAPS (3[3-choramidapropyl]-dimethylaminoamonio]-1-propane-sulfonate), deoxicolato de sodio y sarkosyl. Los resultados mostraron que sarkosyl fue el detergente que solubilizó mejor las proteínas de los polipéptidos de bajo peso molecular de 16 y 17 kDa.

Al realizar ensayos utilizando el sobrenadante bacteriano (medio donde proliferó la bacteria) e incubarlo con las membranas de nitrocelulosa no se observó ningún reconocimiento por parte de EPEC a las proteínas de 32 y 33 kDa. De tal forma que es la bacteria la que interactúa con las proteínas inmovilizadas en la nitrocelulosa y no un producto de la bacteria liberado al medio (Fig. 6 B).

Figura 6.- Detección de las proteínas de 32-33 kDa como proteínas integrales de membrana celular. **A)** carril 1, Fracción de proteínas integrales de membrana celular tratadas con solución de carbonatos; carril 2, Fracción de proteínas integrales de membrana celular tratadas con Triton X-114; carril 3 y 4, fracción de proteínas periféricas de membrana celular. **B)** Demostración de que productos bacterianos liberados al medio de cultivo no reconocen a las proteínas de 32-33 kDa. Carril 1, control positivo (bacterias); carril 2 y 3, sobrenadante bacteriano.



3.5. Caracterización de las proteínas de 32 y 33 kDa

3.5.1. Punto isoeléctrico de las proteínas de 32-33 kDa

Para caracterizar a las proteínas de 32-33 kDa se determinó su punto isoeléctrico mediante electroforesis en geles de dos dimensiones el cual fue de 5.58 además dichas proteínas aparecieron como un solo punto en la electroforesis en geles de dos dimensiones (fig. 7).

3.5.2. Eliminación de lípidos de las proteínas de 32-33 kDa

Para caracterizar la naturaleza de las proteínas de 32 y 33 kDa se removieron los lípidos de las vellosidades intestinales humanas mediante repetidas extracciones con cloroformo-metanol. Se encontró que dicha extracción no interfirió con la unión de las bacterias a las proteínas de 32 y 33 kDa en el ensayo, lo cual indica que estas estructuras no contenían lípidos que participen en la adherencia (Fig 8, carril 8). La naturaleza proteica de las proteínas de 32 y 33 kDa fue confirmada por digestión de las vellosidades intestinales con proteinasa K, la cual eliminó completamente la actividad de adherencia bacteriana. (Fig. 8, carril 7).

3.5.3. Deglicosilación y oxidación de azúcares de las proteínas de vellosidades humanas

El papel que juegan los carbohidratos fue investigado mediante el tratamiento de las proteínas de vellosidades intestinales con *meta*-periyodato de sodio. La oxidación de los azúcares por este procedimiento eliminó un 90% la adherencia de las cepas de *E. coli* a las proteínas de 32 y 33 kDa (Fig.8, carril 3). Se observó además un 80% de inhibición a la adherencia cuando las proteínas de vellosidades fueron incubadas con endoglicosidasa H y glicosidasa F (PNGase), enzimas que hidrolizan residuos de N-acetyl (C)Asn(GlcNAc)₂(Man)₂ (Fig. 8 carril 2), indicando que estas estructuras se encuentran probablemente glicosiladas y que las cepas de *E. coli* se adhieren directamente a los carbohidratos que poseen la proteínas.

Figura 7. Proteínas de 32-33 kDa en electroforesis en geles de dos dimensiones: 1) Proteína de 32 kDa, 2) Proteína de 33 kDa.

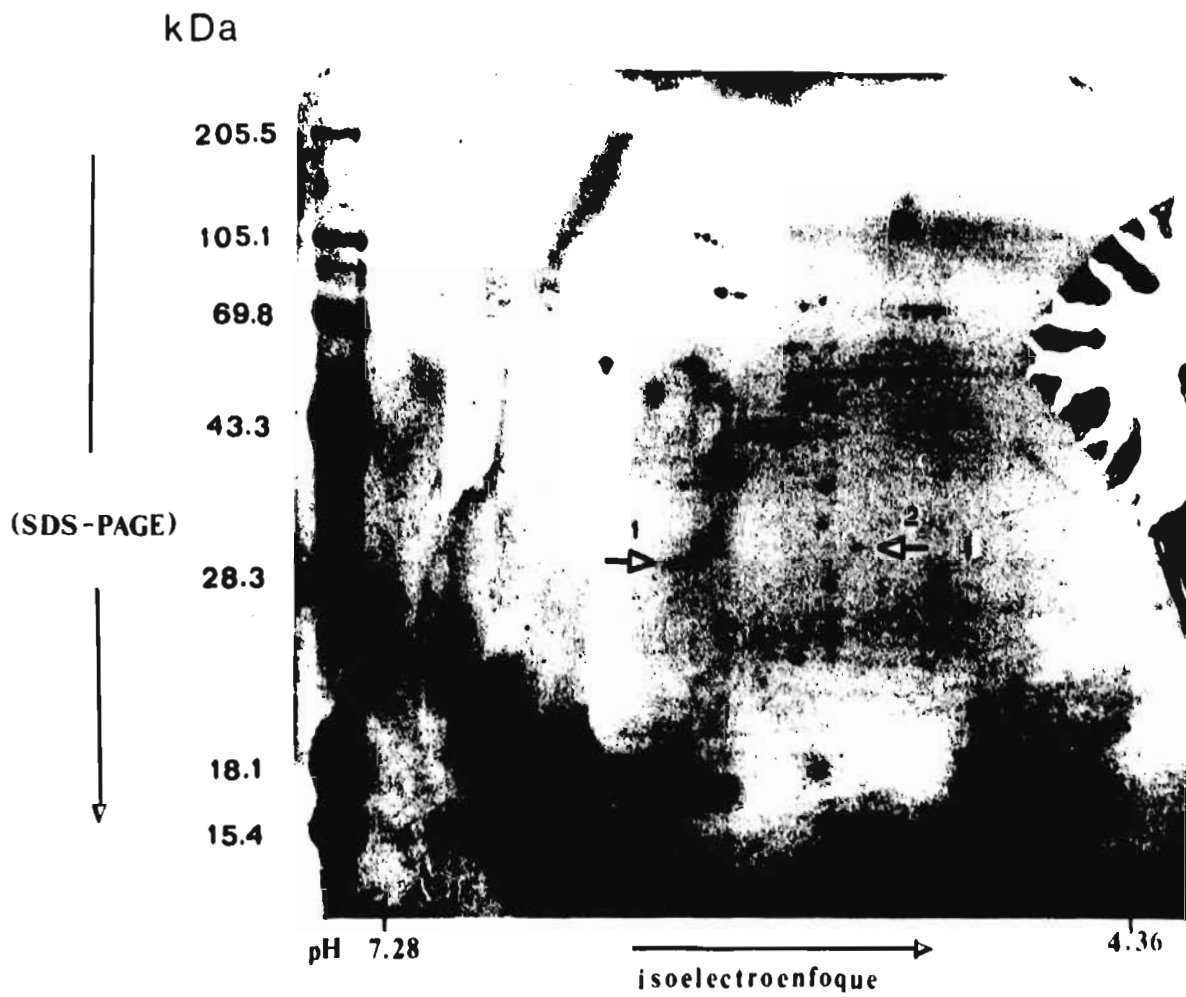
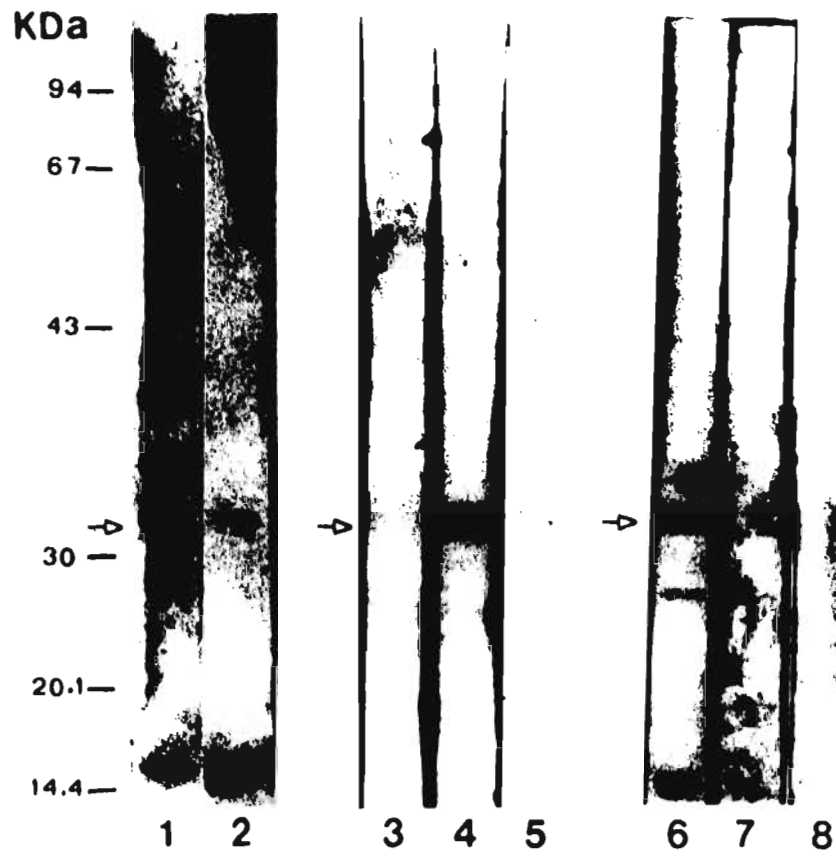


Figura 8.- Desglicosilación con endoglicosidasa H, oxidación con *meta*-periodato de sodio, digestión con proteinasa K y delipidización de las vellosidades intestinales humanas e incubadas con la cepa E2348/69 (EPEC) después de los diversos tratamientos. Carril 1, no deglicosilada (control); carril 2, deglicosilada; carril 3, oxidada; carril 4, no oxidada; carril 5, inhibición de la adherencia de EPEC con oligosacáridos de calostro humano; carril 6, no tratadas (control); carril 7, digestión con proteinasa K; carril 8, tratamiento de delipidización.



Se realizaron estudios preliminares para determinar que estructura de carbohidratos están involucrados en el reconocimiento de las bacterias a las proteínas de 32 y 33 kDa. Para esto se efectuaron ensayos de inhibición a la adherencia bacteriana con los siguientes monosacáridos D-galactosa, L-fucosa, D-fucosa, D-glucosa, lactosa, raffinosa, D-manosa, N-acetilglucosamina y N-acetilgalactosamina a una concentración de 0.1 M, los cuales no inhibieron la adherencia de EPEC a las proteínas de 32 y 33 kDa. En contraste fracciones de oligosacáridos obtenidas de leche materna de mujeres en períodos de lactancia sí produjeron una notable inhibición de la adherencia bacteriana aproximadamente del 95% (Fig. 8, carril 5). Esto nos indicaría que EPEC se adhiere a un conjunto de carbohidratos y no posee especificidad por uno en especial.

3.6. Proteínas de superficie de EPEC reconocen a las proteínas de 32 y 33 kDa

Proteínas asociadas a superficie de EPEC desprendidas por sonicación se adhirieron a las proteínas de 32 y 33 kDa previamente inmovilizadas sobre la membrana de nitrocelulosa. Dichas proteínas habían sido obtenidas de vellosidades humanas, separadas por electroforesis (SDS-PAGE) y transferidas a membranas de nitrocelulosa, donde fueron incubadas con los apéndices bacterianos marcados radioactivamente. El análisis de estas proteínas bacterianas por electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) mostró el peso molecular aparente de los polipéptidos que reconocieron a las proteínas de 32 y 33 kDa, el cual fue de 27-30 y 150 kDa y con menor intensidad se observó una banda de 19 kDa (Fig 9). El reconocimiento de estas proteínas bacterianas se efectuó en presencia de manosa al 1%, lo cual indica que las mismas no corresponden a la fimbria tipo 1. El análisis de las proteínas bacterianas en cromatografía líquida por filtración en gel, (condiciones no desnaturizantes) reveló que los polipéptidos de 27-30 kDa eluyeron en una fracción que

correspondió a un peso molecular muy parecido al encontrado en los geles de poliacrilamida. En contraste con el resto de los polipéptidos que eluyeron en fracciones que correspondieron a pesos moleculares muy distintos a los encontrados en los geles de poliacrilamida.

3.7. Ensayos de inhibición a la adherencia bacteriana utilizando las proteínas de 32 y 33 kDa

Las proteínas de 32-33 kDa fueron obtenidas de vellosidades de intestino humano, separadas por electroforesis (SDS-PAGE) aisladas mediante electroelución para determinar si las mismas pueden bloquear la la adherencia de la bacteria a las células HEp-2. La incubación de las cepas de *E. coli* con 10.0 µg/ml de las proteínas de 32-33 kDa, antes de realizar el ensayo de adherencia, redujo significativamente la adherencia bacteriana a las células HEp-2 en diferente proporción dependiendo del patrón de adherencia bacteriana. (Tabla 4). La cepa E2348/69 de adherencia localizada, presenta el más alto porcentaje de inhibición (86.7%), (fig. 10); seguida por la cepa JPN10 de adherencia agregativa (44.3%), (fig.11); y por último la cepa de adherencia difusa 55784 (18.3%), (fig.12). La inhibición de la adherencia de *E. coli* no fue debida a la falta de viabilidad de la bacteria puesto que se encontró similar contaje de colonias tanto en las cepas incubadas con las proteínas de 32-33 kDa, incubadas en PBS o en los controles antes de la inoculación de las monocapas de células HEp-2. Los controles utilizados fueron proteínas obtenidas por el mismo proceso de electroelución que la proteínas de 32-33 kDa, de tal manera que, el proceso de aislamiento utilizado no produjo daño a la bacteria ni tampoco a las células no infectadas.

Figura 9.- Autorradiografía de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) de proteínas asociadas a superficie bacteriana (adhesinas) de EPEC (cepa E2348/69) que se unen a las proteínas de 32 y 33 kDa previamente inmovilizadas en nitrocelulosa. **A)** Proteínas de superficie bacteriana totales, **B)** y **C)** Proteínas de superficie bacteriana que se unen a las proteínas de 32-33 kDa. Las flechas indican las proteínas con un peso molecular aparente de 17, 27-28 y 150 kDa.

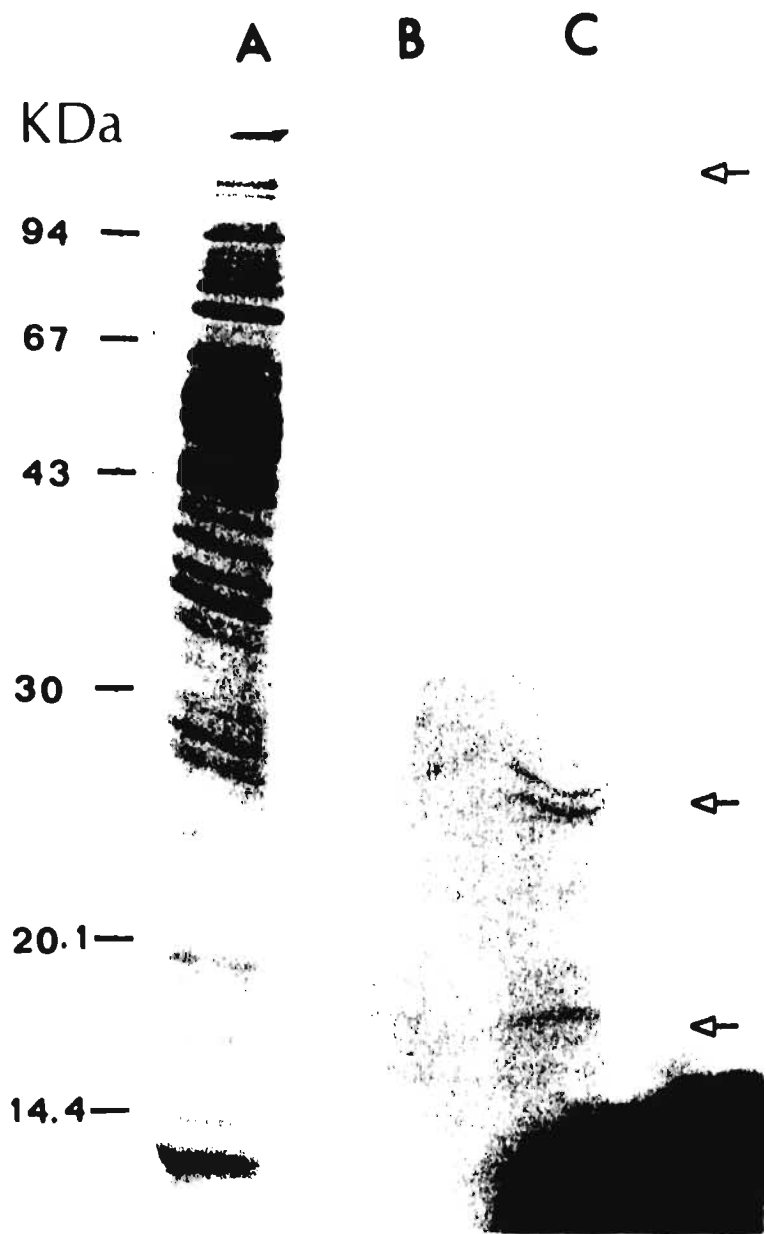


Figura 10.- Inhibición de la adherencia de EPEC (cepa E2348/69) a células HEp-2 por las proteínas de 32-33 kDa. **a)** control positivo y **b)** Ensayo con 10 µg/ml de las proteínas de 32-33 kDa.

d



b

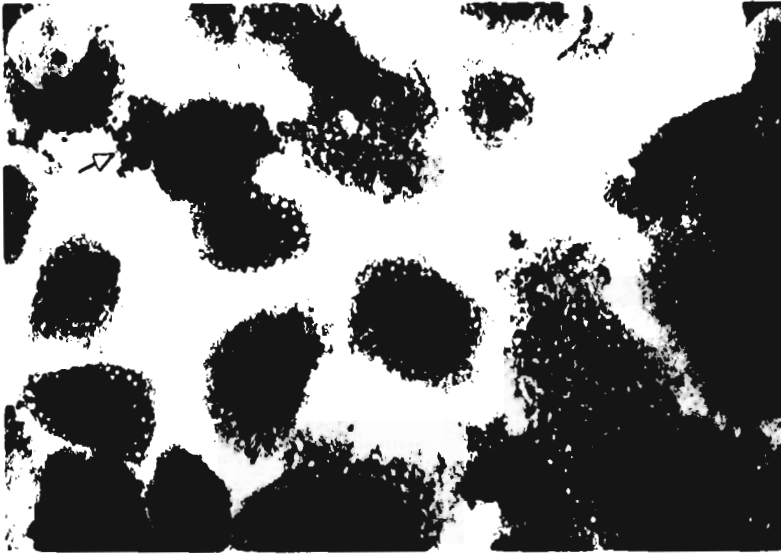
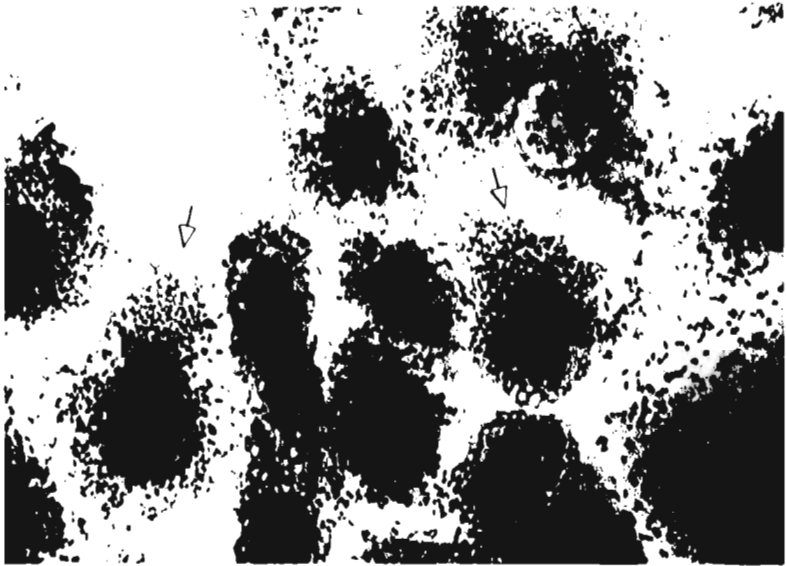


Figura. 11.- Inhibición a la adherencia de la cepa 55784 (difusa) a células Hep-2 con las proteínas de 32-33 kDa. **a)** control positivo y **b)** Ensayo con 10 µg/ml de las proteínas de 32-33 kDa.

d



b

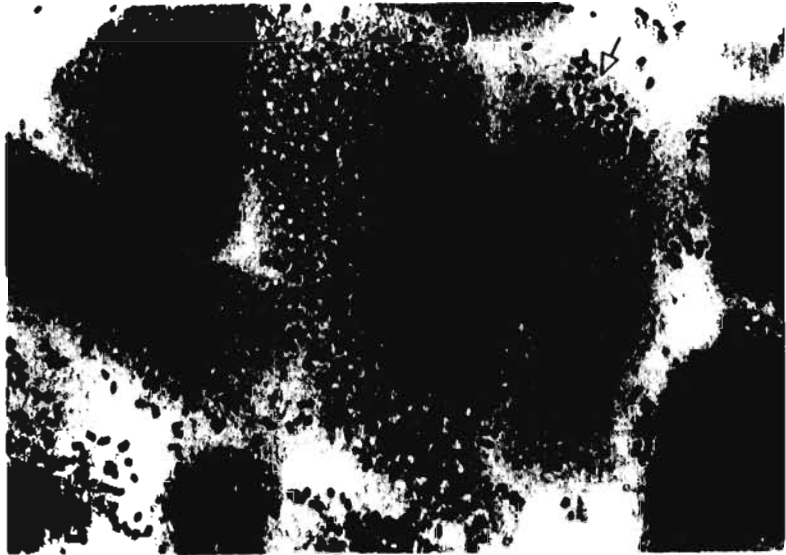


Figura 12.- Inhibición de la adherencia de la cepa JPN10 (agregativa) a células HEp-2 con las proteínas de 32-33 kDa. **a)** control positivo y **b)** Ensayo con 10 µg/ml de las proteínas de 32-33 kDa.



Tabla 4

**Inhibición de la Adherencia de E. coli a células HEp-2 por las
Proteínas de 32 - 33 kDa**

Cepa	Tipo de Adherencia	% de Inhibición de la Adherencia por Proteínas de 32 - 33 KDa	
		5 μg / ml	10 μg / ml
E2348 / 69	Localizada	28.7 (\pm 2.26)	86.7 (\pm 2.50)
55784	Difusa	7.9 (\pm 3.10)	18.5 (\pm 2.08)
JPN10	Agregativa	17.6 (\pm 2.12)	44.3 (\pm 3.1)

Los controles se tomaron como cero por ciento de Inhibición y consistió en proteínas que pasaron por el mismo proceso de aislamiento que las proteínas de 32 - 33 kDa. Los resultados corresponden al promedio \pm de la desviación estandar de tres experimentos ($p < 0,05$).

Sección 4: DISCUSION

El análisis de las vellosidades y del moco intestinal humano indican que varias proteínas se encuentran involucradas en la adherencia de *E. coli* a la superficie del intestino delgado. Las vellosidades intestinales humanas poseen dos proteínas de peso molecular aproximado de 32 y 33 kDa a las cuales se adhirieron las cepas de *E. coli*. Polipéptidos adicionales de peso molecular aproximado de 50-70, 105-130 y 180-200 kDa también fueron reconocidos por las bacterias, aunque con menor intensidad y consistencia que las proteínas de 32-33 kDa. La preparación de las vellosidades mantenida a 37°C sin inhibidores de proteasas permitió observar que aparecieron algunas bandas de bajo peso molecular de 26, 18, 12 kDa. Este efecto es atribuible probablemente a la presencia de productos de degradación de moléculas de mayor tamaño.

Staley and Wilson (1983) reportaron como receptores de las fimbrias de cepas K88 en microvellosidades de cerdo unas proteínas de alto peso molecular que se disocian en polipéptidos de 23 y 32-35 kDa en SDS-PAGE y en presencia de agentes reductores. De tal forma que las proteínas de 32-33 kDa podrían ser el resultado de una disociación de proteínas de alto peso molecular. El hecho de que varias proteínas de alto peso molecular junto con las proteínas de 32-33 kDa sean reconocidas por las bacterias de una misma cepa podría explicarse de diferentes maneras; una que todas estas proteínas compartieran epítomos entre ellas, otra que las bacterias posean diferentes adhesinas capaces de reconocer distintas estructuras de unión en la célula, esto nos llevaría a pensar que existen varias moléculas tanto de origen bacteriano como epitelial que intervienen en el proceso de adherencia.

Al incubar las bacterias con las proteínas de 32-33 kDa la intensidad de las bandas fue mayor con las proteínas de las células Caco-2 que con las proteínas de células HEp-2. Esto probablemente se debe a que las células Caco-2 se derivan de carcinoma de colon humano y cuando crecen en cultivo celular forman monocapas de microvellosidades bien

diferenciadas aumentando de esta manera la superficie membranal (Svensson *et al*, 1991). Las propiedades morfológicas, funcionales y bioquímicas de las células Caco-2 se asemejan a las del intestino delgado (Svensson *et al*, 1991).

Otro hallazgo importante del estudio es la correlación que existe entre la capacidad de las cepas de *E. coli* de reconocer a las proteínas de 32-33 kDa en los experimentos de electrotransferencia y la habilidad de las bacterias para adherirse a las células HEp-2 en el ensayo de adherencia. Los resultados demostraron que independientemente del patrón de adherencia de *E. coli* a las células HEp-2, las cepas bacterianas (localizada, difusa y agregativa) fueron capaces de reconocer con diferente intensidad a las proteínas de 32-33 kDa. Lo cual indica que estas tres cepas con distinto patrón de adherencia probablemente poseen adhesinas en común que reconocen a la misma estructura celular. Como es el caso de la fimbria tipo I que se encuentra en la mayoría de las cepas de *E. coli* de intestino, similarmente la toxina pertussis y la adhesina FHA de *Bordetella pertussis* comparten secuencias homólogas que median la unión a las lactoceramidas, lo cual sugiere que estas dos proteínas se adhieren a la misma molécula en la célula hospedera (Finlay and Falkow, 1997).

Al investigar la afinidad que tienen las cepas con distinto patrón de adherencia a las proteínas de 32-33 kDa se encontró que la cepa E2348/69 de adherencia localizada se unió abundantemente a las proteínas de 32-33 kDa, la tasa de adherencia fue de 800 CFU/min, lo que significa aproximadamente seis veces más alta que la de difusa y agregativa. El patrón agregativo mostró la más baja afinidad a las proteínas de 32-33 kDa con una tasa de unión de 110 CFU/min seguida por la adherencia difusa (140 CFU/min). Estos resultados podrían explicar la preferencia de las cepas agregativas para colonizar el intestino grueso más que el delgado (Knutton, 1992; Yamamoto, 1991). Se ha propuesto que las cepas agregativas se adhieren más al moco que cubre el epitelio que a los enterocitos (Tzipori *et al*, 1992). La adherencia a la mucosa podría estar ayudada por los altos niveles de hidrofobicidad que presentan las cepas agregativas (Elliot and Nataro, 1995). La unión de las cepas agregativas

a la mucosa podría ser considerada poco específica e independiente de interacciones estereoespecíficas, si su adherencia dependiera de su hidrofobicidad.

La adherencia de las cepas con patrón difuso es heterogénea y varía de acuerdo a los niveles de adherencia a un blanco específico (Bilge, 1989). La cepa 55784 (difusa) se adhirió en gran número a las células HEP-2, cinco veces más que las bacterias de adherencia localizada, sin embargo su tasa de unión a las proteínas de 32-33 kDa fue baja en comparación a la tasa de adherencia localizada. Una explicación a estos resultados aparentemente contradictorios es que las cepas de adherencia localizada podrían utilizar a las proteínas de 32-33 kDa como la estructura principal de adherencia a las células epiteliales mientras que las cepas difusas utilizarían principalmente otras estructuras celulares (diferentes a las proteínas de 32-33 kDa) para unirse a la célula. Con estos resultados se puede especular que las proteínas de 32-33 kDa no son la principal molécula por la cual las cepas difusas se adhieren a las células. Las cepas de adherencia difusa probablemente expresan múltiples adhesinas capaces de interactuar con una variedad de estructuras celulares además de las proteínas de 32-33 kDa.

Los resultados obtenidos sugieren que las cepas de adherencia localizada poseen adhesinas que reconocen a las proteínas de 32-33 kDa en una proporción mayor que las cepas con adherencia difusa y agregativa. Aparentemente cada cepa de *E. coli* (localizada, difusa y agregativa) se une a más de una estructura celular dependiendo del tipo de adhesinas que posea. Una de las principales características de las adhesinas de *E. coli* es la de poseer diferente especificidad de unión al epitelio intestinal. (Sharon and Lis, 1993). Los patrones característicos de adherencia de *E. coli* (localizada, difusa y agregativa) podrían deberse principalmente a la interacción bacteria-bacteria, más que a una interacción entre bacteria-célula; de tal forma puede plantearse que no existe un receptor único y específico para cada patrón de adherencia. La formación del agrupamiento bacteriano que da lugar a la adherencia localizada o microcolonias parece ser debido al reclutamiento de las bacterias que están próximas unas con otras, que se unen mediante los BFP y que se encuentran en

las cercanías de la célula epitelial, antes de unirse a la misma. Se ha observado mediante microscopía de barrido que estructuras parecidas a los BFP unen a las bacterias unas con otras (Girón, 1996). Por otro lado se han identificado antígenos fimbriales codificados en plásmidos, AAF/I y AAF/II, los cuales median el fenotipo agregativo, aunque aún se desconoce si estas fimbrias están involucradas en la adherencia de la bacteria a la célula (Elliot and Nataro, 1995). Análisis de microscopía inmunoelectrónica muestran que las cepas enteroagregativas poseen una proteína de 38 kDa que no se encuentra en las cepas EPEC, cuando la proteína fue extraída con cloruro de litio, las cepas perdieron su patrón de adherencia agregativo aunque continuaban adhiriéndose las células HEP-2 (Wai *et al*, 1996). De tal forma que pueden existir proteínas que median los diferentes patrones de adherencia y ser independientes de las proteínas que intervienen en la adherencia directa de la bacteria a la célula.

La adherencia de la cepa con patrón localizado a la mucosa intestinal está probablemente mediada por las proteínas de 32-33 kDa principalmente y en menor proporción por otras estructuras celulares aún no identificadas. Esta idea está apoyada por experimentos de inhibición a la adherencia en células HEP-2, donde se demuestra que las proteínas de 32-33 kDa, bloquearon la adherencia bacteriana. La cepa con patrón localizado presentó el porcentaje más alto de inhibición a la adherencia cuando fue incubada con las proteínas de 32-33 kDa. Estos experimentos proporcionan evidencias de que las proteínas de 32-33 kDa son probablemente el principal receptor celular al cual *E. coli* con adherencia localizada se une. Interesantemente las proteínas de 32-33 kDa parecen ser utilizadas en mucha menor proporción como estructuras de unión por las cepas con adherencia difusa y agregativa de acuerdo con la escasa inhibición a la adherencia observada, indicando que estas cepas se unen principalmente a otros receptores en la superficie celular. Interesantemente la adhesina FHA de *Bordetella pertussis* se une con diferente afinidad a varias moléculas presentes en la célula hospedera, (Finlay and Falkow, 1997). Tres variantes de adhesinas de PapG, (G-I, G-II y G-III), reconocen tres receptores de Gal α -(1-

4)-Gal de los glicolípidos presentes en el tracto urinario superior, los cuales se encuentran muy relacionados entre ellos. (Hultgren *et al*, 1993), (Finlay and Falkow, 1997). Podemos concluir que las cepas de *E. coli* con diferentes patrones de adherencia comparten uno o más receptores en la mucosa intestinal y la afinidad por dichos receptores podría variar de una cepa a otra.

La presencia de las proteínas de 32-33 kDa en el moco crudo podría asegurar la adherencia inicial de *E. coli* facilitando de esta manera la colonización del intestino humano. Estas proteínas podrían ser producidas y secretadas por las células de goblet y liberadas al lumen del intestino desde las vellosidades. No podemos evaluar, hasta la fecha, el significado biológico de la presencia de estas proteínas tanto en el moco como en las vellosidades intestinales.

La extracción de los lípidos de las vellosidades intestinales no interfirió con la capacidad adhesiva de las cepas ensayadas, es decir de reconocer a las proteínas de 32-33 kDa, lo cual indica que estas estructuras no contienen lípidos que participen en la adherencia. La naturaleza proteica de las moléculas de 32-33 kDa fue confirmada mediante la digestión de las vellosidades intestinales con proteinasa K, la cual eliminó totalmente la actividad de adherencia bacteriana.

Mediante la incubación de las proteínas de 32-33 kDa con endoglicosidasas (enzimas que hidrolizan el azúcar ligado a las proteínas) y la oxidación de azúcares con *meta*-periodato de sodio (compuesto químico que altera la conformación estereoquímica de los azúcares), se redujo considerablemente la adherencia bacteriana (más del 90%), indicando así que estas proteínas se encuentran glicosiladas y que su unión a la bacteria se encuentra mediada por carbohidratos. Estos resultados se suman a hallazgos previos donde los oligosacáridos de microvellosidades participan en la adherencia de un gran número de enterobacterias (Hercovics and Bugge, 1980).

Cuando se trató de inhibir la unión de las bacterias a las proteínas de 32-33 kDa con monosacáridos tales como fucosa, manosa, glucosa, galactosa, lactosa, raffinosa o N-acetil-

galactosamina no se produjo inhibición. Se observó una disminución considerable de la adherencia únicamente cuando se incubaron las bacterias en presencia de oligosacáridos de leche materna humana. Cravioto y col. en 1991 demostraron que fracciones de oligosacáridos eran capaces de inhibir la adherencia de EPEC a células HEp-2. Lo cual parece indicar que la bacteria se unen a complejos de azúcares y no a un carbohidrato en particular, quizás debido a que las moléculas interaccionan unas con otras manteniendo su estructura tridimensional y de esta forma es como son reconocidas. Así la habilidad del carbohidrato de la célula eucarionte para actuar como sitio de adherencia, depende no solo del mismo carbohidrato, sino de su accesibilidad y su modo de presentación (Sharon and Lis, 1993).

Los pilis formadores de haces (BFP) descritos por Girón en 1991, los cuales están constituidos de varias subunidades de 19.5 kDa, se encuentran asociados preferentemente con la formación de la adherencia localizada. Cepas mutantes que no poseen el plásmido EAF que codifica para los BFP, pierden la adherencia localizada pero continúan uniéndose a la célula eucarionte (Donnenberg and Kaper, 1991). Se conoce que EPEC expresa una gran cantidad de antígenos fimbriales, entre los cuales los más ampliamente estudiados y caracterizados son los BFP, pero pueden existir otras fimbrias aún no descritas que pueden estar involucradas en la adherencia inicial de EPEC a la célula eucarionte. (Girón, 1996).

Al utilizar las proteínas de 32-33 kDa para tratar de inhibir la adherencia bacteriana se encontró que 10 µg/ml de dichas proteínas bloquearon en un 87% la adherencia de la cepa localizada a las células HEp-2. Lo cual era de esperarse ya que estas cepas presentaron la más alta tasa de reconocimiento a las proteínas de 32-33 kDa. (800 CFU/min). Por el contrario, las cepas difusas y agregativas que mostraron una tasa baja de reconocimiento a las proteínas de 32-33 kDa fueron inhibidas en menor grado (19 y 44% respectivamente) por la misma concentración de las proteínas de 32-33 kDa.

El análisis de las proteínas asociadas a superficie bacteriana desprendidas de EPEC por sonicación demostró que polipéptidos de 17, 27-30 y 150 kDa interactuaron de alguna

manera con las proteínas de 32-33 kDa provenientes de vellosidades intestinales. Los polipéptidos más prominentes de 27-30 kDa podrían ser adhesinas que no forman parte de complejos grandes como fimbrias ya que su peso molecular aproximado en SDS-PAGE fue muy similar al obtenido bajo condiciones no desnaturizantes (Cromatografía líquida por filtración en gel). Al respecto se conoce que algunas adhesinas pueden estar unidas directamente a la membrana externa de la bacteria (Ofek and Doyle, 1994), (Finlay and Falkow, 1997). El resto de los polipéptidos podrían formar complejos con fimbrias o ser subunidades de las mismas ya que su peso molecular fue distinto cuando los polipéptidos no estaban desnaturizados. Las proteínas de 27-30 kDa podrían ser las mismas que reportó Scaletsky como los mejores candidatos de membrana externa de EPEC responsables de la adherencia localizada a células epiteliales (Scaletsky *et al*, 1988). El peso molecular de las proteínas reportadas por Scaletsky es de 29 y 32 kDa. La metodología utilizada por Scaletsky para detectar dichas proteínas fue totalmente distinta a la que nosotros empleamos, y consistió básicamente en utilizar anticuerpos absorbidos que inhibieron la adherencia localizada para posteriormente identificar mediante inmunotransferencia las proteínas de 29 y 32 kDa que reconocieron tales anticuerpos.

La patogénesis de infecciones debido a EPEC ha sido considerada un enigma durante mucho tiempo. El primer contacto de la bacteria con el hospedero se realiza de manera no íntima debida a los BFP y posiblemente a otras proteínas fimbriales no descritas aún (Giron 1996); las proteínas de superficie bacteriana de 17, 27-30 y 150 kDa podrían ser algunas de estas proteínas. Después de esta primera interacción ocurren una serie de eventos de transducción de señales que resulta en un incremento de los niveles de calcio libre intracelular a los 20 minutos del contacto de la bacteria con la célula eucarionte (Knutton *et al*, 1996) producción de inositol fosfato (IP₃), presumiblemente por la hidrólisis del fosfatidil inositol bifosfato (PIP₂), el otro producto de la hidrólisis del PIP₂ es el diacilglicerol, aunque la producción de este lípido no ha sido demostrado experimentalmente, se conoce que el diacilglicerol activa la proteincinasa C que es

dependientes de calcio (Crane and Oh, 1997). Baldwin en 1990 y Crane en 1997 demostraron que la infección con EPEC a células HEp-2 produce activación de proteincinasa C, (Baldwin *et al*, 1990), (Crane and Oh, 1997), fosforilación de proteínas en serina y treonina, probablemente por la activación de la proteincinasa C (Manjarrez-Hernandez *et al*, 1992), (Manjarrez-Hernandez *et al*, 1996); también ocurre una fosforilación en tirosina de una proteína de 90 kDa (Hp90) en células HeLa, esta fosforilación es dependiente de dos proteínas secretadas por EPEC denominadas EspA y Esp B (Jarvis *et al*, 1994) (Kenny *et al*, 1995); la Hp90 fosforilada se une a la intimina, una proteína de 94 kDa que se encuentra en la membrana externa de EPEC, la cual media la adherencia íntima de la bacteria al epitelio intestinal; esta unión intimina-Hp90 induce la formación de pseudópodos de actina en el hospedero (Rosenshine *et al*, 1996), y fosforilación en tirosina de la Hp150 una proteína que presenta homología con la fosfolipasa C- γ 1 (Kenny and Finlay, 1997), la intimina participa además en la acumulación de otros elementos de citoesqueleto. Toda esta serie de eventos de transducción de señales conduce a un esfacelamiento de las microvellosidades intestinales y a la formación de la estructura de pedestal en la membrana del hospedero (Kaper *et al*, 1996). La fosforilación de la proteína de 90 kDa se detectó después de dos horas de la infección de EPEC a las células HeLa (Rosenshine *et al*, 1992). De acuerdo a nuestro estudio de cinética de adherencia, EPEC reconoció a las proteínas de 32-33 kDa después de 5 minutos de incubación. Estos resultados son interesantes por dos razones: La primera es que las proteínas de 32-33 kDa podrían ser el primer sitio de adherencia de EPEC durante el proceso de infección o colonización y la segunda es que, podrían dar la pauta para desencadenar los eventos de transducción de señales mencionados. De tal forma que, evitar la unión de la bacteria a estas proteínas bloquearía de alguna manera el inicio del proceso de infección.

De los resultados hasta ahora obtenidos podemos concluir que las vellosidades de intestino humano poseen dos proteínas de peso molecular aproximado de 32-33 kDa que

son reconocidas con mayor intensidad por cepas de *E. coli* enteropatógena con adherencia localizada.

La unión de la bacteria a las proteínas de 32-33 kDa se encuentra mediada por carbohidratos complejos (oligosacáridos).

La participación de las glicoproteínas de 32-33 kDa como hipotéticos receptores es más activa para las cepas con adherencia localizada que para las cepas con adherencia difusa y agregativa.

Las cepas de *E. coli* que se adhieren a las células HEp-2, poseen adhesinas comunes además de sus propias adhesinas, las cuales facilitan la adherencia a la mucosa intestinal. El proceso de adherencia puede requerir la participación de múltiples constituyentes en la superficie de la célula eucarionte (receptores), que interaccionan de manera secuencial con adhesinas que se encuentran en la superficie bacteriana. Las glicoproteínas de 32-33 kDa pueden ser una parte importante de las estructuras que actúan como receptores de *E. coli*.

Debido a que la adherencia bacteriana es el primer paso para la infección y esta adherencia involucra lectinas que posee la bacteria que se unen a su carbohidrato complementario en la célula hospedera, se podría considerar la utilización de azúcares que inhiban selectivamente la adherencia bacteriana, interceptando al microorganismo patógeno antes de que este alcance a su célula blanco y de esta forma evitar la patogénesis de las enfermedades diarreicas.

REFERENCIAS

Abbas, A., A. H. Lichtman and J. Pober. 1995. Anatomía funcional de las respuestas inmunitarias locales y sistémicas. En: *Inmunología celular y molecular*. pag. 249-264.

Baldini, M.M., J. B. Kaper M. M. Levine, D. C. A. Candy, and H. W. Moon. 1985. Plasmid-mediated adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **45**:434-436.

Baldwin, T.J., S. F. Brooks, S. Knutton, H. A. Manjarrez-Hernandez, A. Aitken, and P.H. Williams. 1990. Protein phosphorylation by Protein Kinase C en HEP-2 cells infected with Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **58**:761-765.

Baldwin, T. J., W. Ward, A. Aitken, S. Knutton, and P.H. Williams. 1991. Elevation of intracellular free calcium levels in HEP-2 cells infected with Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**:1599-1604.

Baudry, B., S. J. Savarino, P. Vial, J. B. Kaper, and M. N. Levine. 1990. A sensitive and specific DNA probes to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J. Infect. Dis.* **161**:1249-1251.

Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.

Bilge, S. S., C. R. Clausen, W. Lau, and S. L. Modeley. 1989. Molecular characterization of a fimbrial adhesin, F1845, mediating diffuse adherence of diarrhea-associated

Escherichia coli to HEp-2 cells. J. Bacteriol. 71:4281-4289.

Bray, J. 1945. Isolation of antigenically homogenous strains of *Bact. coli. neapolitanum* from summer diarrhoea of infants. J. Pathol. Bacteriol. 57:239-247.

Crane, J.K. and J.S. Oh. 1997. Activation of host cell protein kinase C by enteropathogenic *Escherichia coli*. Infect. Immun. 65:3277-3285.

Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to traditional infantile enteropathogenic serotypes. Curr. Microbiol. 3:95-99.

Cravioto, A., A. Tello, H. Villafan, J. Ruiz, S. Del Vedovo, and J.-R. Neeser. 1991. Inhibition of localized adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells by immunoglobulin and oligosaccharide fractions of human colostrum and breast milk. J. Infect. Dis. 163:1247-1255.

Cravioto, A., and C. Eslava. 1992. Vacunas contra *Escherichia coli* causante de diarrea en humanos. pag. 493-501. En: Vacunas, Ciencia y Salud. Secretaría de Salud. Subsecretaría de Coordinación y desarrollo. México.

Cravioto, A., A. Navarro, and C. Eslava. 1996. Diarrea causada por cepa enterotoxigénicas de *Escherichia coli*, En: Enfermedades diarreicas en el niño. Torregosa L., Santos J.I., Rodríguez R., García J., Alpuche C. Hospital Infantil de México "Federico Gómez", S.S. Ed. Interamericana Mc-Hill. Décima Edición, México 1996.

Chart, H., B. Said, and B. Rowe. 1991. Linoleic acid inhibition of adhesion of

enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Lancet* **338**:126-127.

Cuatrecasas, P. 1974. Membrane receptors. *Annu. Rev. Biochem.* **43**:169-214.

Donnenberg, M. S., and J. B. Kaper. 1992. Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **60**:3953-3961.

Elliot, S. J. and J. P. Nataro. 1995. Enteroaggregative and diffusely adherent *Escherichia coli*. *Rev. Med. Microbiol.* **6**:196-206.

Faye, L., and Chrispeels. 1985. Characterization of *N*-Linked oligosaccharides by affinoblotting with concavalin A-peroxidase and treatment of the blots with glycosidases. *Anal. Biochem.* **149**:218-224.

Finlay, B. B. 1990. Cell adhesion and invasion mechanisms in microbial pathogenesis. *Curr. Opin. Cell. Biol.* **2**:815-820.

Finlay, B. B, and S. Falkow. 1997. Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**:136-169.

Foubister, V., I. Rosenshine, and B. Finlay. 1994. A diarrheal pathogen, enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), triggers a flux of inositol phosphates in infected epithelial cells. *J. Exp. Med.* **179**:993-998.

Gastra, W., and F. K. De Graaf. 1982. Host-specific fimbrial adhesins of noninvasive enterotoxigenic *Escherichia coli* strains. *Microbiol. Rev.* **46**:129-161.

Gamberg, C. G., and L. C. Anderson. 1982. Surface glycoproteins of malignant cells. *Biochem. Biophys. Acta.* **651**:65-83.

Giron, J. A., T. Jones, F. Millanuelasco. 1991. a) Diffuse-adhering *Escherichia coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in Mexico. *J. Infect. Dis.* **163**:507-513.

Giron, J. A., S. Y. Ho, and G. K. Schoolnik. 1991. b) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**:710-713.

Giron, J. A. 1996. Fimbriae of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Rev. Microbiol. Sao Paulo*, **27** (suppl. 1):72-76.

Harlow, E., and D. Lane. 1988. *Antibodies a Laboratory Manual*. Chapter 20. Cold Spring Harbor Laboratory, Box 100, Cold Spring Harbor, New York 11724.

Herscovics, A., B. Bugge, A. Quaroni and Kirch. 1980. Characterization of glycopeptides labelled from D-[2-3H] mannose and L-[6-3H] fucose in intestinal epithelial cell membranes during differentiation. *Biochem. J.* **192**:145-153.

Hultgren, S. J., S. Abraham, M. Caparon, P. Falk, J. Geme, and S. Normark. 1993. Pilus and nonpilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell.* **73**:887-901.

Jarvis, K.G., J.A. Giron, A.E. Jerse, T.K. McDaniel, M.S. Sonnenberg, and J.B. Kaper. 1995. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a specialized secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation.

Proc. Natl. Acad. USA **92**:7996-8000.

Kaper, J. B., T. McDaniel, and K. Jarvis. 1996. Molecular genetics of enteropathogenic *Escherichia coli*. Rev. Microbiol. Sao Paulo, **27** (suppl. 1):82-86.

Kenny, B., and B.B. Finlay. 1995. Secretion of proteins by enteropathogenic *E. coli* which mediate signaling in host epithelial cells. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **97**:7991-7995.

Kenny, B. and B.B. Finlay. 1997. Intimin-dependent binding of enteropathogenic *Escherichia coli* to host cells triggers novel signaling events, including tyrosine phosphorylation of phospholipase C- γ 1. Infect. Immun. **65**:2528-2536.

Knutton, S., D. R. Lloyd, and A. S. McNeish. 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal mucosa. Infect. Immun. **55**:69-77.

Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A. S. Mc Neish. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Infect. Immun. **57**:1290-1298.

Knutton, S., R. K. Shaw, M. K. Bhan, H. R. Smith, M. M. McConnell, T. Cheasty, P. H. Williams, and T. J. Baldwin. 1992. Ability of enteroaggregative *Escherichia coli* strains to adhere *in vitro* to human intestinal mucosa. Infect. Immun. **60**:2083-2091.

Knutton, S., G.K. Collington, T.J. Baldwin, R.D. Haigh, and P.H. Williams. 1996. Cellular responses to EPEC infection. 1996. Rev. Microbiol., Sao Paulo, **27** (suppl. 1):89-94.

Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)*. **227**:680-685.

Levine, M. M., E. J. Bergquist, D. R. Nalin, D. H. Waterman, R. B. Hornick, C. R. Young, S. Sotman, and B. Rowe. 1978. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet* **1**:1119-1122.

Lichtenberg, D., J. Robson, and E. A. Dennis. 1993. Solubilization of phospholipids by detergents: structural and kinetics aspects. *Biochem. Biophys. Acta* **737**:285-304.

Lior, H. 1994. Clasification of *Escherichia coli*. En: C. L. Gyles CAB International Wallingford Oxon Ox10 8DE. UK. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. pag. 31-72.

Magge, A. Y., L. Gutierrez, Y. A. McKay, C. J. Marshall, and A. Hall. 1987. Dinamic fatty acylation of p21^{N^{tr}}. *EMBO J.* **6**:3353-3357.

Manjarrez-Hernandez, H. A., T. J. Baldwin, A. Aitken, S. Knutton, and P.H. Williams. 1992. Intestinal epithelial cell protein phosphorylation in enteropathogenic *Escherichia coli* diarrhoea. *Lancet* **339**: 521-523.

Manjarrez-Hernandez, H.A., T. J. Baldwin, P.H. Williams, R. Haigh, S. Knutton, and A. Aitken. 1996. Phosphorylation of miosin light chain at distinct sites and its association with the cytoskeleton during enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect. Immun.* **64**:2368-2370.

Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Gianella. 1983.

Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* **41**:1340-1351.

Nataro, J. P., and M. M. Levine. 1994. *Escherichia coli* disease in humans. En: C. L. Gyles CAB International Wallingford Oxon Ox 10 8DE U. K. *Escherichia coli* in domestic animals and humans. pag. 285-333.

O'Farrell, P. H. 1975. *J. Biol. Chem.* **250**:, 4007.

Ofek, I., and R. Doyle. Bacterial lectins as adhesins. pag. 94-139. En: *Bacterial adhesion to cells and tissues.* 1° ed. 1994. Chapman & Hall (de.).

Ofek, I., H. Lis and N. Sharon. 1985. Animal cell surface membranes. En: Sarvage, D.C. and M. Fletcher (eds.), *Bacterial Adhesion* Plenum Publishing Corp., New York, pag. 71-88.

Polotsky, Y., E. Dragunsky and Th. Khavkin. 1994. Morphologic evaluation of the Pathogenesis of bacterial enteric infections. *Crit. Rev. Microbiol.* **20**:161-208.

Robins-Browne, R. M. 1987. Traditional enteropathogenic *Escherichia coli* of infantile diarrhea. *Rev. Infect. Dis.* **9**:28-53.

Rosenshine, I., M. S. Donnenberg, J. B. Kaper, and B. B. Finlay. 1992. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cells proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J.* **11**:3551-3560.

Rosenshine, I., and B. Finlay. 1993. Exploitation of host signal transduction pathways and cytoskeletal functions by invasive bacteria. *Bio. essays.* **15:**17-24.

Rosenshine, I., S. Ruschkowski, M. Stein, D. Reinscheid, S. Mills, and B. Finlay. 1996. A pathogenic bacterium triggers epithelial signal to form a functional bacterial receptor that mediates actin pseudopod formation. *EMBO. J.* **15:**2613-2624.

Rostand, K. S., and J. D. Esko, 1997. Microbial adherence to and invasion through proteoglycans. *Infect. Immun.* **65:**1-8.

Ryan, K. J., and S. Falkow. 1994. Enterobacteriaceae. pag. 321-344. En: *Medical Microbiology. An Introduction to infectious diseases.* Third Edition. Copyright 1994 by Appleton and Lange, 25 Van Zant Street, East Norwalk, Connecticut 06855.

Sack, R. B. 1980. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: identification and characterization. *J. Infect. Dis.* **142:**279-286.

Sansonetti, P. J. 1993. Bacterial pathogens, from adherence to invasion: comparative strategies. *Med. Microbiol. Immunol.* **182:** 223-232.

Saxon, M. L., Zhao, and J. D. Black. 1994. Activation of protein kinase C isozymes is associated with post-mitotic events in intestinal epithelial cells *In situ*. *J. Cell. Biol.* **126:**747-763.

Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **45:**534-636.

Scaletsky, I. C. A., A. R. Milani, L. Trabulsi, and L. Travassos. 1988. Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **56**:2979-2983.

Sharon, N. and H. Lis. 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science* **246**:227-234.

Sharon, N., and H. Lis. 1993. Carbohydrates in cell recognition. *Scientific American*. January. pag. 74-81.

Sayers, A. A., and D. D. Whitt. 1994. *Escherichia coli* gastrointestinal infections. En: American Society of Microbiology (eds). *Bacterial Pathogenesis a molecular approach*. A.S.M, 1325 Massachusetts Avenue, N.W. Washington D.C. 20005. pag. 190-203.

Staley, T. E., and I. B. Wilson. 1983. Soluble pig intestinal cell membrane component with affinities for *E. coli* K88 antigen. *Mol. Cell. Biochem.* **52**:177-189.

Svennerholm, L., and P. Fredman. 1980. A procedure for the quantitative isolation of brain gangliosides. *Biochem. Biophys. Acta* **617**:97-109.

Svensson, L., B. Brett Finlay, D. Bass, C. von Bonsdorff, and H. Greenberg. 1991. Symetric infection of rotavirus on polarized human intestinal epithelial (Caco-2). *J. Virol.* **65**:4190-4197.

Vial, P. A., R. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Kaper, J. P. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M. M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* **158**:70-79.

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

Weiser, M. M. 1973. Intestinal epithelial cell surface membrane glycoprotein synthesis. J. Biol. Chem. **248**:2536-2541.

Wenneras, C. 1993. Colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*: Binding to intestinal cell membranes and induction of mucosal immune responses in humans. Department of Medical Microbiology and Immunology. University of Goteborg, Sweden. pag. 9-10.

Willemsen, P. T. J., and F. K. de Graaf. 1992. Age and serotype dependent binding of K88 fimbriae to porcine intestinal receptors. Microbiol. Pathog. **12**:367-375.

Wong, P., A. Barbeau, and A. D. Roses. 1985. A method to quantitate Coomassie blue-stained protein in cylindrical polyacrylamide gels. Anal. Biochem. **150**:288-293.

Yamamoto, T., N. Wakisaka, T. Nakai, T. Kamamoto, O. Scrichantalgis, and P. Echeverria. 1996. Characterization of a novel hemagglutinin of diarrhea-associated *Escherichia coli* that has characteristic of diffusely adhering *E. coli* and enteroaggregative *E. coli*. Infect. Immun. **64**:3694-3702.

Zopf, D. and H. Lis. 1993. Oligosaccharide anti-infective agents. Lancet. **347**:1017-1021.

AGRADECIMIENTOS

Expreso mi agradecimiento al Dr. Alejandro Cravioto por su excelente asesoría y apoyo brindado para la realización del presente trabajo.

A mi asesor Dr. Angel Manjarrez H, por sus enseñanzas, apoyo y paciencia. Muchas Gracias.

Al Biol. Armando Navarro por proporcionarnos las cepas bacterianas utilizadas en el presente estudio y a Gabriel Pérez por su ayuda técnica.

A todos mis compañeros del laboratorio por hacerme sentir parte de este gran país.

A la Dirección General de Asuntos del Personal Académico (DGAPA) por la beca otorgada para realizar mis estudios de Maestría.