

28
2Es



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA
DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS

DETECCION DE ESTRUCTURAS CELULARES PARTICIPANTES
EN EL PROCESO DE ADHERENCIA DE *Escherichia coli*
ENTEROPATOGENA A CELULAS EUKARIOTES.

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TITULO DE
B I O L O G A
P R E S E N T A:

MARIA ELENA CHAVEZ BERROCAL

DIRECTOR DE TESIS: DR. ANGEL MANJARREZ HERNANDEZ



1999

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

72-036



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL
AVENIDA DE
MEXICO

M. en C. Virginia Abrín Batule
Jefe de la División de Estudios Profesionales de la
Facultad de Ciencias
P r e s e n t e

Comunicamos a usted que hemos revisado el trabajo de Tesis: DETECCION DE ESTRUCTURAS CELULARES PARTICIPANTES EN EL PROCESO DE ADHERENCIA DE Escherichia coli ENTEROPATOGENA A CELULAS EUCARIONTES.

realizado por MA. ELENA CHAVEZ BERROCAL

con número de cuenta 8955306-6 , pasante de la carrera de biología

Dicho trabajo cuenta con nuestro voto aprobatorio.

Atentamente

Director de Tesis Propietario	DR. ANGEL MANJARREZ HERNANDEZ
Propietario	M. en C. GABRIELA GARCIA
Propietario	DRA. DIANA E. AGUILAR LEON
Suplente	DR. JOSE LUIS SILENCIO BARRITA
Suplente	BIOL. JACQUELIN FERNANDEZ VARGAS

[Firma manuscrita]

[Firma manuscrita]

FACULTAD DE CIENCIAS
M.

[Firma manuscrita]
Consejo Departamental de Biología
DRA. EDNA MARIA SUAREZ DIAZ

DEPARTAMENTO
DE BIOLOGIA

**EL PRESENTE TRABAJO FUE REALIZADO BAJO LA ASESORIA DEL DR. ANGEL
MANJARREZ HERNANDEZ, EN EL DEPARTAMENTO DE SALUD PUBLICA, DE LA
FACULTAD DE MEDICINA DE LA UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE
MEXICO.**

DEDICATORIA:

A MIS PADRES POR TODO SU APOYO Y AYUDA BRINDADA

A MI ESPOSO: POR TODO SU APOYO

DE MANERA MUY ESPECIAL.

**A TI MAMÁ POR TODA TU COMPRESION Y AYUDA QUE ME HAS BRINDADO,
GRACIAS POR SER COMO ERES.**

ABREVIATURAS

A/E	Adherencia y esfacelamiento
AGGEC	<i>E.coli</i> agregativa
CASOY	Caldo-Peptona de Caseina-Peptona de harina de soya (medio de cultivo para bacterias)
EDTA	Acido etileno diamine tetracetico
EHEC	<i>E.coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>E.coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>E.coli</i> enteropatógena
DAEC	<i>E.coli</i> adherencia difusa
DG	Diacil glicerol
DTT	Ditiotreitol (es un agente reductor)
EDTA	Acido etileno diamine tetracetico
HEp-2	Células de epidermis de carcinoma de laringe humano
kDa	Kilo daltones
PBS	Solución salina de fosfatos
PMSF	Fenil metil sulfonil fluoruro (inhibidor de proteasas)
Ponceau S	Es un colorante compatible para muchos antígenos
SDS	Dodecil sulfato de sodio (detergente)
TEMED	Tetrametil etileno diamino (polimerizador)
Trisma	(Tris [hydroxy metil] amino metano)

INDICE

	PÁGINA
I.RESUMEN.....	1
II.INTRODUCCION.....	2
Clasificación de cepas de <i>Escherichia coli</i>	
<i>E.coli</i> enterotoxigenica (ETEC).....	4
<i>E.coli</i> enteroinvasiva (EIEC).....	4
<i>E.coli</i> enterohemorrágica (EHEC).....	4
<i>E.coli</i> adherencia difusa (DAEC).....	5
<i>E.coli</i> agregativa(AGGEC).....	5
<i>E.coli</i> enteropatógena (EPEC).....	6
Adherencia Bacteriana.....	8
Tipos de adherencia.....	9
Factores de virulencia de EPEC.....	13
Efectos producidos por la adherencia de EPEC a células epiteliales.....	15
Tipos de adhesinas.....	18
Las lectinas en el papel de reconocimiento de las células epiteliales.....	19
III.OBJETIVOS.....	21
IV. HIPOTESIS.....	22
V. MATERIAL Y METODOS	
Obtención de cepas bacterianas.....	25
Crecimiento de cepas.....	25
Ensayo de adherencia a células HEp-2.....	25
Electroforesis en geles de poliacrilamida.....	27
Tinción con azul de coomassie.....	28
Obtención de membranas apartir de células HEp-2.....	29
Preparación de vellosidades.....	29
Preparación de antígeno.....	30
Inmunización para producir anticuerpos policlonales.....	31
Preparación de suero.....	32
Electrotransferencia.....	32
Tincion de membrana de nitrocelulosa con Ponceau S.....	34
Immuno detección de proteínas.....	34

Electrotransferencia.....	32
Tinción de membrana de nitrocelulosa con Ponceau S.....	34
Inmuno detección de proteínas.....	34
Obtención de apéndices de superficie bacteriana.....	35
Determinación de proteínas.....	36

VI. RESULTADOS.....	37
----------------------------	-----------

VII. DISCUSION.....	47
----------------------------	-----------

VIII. CONCLUSIONES.....	53
--------------------------------	-----------

IX. APENDICE.....	54
--------------------------	-----------

X. BIBLIOGRAFIA.....	58
-----------------------------	-----------

I. RESUMEN

Recientes estudios han indicado que la adherencia de las bacterias a las superficies de la mucosa intestinal es el evento inicial en la patogénesis de algunas de las enfermedades infecciosas en el hombre. Para encontrar nuevas formas de combatir estas enfermedades infecciosas es necesario comprender los mecanismos de adaptación que desarrollan los microorganismos, los cuales les permiten sobrevivir a los cambios del medio ambiente que los rodea.

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un importante patógeno causante de diarrea aguda en niños menores de 1 año. EPEC coloniza el intestino delgado del hospedero, adhiriéndose a las células epiteliales y como consecuencia produce ciertas lesiones de adherencia y esfacelación (destrucción de microvellosidades).

Poco se sabe de las estructuras celulares que participan en el proceso de adherencia de las EPEC a células eucariontes. A la fecha no se han identificado proteínas de superficie bacteriana (adhesinas) responsables de la adherencia de EPEC a la mucosa intestinal. Tampoco se tiene información sobre los receptores celulares que utiliza la bacteria para adherirse. En este trabajo encontramos dos proteínas de superficie de EPEC que reconocieron enterocitos y moco intestinal de cerdo. El peso molecular de dichas proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) fue de 43 y 150 kDa. Otras proteínas de bajo peso molecular también fueron detectadas pero con menor intensidad 17-19 y 27-29 kDa.

Con respecto a los posibles receptores celulares que utiliza la bacteria para adherirse a la mucosa intestinal, dos proteínas de 32-33 kDa de vellosidades de intestino humano han sido reportadas como estructuras de unión de EPEC.

En el presente estudio se demostró que un antisuero específico contra las proteínas de 32-33 kDa inhibió la adherencia de EPEC a células HEp-2 en un ensayo de adherencia. Este resultado sugiere la participación de las proteínas de 32-33 kDa durante el proceso de adherencia de EPEC.

II. INTRODUCCION

Las diarreas son uno de los problemas de salud más graves que afectan a la población infantil en los países en desarrollo. En muchos países, ocupa el primer lugar como causa de defunción en niños de 1 a 4 años de edad (OMS,1994). En 1979 Ecuador, Nicaragua y México obtuvieron altas tasas de mortalidad por diarrea en niños menores de un año. Según estimaciones de la OMS-UNICEF, publicadas en 1984 en los países en desarrollo cinco millones de niños menores de cinco años de edad mueren cada año , a consecuencia de las enfermedades diarreas. En un estudio realizado en México en el año de 1982 se encontró que el total de defunciones causadas por diarrea, el 75% correspondió a niños menores de cinco años y el 25% a niños menores de un año (Herrera.1990). En el año de 1996 se presentaron un total de 2 181 459 casos de enfermedades diarreas, en 1997 se presentaron 2 181 459 casos (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica.1997) y en la actualidad se han presentado un total de 1 609 085 casos diarreicos en toda la República (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica, 1998).

Escherichia coli es una bacteria gram-negativa, perteneciente a la familia enterobacteriaceae, algunas de sus cepas son componentes de la flora intestinal humana y tienen una relación comensal con el hospedero (Murray.1993). Puesto que existen cepas patógenas de *E.coli* que causan diferentes tipos de enfermedades, se elaboró un esquema de clasificación serológica en 1940 por Kauffman, en el que se ordena a las cepas de *E.coli* por divisiones o sistemas de serotipificación. *E.coli* es dividida en serogrupos tomando como base la termo-estabilidad de los antígenos (Levine M.1984). Hay tres grupos principales de antígenos: lipopolisacárido

somático **O** (LPS), antígenos capsulares **K**, y antígenos proteicos **H** presentes en los flagelos bacterianos. El antígeno **O** de los lipopolisacáridos identifica el serogrupo de la cepa (ejemplo **O8**), y el serotipo es identificado por el antígeno somático **O** y el antígeno flagelar **H** (ejemplo **O111:H12**) (Stanier.*et al.*1992, Smith.*et al.*1994).

Los serotipos de *E.coli* asociados constantemente con procesos diarreicos presentan algunos mecanismos comunes de patogenicidad.

Estos mecanismos corresponden fundamentalmente a tres tipos:

- 1) adherencia, que permite a las bacterias acercarse, adherirse y colonizar el epitelio intestinal.
- 2) producción de proteínas bacterianas (toxinas) que estimulan la secreción de agua y electrolitos al interactuar con las células del intestino y
- 3) invasión y reproducción dentro de las células epiteliales del intestino (Cravioto. 1994)

CLASIFICACION DE CEPAS DE *E. coli* RELACIONADAS CON LA PRODUCCION DE DIARREA EN HUMANOS.

El conocimiento de los mecanismos de patogenicidad de las cepas de *E.coli* asociadas con procesos diarreicos ha permitido clasificar a las cepas en seis grupos: *E.coli* enterotoxigenica (ETEC), *E.coli* enteropatógena (EPEC), *E.coli* enteroinvasiva (EIEC), *E.coli* enterohemorrágica (EHEC) (Knutton.1992, M; Albert.1995), *E.coli* adherencia difusa (DAEC) y *E.coli* agregativa (AGGEC), estas dos últimas originalmente descritas como *E.coli* enteroadherente (Elliott 1995).

***E.coli* enterotoxigénica (ETEC).** Las cepas se adhieren a la mucosa intestinal, no la invaden; sin embargo pueden producir dos tipos de enterotoxinas, unas enterotoxinas lábiles (LT) de aproximadamente 86 500 Da, muy semejante en estructura y función a la enterotoxina producida por *V.cholerae*. Esta enterotoxina esta formada por cinco subunidades B que rodean a la única subunidad lipídica A, que se encuentra en la membrana externa de la bacteria (Rietschel Ernest). Después de secretar la toxina lábil (LT) se une mediante cinco subunidades B al gangliósido GM¹ en la membrana del enterocito. Una vez fijada a la membrana celular, la subunidad A penetra al citoplasma para estimular la producción de la enzima adenilciclase y provocar un incremento intracelular de adenosina monofosfato cíclico (AMPcíclico), dando como consecuencia un aumento de la secreción de agua, cloro y potasio por la célula de la mucosa intestinal (Salysers 1994).

La toxina termo-estable (ST), estimula la guanilactociclase, e incrementa la concentración intracelular de guanilato monofosfato cíclico (GMP) lo cual produce la diarrea (Fasano. 1977).

***E.coli* enteroinvasiva (EIEC).** Las cepas de este grupo colonizan a la célula, penetrando al epitelio intestinal, proliferan dentro de la célula, y pueden invadir a las células adyacentes, la invasión de una célula a otra aparentemente tiende a ser igual a la realizada por *Shigella spp*. Aunque las cepas de EIEC son parecidas a las cepas de *Shigella spp*, las cepas de EIEC no producen toxina Shiga (Elliott.1994).

***E.coli* enterohemorrágica (EHEC).** Las cepas de EHEC han sido reconocidas recientemente como una causa de enfermedades diarreicas, se ha relacionado con colitis hemorrágica y Síndrome Uremico Hemolitico (HUS) Las cepas de EHEC causan una enfermedad similar a la disentería producida por *Shigella* o a la diarrea

producida por ETEC o EPEC. Las cepas de EHEC se adhieren fuertemente a cultivos de células, y produce una lesión típica de adherencia y esfacelamiento celular similar al producido por las cepas de EPEC.

Aunque algunas cepas de EHEC causan disentería similar a la causada por *Shigella* spp., estas cepas de EHEC probablemente no invaden las células de la mucosa intestinal tan fácil como las cepas de *Shigella*. Las cepas de EHEC producen una toxina la cual es semejante a la toxina Shiga. Esta toxina juega un papel en la intensa respuesta inflamatoria producida por las cepas de EHEC (Elliott.1994).

***E.coli* adherencia difusa (DAEC).** Las cepas DAEC han sido asociadas con la producción de diarrea aguda y crónica. La adhesión de las cepas DAEC es heterogénea, las bacterias se adhieren sobre la superficie celular cubriendo totalmente a la célula. Un número de toxinas le han sido descritas; pero ninguna esta claramente asociada con el efecto producido sobre la adherencia difusa, una de ellas es la producción de la alfa-hemolisina que esta asociada con la producción de diarrea. Otra toxina desintegra el citoesqueleto de las células, aunque estas han sido observadas con poca frecuencia (Elliott.1994).

***E.coli* agregativa (AGGEC).** Estas cepas han sido asociados con gastroenteritis crónica infantil. Presentan un patrón de adherencia a células HEp-2 diferente al localizado y al difuso, el cual fue observado en cepas carentes del factor de adherencia plasmidico (EAF), este factor es necesario para llevar acabo la adherencia localizada, estas cepas fueron asociados con gastroenteritis infantil en Chile. En modelos experimentales con conejos y ratas EAggEC producen lesiones histopatológicas del intestino y destrucción de las vellosidades de los

enterocitos tanto en los conejos como en las ratas (Bhan. 1989). Las bacterias forman agregados tanto en la superficie celular como en la superficie del vidrio de la preparación. La adherencia de cepas agregativas a la mucosa del colon produce alteraciones en la estructura de las criptas y vellosidades a las cuales les fue atribuido el efecto de una posible toxina (Elliott.1994).

***E.coli* enteropatógena (EPEC)**, fue el primer grupo que se identificó como productor de cuadros clínicos diarreicos infantiles, tomándose en cuenta bases epidemiológicas y algunos hallazgos clínicos como el comunicado por Varela, Aguirre y Carrillo en 1946 , en el Hospital Infantil y que posteriormente fue clasificado en el Esquema de Kauffmann, Knipchild, y Vahlne como serotipo O111:B4 (K58)². El término de *E.coli* enteropatógena (EPEC), fue acuñado por Neter y Shumway en 1955 (Cravioto.,and Eslava.1994). La habilidad de *E.coli* enteropatógena (EPEC) para producir diarrea en humanos esta asociada a la formación de lesiones histopatológicas en los enterocitos del intestino, daño en el citoesqueleto de la célula y pérdida de las microvellosidades.

Cravioto et al. reportaron que a diferencia de otras *E.coli*, las cepas de EPEC presentan la capacidad de adherirse en forma de microcolonias a células epiteliales mantenidas en cultivo. La capacidad de adherirse en forma de microcolonias fue denominada como adherencia localizada por Scaletsky et al. La capacidad de adherirse en forma localizada, la compartían todas las cepas de EPEC, independiente de su serotipo. El modelo propuesto por Knutton et al, para explicar la naturaleza molecular de la adherencia localizada consta de las siguientes fases: La primera fase comprende el acercamiento y agrupación de las bacterias sobre las células epiteliales, este tipo de asociación de la bacteria con las célula hospedera es denominado adherencia no íntima y es dependiente en parte de la presencia de un

plásmido de 55-70 mDa que codifica la formación de haces de fimbrias o pilis adhesivos y que se han denominado como haces formadores de pilis (BFP). Los BFP tienen una secuencia terminal de aminoácidos muy similar a la de las fimbrias producidas por *Vibrio cholerae* y *Neisseria gonorrhoea*, indicando que se trata de proteínas bacterianas que regulan la adherencia fundamental a las células del intestino. Estas fimbrias permiten a las bacterias unirse unas con otras para formar microcolonias a través de las cuales van a interactuar con las células epiteliales (Cravioto, and Eslava.1994). Una segunda fase comprende un íntimo contacto de las bacterias con las células intestinales (adherencia íntima). Funcionalmente la intimina es esencial para llevar a cabo la adherencia íntima de la bacteria con las células epiteliales. La intimina es el producto de un locus cromosomal bacteriano *eaeA*, y es

una proteína de 94kDa. La intimina aparentemente participa en la estimulación para la reorganización del citoesqueleto de la célula huésped.

Otros factores bacterianos estimulan la transducción de señales epiteliales produciéndose una consecuente degeneración localizada de las microvellosidades de las células intestinales, así como alteraciones del citoesqueleto. A este daño celular se le ha llamado adherencia y esfacelamiento (AE). Las lesiones de AE producidas están asociadas al desajuste que se produce en las estructuras, alfa-actina, miosina, ezrina, talina, del citoesqueleto en las células epiteliales a las que se adhiere la bacteria.

La adherencia de EPEC a la superficie epitelial provoca el fenómeno esfacelamiento, el cual involucra un íntimo contacto, degeneración localizada de los bordes de las microvellosidades, la reorganización de las estructuras del citoesqueleto y la formación de una estructura en forma de pedestal debajo de donde se encuentra adherida la bacteria.

A pesar del progreso que se ha hecho para entender el proceso de adherencia de las

cepas de EPEC, se conoce poco de los eventos que inducen el incremento de la secreción a nivel celular, los cuales producen diarrea en individuos infectados. Los mecanismos por los cuales E.coli enteropatógena (EPEC), causa diarrea no han sido determinados completamente; sin embargo la habilidad de adherirse a la mucosa intestinal y destruir las microvellosidades es un factor muy importante a determinar (Elliott, and Nataro1995).

ADHERENCIA BACTERIANA

Recientes estudios han indicado que la adherencia bacteriana a la mucosa intestinal, es el evento inicial en la patogénesis de la mayoría de las enfermedades infecciosas. La bacteria usa numerosos mecanismos con los cuales se adhiere y/o penetra a los tejidos del hospedero (receptores) (Firon, 1985).

Frecuentemente, múltiples ligandos localizados en la superficie de los patógenos sirven para incrementar la fuerza y especificidad de la adherencia. El proceso de adhesión de una bacteria requiere una estrategia, y la más común para la mayoría de las bacterias es poseer adhesinas en la punta de sus apéndices y en algunos casos en las superficies laterales de estos apéndices. Entre los apéndices de superficie y estructuras bacterianas que portan adhesinas se incluyen fimbrias o pilis, flagelos. Las adhesinas así nombradas por Jones Duguid *et al*, se refieren a el término ligando, usualmente son pequeñas moléculas adherentes localizadas principalmente en las fimbrias de las bacterias, y compuestas de largas estructuras poliméricas. Los pilis estabilizan el contacto entre la superficie bacteriana y la superficie de la célula hospedera (Nathan.1989).

TIPOS DE ADHERENCIA

Las cepas de *E.coli* causantes de diarrea se adhieren a células en cultivo (HEp-2 o HeLa) formando diferentes patrones. Se consideran tres patrones de adhesión bien definidos: adherencia localizada, adherencia difusa y adherencia agregativa. La **adherencia localizada**, se caracteriza por que las bacterias forman microcolonias y se adhieren en forma localizada a células epiteliales mantenidas en cultivo (Figura 1). La **adherencia difusa** se caracteriza por la presencia de bacterias adheridas individualmente a toda la superficie celular (Figura 2). Y en la **adherencia agregativa** las bacterias frecuentemente se apilan en forma de ladrillos formando cúmulos, a través de los cuales se adhieren tanto a las células en cultivo como al vidrio de la preparación (Knutton .1987) (Figura 3).



Fig 1. Microfotografía en campo claro en un aumento de 100x. Monocapa de células Hep-2, inoculadas con *E.coli* enteropatógena (EPEC), cepa E2348/69 Presentan adherencia localizada caracterizada por bacterias que forman microcolonias, además de adherirse únicamente a ciertas regiones de la superficie celular.

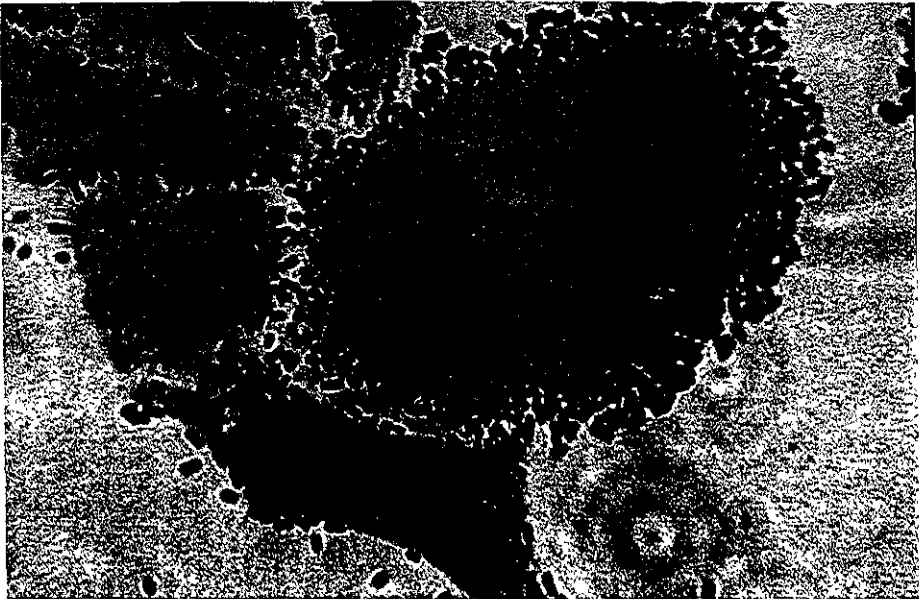


Fig 2. Microfotografía en campo claro en un aumento 100x. Monocapa de células Hep 2 inoculadas con *E coli* con adherencia difusa, cepa 55784. Se observa adherencia difusa caracterizada por la presencia de bacterias adheridas individualmente a toda la superficie celular.

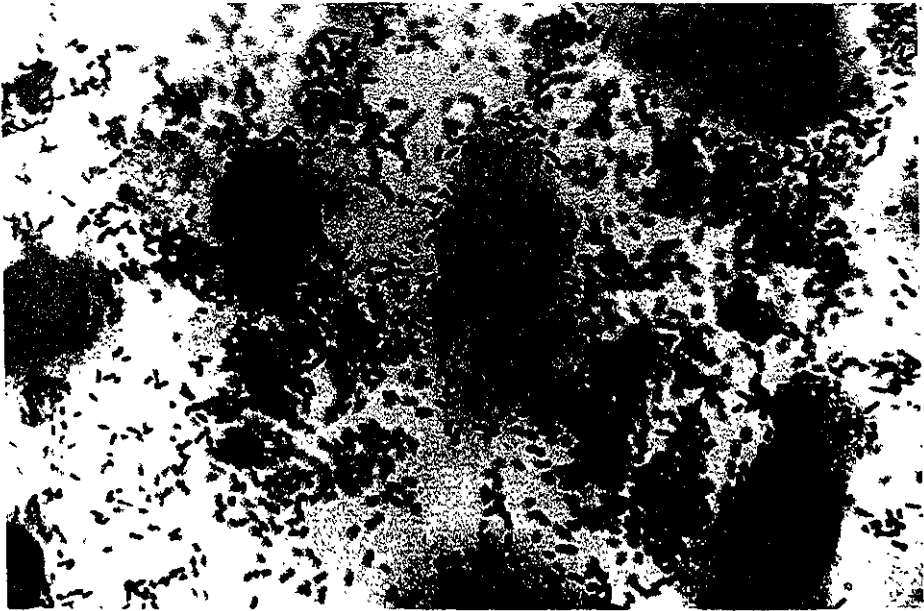


Fig 3. Microfotografía en campo claro en un aumento de 100x. Monocapa de células Hep-2, inoculada con *E. coli* con adherencia agregativa (JPN10). Observándose adherencia agregativa. Las bacterias se apilan en forma de ladrillos formando cumulos, a través de los cuales se adhieren tanto a las células en cultivo como al vidrio de la preparación

FACTORES DE VIRULENCIA DE EPEC

La mayoría de las cepas de EPEC no producen toxinas, sin embargo producen diarrea. Se desconoce el mecanismo por el cual estas cepas producen la enfermedad. Posiblemente la diarrea es resultado del daño causado a las vellosidades intestinales (esfacelación), disminuyendo su capacidad absorbiva. Aunque la causa de diarrea asociada con las cepas de EPEC no ha sido identificada en su totalidad, se cree que los complejos efectos de la adhesión bacteriana, las lesiones de adherencia y la esfacelación (A/E), producidas por estas cepas pueden ser la causa de la producción de diarrea (Nathan.1989). Las lesiones de A/E (o pedestal) están asociadas con el ensamble y organización de las estructuras del citoesqueleto en las células epiteiles inmediatamente después de que la bacteria se adhiere (Kutton *et al.*,1989).

El primer estado de asociación de la bacteria con la célula hospedera es por medio de una unión no íntima, la cual es llevada a cabo por un complejo proteico denominado formadores de Asas o Fimbrias (BFP). según el modelo mas aceptado (Knutton *et al.*,1988). En un segundo estado las moléculas involucradas en el contacto de la bacteria con la célula, o porción de una parte de la célula, llevan a cabo un mecanismo de transducción de señales (Rosenshine.1992).

La importancia de los Bfp en la virulencia de las cepas de EPEC no ha sido establecida, pero los Bfp aparentemente son responsables de la adherencia bacteriana en forma localizada en cultivos de células HEP-2. La tendencia de las cepas de EPEC a agregarse durante el crecimiento, probablemente es mediado por los Bfp en la interacción bacteria-bacteria antes de la adherencia entre la bacteria y la célula hospedera. Algunas cepas de EPEC tienen adhesinas que reconocen

diferentes receptores reconocidos probablemente por los Bfp, los cuales no han sido identificados (Nathan.1989).

La transmisión de mensajes entre el exterior y el interior de la célula, no implica necesariamente el intercambio de moléculas o iones. Existen otros mecanismos de transducción de información que exige la participación de proteínas de membrana (Popot.1986). Este segundo evento esta sociado con la activación de la fosfolipasa C de la célula hospedera y da como resultado un incremento en los niveles de calcio intracelular de la célula.

En un tercer estado, la bacteria se asocia aun más con la célula teniendo un íntimo contacto, se produce un extensivo rearrreglo de los filamentos de actina del citoesqueleto y pérdida de las microvellosidades de las células epiteliales. A consecuencia de este fenómeno se forma una estructura en forma de pedestal justo debajo de donde se adhiere la bacteria que se compone de una densa cantidad de filamentos de actina. Este efecto puede ser observado por fluorescencia (FAS) y se le ha llamado esfacelamiento (AE). Uno de los genes que estan involucrados en estos procesos ha sido designado como *eae* (Ruoslahti.1991).

La unión íntima de las cepas de EPEC a las células hospederas es regulada por otra proteína de membrana de 94 kDa llamada intimina. El gen de la intimina ha sido designado *eaeA* (Narhan 1989).

EFFECTOS PRODUCIDOS POR LA ADHERENCIA DE EPEC A CELULAS EPITELIALES

Al estabilizarse el contacto entre la célula hospedera y los pilis o fimbrias de la superficie bacteriana. EPEC produce señales en las células epiteliales infectadas, produciendo la generación del inositol trifosfato, flujo del calcio intracelular y la fosforilación de proteínas en los amonoácidos tirosina (Figura 4).

La elevación de calcio es dependiente del inositol trifosfato y trae como consecuencia el rearrreglo del citoesqueleto, facilitando la destrucción de las microvellosidades, esto probablemente afecta la permeabilidad epitelial y contribuye a la producción de diarrea.

EPEC activa la fosfolipasa C en la célula, la cual hidroliza el fosfatidil inositol de la membrana celular, produciendose el inositol trifosfato y el diacil-glicerol (DG), considerados como segundos mensajeros. El inositol trifosfato interactua con sus receptores que se encuentran en almacenes de calcio, como el retículo endoplasmico, permitiendo la salida del calcio intracelular, este mismo calcio junto con el diacil-glicerol, activan a la proteína quinasa C (PKC), esta posteriormente fosforila a las proteínas en serina/treonina. El incremento de calcio intracelular podría contribuir junto con los efectos de fosforilación en la destrucción de las microvellosidades.

La fosforilación de la tirosina en la proteína de 90 kDa (Hp90), facilita la adherencia íntima, junto con otra proteína la intimina. También se ha visto que la fosforilacion en tirosina es necesaria para que la bacteria penetre la célula hospedera.

El gen involucrado en la inducción del rearrreglo del citoesqueleto es el gen eae. Este gen codifica la intimina una proteína de 94 kDa. Funcionalmente la intimina es esencial para la íntima adherencia de la bacteria a las células epiteliales y para la

invasión de las mismas en algunos casos. También se ha demostrado que los genes **efm** de EPEC son necesarios para la inducción de la fosforilación de la tirosina (Hp90) (Rouslahti.1991).

Por otra parte EPEC también fosforila una proteína de 20 kDa identificada como la cadena ligera de miosina. Los resultados proponen la extensa fosforilación de la cadena ligera de miosina, activada por las concentraciones de calcio en los sitios de la célula en donde se adhiere EPEC, con esto se piensa que se produce destrucción de las microvellosidades (Rouslahti.1991).

TRANSDUCCION DE SEÑALES

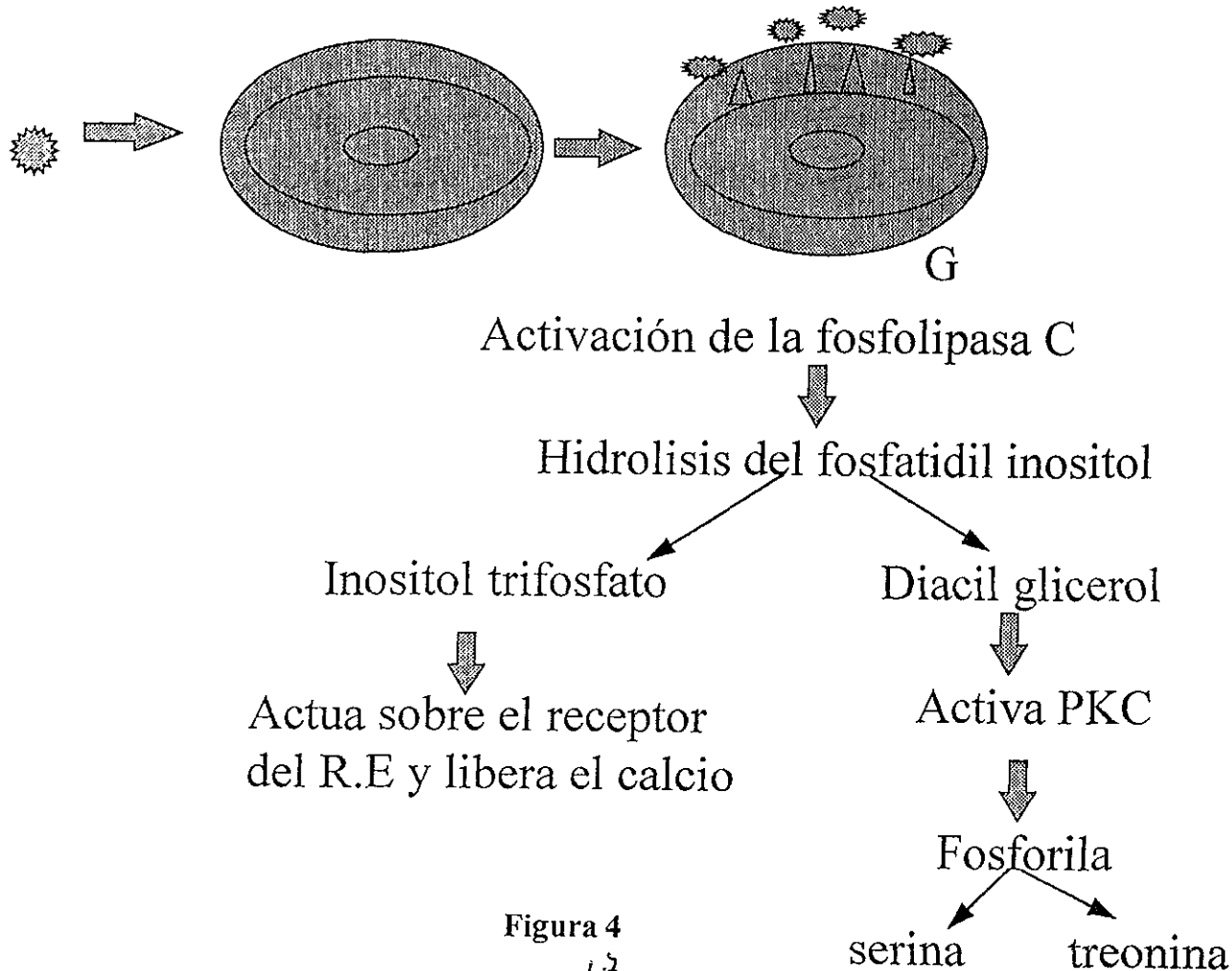


Figura 4

TIPOS DE ADHESINAS

Las bacterias expresan diferentes tipos de adhesinas, como las existentes entre interespecies (bacteria-célula hospedera) e intraespecie (bacteria-bacteria) (Stanier R.1992). Se conocen adhesinas de composición proteica, lipopolisacárida, lipídica y algunas en forma compleja como glucoproteínas o glucolípidos (Ryley.1987).

Adhesinas de naturaleza proteica. En este grupo se reconocen las fimbrias o pilis, proteínas de membrana externa y quizá antígenos flagelares (Beachey.1981).

Adhesinas de naturaleza polisacárida. Las cápsulas de algunos organismos gram positivos y gram negativos funcionan como adhesinas en la colonización de las mucosas del huésped.

Adhesinas de naturaleza lipídica como el ácido lipoteicoico, en *Sptococcus pyogenes*, que forma puentes en la proteína M para conferir hidrofobicidad en la superficie y poder interactuar con sitios de unión en la fibronectina en tejidos faríngeos (Ryley.1987).

LAS LECTINAS EN EL PAPEL DE RECONOCIMIENTO DE LAS CELULAS.

Las adhesinas son usualmente lectinas, capaces de reconocer residuos de azúcar y actuar como mensajeros para glicoproteínas o glicolípidos (Ryley, 1987). Muchas especies de Enterobacterias tienen la habilidad de producir lectinas de superficie (por ejemplo, *Escherichia coli* y *Salmonellae spp*). Al igual que en algunas otras especies las lectinas están comúnmente en forma de apéndices parecidos a cabellos submicroscopicos conocidos como fimbrias (pili) que salen de la superficie celular. Las fimbrias son usualmente de 5 a 7 nm de diámetro y de 100 a 200 nm de longitud. Los receptores de los pilis en la célula hospedera son comúnmente carbohidratos, residuos de glicoproteínas o glicolípidos. Varias especies de la familia enterobacteriacea expresan fimbrias tipo I conteniendo subunidades de lectinas que reconocen glicanos tipo oligomanosa en la superficie de las células eucariontes como receptores. Las lectinas en la superficie de la célula regulan la interacción célula-célula por la combinación de carbohidratos complementarios en aposición a las células.

Todas las células llevan carbohidratos en la superficie en la forma de glicoproteínas, glicolípidos y lipopolisacáridos. Los carbohidratos tienen un enorme potencial para codificar información biológica. En los carbohidratos la información es codificada en la posición y configuración anomérica (α o β) de las unidades glicosidicas (Stryer.1995) Dos moléculas de un simple monosacarido se pueden unir con 11 diferentes disacaridos, dos moléculas de un aminoácido o un simple nucleotido se puede unir con un dipeptido o un dinucleotido respectivamente. Cuatro diferentes

monosacáridos se pueden unir con 35 560 distintos disacáridos, puesto que cuatro diferentes aminoácidos o nucleótidos pueden unirse con 24 estructuras tetraméricas. Una unión-fuerte ocurre por adherencia covalente del sulfato, fosfato y grupo acetil o el azúcar. La primera hipótesis sugiere que la especificidad de muchos polímeros es en términos de residuos de azúcar y no de aminoácidos o nucleótidos. En muchos casos los carbohidratos modifican las actividades de las proteínas a las cuales estas se adhieren. Ciertas lectinas de membrana tienden a presentar o participar en la interacción con las glicoproteínas. Las lectinas distinguen los diferentes monosacáridos, algunos se unen específicamente a oligosacáridos, detectando sutiles diferencias en complejos carbohidratos. Muchas lectinas se combinan con carbohidratos de componentes insolubles de la matriz extracelular que promueve la adhesión al sustrato de la célula. Además muchas lectinas solubles actúan como puente de unión a carbohidratos en oposición a las células (Roth.1995).

III. OBJETIVO

Identificar las proteínas (adhesinas) de EPEC que le permiten adherirse a la mucosa intestinal. Por otro lado, determinar si las proteínas de (32-33 kDa) de microvellosidades de cerdo actúan como estructuras de unión (receptores) de EPEC durante el proceso de adherencia.

IV.HIPOTESIS

A) Proteínas de superficie bacteriana, desprendidas de la bacteria por efecto mecánico, reconocerán sus receptores en células epiteliales. De esta manera podremos detectar las proteínas que EPEC utiliza para adherirse al epitelio intestinal.

B) Dos proteínas de microvellosidades de cerdo con peso molecular de 32-33 kDa, fueron reconocidas por EPEC en un ensayo in vitro, la inhibición de la adherencia bacteriana mediante antisuero específico contra estas proteínas, determinará la relevancia de estas proteínas en el proceso de adherencia de EPEC.

DISEÑO EXPERIMENTAL

A. Detección de proteínas de superficie bacteriana involucradas en el proceso de adherencia.

Marcaje radiactivo y crecimiento de cepas E2348/69 en medio sintético.

Liberación de proteínas de superficie bacteriana por sonicación.

Obtención de proteínas de superficie bacteriana por centrifugación y filtración a través de membrana de 22 µM.

Obtención de microvellosidades de intestino y células HEp-2.

Incubación de microvellosidades ó cél. HEp-2 con prot. de sup. bacteriana

Electroforesis en geles de poliacrilamida SDS-PAGE

Autoradiografía

**B. RELEVANCIA DE LAS PROTEINAS DE INTESTINO
(32-33 kDa)**

**Obtención de proteínas totales
de microvellosidades de cerdo**



**Electroforesis en geles de po-
liacrilamida SDS-PAGE.**



**Obtención de bandas corres-
pondientes a las proteínas
32-33 kDa.**



**Inmunización en conejos y
obtención de antisuero
(32-33 kDa)**

**Obtención de proteínas de intestino
humano y células HEp-2.**



**Electroforesis en geles de poliacri-
lamida SDS-PEGE.**



**Electrotransferencia de las protei-
nas a membrana de nitrocelulosa**

**Utilización del antisuero para inhibir
la adherencia bacteriana a células HEp-2.**

V.MATERIAL Y METODOS

OBTENCION DE LAS CEPAS BACTERIANAS

Las cepas bacterianas E23487/69,55784 y JPN10 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.

CRECIMIENTO DE CEPAS

Las cepas bacterianas fueron crecidas en medio caldo CASOY líquido por 8 horas a 37°C, posteriormente se tomaron dos gotas de la suspensión bacteriana y fueron sembradas en medio sintético con manosa al 1% .

ENSAYO DE ADHERENCIA A CELULAS HEp-2

Las cepas E2348/69,55784 y JPN10, fueron crecidas durante un período de 18 horas 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 a 6×10^8 Unidades Formadoras de Colonia/ml (UFC/ml). Se empleo la técnica descrita por Cravioto *et al.* La prueba se desarrollo 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 2.5×10^6 /ml, se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ durante 24 horas para formar una monocapa con 80% de confluencia.

Después de este tiempo se eliminó el medio de cultivo de los pozos y se lavó con amortiguador de fosfatos pH 7.2. Posteriormente se agregó 1×10^8 bacterias en 1 ml de medio de cultivo celular (Medio Esencial Mínimo de Eage). Se incluyó un control positivo y un pozo con cepa negativa a la adherencia. La placa fue incubada por tres horas a 37°C en atmósfera de 5% de CO₂, después de este período de incubación se descartó el medio, y se lavó cada pozo tres veces con 1 ml de amortiguador de fosfatos, con la finalidad de eliminar a las bacterias no adheridas a las células. Las células se fijaron con 0.5 ml de metanol, ácido acético 3:1 durante 10 minutos, se dejaron secar las preparaciones y posteriormente se tiñeron con colorante Giemsa durante 20 minutos. Finalmente 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 porta objetos fijándola con bálsamo de Canadá para observarla posteriormente en microscopio de luz.

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA

Las proteínas de membrana celular fueron separadas esencialmente por el método descrito por Laemmli (1970), denominado electroforesis de Poliacrilamida en Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE). Las membranas celulares fueron hervidas por 5 minutos en solución de Laemmli (ver apéndice), para solubilizar las proteínas y liberarlas de la bicapa lipídica, reducir los puentes de cisteína y abrir o desdoblar las proteínas para la separación electroforetica óptima. Las soluciones que se utilizaron para realizar la SDS-PAGE son las siguientes:

GEL SEPARADOR

Acrilamida-bis Acrilamida (30:0.8)	11.0 ml
Tris-HCL 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	0.015ml

GEL CONCENTRADOR

°	Acrilamida-bis Acrilamida (30:0.8)	1.250 ml
	Tris-HCl 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	0.0075 ml

Los marcadores de pesos moleculares utilizados son: fosforilasa b (94,000 daltones), albúmina (67,000 daltones), ovoalbúmina (43,000), anidrasa carboniva (30,000), inhibidor de tripsina (20,100 daltones), o-lacto albúmina (14,400 daltones).

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 con azul de Coomassie (ver apéndice) o electrotransferidos a membranas de nitrocelulosa.

TINCION CON AZUL DE COOMASSIE

El gel fue teñido inmediatamente después de la electroforesis en una solución conteniendo 40% (v/v) metanol, 10% ácido acético y 0.2% (p/v) de azul de coomassie R-250 durante 2 horas. Esta solución debe ser filtrada antes de usarse. Los geles son desteñidos durante varias horas en una solución conteniendo 20% de metanol y 10% de ácido acético (v/v).

OBTENCION DE MEMBRANAS A PARTIR DE CELULAS HEp-2

Las células HEp-2, fueron obtenidas de cultivos celulares. El medio de cultivo se desechó y la monocapa celular se lavó tres veces con PBS frío y se desprendió raspándola con un gendarme de plástico, las células fueron colectadas por centrifugación a 500g a 4°C por 5 minutos, lavadas dos veces con PBS frío. 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 fueron lisadas al ser pasadas a través de una aguja de 27 x 13 mm. Las células enteras y núcleos fueron removidos por centrifugación a 500g durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante fue centrifugado a 40 000g por una hora a 4°C. El botón resultante que contiene las membranas fue resuspendido en PBS y guardado en alicuotas a -20°C o hervidas por 5 minutos en solución de Laemmli.

PREPARACION DE VELLOSIDADES

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.

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 leupeptin, 25 mg/ml aprotinin, 1mM PMSF y 1mM EDTA.

EDTA. EL epitelio celular fue resuspendido en 20 ml de solución A , conteniendo 1mM PMSF y 1mM DTT, fue homogeneizado suavemente pasándolo a través de una aguja (17x13mm) con jeringa (20 veces). Después el homogeneizado se centrifugo 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, conteniendo 1mM PMSF, 1mM DTT y fue filtrado a través de una malla de nylon de 30 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.

PREPARACION DEL ANTIGENO

El antígeno se preparó según Cooper and Paterson 1991. Se utilizó la fracción celular que contenía las vellosidades de cerdo (método descrito anteriormente) para preparar el antígeno. Las proteínas fueron separadas por electroforesis en gel de poliacrilamida (SDS-PAGE) según el método de Laemmli. El gel se tiñó con azul de Coomassie al 0.05 % en agua para localizar la región en donde se encuentran las bandas de proteínas (32-33 kDa) que fueron utilizadas como antígenos. Después de desteñir el gel con agua se cortaron las bandas del gel con un bisturí y se mezclaron con 0.5ml de PBS y 0.2ml de adyuvante completo de Freund. Posteriormente se homogeneizó la mezcla pasándola a través de un conector de plástico con orificios

de tamaño ajustable. Una vez que la mezcla (acrilamida, proteínas, adyuvante y PBS), está completamente homogénea y blanca, se verificó que la emulsión fuera estable, liberando unas gotas sobre la superficie de agua. Una emulsión bien preparada debe mantenerse junta cuando se gotea sobre el agua. Es importante expulsar las burbujas de aire hasta donde sea posible, utilizar jeringas de vidrio, así como tratar de mantener la temperatura lo más cercano a 4°C. Para preparar el antígeno de reforzamiento inmunológico, se siguió el mismo procedimiento; pero se usó adyuvante incompleto de Freund para preparar la emulsión.

INMUNIZACION PARA PRODUCIR ANTICUERPOS POLICLONALES

Para producir los anticuerpos se utilizaron conejos hembras de la cepa Nueva Zelanda, de aproximadamente 12 semanas de edad. Se inmunizaron, uno con las proteínas respectivas de 32 kDa y el otro con las proteínas de 33 kDa en una emulsión de PBS y Adyuvante de Freund completo. Para la inmunización de los conejos se siguió el protocolo descrito por Cooper y Paterson, 1991. Los conejos fueron sangrados antes de ser inmunizados para obtener el suero preinmune a partir de la muestra de sangre. Los conejos fueron inyectados subcutáneamente en diferentes sitios de su parte dorsal. La primera inmunización se repitió después de una semana. Se aplicaron cuatro inmunizaciones de refuerzo con la misma concentración cada dos semanas después de la inmunización primaria. A los conejos se les tomaron muestras de sangre 14 días después de las dos primeras inmunizaciones para verificar la producción de anticuerpos contra el antígeno aplicado. El antígeno de refuerzo fue preparado con adyuvante incompleto de Freund. Finalmente los conejos fueron sangrados a blanco y se procesó el suero.

PREPARACION DEL SUERO

La sangre obtenida de los conejos fue incubada a 37°C durante 15 minutos para separar el suero del paquete celular, posteriormente a 4°C por 3 horas para permitir la contracción del coágulo. El coágulo formado fue despegado de las paredes del tubo, con un aplicador de madera. El suero fue removido del coágulo por centrifugación a 10 000 g durante 10 minutos y guardado a -20°C.

ELECTROTRANSFERENCIA SEMI- SECA

La electrotransferencia de proteínas de las células HEP-2 y de las vellosidades fue llevado 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 y una cámara de electrotransferencia (Pharmacia LKB, Multiphor).

De la siguiente manera:

- 1) Cortar 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 sobrepase el borde del gel para que la transferencia sea eficiente.
- 2) Sumergir cuidadosamente la membrana de nitrocelulosa en agua destilada por dos minutos. Posteriormente sumergir el papel absorbente y la membrana de nitrocelulosa en solución de electro 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.

4) Evitar la formación de burbujas de aire y removerlas cuidadosamente si estas se han formado. Poner cuidadosamente el electrodo superior (el cátodo) sobre el sandwich de papel, membrana y gel recién formados.

5) El gel de poliacrilamida se tiñe con azul de coomassie para verificar la transferencia.

6) La membrana de nitrocelulosa se tiñe con Ponceau S para verificar la eficiencia de la transferencia de las proteínas. La transferencia se realizó a miliamperage constante (mA) de acuerdo con la siguiente regla 1.0 mA/cm, unidades de transferencia por 1.30 horas aproximadamente.

La transferencia se realizó a corriente constante de 120 (mA) durante 1 hora 30 minutos.

Esta electrotransferencia fue usada posteriormente para inmunodetección de proteínas, reconocimiento de proteínas de mucosa intestinal y células HEP-2 por proteínas de superficie bacteriana.

TINCION DE LA MEMBRANA DE NITROCELULOSA CON PONCEAU S

Este método es utilizado para teñir las proteínas que han sido transferidas del gel de poliacrilamida a la membrana de nitrocelulosa y así poder ubicar la localización de las proteínas y sus pesos moleculares.

- 1) Lavar la membrana de nitrocelulosa con PBS después de la transferencia.
- 2) Agregar Ponceau S diluido recientemente 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 tres cambios de PBS.
- 4) Una vez marcada la posición de las proteínas transferidas a la membrana, se destiñe totalmente enjuagándola con PBS o agua.

INMUNO DETECCION DE PROTEINAS

La detección del antígeno producido en conejos se llevo acabo mediante la unión de estos anticuerpos a las proteínas de 32 y 33 kDa, provenientes de las células Hep-2 y de vellosidades, previamente transferidas a la nitrocelulosa.

Una vez que las proteínas fueron electrotransferidas a la membrana de nitrocelulosa, se procedió a bloquear los sitios no específicos de unión de la proteína restante, en la membrana de nitrocelulosa, incubando esta con 5% de leche semidescremada (Svelty, Nestle) en PBS durante 2 horas a 4°C. Posteriormente se agrego el suero que contiene los primeros anticuerpos producidos en conejos contra las proteínas de

32 y 33 kDa a una dilución de 1:50 y se incubó durante 2 horas a temperatura ambiente. La membrana fue lavada tres veces con una solución de PBS con 0.2% de Tween 20, e inmediatamente después se incubó durante una hora con el segundo anticuerpo inmunoglobulina anticonejo tipo IgG producida en cabra, y acoplado con peroxidasa (Kirkegaard y Perry Laboratorios Inc). El anticuerpo se utilizó a una dilución 1:300.

La membrana fue lavada tres veces con PBS con 0.2% de Tween 20. El antígeno se detectó incubando la membrana de nitrocelulosa con el sustrato de la peroxidasa, 4-chloronaphtol.

OBTENCIÓN DE APÉNDICES DE SUPERFICIE BACTERIANA

Las cepas de *Escherichia coli*, crecidas en medio líquido durante la noche (16 horas), fueron lavadas tres veces con PBS. El botón bacteriano final se resuspendió en 0.5-1ml de medio sintético (dependiendo del tamaño del botón), y se sonicó tres veces a 25 wats por intervalos de 30 segundos a 4°C. 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 sonicado por diversos periodos de tiempo, hasta encontrar el tiempo de sonicación idóneo. La suspensión sonicada fue centrifugada a 10,000g por 15 minutos. El sobrenadante conteniendo los apéndices de superficie bacteriana fue colectado y filtrado a través de una membrana de 0.22µm.

DETERMINACION DE PROTEINAS

Se realizó por el método de Bradford (Ausubel 1987). Este método consta de dos fases, en la primera se preparan las diluciones y en la segunda se ponen en contacto la muestra de proteína con el reactivo de Bradford y se toma la lectura en el colector de placas.

1) En una placa de 96 pozos de poliestireno se colocan diluciones 1:20, 1:15, 1:6 y 1:5, de albúmina sérica bovina diluidas en PBI, como control. En otros pozos de la misma placa se llevan a cabo diluciones 1:4, 1:8, 1:16, 1:32 y 1:64 de la muestra de proteínas a determinar.

2) En una segunda placa se colocan 20 μ l de cada dilución con 150 μ l de Reactivo de Bradford, en agitación durante 5 minutos.

La concentración de proteínas se determinó utilizando albúmina sérica como patrón y se realizaron lecturas en un colector para placas de ELISA (Microelisa Auto Readera Dynatech MR 580), a 575nm.

VI.RESULTADOS

I. DETECCION DE PROTEINAS DE EPEC INVOLUCRADAS EN LA ADHERENCIA A LA MUCOSA INTESTINAL

Inhibicion de la Adherencia a las células HEp-2 por Proteínas de Superficie Bacteriana.

Con el objetivo de identificar los apéndices de EPEC responsables de la adherencia a la mucosa intestinal, se obtuvieron proteínas de superficie bacteriana por efecto mecánico. Esto es, se desprendieron apéndices y proteínas de la superficie bacteriana de EPEC (cepa E2348/69) mediante sonicación. Después de haber sonificado la suspensión bacteriana por diferentes intervalos de tiempo, se eligió el intervalo más apropiado, que liberó la mayor cantidad de proteínas de superficie con un daño mínimo a la membrana externa bacteriana. Esto se verificó mediante observación en el microscopio óptico y la electroforesis de las proteínas liberadas. Para conocer si estas proteínas de superficie bacteriana contienen proteínas o adhesinas que participen en la adherencia, se realizaron ensayos de inhibición a la adherencia bacteriana con dichas proteínas en células HEp-2.

El ensayo consistió en preincubar las células HEp-2 con las proteínas de superficie bacteriana, remover las proteínas no adheridas y posteriormente agregar las bacterias a las células e incubarlas por dos horas, finalmente lavar la monocapa celular para remover las bacterias no adheridas.

Como resultado obtuvimos que en general la inhibición fue dependiente de la concentración de proteínas utilizadas en el ensayo, esto es que al aumentar la concentración de proteínas aumentó el porcentaje de inhibición de la adherencia bacteriana.

La cepa E2348/69 con adherencia localizada presentó el mayor porcentaje de inhibición (67.6%) cuando se preincubo 1.0 mg/ml de proteína con las células HEp-2. Seguida de la cepa agregativa JPN10 con 29.7% de inhibición (Tabla 1). En contraste, la cepa difusa 55784 no sufrió ningún efecto de inhibición a la adherencia sino por el contrario aumentó el número de bacterias adheridas a las células HEp-2. El porcentaje en la adherencia fue de hasta 110%.

Proteínas de Superficie de EPEC Reconocen la Mucosa Intestinal Humana y Células HEp-2

Al incubar las proteínas de superficie bacteriana con la mucosa intestinal, encontramos que principalmente dos proteínas son las que reconocieron los enterocitos y moco intestinal. El peso molecular de dichas proteínas en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) fue de 43 y 150 KDa. Otras proteínas de bajo peso molecular también fueron detectadas pero con menor intensidad, 17-19 y 27-29 kDa. Resultados muy similares se encontraron con las líneas celulares HEp-2 y Caco-2. Estas proteínas fueron detectadas mediante un análisis de electroforesis en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE) y autoradiografía del mismo gel ya que las proteínas bacterianas estaban marcadas radiactivamente (Fig.5).

TABLA 1. PORCENTAJE DE INHIBICION A LA ADHERENCIA DE *E.coli* POR PROTEINAS DE SUPERFICIE BACTERIANA (cepa E2348/69).

CEPA	TIPO DE ADHERENCIA	PROTEINAS DE SUPERFICIE BACTERIANA		
		0.10mg/ml	0.50mg/ml	1.0mg/ml
E2348/69	LOCALIZADA	11.4(\pm 7)	44.0(\pm 7)	67.6(\pm 5)
S5784	DIFUSA	ND	5.0(\pm 8)	0.1
JPN10	AGREGATIVA	ND	29.7(\pm 6)	110

ND: no determinado

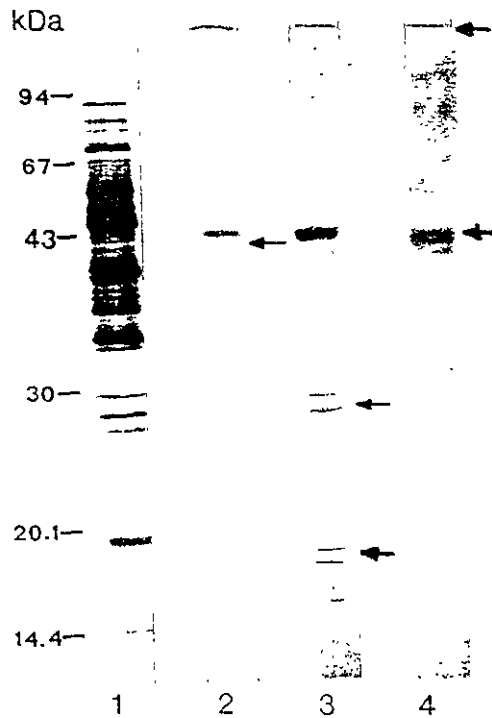


Fig 5.- Autoradiografía que muestra proteínas de superficie bacteriana de EPEC (E2348/69) que reconocieron, enterocitos, moco intestinal y células HEp-2.
 1) Proteínas totales de superficie bacteriana (antes de incubar)
 2) Enterocitos
 3) Células Hep-2
 4) Moco intestinal

II. RELEVANCIA DE LAS PROTEINAS DE INTESTINO (32-33 kDa) COMO ESTRUCTURAS DE UNION DE EPEC

Producción de Antisuero

En previas investigaciones realizadas (Manjarrez *et al*,1997) se detectaron dos proteínas de vellosidades de intestino humano a las cuales se adhieren cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC). El peso molecular de estas proteínas es de 32-33 kDa en geles de poliacrilamida (SDS-PAGE). En el presente trabajo se determinó la relevancia de dichas proteínas (32-33 kDa) como estructuras de unión de EPEC mediante ensayos de inhibición a la adherencia bacteriana. Por lo tanto se produjo antisuero dirigido contra las proteínas de 32-33 kDa aisladas de vellosidades de cerdo.

El antisuero específico se obtuvo mediante la inmunización de conejos con las proteínas de 32-33 kDa extraídas del gel de poliacrilamida. Para verificar la producción de anticuerpos contra dichas proteínas, se obtuvo el suero de los conejos y se incubó con las proteínas obtenidas de las vellosidades intestinales en el ensayo de inmunotransferencia.

De esta manera se pudo verificar que los conejos produjeron anticuerpos contra las proteínas de 32-33 kDa (Fig.6). El antisuero también reaccionó con las proteínas de 32-33 kDa obtenidas de células HEp-2 y vellosidades humanas.

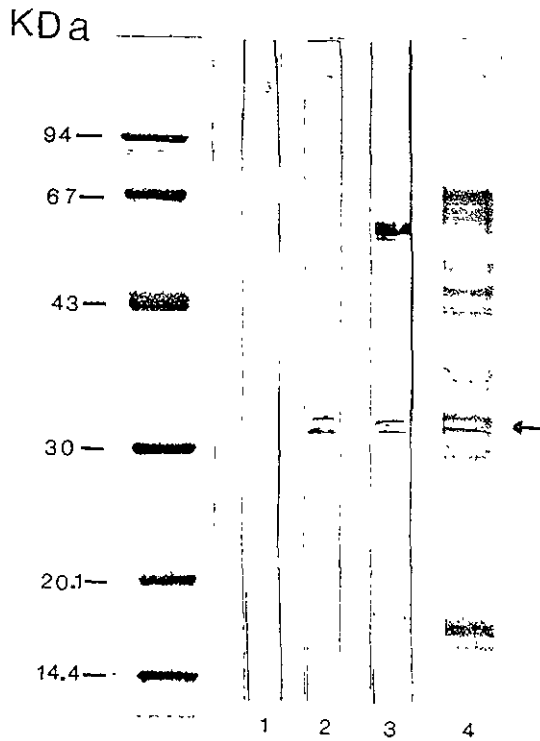


Fig.6. Inmunoelectrotransferencia que muestra el reconocimiento de las proteínas de 32-33 kDa provenientes de células HEp-2 y de vellosidades humanas por antisuero específico contra estas proteínas. *Carril 1*, antisuero preinmune. *Carril 2*, células HEp-2. *Carril 3*, microvellosidades humanas. *Carril 4*, tinción con azul de Coomassie de las proteínas totales de membrana de vellosidades después de ser separadas por electroforesis (SDS-PAGE).

Inhibición de la Adherencia Bacteriana con Antisuero

Una vez observado el reconocimiento de las proteínas por el antisuero, se procedió a determinar si dicho antisuero era capaz de inhibir la adherencia bacteriana a las proteínas de 32-33 kDa en el ensayo de electrotransferencia.

Las proteínas de membrana de vellosidades intestinales y de células epiteliales (HEp-2), fueron separadas electroforéticamente en geles de poliacrilamida SDS-PAGE, transferidas a membranas de nitrocelulosa, e incubadas con el antisuero y las bacterias marcadas radiactivamente (ver métodos). La figura 7 muestra el reconocimiento y adherencia de las bacterias a las proteínas de 32-33 kDa provenientes de vellosidades de intestino y células HEp-2. La dilución 1:100 del antisuero específico bloqueó la adherencia de las bacterias a las proteínas de 32-33 kDa. Este efecto fue observado con las cepas que tienen un patrón de adherencia localizada, difusa y agregativa (Fig.8) Posteriormente se evaluó la capacidad de este antisuero específico para inhibir la adherencia bacteriana a las células HEp-2 mantenidas en cultivo utilizando la técnica descrita por Cravioto et al 1979. Se utilizaron cepas de *E.coli* que mostraron patrones de adherencia localizada, difusa y agregativa en células HEp-2. Se encontró que la dilución 1:50 del antisuero bloqueó la adherencia de las bacterias, a las células mantenidas en cultivo. El grado de inhibición varió según el patrón de adherencia de cada cepa bacteriana. La cepa localizada E2348/69 fue la que sufrió un mayor porcentaje de inhibición $61.2 \pm 4.2\%$, seguida por la cepa agregativa JPN10 con $26.4 \pm 6.1\%$ y difusa 55784 con $11.4 \pm 3.2\%$ (Tabla 2). En general, la inhibición fue dependiente de la concentración del antisuero, ya que al aumentar la dilución del antisuero (1:200) disminuyó la inhibición a la adherencia.

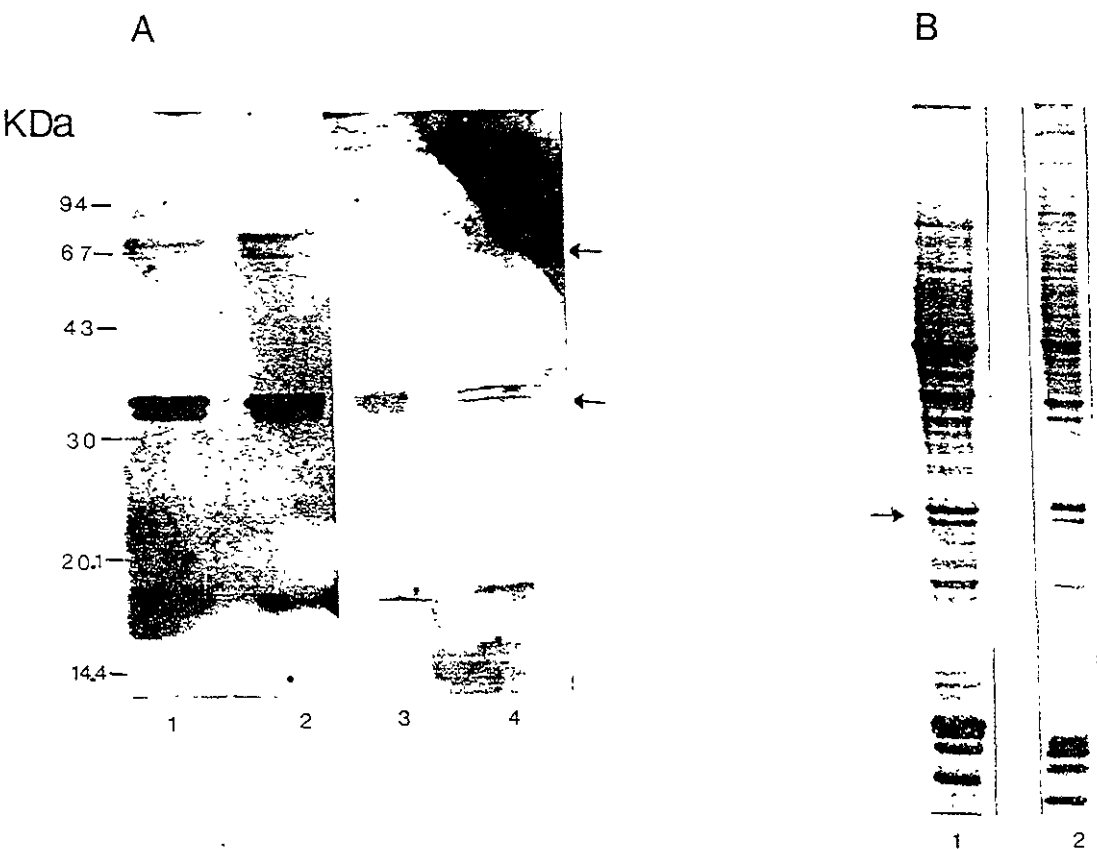


Fig.7. A) Autoradiografía que muestra el reconocimiento de las proteínas de 32-33kDa por las bacterias. *Carril 1*, células HEP-2 incubadas con cepa localizada (E2348/69). *Carril 2*, vellosidades de intestino incubada con cepa localizada (E2348/69). *Carril 3*, vellosidades de intestino incubadas con cepas difusas (88255). *Carril 4*, vellosidades de intestino incubada con cepa agregativa (JPN10).
B) Tinción con azul de coomassie de las proteínas separadas por electroforesis (SDS-PAGE). *Carril 1*, proteínas extraídas de membranas de vellosidades humanas. *Carril 2*, proteínas extraídas de membranas de células HEP-2.

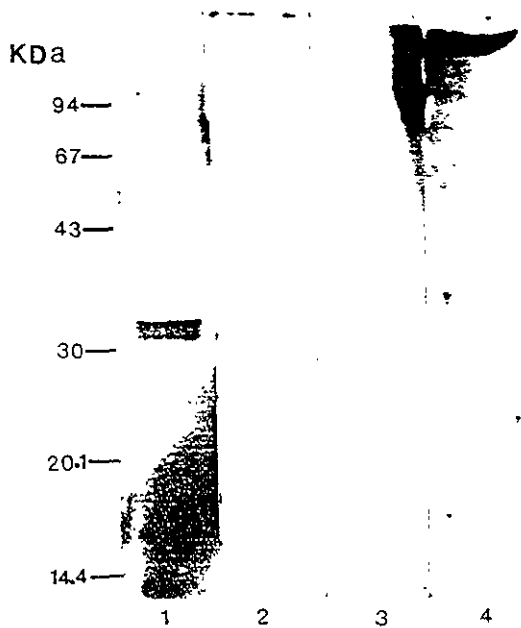


Figura 8. Inhibición de la adherencia bacteriana a las proteínas de 32-33 kDa por antisuero.

- 1) Control bacteriano que reconoce las proteínas de 32-33 kDa (localizada)
- 2) Antisuero con cepa localizada
- 3) Antisuero con cepa difusa
- 4) Antisuero con cepa agregativa

TABLA 2. PORCENTAJE DE INHIBICION A LA ADHERENCIA POR ANTISUERO DIRIGIDO CONTRA LAS PROTEINAS DE 32-33 KDa.

CEPA	TIPO DE ADHERENCIA	DILUCION DE ANTISUERO	
		1:50	1:200
E2348/69	LOCALIZADA	61.2(±4.2)	16.7 (±5.3)
55784	DIFUSA	11.4(±3.2)	4.0(±1)
JPN10	AGREGATIVA	26.4(±6.1)	6.8(±2.01)

VII.DISCUSION

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es considerada como uno de los mas importantes agentes patógenos asociados con la producción de diarrea en niños menores de 1 año de edad, EPEC coloniza el intestino y produce lesiones de adherencia y esfacelamiento (AE) caracterizadas por una destrucción localizada de las microvellosidades. Los mecanismos por los cuales EPEC causa diarrea aun son inciertos, pero la habilidad que tiene para adherirse a la mucosa intestinal y a las microvellosidades son de considerable importancia. Se sabe que las bacterias utilizan numerosas estructuras con las cuales se adhieren a los tejidos del hospedero. Uno de los mecanismos de adherencia pueden ser las moléculas adhesivas que se encuentran en la superficie bacteriana (adhesinas) las cuales reconocen receptores moleculares en la superficie epitelial del hospedero. A la fecha no se han identificado las adhesinas responsables de la adherencia de EPEC a la mucosa intestinal. Tampoco se tiene información sobre los receptores celulares que utiliza la bacteria para adherirse. Recientemente reportamos unas proteínas (32-33 kDa) de vellosidades de intestino humano, las cuales fueron reconocidas por EPEC mediante un ensayo in vitro y electrotransferencia (Manjarrez *et al.*1997). Para evaluar la relevancia de estas proteínas como receptores bacterianos consideramos de suma importancia probar la capacidad inhibitoria a la adherencia de estas proteínas por medio de antisueros dirigidos contra las proteínas de 32-33 kDa.

Para obtener una buena fracción de proteínas de superficie de (EPEC), que puedan estar involucradas en la adherencia a la mucosa intestinal, fue necesario recurrir a un efecto mecánico producido por ultrasonido. Este método de sonicación parece ser el más apropiado para la liberación de las proteínas de superficie bacteriana ya que se observó que a cortos intervalos de tiempo y a baja intensidad la sonicación

no rompe a la bacteria sin embargo, libera una gran cantidad y variedad de proteínas de la superficie bacteriana. Esto puede ser verificado mediante electroforesis en geles de poliacrilamida. El principio del ultrasonido es que convierte el voltaje (50/60 Hz) en energía eléctrica de alta frecuencia (20 Khz, 20,000 ciclos por segundo). Esta energía de alta frecuencia es transmitida a un traductor dentro del convertidor, donde es cambiada en vibración mecánica. Las vibraciones producen en el líquido la formación de millones de burbujas microscópicas (cavidades) las cuales se expanden y explotan. Este fenómeno, conocido como cavitación produce finalmente el rompimiento de las membranas celulares. Métodos similares se han utilizado con este fin (Rodríguez.1987).

La inhibición a la adherencia bacteriana (67.6% de inhibición) producida por la fracción de proteínas de superficie de EPEC liberadas por sonicación indica que esta fracción contiene proteínas involucradas en la adherencia. ya que algunas de estas proteínas se adhirieron a las células HEp-2 bloqueando de esta manera la adherencia de la bacteria completa. En otras palabras la proteínas liberadas y la bacteria compiten por los mismos receptores en las células HEp-2. Esperábamos inhibir únicamente la cepa localizada E2348/69 ya que de esta cepa obtuvimos las proteínas de superficie, sin embargo; la cepa agregativa también presentó inhibición (19.7% de inhibición) En contraste, la cepa difusa no sufrió ningún efecto de inhibición sino por el contrario el porcentaje de adherencia fue de hasta un 110%, esto es que se observó aproximadamente 10% mas bacterias adheridas a las células cuando la cepa difusa se incubó con las proteínas de superficie. En general cuando se produjo esta inhibición fue dependiente de la concentración de proteínas utilizadas ya que al aumentar la concentración de proteínas aumentó el porcentaje de inhibición. Estos resultados nos hacen pensar que las cepas con adherencia localizada y agregativa utilizan algunos receptores análogos para adherirse a las

células epiteliales. Los podemos relacionar con lo reportado por algunos autores en trabajos con bacterias en los que se indica la presencia de receptores análogos, los cuales interfieren con la adherencia y colonización bacteriana. Por otro lado, las proteínas de superficie liberadas de la cepa E2348/69 aparentemente interactuaron con la bacteria difusa puesto que favorecieron la adherencia a las células HEp-2. Estos resultados sugieren que proteínas de distintas cepas bacterianas pueden interactuar unas con otras y de esta manera favorecer la adherencia a la mucosa intestinal. Giron *et al.* proponen para las cepas localizadas que el incremento y acumulación de las bacterias a las células epiteliales es llevada a cabo mediante la formación de haces de fimbrias que se han denominado como BFP (haces formadores de fimbrias). Estas fimbrias permiten a las bacterias unirse unas con otras para formar microcolonias por medio de las cuales interactúan con las células epiteliales. La inhibición a la adherencia bacteriana causada ($61.2 \pm 4.2\%$) por las proteínas de superficie de EPEC sugiere que esta fracción de proteínas de superficie contiene adhesinas involucradas en la adherencia de las bacterias a las células epiteliales HEp-2. Es importante hacer notar que las proteínas que inhibieron la adherencia de las bacterias fue producida únicamente por las proteínas que se adhirieron a las células HEp-2, puesto que las proteínas bacterianas que no se adhirieron a las células epiteliales fueron removidas antes de agregar las bacterias en el ensayo de adherencia.

En la parte correspondiente al reconocimiento de la mucosa intestinal y células HEp-2 por las proteínas de superficie bacteriana, obtuvimos que; varias proteínas bacterianas interactuaron con las células epiteliales, entre ellas las de 27-29 kDa. Estas proteínas de 27-29 kDa tienen peso molecular similar a las proteínas reportadas por (Scaletsky 1988) correspondientes al factor de unión responsable de

la adherencia localizada. Sin embargo, la relevancia de estas proteínas en la adherencia no ha sido comprobada.

Otras proteínas bacterianas de peso molecular aproximado de 43 y 150 kDa también reconocieron la mucosa intestinal y células HEp-2 estas proteínas parecen ser muy importantes ya que fueron las bandas más intensas en la autoradiografía. Esto pudiera deberse a que dichas proteínas tienen mayor afinidad por las células epiteliales o que se encuentran en mayor cantidad en la superficie bacteriana y que es el gran número de proteínas, las que reconocieron a las células, lo que produce tal radiactividad. Al observar en estos resultados esta fuerte unión de las proteínas, nos hace pensar que la abundancia de estas proteínas sobre la superficie bacteriana le permite hacer más eficiente su interacción con las células huésped. Hasta el momento no se tienen antecedentes de adhesinas en EPEC con este peso molecular. La similitud de las proteínas reconocidas en ambos ensayos (con células HEp-2 y mucosa intestinal) nos hace pensar en la presencia de receptores similares tanto en mucosa intestinal como en células HEp-2. La adherencia de EPEC a la mucosa intestinal está mediada probablemente por varias adhesinas que poseen diferente afinidad por sus receptores y que interactúan además en forma secuencial. Al respecto se cree que las proteínas que reconocieron débilmente la mucosa intestinal tienen menos afinidad por sus receptores, pero pueden ser importantes para estabilizar la adherencia bacteriana. Nuestros resultados sugieren que los apéndices bacterianos que participan en el proceso de adherencia de EPEC se encuentran ubicados estratégicamente en la superficie bacteriana ya sea insertados directamente en la membrana externa o formando parte de una estructura fimbrial.

Estudios posteriores serían de gran utilidad para establecer la relevancia de las proteínas de 27-29,43 y 150 kDa de EPEC en el proceso de adherencia. Por lo tanto, es necesario aislar dichas proteínas y hacer ensayos de inhibición a la

adherencia ya sea con las mismas proteínas o con antisueros específicos, así como su identificación.

Cuando se aumenta el tiempo de exposición de la película, con el gel que contiene las proteínas marcadas, aparecen nuevas bandas con diversos pesos moleculares. Esto significa que otras proteínas (aproximadamente 15) se adhieren a la mucosa intestinal aunque con menor intensidad. Otra interpretación a este resultado es que dichas proteínas aparecen como contaminantes, consecuencia de las limitaciones del tipo de ensayo realizado, ya que aunque lavemos con un detergente (tween 20) el fondo no se puede eliminar. Analizando todos estos resultados se cree que un gran número de proteínas de la superficie bacteriana participan en la adherencia de EPEC a las células epiteliales. Algunas de estas proteínas probablemente son más específicas o abundantes, lo que les da su importancia en el proceso de adherencia.

Por otro lado en investigaciones previas en nuestro laboratorio se detectó la presencia de dos proteínas de 32-33 kDa en vellosidades de intestino humano, que son reconocidas por las cepas de EPEC. Estas proteínas de membrana (32-33 kDa) también se encontraron en células HEp-2. En el presente trabajo se pudo comprobar la participación de estas proteínas de vellosidades de intestino durante el proceso de adherencia de EPEC a las células HEp-2. Este resultado concuerda con lo reportado previamente (Manjarrez et al.1997) en los cuales 10 mg/ml de las proteínas de 32-33 kDa produjeron una inhibición a la adherencia del 86.7, 18.5 y 44.3% a las cepas localizada, agregativa y difusa, respectivamente. Este mismo grado de inhibición se encontró con el antisuero el cual produjo 61.2, 26.4 y 11.4% de inhibición en las cepas localizada, agregativa y difusa respectivamente. El método utilizado para producir anticuerpos contra las proteínas de 32-33 kDa resultó ser efectivo ya que se logró que los anticuerpos producidos reconocieran a las proteínas provenientes

VIII. CONCLUSIONES

En este trabajo pudimos detectar que en el proceso de adherencia de EPEC a la mucosa intestinal, interactúan un gran número de proteínas tanto de origen bacteriano como de origen celular. Entre las proteínas de origen bacteriano que consideramos de mayor importancia están las de 43 y 150 kDa, las cuales reconocieron tanto a la mucosa intestinal como a las células HEp-2. Es necesario caracterizar y aislar dichas proteínas para seguir investigando su papel en el proceso de adherencia.

Con respecto a las proteínas de origen epitelial, la participación de las proteínas de vellosidades de 32-33 kDa fue significativa en el proceso de adherencia de EPEC, ya que el antisuero específico contra las proteínas de 32-33 kDa inhibió la adherencia a células HEp-2.

Otro aspecto interesante que observamos, es que ciertas proteínas de superficie bacteriana aparentemente interactúan adhiriéndose con proteínas bacterianas de otras cepas, como en el caso de las bacterias difusas en donde se observó que las proteínas liberadas de EPEC favorecieron la adherencia de las bacterias difusas a las células HEp-2.

IX. APPENDICE

AMORTIGUADOR DE CORRIDA 1X PARA ELECTROFORESIS

Tris	3.0 g
Glicina	14.4 g
SDS	0.5 g
Volumen final	1000ml

AZUL DE COOMASSIE

(Tefidor de geles de poliacrilamida)

Azul de coomassie 0.1%	1gr
Metanol 30%	300ml
Acido acético 10%	100ml
Volumen final	1000ml

AMORTIGUADOR DE TRANSFERENCIA

ACRILAMIDA-bis Acrilamida (30:0.8)

Acrilamida	60gr
Bis-acrilamida	1.6gr
Volumen final	200ml

CALDO CASOY

(Medio de cultivo para bacterias)

Caldo casoy	3 g
Agua desionizada	100ml.

DESTENIDOR

(Desteñidor de geles de poliacrilamida)

Acido acético 10%

Metanol 20%

MEDIO SINTETICO

(Cultivo de bacterias)

NH₄ H₂ PO₄ 1.0 g

NaCL 2.5g

MgSO₄ 0.1g

K₂HPO₄ 0.5 g

Glucosa 2.5g

pH 7.2

SOLUCION SALINA DE FOSFATO

(PBS 10X)

NaCL 85g

Na₂HPO₄ 10.7g

NaH₂PO₄ 3.9g

Volumen final 1000ml

PMSF

(Inhibidor de proteasas)

PMSF 17.4mg/ml

Volumen final 1ml de isopropanol

REVELADOR DE INMUNOBLOT

Chloranaphthol 0.2ml

Trisma base 50mM

Peróxido de hidrógeno 30%

SOLUCION A

EDTA 5mM

Hepes-Tris 1mM

Trisma base 1mM 0.24g

pH 7.5

Volumen final 200ml

SOLUCION B

EDTA 0.8mM

NaCL 0.09M

Hepes-Tris 1mM

pH 7.5

Volumen final 200ml

**SOLUCION AMORTIGUADORA PARA
ELECTROTRANSFERENCIA**

Tris 50mM
Glicina 380mM
SDS 0.1%
Metanol 20%

SOLUCION LAEMMLI 4X

SDS 0.12 g
Mercaptoetanol 0.5 ml
Azul de bromofenol 0.5 g
Glicerol 1.0 ml
Tris HCL 0.063 M

SOLUCION pH 8.8

Trisma base 36.3gr
Volumen final 100ml

SOLUCION pH 6.8

Trisma base 6.0gr
volumen final 100ml

BIBLIOGRAFIA

- Albert, M. John.,** S.M.Faruque, P.K.B.Neogi, M.ansaruzzaman, N.A.Bhuiyan, K.Alam and M.S.A.KBar. 1995. Controlled Study of *Escherichia coli* Diarreheal Infeccion in Bangladeshi Children. *Journal of clinical Microbiology* . 33: 973-977
- Ausubel, M.,** Kington,B.R.,David.G.J.1987. Current protocols in molecular Biology.United Estates of America.10.1.1- 10.1.3
- Beachey,E.H.**1981. Bacterial adherence adhesin-receptor interactions mediating the attachmen of bacterial to mucosal surfaces.*J.Infect.Dis.* 143:325-345
- Bhan,M.M.,**Ray.P.,Levine.M.M.,Kaper.J.B.1989. Enteroagregative *Escherichia coli* Asociated with Persistent Diarrhea a Cohor of Rural Children in India.*J.of Infec.Dise* 159:1061-1065
- Contreras, H.M** 1990. Prevención y control de las diarreas. Memorias del seminario internacional de enfermedades diarreicas e hidratación oral. 5-13 pp
- Cooper, M. H.,** and Paterson, Y. 1991. Production of antibodies. *Current Protocols in Immunology.* 241-247
- Cravioto A.,** Eslava C.1994. Vacunas contra *Escherichia coli* causante de diarrea en humanos.*Vacunas y Salud. México.*493-499
- Elliott,S.J.,** and J.P.Nataro.1995. Enteroaggregative and difffusely adherent. *Escherichia coli.* *Reviews in Medical Microbiology.*6:196-206
- Fasano,A.**1997. Cellular Microbiology: How enteric pathogens socialize with their intestinal host. *Features.*63:259-265
- Firon,N.D.D.,**and Nathan, S.1985. Manose specific adherence of *E.coli* to BHK cells taht differ in their glycosylation patters.*FEMS Microbiology Letters.*27:161-165

- Giron, J.A., T. Jones, F. Millanuelasco.** 1991. Diffuse-adhering *E.coli* (DAEC) as a putative cause of diarrhea in Mayan children in México. *J. Infect. Dis.* 163:507-513
- Harlow, E., and D. Lane.** 1988. *Antibodies a Laboratory Manual*. Chapter 20. Col Spring Harbor, Box 100, Cold Spring Harbor, New York 11724
- Jones, C.H., F. Jacob-Dubuisson, K. Dodson, M. Kuehn, L. Slonim, R. Striker, and S.J. Hutt.** 1992. Adhesin presentation in bacterial requires molecular chaperonas and ushers. *Infeccion and Immunity.* 445-451
- Knutton S., Mary M. Baldini, James B. Kaper, and Alexander S. McNeish.** 1987. Role of Plasmid-Encoded Adherence Factors in Adhesión of Enteropathogenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Journal of General Microbiology.* 55:78-85.
- Knutton S., Robert K. Shaw, Mahara. J.K Bham, Henry R. Smith, Moyra M. Mc Connell, Tom Cheasty, Peter H. Williams, and Tom J. Baldwin.** 1992. Ability of Enteroggregative *E.coli* strain To Adherence Invitro to Human Intestinal Mucosa. *Infeccion and Immunity.* 60: 2083-2-91
- Levine, M.M., and Edelman Robert.** 1984. Entropatogenic *Escherichia coli* of classic serotypes Associated with Infant Diarrhea: Epidemiology and Pathogenesis *Epidemiology. Reviews.* 6:31-51
- Manjarrez, J.A., Gavilanes, P.S., Chávez, B. Ma E, Molina, L.J, and Cravioto, A.** 1997. Binding of diarrheagenic *Escherichia coli* to 32 to 33-kilodalton human intestinal brush border proteins. *Infection and Immunity.* 65:
- Murray R.P., Ph.D.** *Microbiología Médica.* 1993. Reverte, España. 470-679 pp
- Nathan, S. and Halina, L.** 1989. Lectins as cell recognition molecules. *Science.* 246:226-246
- OMS.** Las condiciones de la Salud en las Américas. Organización panamericana de la Salud. 1994, volumen 2:306-313

Popot, J-L. 1986. La estructura de las proteínas de membrana. Investigación y Ciencia

Rietschel T.E, Helmut Brade. 1992. endotoxinas Bacterianas. Scientific American. August. 26-33

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

Roth, J.A., Carole A, Bolin Kim A. Brogden F. 1995. Virulence mechanisms of bacterial pathogens. American Society for Microbiology. 3-9

Ruosiahti, E. 1991. Integrin. American Society for Clinical Investigation, Inc. 87:1-5

Ryley,L.W.,L.N.Junio,L.B.Libeaq,and G.K.Schoolnik.1987. Plasmid encoded expression of lipopolisaccharide O-antigenic polysaccharide in enteropathogenic *E.coli*.Infect.Immun.55:2052- 2056

Salyers, A.A and Whitt, D. D. 1994. Bacterial Patogenesis. United States of American. 190- 202pp

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., A.R.Milani,L.Trabulsi, and L.Travassos. 1988. Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *E.coli*. Infect. Imum.56:2979-2983

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiologica.1997.Bolctin Epidemiologico.Vol.14, semana 28.17-23 mayo

- Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica.**1998. Boletín Epidemiológico.Vol.15, semana 20.17-23 mayo
- Smith,H.R.,** S.M. Scotland, G.A.Willshaw, B.Rowe, A.Cravioto, and C. Eslava. 1994. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of Diverse Origin Are Enteroagregative. Journal of Infectious Diseases. 170:1610-13
- Stanier, Y. R.** Microbiología.1992. Reverte, España. 470-676 pp
- Stryer, L.** 1985. Bioquímica. Reverte,México. 871pp