



**Universidad Nacional Autónoma de México**  
**Facultad de Estudios Superiores Zaragoza**



**Análisis del papel del sistema toxina-antitoxina tipo II Z1059-Z1060 en la patogénesis de *Escherichia coli* enterohemorrágica**

Tesis que para obtener el título de:  
Químico farmacéutico Biológico

Presenta:

**Martínez López Eduardo Abihú.**

No. Cuenta: 3606138841

Director:

**Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas**

Asesor:

**Dr. Rubén Marroquín Segura**

México, D.F., Noviembre del 2015



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

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

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

## **Agradecimientos**

Este trabajo fue realizado en el Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI- IMSS, en la Unidad de Infecciones Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, con lo cual estoy completamente agradecido por abrirme las puertas para poder realizar este trabajo.

Esta tesis va dirigido a aquellas personas que con su apoyo han logrado que siga adelante y que han influido sobre mi persona y que me han enseñado día con día, que la vida es un constante aprendizaje.

A quienes hacen posible todo esto, a mi familia. Agradeciéndoles infinitamente, ya que con su apoyo han logrado que esto sea posible, estoy orgulloso de ustedes. Gracias a mis padres Eduardo Martínez Martínez y Marlene López Zapata, que han sido mí constante apoyo siempre y en todo lugar y sé que puedo contar con ellos siempre.

A mis hermanos Yair Alí Martínez López y Juan Manuel Martínez López, que los quiero mucho.

Quiero agradecer infinitamente a Jazmín Guadalupe Camacho Rodríguez, por estar siempre presente en cada aspecto de mi vida y por el apoyo incondicional que me ha brindado a lo largo de todo este tiempo que hemos compartido juntos y estar presente cuando más la he necesitado, no dejando que desista ante cualquier adversidad. No alcanzan las palabras para agradecerse y poder demostrar lo que siento por ella y estimo.

Al Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas, que me ha dado la oportunidad de formar parte de su equipo de trabajo, confiar en mis habilidades para, con su ayuda y consejos, poder sacar adelante este proyecto. Pero sobre todo, por brindarme su amistad y consejos, que siempre estarán presentes en las decisiones que realice, siempre estaré agradecido de todo corazón

A la Maestra en ciencias Gabriela por enseñarme y ayudarme en el manejo de datos, agradezco sus enseñanzas y su amistad que me brindo.

A los señores Emma Rodríguez y Simón Camacho por preocuparse por mí y, hacerme sentir siempre en casa.

A mis compañeros de la Universidad: Mónica Hernández, Cristian Arce, Juan Rojas Rodríguez, Lázaro Limón Edith, Jorge Desion, Roberto Toledo, Mitzi, Miguel y Alejandra.

A mis amigos, que han formado parte de mi vida y serán siempre mis hermanos: David Miranda Fuentes, Alain Servín Carmona, Daniel Agustín, Rosas Almanza Mario.

A mis familiares que siempre estarán en mi corazón y permanecerán de forma imborrable: Dolores, Roció, Elías, Antonio, Leticia, Efrén.

Un especial agradecimiento a mis tías Maribel y Griselda por el apoyo que me han brindado a mí y a mi familia.

A mis sobrinitas Sofía y Abigail que son mis pequeños rayos de alegría.

A mis abuelos Onésimo López, Adela Zapata, Modesto Martínez y Elena Martínez, mis bisabuelos Manuela Peña y por el cariño y apoyo que me han brindado a lo largo de toda mi vida.

Y un especial agradecimiento a quienes hacen posible todo esto, a mi familia. Agradeciéndoles infinitamente, ya que con su apoyo han logrado que esto sea posible, estoy orgulloso de ustedes. Gracias a mis padres Eduardo Martínez Martínez y Marlene López Zapata, que han sido mi constante apoyo siempre y en todo lugar y sé que puedo contar con ellos siempre y en todo lugar, inspirándome en alcanzar mis sueños. A mis hermanos Yair Alí Martínez López y Juan Manuel Martínez López, que los quiero mucho.

A todos mis compañeros(as) del laboratorio de la Unidad de enfermedades Infecciosas y parasitarias, del Hospital de Pediatría Siglo XXI IMSS. Un especial agradecimiento a la Dra. Margarita Camorlinga, la Dra. Guadalupe Cárdenas, y Graciela.

A la UNAM y a la FES Zaragoza por la excelente formación académica.

A mi asesor de tesis: Dr. Rubén Marroquín Segura y a mis revisores: José Oscar González Moreno, Esperanza Jiménez Castañeda y Alicia Cabrera Aguilar.

Gracias a cada uno por sus constantes enseñanzas y saber que uno nunca deja de aprender.

## TABLA DE CONTENIDO

	Pág.
Abreviaturas	1
Anexos	3
1. Introducción	4
2. Marco teórico	6
2.1 <i>Escherichia coli</i>	6
2.1.1 Características morfológicas y fisiológicas de <i>E. coli</i>	6
2.1.2 Epidemiología	8
2.1.3 Cuadro clínico ocasionado por <i>E. coli</i> intestinales	8
2.2 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	12
2.2.1 Cuadro clínico	12
2.2.2 Factores de virulencia	15
2.2.3 Sistemas de secreción	17
2.2.4 LEE	18
2.2.5 Toxina Shiga	21
2.3 Sistema Toxina-antitoxina	22
2.3.1 Clasificación de los sistemas Toxina-Antitoxina	22
2.3.2 Sistema Toxina-antitoxina tipo II y patogénesis	25
3. Planteamiento del problema	27
4. Hipótesis	27
5. Objetivos	28
6. Diseño experimental	28
7. Materiales y Métodos	29
8. Resultados	40
9. Análisis de resultados	46
10. Conclusiones	49
11. Perspectivas	50
12. Glosario	51
13. Referencias	55

## ABREVIATURAS

A	Antitoxina
A/E	Adhesión y borrado
Ap	Ampicilina
APS	Persulfato de amonio
CA	Complejo de aguja
Cm	Cloranfenicol
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difuso adherente
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EMSA	ensayos de cambio en la movilidad electroforética
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatogena
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigenica
GB3	Globotriaosilceramida
gfp	Proteína verde fluorescente
HGT	Transferencia Horizontal de Genes
HUS	Síndrome Urémico Hemolítico
ITU	Infecciones del tracto urinario
Km	Kanamicina
LB	Luria-Bertani
LEE	Locus de la Eliminación del Enterocito
Ler	Regulador maestro Ler
LPS	Lipopolisacárido

LT	Toxinalábil
ORFs	Marcos de lectura abiertos
PBS	Solución buffer de fosfatos
PAIs	Islas de patogenicidad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
SST3	Sistema de secreción tipo 3
ST	Toxina termoestable
Stx	Toxina tipo Shiga
T	Toxina
TA	Toxina-antitoxina
TBE	Tris borato EDTA
TEMED	N,N,N',N'-tetrametilendiamina
Tir	Receptor translocadointimina
UFC	Unidades Formadoras de Colonia
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena

## Anexos

### INDICE DE FIGURAS

**Figura 1.** Sitio de colonización de diferentes patógenos de *Escherichia coli*.

**Figura 2.** Patotipos de *Escherichia coli* por diferentes elementos móviles: plasmidos, fagos, PAI, transposones.

**Figura 3.** Mecanismos de invasión de los diferentes patotipos diarrogénicos.

**Figura 4.** Pared celular de enterobacterias.

**Figura 5.** Sistemas de secreción de proteínas de bacterias Gram negativas.

**Figura 6.** La regulación central de la isla LEE.

**Figura 7.** Lesiones histopatológicas inducidas por adhesión y borrado (A/E) patógenos, codificado por LEE.

**Figura 8.** Los cinco tipos de sistemas Toxina-Antitoxina.

**Figura 9.** Generación de mutantes por el método de interrupción por un solo paso.

**Figura 10.** Generación de la fusión transcripcional *ettAB-gfp*.

**Figura 11.** El sistema toxina-antitoxina Z1059-Z1060 está presente en patotipos de *E. coli*.

**Figura 12.** Cinética de crecimiento de la cepa silvestre (wt) y las diferentes mutantes  $\Delta ettA$ ,  $\Delta ettB$  y  $\Delta ettAB$ .

**Figura 13.** Niveles de expresión a dos temperaturas de crecimiento 37°C y Temperatura ambiente la cepa silvestre (wt) y las diferentes mutantes generadas ( $\Delta ettA$ ,  $\Delta ettB$  y  $\Delta ettAB$ ).

**Figura 14.** Análisis de las fracciones de la antitoxina EttB-Myc-6XHis purificada.

**Figura 15.** La antitoxina EttB-Myc-6XHis se unió específicamente a su propio promotor.

**Figura 16.** Adherencia de EHEC y derivadas mutantes en el sistema TA tipo II EttAB.



## 1. Introducción

Los sistemas de toxina-antitoxina (TA) tipo II se consideran como pares de proteínas en las que una toxina se asocia con una antitoxina (antídoto) formando un módulo. Por medio de una búsqueda bioinformática se identificó un sistema TA tipo II Z1059-Z1060 en la cepa patógena EDL933 de *Escherichia coli* (*E.coli*) enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en inglés). Se generaron mutantes nulas por medio de la interrupción genética en un solo paso.

Para analizar la expresión transcripcional del operón *z1060-z1059*, se clonó la región promotora de este sistema en un plásmido que lleva el gen reportero *gfpmut3A*. Se analizaron los niveles de expresión, detectando los niveles de fluorescencia por medio de citometría de flujo. La ausencia de la antitoxina Z1059 (EttB) incrementó los niveles de expresión del sistema Z1059-Z1060, observando que la antitoxina Z1059 (EttB) reprime su propia expresión. Además de lo anterior, se analizó la interacción directa de la antitoxina Z1059 (EttB) sobre su propia región promotora usando Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética, (EMSA, por sus siglas en inglés). La antitoxina Z1059 (EttB) fue capaz de unirse a su propia región promotora observando complejos DNA-proteína.

Interesantemente, la ausencia de la antitoxina Z1059 (EttB) afectó el crecimiento de EHEC a temperatura ambiente pero no a 37°C. Nuestros datos mostraron que el sistema Z1059-Z1060 fue estimulado a bajas temperaturas con respecto a 37°C.

Las mutantes derivadas del sistema Z1059-Z1060 fueron analizadas en su interacción tanto a células animales (células vero, 37°C) como vegetales (lechuga, temperatura

ambiente). En línea con los datos de termorregulación, la mutante antitoxina z1059 ( $\Delta ettB$ ) estuvo afectada en la adherencia a células vegetales pero no a células animales, indicando que este sistema es relevante para la patogénesis de EHEC a temperatura ambiente.

## **2. Marco teórico**

### **2.1 *Escherichia coli***

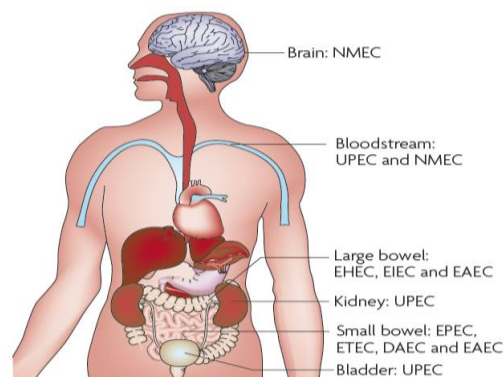
#### **2.1.1 Características morfológicas y fisiológicas de *E.coli***

El género *Escherichia* son bacterias Gram negativa pertenecientes a la familia Enterobacteriaceae. El género está conformado por seis especies: *Escherichia coli*, *Escherichia hermannii*, *Escherichia fergusonii*, *Escherichia vulneris*, *Escherichia blattae* y *Escherichia albertii*(1). Las bacterias del género *Escherichia* son oxidasa negativas y son anaerobias facultativas que tienen tanto un tipo de metabolismo respiratorio y uno fermentativo. Tanto la generación de ácido y gas se forman a partir de la mayoría de los hidratos de carbono fermentables.

La especie más frecuente e importante del género es *E. coli*, la cual fue aislada por primera vez de las heces de un niño en 1885 por el pediatra austriaco Theodor Escherich(2). *E. coli* es un bacilo Gram negativo de tamaño 0.3-1 x 1-6  $\mu\text{m}$ , que juega un papel nutricional en el tracto intestinal al sintetizar vitaminas, particularmente vitamina K (3). Las cepas silvestres de *E. coli* rara vez requieren factores de crecimiento y son capaces de crecer utilizando una amplia variedad de fuentes de carbono y energía como azúcares, aminoácidos, ácidos orgánicos, tiene requerimientos nutricionales sencillos: fermentan la glucosa y lactosa, son capaces de reducir los nitratos a nitritos, son catalasa-positivos y presentan una cápsula prominente (4).

*E. coli* es una cepa comensal del intestino delgado no patógena que forma parte de la biota intestinal tanto del humano como de muchos mamíferos. La pérdida y la ganancia de elementos genéticos móviles tienen un principal papel en la formación de los

genomas de bacterias patógenas. Grandes grupos de genes de virulencia, denominadas Islas de Patogenicidad (PAIs), se pueden encontrar en plásmidos o integrados en el cromosoma en bacterias patógenas, pero que no se encuentran en las bacterias no patógenas. Debido a estos mecanismos de recombinación se han generado patotipos de *E. coli*, los cuales forman parte de la misma especie pero con características de virulencia que las hacen diferentes a nivel de patogenicidad. Hasta la fecha, ocho patotipos y sus mecanismos de la enfermedad han sido ampliamente estudiados. Estos patotipos pueden ser ampliamente clasificados como: *Escherichia coli* Diarrogénicos y *Escherichia coli* Extraintestinales (ExPEC). Los seis patotipos diarrogénicos son: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* difuso adherente (DAEC) y *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) y dos patotipos extraintestinales: *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) y *Escherichia coli* meningitis neonatal (NMEC) (5)



**Figura1. Sitio de colonización de diferentes patógenos de *Escherichia coli*** EPEC, ETEC y DAEC colonizan el intestino delgado, ocasionando diarrea, mientras que EHEC y EIEC ocasionan la diarrea en el intestino grueso; EAEC puede colonizar ambos intestinos. UPEC entra en el tracto urinario y viaja a la vejiga para causar cistitis, sin tratamiento, puede ascender a los riñones provocando pielonefritis. La septicemia puede ocurrir tanto con UPEC y NMEC meningitis neonatal, NMEC puede cruzar la barrera hematoencefalica, causando meningitis (5).

### **2.1.2 Epidemiología**

La importancia de EHEC como problema de salud pública se hizo presente después de un brote epidemiológico registrado en los Estados Unidos en 1982 cuando muchas personas enfermaron tras la ingestión de salchichas que no se calentaron lo suficiente (6), así como de una infección reportada en Las Vegas asociada con hamburguesas en 1992 (7). Similarmente, en 1996 en Japón (8), un brote de EHEC provocó que más de 9.000 escolares enfermaran por la ingestión de semillas germinadas de rábanos. Más de 1000 casos reportados y 2 muertes fueron registrados en Nueva York en 1999 debido a la contaminación de pozos de agua por el escurrimiento de estiércol de ganado infectado (9) y en 2006 en 26 estados de Estados Unidos de América (10).

En 2009 se documentaron en Alemania un total de 836 casos de infección de EHEC sin Síndrome Urémico Hemolítico (HUS, por sus siglas en inglés) según el Instituto Robert Koch, el 44% de ellos niños de menos de 5 años. En este contexto, hubo un brote epidemiológico en el verano del 2011 en el norte de Europa, donde cepas híbridas EHEC/EAEC encontradas en lechugas y otros vegetales causaron la muerte de cientos de personas (11). Estos últimos hallazgos mostraron la importancia de estas cepas patógenas y la plasticidad de su genoma.

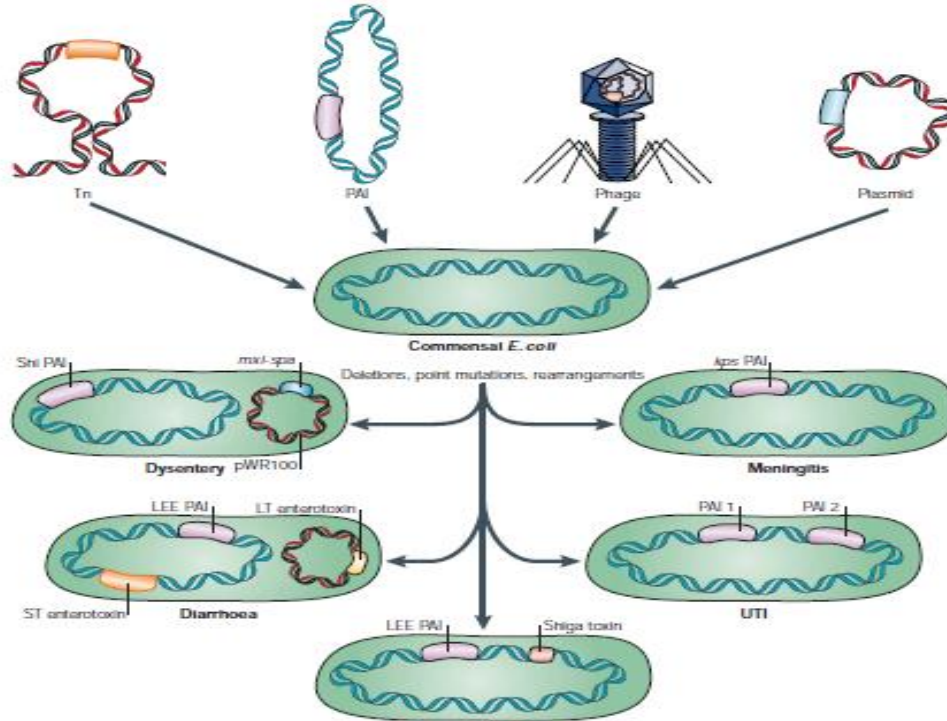
### **2.1.3 Cuadros clínicos ocasionados por *Escherichia coli* intestinales**

*E. coli* es una bacteria entérica habitual en el intestino del ser humano y de otros animales. La bacteria se transmite principalmente por el consumo de alimentos contaminados, como productos cárnicos poco cocidos, leche cruda, hortalizas contaminadas con materia fecal (12-14).

Las cepas de *E. coli* patógenas están asociadas a múltiples enfermedades que incluyen tanto gastroenteritis como infecciones extra intestinales, tales como como la Insuficiencia en el Tracto Urinario (ITU), meningitis y sepsis. Las cepas patógenas de *E. coli* están implicadas en diarreas en niños, siendo un grave problema de salud en los países en desarrollo. *E. coli* es responsable de un número considerable de infecciones del tracto urinario femenino (15, 16).

La pérdida y la ganancia de elementos genéticos móviles tienen un principal papel en la formación de los genomas de bacterias patógenas. La Transferencia Horizontal de Genes (HGT, por sus siglas en inglés) es un mecanismo importante que difunde rápidamente nuevos rasgos. La adquisición de estas nuevas características es crucial en la promoción de la supervivencia de un patógeno, mientras que evoluciona con su anfitrión. Grandes grupos de genes de virulencia, denominadas islas de patogenicidad (PAIs, por sus siglas en inglés), se pueden encontrar en plásmidos o integrados en el cromosoma en patógena bacterias, pero que no se encuentran en las bacterias no patógenas. PAIs se suelen logran transmitir por medio de: elementos genéticos móviles, bacteriófagos, secuencias de inserción o transposones(17).

Los 6 principales patotipos diarrogénicos, son: EPEC, ETEC, EIEC, EAEC, ETEC, DAEC y EHEC (16). Los diferentes patotipos comparten muchas estrategias devirulencia y la adherencia a las células huésped es un requisito para todos los patotipos exceptuando EIEC.Después de la unión a la célula epitelial, debe evadir la respuesta inmune y lograr una colonización eficiente, para poder ocasionar la enfermedad(5).



**Figura2. Patotipos de *Escherichia coli* por diferentes elementos móviles: plásmidos, fagos, PAI, transposones.** Se ha propuesto que a partir de una *E. coli* comensal se han originado varios patotipos debido a la adquisición de factores de virulencia por transferencia horizontal codificados en elementos móviles, tales como plásmidos, transposones, islas de patogenicidad o DNA de bacteriófagos

Los mecanismos de invasión de los diferentes patotipos diarrogénicos se representan en la figura 3, y son los siguientes:

EPEC se adhieren a los enterocitos intestinales, destruyendo la arquitectura normal de microvellosidades, induciendo la fijación característica y lesión modesta. Alteraciones del citoesqueleto se acompañan de una respuesta inflamatoria y diarrea. Empieza con una adherencia inicial, seguida de la formación del Sistema de Secreción Tipo 3 (SST3) y por último la formación del “pedestal”.

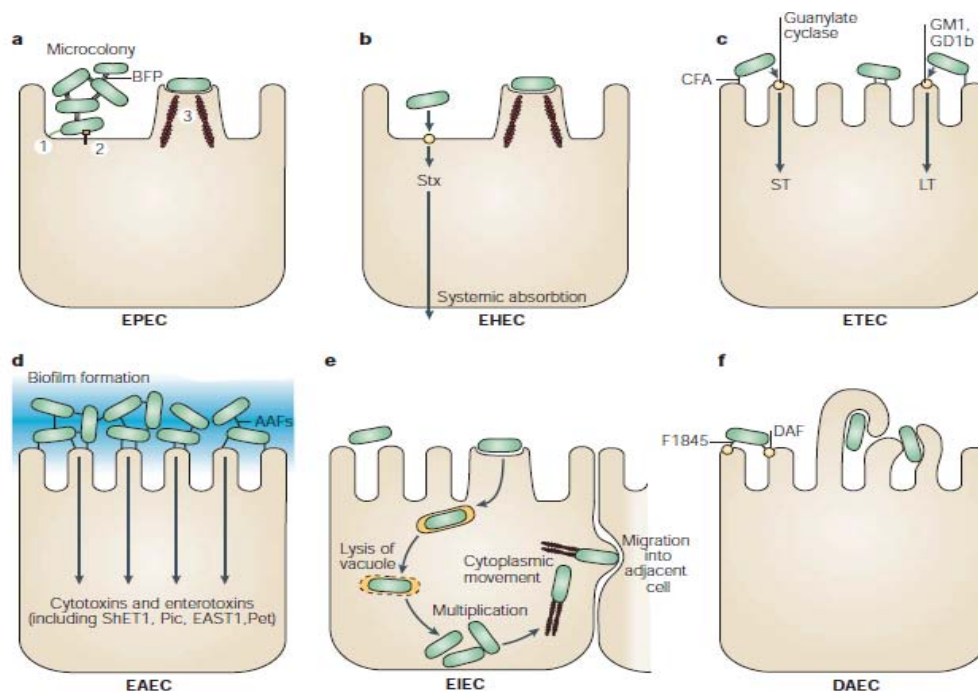
EHEC también induce la formación de pedestales, pero en el colon. La característica distintiva de EHEC es la elaboración de la toxina Shiga (Stx), que puede conducir a mortales complicaciones.

EPEC se adhieren a los enterocitos intestinales e inducen diarrea acuosa por la secreción de dos enterotoxinas: termolábil (LT) y termoestable (ST).

EHEC se adhiere a las células epiteliales intestinales formando una biopelícula gruesa mediada por la formación de fimbrias.

EIEC invade la célula epitelial del colon, lisa el fagosoma y se mueve a través de la célula por nucleación de microfilamentos de actina. Las bacterias pueden moverse lateralmente a través del epitelio por propagación directa de célula a célula o pueden salir y volver a entrar en la membrana plasmática.

EAEC provoca un efecto de transducción de señal característica en enterocitos del intestino delgado que se manifiesta como el crecimiento de las proyecciones celulares largos en forma de dedos, que se envuelven alrededor de las bacterias (17).



**Figura3. Mecanismos de invasión de los diferentes patotipos diarrogénicos** Esquema representativo de las seis categorías reconocidas de *E. coli* diarrogénicas cada uno tiene características únicas en su interacción con las células eucariotas. a) EPEC b) EHEC c) ETEC d) EAEC e) EIEC f) DAEC



## **2.2 *Escherichia coli* enterohemorrágica**

### **2.2.1 Cuadro clínico**

Las infecciones pueden variar de diarrea acuosa leve a diarrea sanguinolenta (colitis hemorrágica) y presentar un riesgo para el desarrollo de Síndrome Urémico Hemolítico (HUS). El período de incubación antes de la aparición de los primeros síntomas es de 3 días, siendo el primer síntoma la diarrea, que puede ser acompañada por fiebre y dolor abdominal con vómitos.

Los pacientes pueden experimentar colitis hemorrágica en los días subsecuentes, con una resolución de la diarrea, pero se debe tener preocupación debido a la asociación de las infecciones con HUS, y puede desarrollarse entre los días 5 y 13 después de la aparición inicial de la diarrea. A largo plazo pueden presentarse secuelas cardíacas, HUS incluyendo complicaciones gastrointestinales, trastornos neurológicos, hipertensión, enfermedad renal crónica y cambios en el comportamiento (18).

Las personas que sufren diarrea sanguinolenta o calambres abdominales intensos deben buscar atención médica. Los antibióticos no deben formar parte del tratamiento de los pacientes con enfermedad por EHEC, y posiblemente aumentan el riesgo de HUS posteriormente.

### **El síndrome urémico Hemolítico (HUS)**

El síndrome urémico hemolítico (SUH) es un síndrome clínico caracterizado por la tríada de microangiopatía trombótica, trombocitopenia y lesión renal aguda. Se presentan lesiones endoteliales secundarias debido a la toxina Shiga producidas por

las bacterias. El HUS familiar supone el 5-10% de los casos. En algunos de estos pacientes se encuentra una deficiencia o forma anómala del Factor H del complemento (19).

El HUS se observa principalmente en niños, sobre todo tras una infección digestiva por *E. coli*, en general del serotipo O157:H7, asociado a una diarrea sanguinolenta grave. El HUS se encuentra también en adultos, sobre todo, asociado a la exposición a diversos fármacos (mitomicina C, ticlopidina, ciclosporina, tacrolimús, quinina o quimioterapia combinada), en el período posparto, en la inmunosupresión o tras el trasplante de médula ósea de órganos. (20-22), La disfunción renal es el rasgo dominante y con frecuencia necesita diálisis. Los síntomas neurológicos son en general menos llamativos. El HUS suele cursar como un episodio único. La proteinuria, la hematuria y el aumento de las concentraciones de nitrógeno ureico y creatinina en sangre reflejan el grado de insuficiencia renal. Otros datos de laboratorio incluyen una anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y aumento de Lactato Deshidrogenasa (LDH)(23).

### **Infección del sistema urinario**

*E. coli* es la causa más frecuente de infección de las vías urinarias y contribuye a casi 90% de las primeras infecciones urinarias en mujeres jóvenes. Los síntomas y signos consisten en polaquiuria, disuria, hematuria y piuria. El dolor en la fosa rena (región lumbar unilateral) que se relaciona con infección urinaria alta. Ninguno de estos síntomas o signos es específico de la infección por *E. coli*. La infección del sistema urinario puede ocasionar bacteriemia con signos clínicos de septicemia (24). La mayor

parte de las infecciones urinarias que afectan a la vejiga o al riñón en un hospedador, por lo demás “sano”, son causadas por un pequeño número de tipos de antígeno o que han elaborado específicamente factores de virulencia que facilitan la colonización y las infecciones clínicas subsiguientes. Tales microorganismos se designan como *E. coli* uropatógena. Por lo general estos microorganismos producen hemolisina, que es citotóxica y facilita la invasión de los tejidos. Las cepas que producen pielonefritis expresan el antígeno K (capsular) y elaboran fimbrias P (pili) (25).

### **Septicemia**

De forma característica, proviene de infecciones del aparato urinario o digestivo, como puede ser una perforación gastrointestinal que provoca una infección intraabdominal. La mortalidad que se asocia a la septicemia es elevada en pacientes cuya inmunidad está alterada, o en los que la infección primaria se localiza en el abdomen o en el SNC.

Cuando las defensas normales del hospedador son inadecuadas, *E. coli* puede llegar al torrente sanguíneo y producir septicemia. Los recién nacidos son muy susceptibles a septicemia con *E. coli* porque carecen de anticuerpos IgM. La septicemia puede presentarse como consecuencia de la infección del sistema urinario.

### **Meningitis neonatal**

Meningitis bacteriana neonatal es infrecuente pero devastadora. La morbilidad entre los sobrevivientes sigue siendo alta. Los tipos y la distribución de los patógenos están relacionados con la edad gestacional, la edad postnatal, y región geográfica. Confirmación del diagnóstico es difícil. Los signos clínicos son a menudo sutiles, punciones lumbares se difieren con frecuencia, y los cultivos de líquido cefalorraquídeo

(LCR) puede verse comprometida por la exposición a antibióticos. Los niños con meningitis bacteriana pueden tener hemocultivos negativos y los parámetros normales del LCR. Pruebas prometedoras, tales como la PCR requieren un mayor análisis. El tratamiento oportuno con antibióticos es esencial(26).

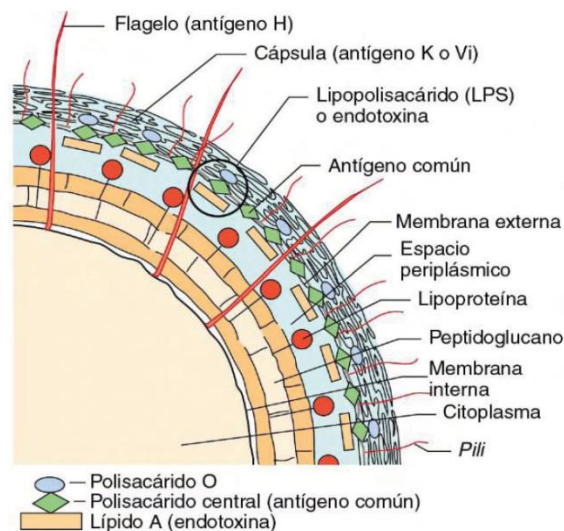
### **2.2.2 Factores de virulencia**

EHEC posee una amplia variedad de factores de virulencia además de los factores generales que comparten todos los miembros de la familia Enterobacteriaceae, como son el lipopolisacárido (LPS) y capsula. Las cepas de EHEC poseen factores de virulencia especializados, tales como las adhesinas y las exotoxinas (27).

También se encuentran presentes 2 principales factores de virulencia: el sistema de secreción tipo 3 (SST3) codificado en la isla de patogenicidadLEE y la Toxina tipo Shiga (Stx).

#### **Lipopolisacárido (LPS)**

El LPS es el principal antígeno de la pared celular y está formado por tres componentes: el polisacárido somático O más externo, una región central polisacáridica compartida por todas las enterobacterias, conforma el antígeno común enterobacteriano y el lípido A (figura 4)



**Figura4. Pared celular de enterobacterias.** La pared de las enterobacterias se compone de el lipopolisacárido , que es el principal antígeno de la pared celular, conformado por el polisacárido O, polisacáridocentral y lípido A(21).

La actividad del LPS depende del componente lípido A del lipopolisacárido que se libera durante la lisis celular. Muchas de las manifestaciones sistémicas de las infecciones por bacterias Gram negativas se inician por el LPS, entre ellas las siguientes: activación del complemento, liberación de citocinas, leucocitosis, trombopenia, coagulación intravascular diseminada, fiebre, disminución de la circulación periférica, shock y muerte (29).

### Cápsula

La formación de la cápsula protege de la fagocitosis mediante los antígenos capsulares hidrofílicos, los cuales repelen la superficie hidrofóbica de la célula fagocítica. Estos antígenos interfieren en la unión de los anticuerpos a las bacterias y son poco inmunógenos o activadores del complemento. Sin embargo, el papel protector de la cápsula se reduce cuando el paciente desarrolla anticuerpos anticapsulares específicos.

Las adhesinas son un grupo de proteínas en *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) que están implicados en la unión o la colonización de este patógeno a las superficies biológicas, tales como las que se encuentran en el aparato urinario o en el aparato digestivo como consecuencia de su capacidad de adherencia a las células en estas localizaciones para evitar ser eliminado por el efecto de arrastre de la orina que se expulsa con la micción o por la motilidad intestinal. Las cepas de *E. coli* poseen numerosas adhesinas muy especializadas. Estas incluyen factores antígenos del factor de colonización (CFA/I, CFA/II, CFA/III), fimbrias de adherencia y agregación (AAF/I, AAF/III), pili que forman haces (Bfp), intimina, pili P que se une a los antígenos del grupo sanguíneo P, proteína Ipa (antígeno del plásmido de invasión) y fimbrias Dr, que se unen a los antígenos del grupo sanguíneo Dr(30).

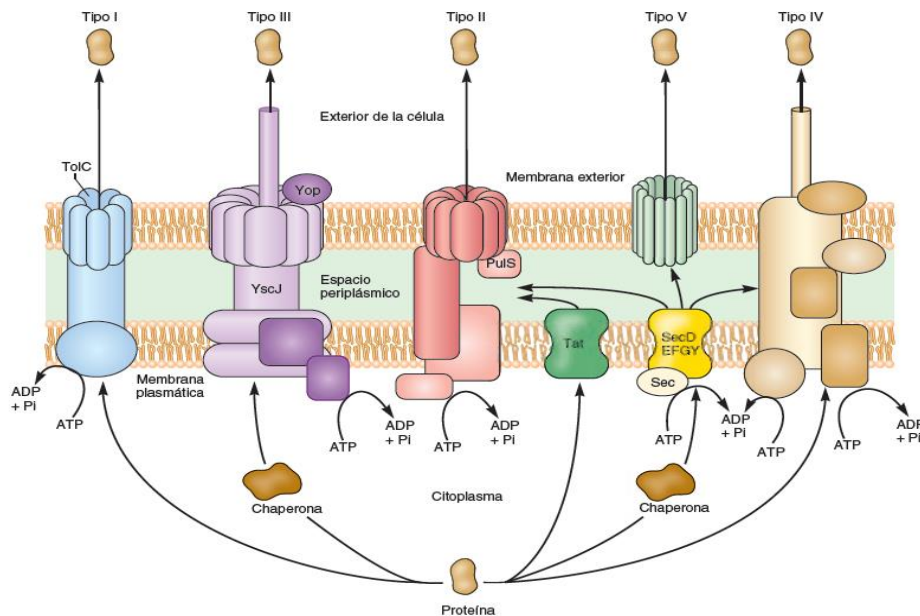
### **Exotoxinas**

*E. coli* produce también un espectro variado de exotoxinas. Estas incluyen las toxinas Shigas (Stx-1, Stx-2), las toxinas termoestables (STa, STb) y las toxinas termolábiles (LT-I y LT-II).

### **2.2.3 Sistemas de secreción**

Se han descrito seis vías de secreción de proteínas en las bacterias: sistemas de secreción tipos I, II, III, IV, V y VI. Dependiendo del sistema de secreción, los sustratos secretados tienen tres posibles destinos: que permanecen asociadas con la membrana externa bacteriana (OM), que se liberen al espacio extracelular o pueden ser inyectados a una célula diana (eucariota o bacteriano)(22).

En las bacterias Gram negativas, estos mecanismos se pueden dividir en dos categorías; aquellos que abarca tanto la membrana interna y la membrana externa (IM y OM por sus siglas en inglés, respectivamente), y aquellos que abarcan la OM solamente (23).



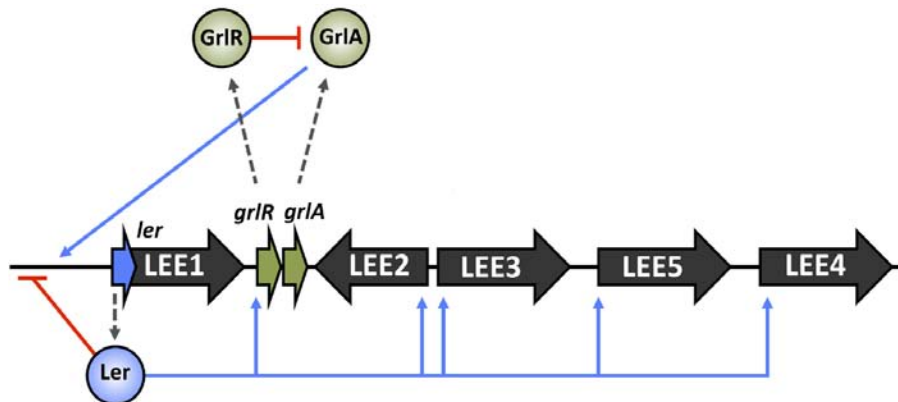
**Figura5. Sistemas de secreción de proteínas de bacterias Gram negativas** Se esquematizan los cinco Sistemas de secreción de las bacterias Gram negativa. Las vías dependientes de Sec y Tat suministran proteínas del citoplasma a espacio periplásmico. Los sistemas de tipo II, V y IV completan el proceso de secreción por una vía dependiente de Sec. El sistema Tat parece suministrar proteínas solo a la vía de tipo II

## 2.2.4 LEE

*E. coli* O157: H7 forma lesiones de adhesión y borrado (A/E, por sus siglas en inglés) en las células epiteliales, caracterizado por la unión íntima a la superficie de la célula huésped, la alteración del citoesqueleto de actina y la formación del "pedestal"(15, 24). De igual manera EPEC y *Citrobacter rodentium*, también producen el fenotipo de A/E en las células huésped. La formación de lesiones de A/E (18, 25) se ha atribuido a una isla de patogenicidad (PAI, por sus siglas en inglés) de 35 kb (PAI) denominada locus de eliminación de enterocitos (LEE, por sus siglas en inglés). La isla LEE contiene todos

los genes necesarios para la formación de un SST3 funcional. LEE tiene un contenido de Guanina-Citosina (GC) de 38,3%, que es en contraste con el 50,8% de una cepa de *E. coli* comensal K-12, lo que sugiere que la LEE fue adquirido por un evento de transferencia horizontal de genes(26, 27).

LEE contiene 41 marcos de lectura abiertos (ORFs, por sus siglas en inglés) que incluyen genes que codifican el aparato basal y de secreción del SST3. Los 41 ORFs se encuentran organizados en cinco operones policistronicos: LEE1 a LEE5 (28). Los operones LEE1, LEE2 y LEE3 codifican para las proteínas del SST3, las cuales forman un complejo de aguja (Ca) o inyectisoma; LEE4 codifica para las proteínas que se secretan a través del SST3 las cuales se conocen de forma colectiva con el nombre de Esp (proteínas secretadas por EPEC); y en LEE5 están codificadas tanto la adhesina bacteriana intimina y su receptor llamado Tir, que es translocado por la misma bacteria a través del SST3 hacia el interior de la célula huésped (29, 30).



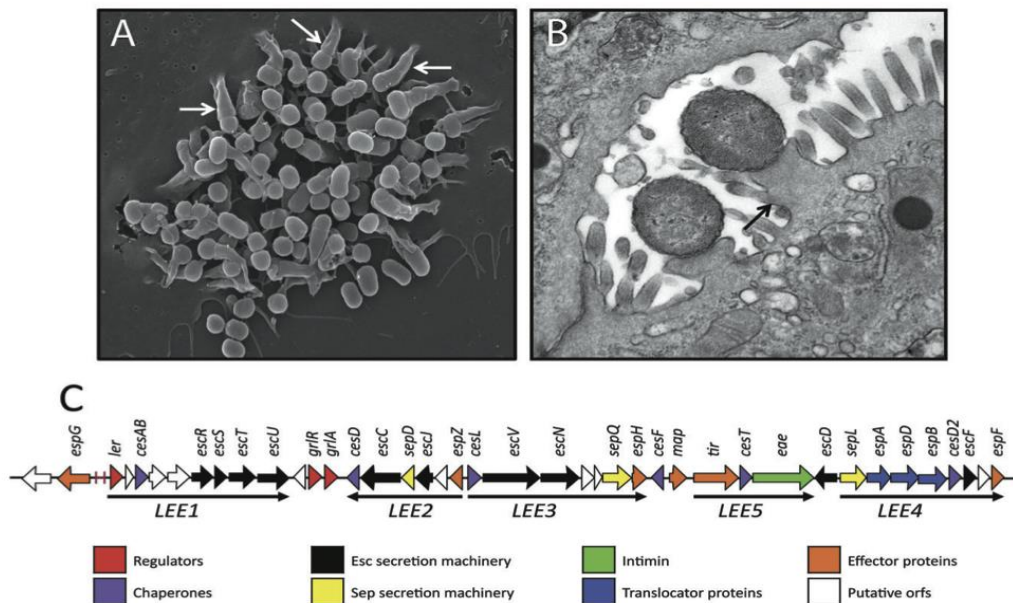
**Figura6. La regulación central de la isla LEE.** Los operones LEE 1-5 se indica en negro con los activadores maestros ORF: Ler en azul y GrlRA en verde. Las flechas grises punteadas corresponden a productos traducidos de estos genes. Las líneas azules representan los puntos de entrada de positivo regulación transcripcional, mientras que las flechas rojas indican una regulación negativa(31).

El ORF 1 localizado en LEE1 codifica para el regulador maestro Ler, el cual regula positivamente los operones LEE2 a LEE5. Además de Ler, existe un segundo sistema regulador maestro: GrlRA. El operón *grlRA* está situado entre los operones LEE1 y



LEE2, y es activado por Ler y forma un sistema de retroalimentación positivo de la expresión de LEE1(26). En contraste, la isla LEE se encuentra regulada negativamente por la proteína nucleoide H-NS, donde la proteína Ler(32) actúa como un antagonista de la proteína H-NS, contrarrestando el silenciamiento de la expresión de la isla(33).

La expresión de LEE está estrechamente regulada en respuesta a múltiples estímulos: la temperatura del anfitrión de 37°C proporciona una óptima expresión de LEE, ocasionando una fase de crecimiento exponencial(34). Experimentalmente, la isla LEE puede ser inducida por el crecimiento en medio de cultivo celular DMEM (35) ya que estas condiciones mimetizan el entorno fisiológico *in vitro* de temperatura, pH, osmolaridad, calcio, hierro y concentraciones de sal. La regulación transcripcional de LEE es extremadamente compleja. Se controla a nivel central en dos integrante regulatorio sistemas codificados dentro de LEE, Ler y GrIRA(31).



**Figura 7. Lesiones histopatológicas inducidas por adhesión y borrado (A/E) patógenos, codificado por LEE** A) Micrografía electrónica de barrido de pedestales inducidos por bacterias adherentes. B) Micrografía electrónica de transmisión mostrando lesiones A/E intestinales C) diagrama que ilustra la organización genética del locus de enterocitotoxigénico (LEE) (36).

## 2.2.5 Toxina Shiga

Aún más importante que la isla LEE en EHEC, el principal factor de virulencia de este patotipo es la toxina tipo Shiga (Stx), la cual es básicamente idéntica que la toxina Shiga producida por *Shigelladisenteriae*. La toxina Stx es la causante del síndrome hemolítico urémico (HUS), un trastorno que se caracteriza por insuficiencia renal aguda, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática. El HUS se ha asociado sobre todo a la producción de Stx-2, que destruye las células endoteliales del glomérulo. Las lesiones en las células endoteliales inducen activación de las plaquetas y acumulación de trombina, lo que a su vez da lugar a disminución del filtrado glomerular e insuficiencia renal aguda (37, 38).

Las cepas de EHEC expresan la toxina Shiga (Stx-1, Stx-2, o ambas), inducen lesiones de A/E en las células epiteliales y poseen un plásmido de 60 MDa que contiene genes que codifican para otros factores de virulencia. Stx-1 es esencialmente idéntica a la toxina Shiga producida por *Shigelladysenteriae*; Stx-2 presenta una identidad del 60% a Stx1. Ambas toxinas se adquieren a partir de bacteriófagos lisogénicos. Ambas toxinas poseen una subunidad A y cinco subunidades B, y estas últimas se unen a un glucolípidido específico de la célula del organismo anfitrión llamado globotriaosilceramida (GB3). Hay una alta concentración de receptores de GB3 en las vellosidades intestinales y en las células endoteliales del riñón. Tras la internalización de la subunidad A, la toxina se escinde en dos moléculas, y el fragmento A<sub>i</sub> se une al ácido ribonucleico ribosómico (rRNA) 28S e interrumpe la síntesis de proteínas. La destrucción de las vellosidades intestinales da lugar a disminución de la absorción y aumento relativo de la secreción de líquidos. El HUS se ha asociado sobre todo a la producción de Stx-2, que destruye las células endoteliales del glomérulo. Las lesiones

en las células endoteliales inducen activación de las plaquetas y acumulación de trombina, lo que a su vez da lugar a disminución del filtrado glomerular e insuficiencia renal aguda. Las toxinas Stx estimulan la expresión de citocinas inflamatorias (factor de necrosis tumoral- $\alpha$  [TNF $\alpha$ ], interleucina-6), que entre otros efectos, aumentan la expresión de globotriaosilceramida (GB3).(37)

### **2.3 Sistemas Toxina-antitoxina**

Además del SST3 y de la toxina Stx se han descrito otros factores de virulencia como reguladores transcripcionales y adhesinas (15, 39, 40).

Existen 5 diferentes tipos de sistemas TA descritos, de los cuales el más estudiado es el sistema tipo II. En este sistema los genes toxina y antitoxina se encuentran codificados en un operón bicistrónico. La antitoxina además de neutralizar la toxina por interacción proteína-proteína, funciona como un represor transcripcional de su propia expresión. Generalmente, la antitoxina reconoce una secuencia palindrómica localizada próxima a la caja -10 y -35 de la región promotora del operón.

#### **2.3.1 Clasificación de los sistemas Toxina-Antitoxina**

La principal característica de los sistemas de Toxina-Antitoxina es que están formados por dos componentes. Uno es una toxina de larga vida media y el otro una antitoxina, con una vida media mucho más corta, capaz de antagonizar el efecto tóxico de la toxina. Estos sistemas se clasifican según la naturaleza de la antitoxina en cinco tipos.

#### **Tipo I**

Está basado en el apareamiento de bases del RNA de la antitoxina que es complementario con el mRNA de la toxina. La traducción del mRNA se inhibe o bien por la degradación a través de RNasa III o mediante la oclusión de la secuencia del sitio de unión al ribosoma. A menudo, la toxina y la antitoxina están codificados en cadenas opuestas del DNA. El 5' o 3' de la región de solapamiento entre los dos genes es el área involucrada en el apareamiento de bases complementarias, por lo general con entre 19-23 pares de bases contiguos.

Las toxinas de los sistemas de tipo I son pequeñas proteínas hidrófobas, que confieren toxicidad por las membranas celulares perjudiciales. Pocos dianas intracelulares de las toxinas de tipo I se han identificado, posiblemente debido a la naturaleza difícil de analizar las proteínas que son tóxicos para sus huéspedes bacterianos.

El tipo I de sistemas a veces incluye un tercer componente. En el caso de que el sistema Hok/sok bien caracterizado, además de la toxina y la antitoxina Hok/sok, hay un tercer gen, llamado Mok. Este ORF casi en su totalidad se solapa con el de la toxina, y la traducción de la toxina es dependiente de la traducción de este tercer componente. Por lo tanto la unión de antitoxina a la toxina es a veces una simplificación, y la antitoxina, de hecho, se une a un tercer RNA, que a su vez afecta la traducción de la toxina.

## **Tipo II**

Son generalmente de mejor comprensión que el tipo I. En este sistema, una antitoxina es una proteína lábil que se une fuertemente e inhibe la actividad de una toxina estable. La familia más grande de toxina-antitoxina sistemas de tipo II es VapBC, que se ha

encontrado a través de búsquedas bioinformática para representar entre el 37 y el 42% de todos los loci de tipo II predichos.

Los sistemas de tipo II están organizados en operones con la proteína antitoxina típicamente situado aguas arriba de la toxina. La antitoxina inhibe la toxina por la regulación negativa de su propia expresión. Las proteínas son típicamente alrededor de 100 aminoácidos de longitud

Los sistemas toxina antitoxina tipo II se expresan genéticamente en un operón bicistrónico, que es autorregulado ya sea por el complejo toxina-antitoxina o solamente por la antitoxina. Proteasas celulares como Lon o ClpP, degradan proteolíticamente a la antitoxina, que en consecuencia provocan la liberación de las toxinas. La toxina libre puede actuar sobre un blanco celular específico que provoca el arresto del crecimiento de la célula bacteriana o su posterior lisis (41).

### **Tipo III**

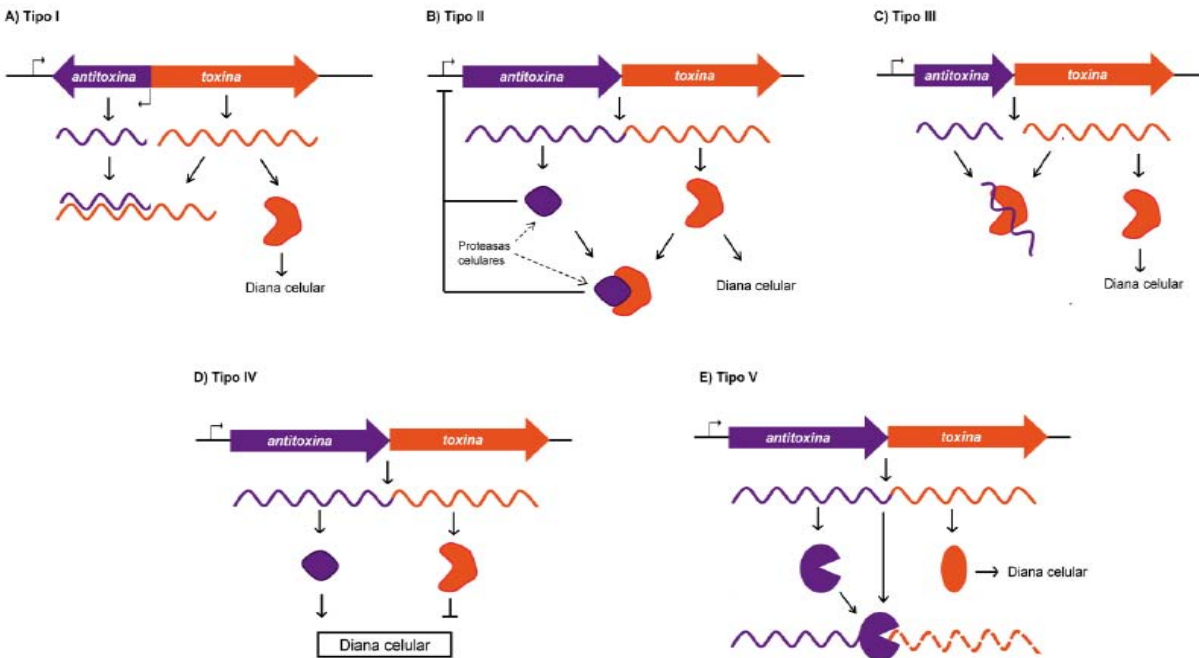
Este tipo de sistema TA se basan en la interacción directa entre la proteína toxina y el RNA de la antitoxina. Los efectos de la proteína toxina son neutralizados por el RNA de la antitoxina.

### **Tipo IV**

El sistema tipo IV fue propuesto para las proteínas YeeU/YeeV (también llamado CtbA/CtbB) descrito en *E. coli*. El análisis funcional de este módulo TA reveló que la toxina YeeV actúa interfiriendo con proteínas del citoesqueleto bacteriano.

### **Tipo V**

Recientemente, el módulo TA GhoS/GhoT de *E. coli* fue designado como un sistema tipo V. Las proteínas GhoS codifican para una antitoxina que tiene actividad de endorribonucleasa, degradando específicamente el mRNA de la toxina GhoT y por lo tanto impide su traducción.



**Figura8. Los cinco tipos de sistemas Toxina-Antitoxina.** Modelo esquemático de los 5 sistemas de Toxina-antitoxina. La diferencia de los sistemas TA radica principalmente en la naturaleza estructural de la antitoxina y su modo de neutralización.

### 2.3.2. Sistemas Toxina-Antitoxina tipo II y patogénesis

En el sistema TA tipo II la antitoxina inestable inhibe la toxina estable. La inestabilidad de la antitoxina puede explicarse por una estructura menos ordenada, lo que resulta en una mayor sensibilidad a la degradación proteolítica. La actividad bioquímica de la toxina tipo II más común es como una ribonucleasa.

Los sistemas TA tipo II han emergido como potenciales factores de virulencia de bacterias patógenas. Estos sistemas se han asociado a la virulencia de muchos

patógenos humanos importantes; se encuentran frecuentes en muchos genomas de bacterias y han sido implicados también en la formación de biopelículas y la persistencia celular (42). Los sistemas TA tipo II son ampliamente prevalentes en bacterias y se ha propuesto que son benéficos en condiciones hostiles favoreciendo la persistencia (43). En el 2005, en una búsqueda de más de 100 genomas procarióticos se encontró que los sistemas TA tipo II fueron abundantes en procariotes de vida libre pero raramente encontrados en bacterias asociadas a hospederos (44). *Yersinia pestis*, el agente de la peste, codifica al menos 10 sistemas TA tipo II cromosomales (45). *Mycobacterium tuberculosis* tiene al menos 60 sistemas TA tipo II, mientras que la bacteria saprófita *Mycobacterium smegmatidis* tiene solo dos (44). *Rickettsia* spp. que son bacterias intracelulares estrictas, presentaron hasta 14 sistemas TA y fueron capaces de inducir muerte celular en células endoteliales (46). Un estudio reciente estableció que un sistema TA tipo II promovió la colonización de vejiga y riñones de ratón por *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) (42). Además, un sistema TA tipo II llamado SehAB fue importante para la virulencia de *Salmonella enterica* serotipo Typhimurium cuando fue inoculada por vía oral (47).

### **3. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.**

El SST3 y la toxina shiga son los factores de virulencia más importantes de EHEC. Recientemente, se han descrito los sistemas toxina antitoxina tipo II como potenciales factores de virulencia en diversas bacterias patógenas. En una búsqueda bioinformática identificamos el sistema TA tipo II Z1059-Z1060 que está presente en EHEC y ausente en una *E. coli* comensal, por lo que probablemente deben conferirle a EHEC un papel importante en la patogenia con respecto a la *E. coli* comensal. Por lo tanto, se plantean las siguientes preguntas de investigación:

1. ¿Cuál es la ventaja del sistema TA tipo II Z1059-Z1060 en el crecimiento de EHEC?
2. ¿El sistema TA tipo II Z1059-Z1060) está involucrado en la patogénesis de EHEC?
3. ¿En el sistema TA tipo II Z1059-Z1060, la antitoxina Z1059 reprime directamente la expresión transcripcional del sistema?

### **4. HIPÓTESIS**

Si el sistema TA tipo II Z1059-Z1060 está presente en EHEC y ausente en la *E. coli* comensal, este sistema conferirá una ventaja adaptativa ya sea en su viabilidad o en la virulencia. Siendo un sistema TA tipo II, la antitoxina Z1059 se unirá específicamente a su propio promotor, autoregulando negativamente su propia expresión.



## 5. OBJETIVO

### Objetivo general

- Analizar el papel del sistema TA tipo II Z1059-Z1060 en la patogénesis de *Escherichia coli* enterohemorrágica.

### Objetivos específicos

- Generar mutantes nulas en el sistema Z1059-Z1060 por el método de interrupción en un solo paso (48).
- Caracterizar el crecimiento de las mutantes generadas por medio de una cinética de crecimiento.
- Evaluar la expresión transcripcional del sistema TA tipo II Z1059-Z1060.
- Analizar por medio de EMSA la interacción directa de la antitoxina Z1059 sobre su propia región promotora

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

- Tipo de estudio: Experimental, prospectivo.
- Población de estudio: Cepas del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI- IMSS: EHEC EDL933, EHEC  $\Delta z1059::Km$ , EHEC  $\Delta z1060::Km$ , EHEC  $\Delta z1059-60::Km$ , EHEC  $\Delta z1059::Km$  pBAD-Z1059. Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

Los materiales y métodos que se describen en esta sección fueron proporcionados por el laboratorio de Microbiología Molecular de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI- IMSS. Se presentan una lista de cepas utilizadas en este trabajo.

### Listado de cepas y características

#### Lista de cepas

Cepas	Características
EHEC EDL933	Cepa silvestre de EHEC; patógena
EHEC pKD46	Cepa silvestre de EHEC con el plásmido que expresa la recombinasa $\lambda$ -red
EHEC $\Delta z1059::Km^r$	Cepa mutante en la antitoxina Z1059
EHEC $\Delta z1059::Km^r$ pBAD-Z1059	Cepa mutante en la antitoxina Z1059 (EttB) complementada con un plásmido que expresa la antitoxina Z1059 bajo el control de un promotor de arabinosa
EHEC $\Delta z1060::Km^r$	Cepa mutante en la toxina Z1060
EHEC $\Delta z1059-60::Km^r$	Cepa mutante en el sistema toxina-

antitoxina Z1059-Z1060

---

MC4100	Cepa silvestre de <i>E. coli</i> comensal
--------	---

---

MC4100 pKD4	Cepa de <i>E. coli</i> con el plásmido que codifica la resistencia a Kanamicina (Km <sup>r</sup> )
-------------	--

### Medio de cultivo

Se utilizó para el cultivo de *E. coli* el medio Luria-Bertani (LB)

Composición de medio LB

#### Composición

NaCl	5g
Triptona	10g
Extracto de levadura	5g
Agua desionizada	1000mL

---

Medio esterilizado en autoclave a 120°C, 15 Bar durante 20 min

Para los ensayos de adherencia se utilizó medio DMEM LG

### Antibióticos

Los medios fueron suplementados al medio estéril atemperados con los antibióticos correspondientes

- Ampicilina (Ap): 200µg/mL
- Cloranfenicol (Cm) : 30µg/mL

- Kanamicina (Km): 30µg/mL

### Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

La amplificación de secuencias de DNA genómicas o plasmídicas se realizó en 100 µl de reacción que contenía:

Mezcla de reacción de la PCR

Mezcla de reacción (100 µl)	
Taq DNA Polimerasa	1µL
Amortiguador (10X)	10 µL
Cloruro de Magnesio (25 mM)	6 µL
dNTPs (10 mM)	2 µL
Oligonucleótidos c/u (100 mM)	2 µL
DNA	2
H <sub>2</sub> O	c.b.p. 100µL

Programa básico de amplificación:

- Desnaturalización inicial: 94°C, 5min
  - Desnaturalización: 94°C, 50 seg
  - Hibridación: 50°C, 50seg
  - Extensión: 72°C, 30seg
  - Extensión final: 72°C, 5min
- } 30 ciclos

## **Electroforesis de DNA**

Se usaron geles horizontales de agarosa al 1%. La electroforesis se realizó en un amortiguador TAE (Tris-Acetato-EDTA) 1X, a voltaje constante 100V. Los geles se tiñeron con Bromuro de Etidio y el DNA se visualizó en untransiluminador con lámpara de UV.

### **Generación de mutantes $\Delta z1059::Km$ (A), $\Delta z1060::Km$ (T) y $\Delta z1059-60::Km$ (TA)**

La generación de las mutantes sencillas y dobles en los genes Z1059 y Z1060 de EHEC se llevaron a cabo por medio de la metodología reportada por Datsenko y Wanner (48). Se usará la cepa silvestre de EHEC EDL933.

En resumen, la metodología de generación de mutantes es la siguiente:

El casete de resistencia a kanamicina( $Km^r$ ) del plásmido pKD4 se amplificó por PCR con los siguientes oligonucleótidos:

Z1059-H1P1

GCT TCT TGA TTG AGG TGA AAA ATG AGC GAT AAA TTA CAA ATG ATGTGT  
AGG CTG GAG CTG CTT CG

Z1059-H2P2

GGT AAA TCA TTT GCA AAC ATT TTA CTT TGC AAA AAC TTC CGG CCC CAT  
ATG AAT ATC CTC CTT AG

Z1060-H1P1

TAA ACA TTA CCA CAA GGA TGG ATGGGT GTG TAT AAG GCA AGG CGA TGT  
AGG CTG GAG CTG CTT CG

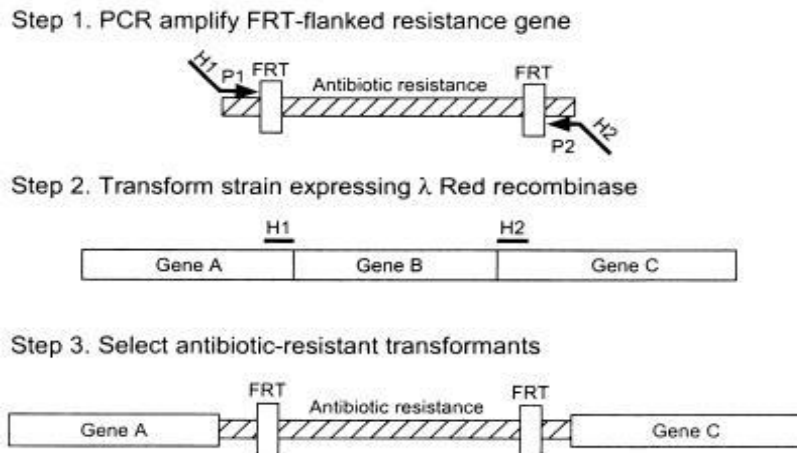
Z1060-H2P2

TCT TCC AGC ATC ATT TGT AAT TTA TCG CTC ATT TTT CAC CTC AAT CAT ATG  
AAT ATC CTC CTT AG

La cepa silvestre fue transformada con el plásmido pKD46, el cual expresa la recombinasa lambda-red ( $\lambda$  Red).

Se prepararon células electrocompetentes con la cepa silvestre que contiene el plásmido pKD46, creciéndolas aproximadamente 3 horas a temperatura ambiente y siendo inducidas con L-arabinosa a una concentración final de 1%. Las bacterias fueron transformadas con el producto de PCR que amplificó la resistencia al antibiótico y posteriormente serán recuperadas 3 horas a temperatura ambiente.

El producto de la transformación se plaqueó en cajas de LB con el antibiótico correspondiente y se incubaron toda la noche a 42°C.



**Figura9. Generación de mutantes por el método de interrupción por un solo paso**Proceso mutagénico: H1 y H2 son las regiones de homología del gen, y P1 y P2 a las regiones de homología con el plásmido pKD46(48).

## Electroporación

Se llevó a cabo la transformación de células bacterianas, al permitir la permeabilización de la membrana al inducirle una descarga eléctrica.

A partir de un inóculo crecido toda la noche (cultivo “overnight”), se inocularon 200 µl de este cultivo a saturación en 20 mL de medio LB y se incubó en agitación por 3 horas en agitación a temperatura ambiente.

Se centrifugó el cultivo a 5,000 rpm por 10min a 4°C. Se efectuaron 3 lavados con H<sub>2</sub>O estéril a 4°C (en hielo) agregando 20 mL, centrifugándose y eliminando el sobrenadante. Se resuspendió la pastilla bacteriana en 200 µl de H<sub>2</sub>O estéril de y se transfirieron 80 µl de la suspensión bacteriana a tubos Eppendorf estéril y se agregaron 10 µl del producto de PCR (para el caso de transformaciones convencionales diferentes a la mutagénesis, con 3 µl de DNA plásmídico es suficiente). Se transfirió la mezcla bacteria/DNA a las celdas de electroporación incubadas en hielo. Los Parámetros del electroporador fueron:

Parámetros empleados en la electroporación de bacterias transformantes.

<b>Parámetros de Electroporación</b>	
<b>Modo</b>	E coli 2.5 kV
<b>Capacitancia</b>	µF
<b>Resistencia</b>	200 Ω
<b>Voltaje de la descarga</b>	2500

Una vez efectuada la electroporación se resuspendió en 1mL de medio LB estéril y el producto de transformación fue transferido a tubos Eppendorf estériles, incubándolos a 37°C con agitación por 3h a temperatura ambiente (en el caso de transformaciones convencionales con 1 hora a 37°C es suficiente). Posteriormente, se plaquearon en medio LB agar con el antibiótico correspondiente, y se incubaron toda la noche a 42°C. Se seleccionaron colonias aisladas y se corroboró la inserción del gen de resistencia por medio de PCR y secuenciación.

### **Cinética de crecimiento**

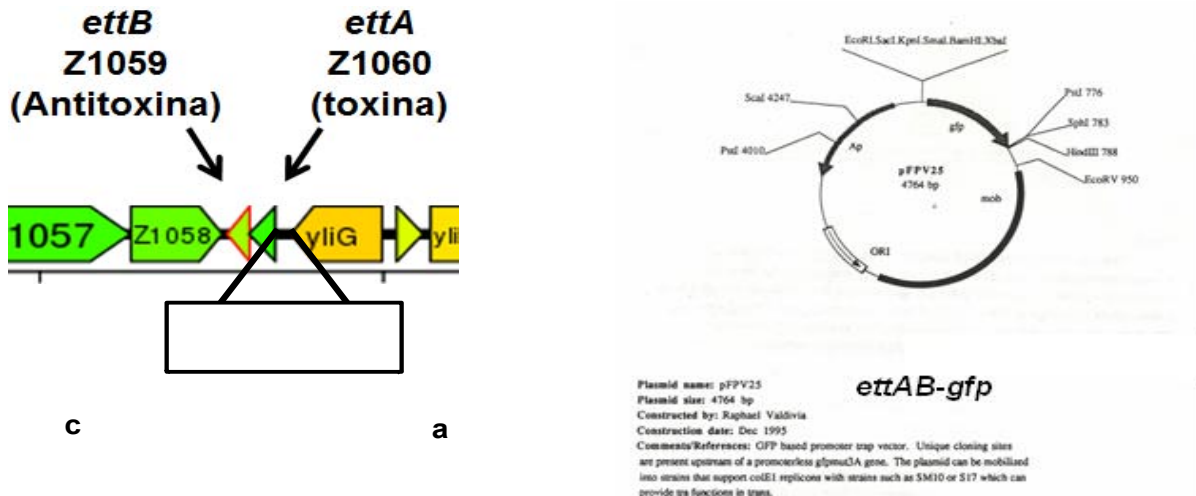
A partir de un inóculo crecido toda la noche, se colocaron 100 µL del cultivo a saturación en 50 mL de LB estéril en matraces Erlenmeyer de 250 mL. Los cultivos fueron incubados a diferentes temperaturas (temperatura ambiente y 37°C) y en agitación a 200 rpm. Cada hora se tomó una muestra de 800 µl, por un periodo de 8h, y se midieron las absorbancias en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 600 nm.

### **Generación de fusiones transcripcionales al gen reportero *gfp***

Se amplificó por medio de PCR la región reguladora del sistema Z1059-Z1060 usando oligonucleótidos específicos que contienen los sitios de restricción para las enzimas EcoRI y BamHI en el 5' y 3', respectivamente (De la Cruz et al., datos no publicados). El PCR fue limpiado y posteriormente digerido con las enzimas de restricción EcoRI-BamHI. El DNA fue purificado y clonado en el plásmido pFPV25(49), el cual fue previamente digerido con las mismas enzimas de restricción. La reacción de ligación fue transformada en células competentes de *E. coli* y se seleccionaron colonias



candidatas resistentes a ampicilina ( $Ap^r$ ). Se originó el plásmido *ettAB-gfp* que lleva la región promotora del sistema Z1059-Z1060 fusionado al gen que codifica para la proteína GFP (proteína verde fluorescente, por sus siglas en inglés).



**Figura 10. Generación de la fusión transcripcional *ettAB-gfp*.** Esquema de la fusión transcripcional mostrando la amplificación por PCR de la región promotora. El PCR fue digerido y clonado en el vector pFPV25 originando el plásmido *ettAB-gfp*.

### Preparación de células para citometría de flujo

A partir de un cultivo crecido toda la noche, se colocaron 100  $\mu$ L del cultivo del cultivo a saturación en 5 mL de medio LB fresco en tubos Falcon de 15 mL, en agitación a 37°C durante 4h, hasta llegar a fase exponencial. Se tomó 1 mL de la suspensión bacteriana y se centrifugó a 12,000 rpm, desechando el sobrenadante. Se realizaron tres lavados con 1 mL PBS 1x, centrifugándose a 12,000 rpm y se eliminó sobrenadante. Se fijaron las bacterias con PBS-formaldehído 1.5%, colocándolas a 4°C para su posterior análisis.

### Purificación de la proteína Z1059 (antitoxina)

Se preparó un cultivo toda la noche de la cepa BL21 (DE3) conteniendo el plásmido pBAD-Z1059. Se inocularon 1 mL del cultivo a saturación en 100 mL de medio LB a

37°C suplementado con 200 µg/mL de ampicilina. Después de 3 horas de crecimiento se le agregó L-arabinosa a una concentración final del 0.1% y se incubó 3 h adicionales en las mismas condiciones. Posteriormente, el cultivo bacteriano se centrifugó a 5,000 rpm por 10min a 4°C. La pastilla bacteriana fue resuspendida en 10 mL de amortiguador urea 8M y se procedió a sonicar (10 pulsos de 1 min con pausas de 1 min) en frío. La suspensión fue centrifugada a 5,000 rpm por 20 min a 4°C y el sobrenadante fue transferido a una columna con resina de agarosa-níquel previamente tratada con amortiguador urea 8M. Se procedió a lavar la columna con 100 mL de amortiguador PBS con 50 mMimidazoly en el lavado final se usó 5 mL de amortiguador PBS con 500 mMimidazol con las cuales se colectaron 5 fracciones que fueron posteriormente analizadas por electroforesis de proteínas.

### **Ensayos de retardamiento en gel (EMSA)**

Se preparó un gel de acrilamida nativo al 8% usando la siguiente mezcla:

<b>Componente</b>	<b>Cantidad</b>
Acrilamida	3mL
TBE10X	1.5mL
H <sub>2</sub> O	10.52mL
APS	100µL
TEMED	16µL

Para los ensayos de retardo en gel se utilizó un fragmento de 600pb que contenía la región promotora del operón *z1060-z1059*. El DNA se incubó con concentraciones crecientes de la antitoxina Z1059 (0, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4µM) durante 30 min, a temperatura

ambiente, en amortiguador de unión 1X (PBS-glicerol 50%). Se usó como control negativo, usando el DNA de *fbpA* (que codificapara una fimbria de *Mycobacterium tuberculosis*).

La electroforesis se realizó a voltaje constante (100V), duranteaproximadamente1:30 h, al término del cual,se tiño con bromuro de etidio y se observa el gel en un equipo de transiluminación de UV.

### **Ensayos de adherencia en hojas de lechuga**

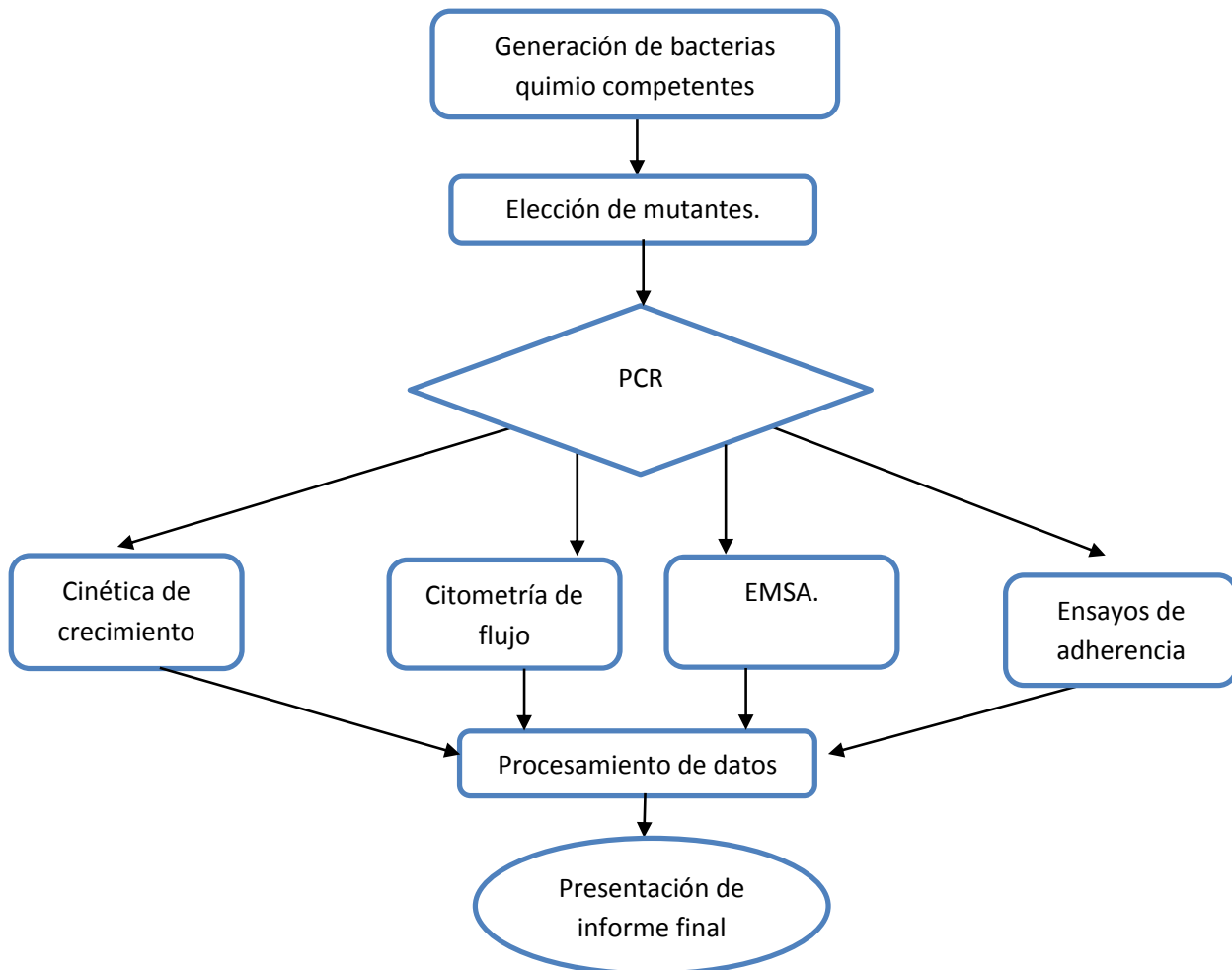
Se cortaron hojas de lechuga con la boca de un tubo Falcón de 15 mL y se colocó en el fondo de cada pozo de una placa de 24 pocillos. Posteriormente, se realizaron lavados con una solución de cloro al 1% por 2 min y se lavó la lechuga tres veces con solución PBS estéril. Se le agregó a cada pocillo 1mL de DMEM LG (lowglucose, 1.0 g/L) y 10µl del cultivo bacteriano crecido toda la noche, incubándose por 4h a temperatura ambiente. Se procedió a realizar 3 lavados con PBS estéril. Se transfirieron las hojas a tubos Eppendorf de 2mL y fue agregado 1mL de tritón X-100 0.1% con aproximadamente 10 perlitas de vidrio, Vortexearpor 2 min. Se realizaron diluciones seriadas: 900 µL de PBSestéril y 100 µL de la muestra. Para plaquear se inocular 20 mL de cada dilución por triplicado en una placa de agar LB con ampicilina (200 µg/mL)y se incubo a 37°C toda la noche.

### **Ensayos de adherencia a células Vero**

Se contó con una placa de 24 pocillos con una monocapa de células vero, previamente cultivadas, con medio DMEM y cultivadas a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>; se realizaron tres lavados con solución PBS estéril. Se le agregó a cada pocillo 1mL de DMEM LG (lowglucose,

1g/L) y 10µL del cultivo bacteriano, incubándose por 4h a 37°C y 5% CO<sub>2</sub>. Después de las 4 horas, se retiró el medio y realizaron 3 lavados con PBS estéril. Se eliminó el sobrenadante y fue agregado 1mL de tritón X-100 0.1% y se procedió a raspar la base de los pozos para transferir este lisado en tubos Eppendorf de 1.5 mL. Se realizaron diluciones seriadas: 900 µL de PBS estéril y 100 µL de la mezcla. Para plaquear se inocular 20 µL de cada dilución por triplicado en una placa de agar LB con ampicilina (200 mg/mL) y se incubo a 37°C toda la noche.

### Representación esquemática del diseño experimental utilizado



## 8. RESULTADOS

### El sistema toxina-antitoxina Z1059-Z1060 está presente en patotipos de *E. coli*

Se han descrito muchos sistemas TA tipo II en la *E. coli* comensal K-12. Mediante una búsqueda bioinformática de genes homólogos TA tipo II en la cepa EDL933 de EHEC, fue identificado un sistema presente en esta cepa patógena pero ausente en la cepa no patógena de *E. coli* K-12. Este sistema está anotado en el genoma de EHEC como *z1060-z1059*. La presencia de *z1060-z1059* en EHEC y su ausencia en *E. coli* K-12 sugiere un probable papel en la patogénesis. Además de EHEC, dicho sistema también fue identificado en EAEC, el cual es otro patotipo de *E. coli*. Debido a los fenotipos mostrados en termoregulación, estos genes fueron renombrados como *ettAB* (*Escherichia coli* thermoregulated Toxin-Antitoxin): el gen *ettA* (*z1060*) codifica para la toxina mientras que *ettB* (*z1059*) para la antitoxina.

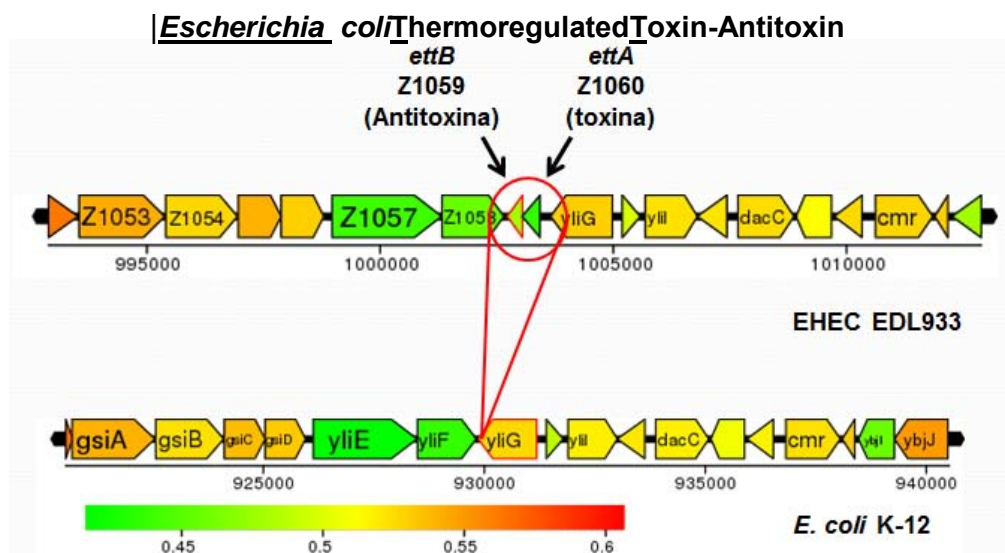


Figura 11. El sistema toxina-antitoxina Z1059-Z1060 está presente en patotipos de *Escherichia coli*. La adquisición de este sistema TA presente en la versión patógena con respecto a la comensal sugiere un papel en la patogénesis.

## Generación de mutantes por el método de interrupción en un solo paso

Se generaron tres mutantes en los genes *ettAB*, insertando un casete de resistencia a usando la cepa EDL933 que lleva el plásmido pKD46 el cual expresó la recombinasa  $\lambda$ -red:  $\Delta ettA$  ( $\Delta z1060$ ),  $\Delta ettB$  ( $\Delta z1059$ ) y  $\Delta ettAB$  ( $\Delta z1060-59$ ).

## La ausencia de la antitoxina EttB afecta el crecimiento de EHEC a temperatura ambiente

Para caracterizar las mutantes en el sistema TA tipo II EttAB, se realizaron cinéticas de crecimiento a 37°C y a temperatura ambiente en medio LB, comparándolas con la cepa silvestre. Mientras que a 37°C las mutantes en el sistema TA tipo II EttAB no estuvieron afectadas, la mutante antitoxina  $\Delta ettB$  presentó una disminución en el crecimiento. Interesantemente, la doble mutante  $\Delta ettAB$ , donde ya está ausente la toxina y la antitoxina, recuperó el crecimiento similar a la cepa silvestre.

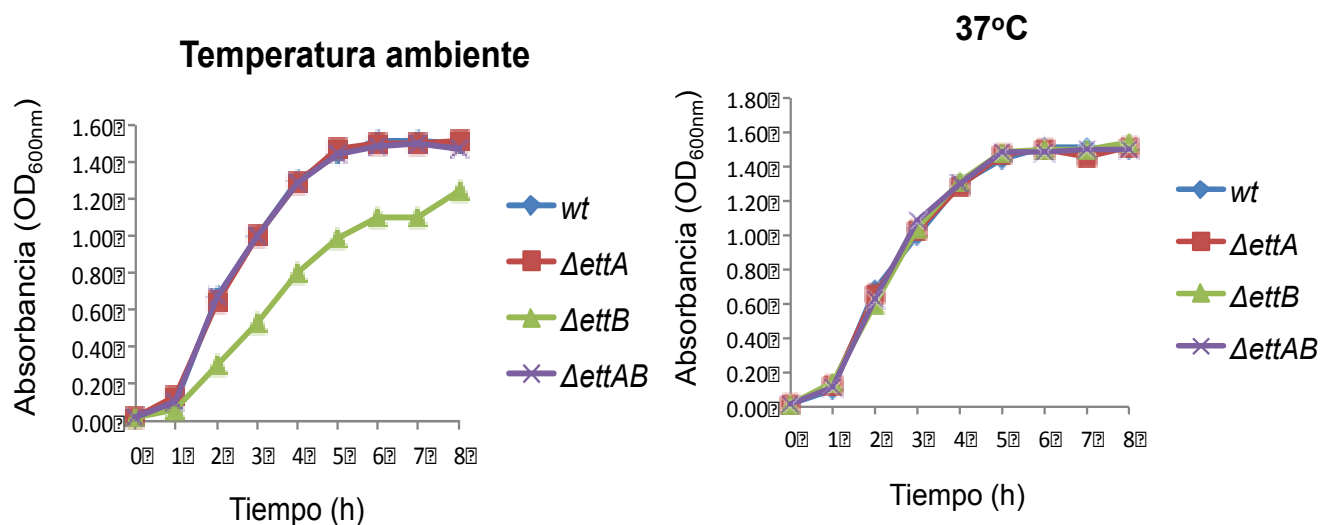


Figura12. Cinética de crecimiento de la cepa silvestre (wt) y las diferentes mutantes  $\Delta ettA$ ,  $\Delta ettB$  y  $\Delta ettAB$ . Se muestran las curvas de crecimiento en los diferentes fondos mutantes durante un periodo de 8 horas de crecimiento a 37°C y a temperatura ambiente.

### Análisis transcripcional del operón *ettAB*: evidencia de termorregulación.

Para evaluar la expresión del sistema EttAB, se introdujo la fusión *ettAB-gfp* en la cepa silvestre de EHEC y derivadas mutantes  $\Delta ettA$ ,  $\Delta ettB$  y  $\Delta ettAB$ . Por medio de citometría de flujo se evaluaron los niveles de fluorescencia (GFP) emitidos por las fusiones transcripcionales. En la cepa silvestre, la fusión *ettAB-gfp* mostró altos niveles de expresión a temperatura ambiente con respecto a 37°C. En ausencia de la toxina EttA ( $\Delta ettA$ ) no hubo termorregulación. Los niveles de expresión de la fusión transcripcional *ettAB-gfp* fueron desreprimidos en la ausencia de la antitoxina EttB ( $\Delta ettB$ ) y aún en este fondo genético hubo evidencia de termorregulación. La doble mutante  $\Delta ettAB$  presentó un comportamiento similar a la mutante sencilla antitoxina  $\Delta ettAB$ . Estos datos muestran que el sistema TA tipo II EttAB presentó termorregulación siendo estimulado transcripcionalmente a temperatura ambiente con respecto a 37°C.

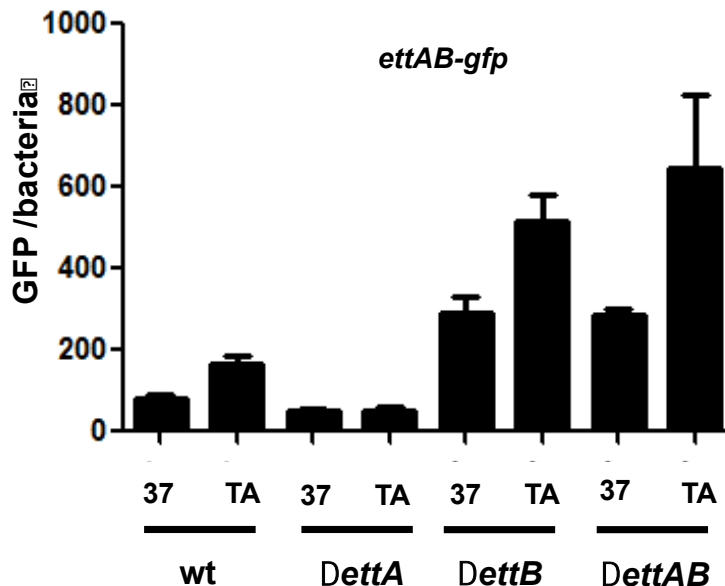
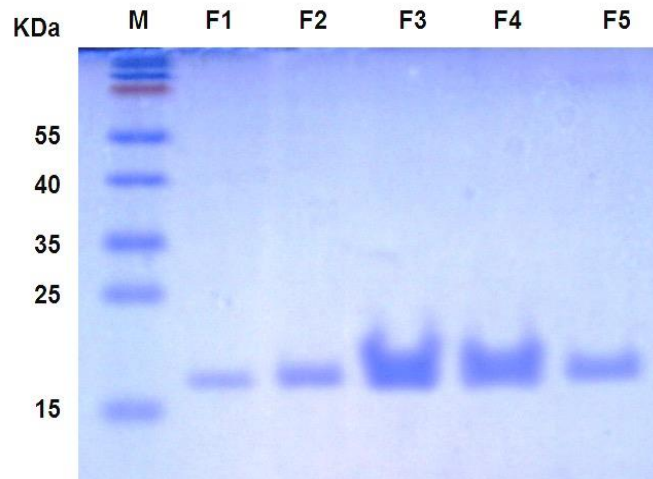


Figura13. Niveles de expresión a dos temperaturas de crecimiento 37°C y Temperatura ambiente la cepa silvestre (wt) y las diferentes mutantes generada ( $\Delta ettA$ ,  $\Delta ettB$  y  $\Delta ettAB$ ). Existen mayores niveles de expresión, transcripción de la fusión *ettAB-gfp* a temperatura ambiente que a 37°C, evidenciando termorregulación de este sistema TA.

## La antitoxina EttB es capaz de unirse específicamente a su propio promotor

Usando un sistema heterólogo en una cepa de *E.coli*/BL21(DE3) se sobre-expresó la antitoxina EttB que contiene en su extremo carboxilo terminal una etiqueta de Myc y seis histidinas (*Myc-6Xhis*) (De la Cruz et al., datos no publicados). Usando una resina de agarosa-níquel se purificó la proteína y las fracciones colectadas fueron analizadas en un gel de proteínas como puede ser visto en la siguiente figura:

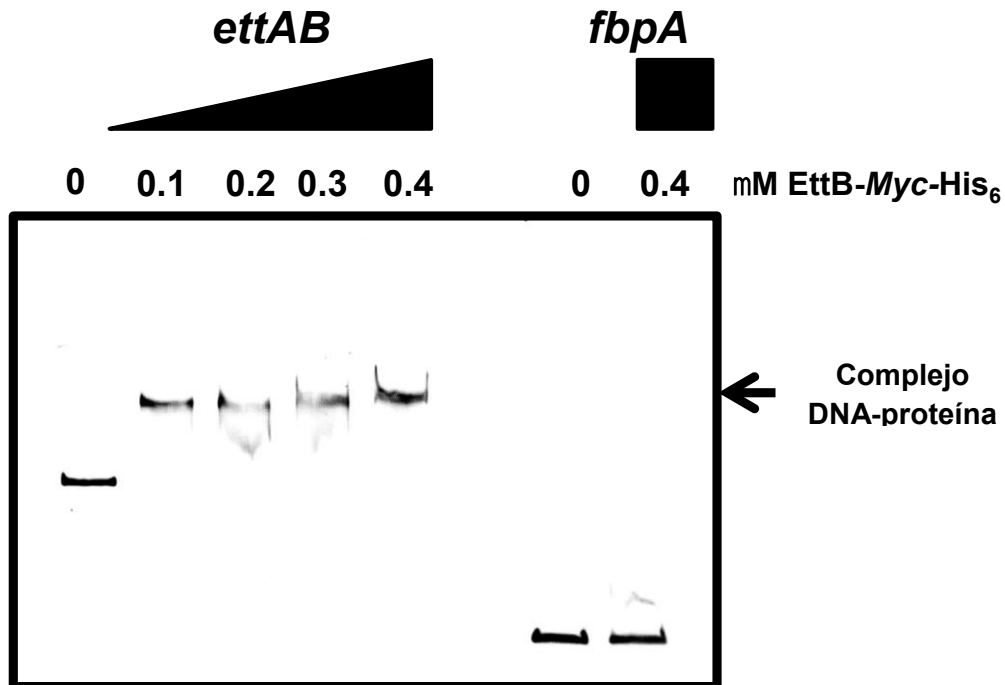


**Figura14. Análisis de las fracciones de la antitoxina EttB-Myc-6XHis purificada.** Gel de poliacrilamida desnaturalizante teñido con azul de Coomassie. El gel muestra el marcador de proteínas (M) y las diferentes fracciones eluidas (F1-F5). En la fracción F3 se observó la mayor concentración de proteína.

Con la antitoxina purificada se procedió a realizar ensayos de cambio en la movilidad electroforética (EMSA, por sus siglas en inglés). Se amplificó por medio de PCR la región promotora de los genes *ettA* y *ettB*; este DNA (100 nM) fue incubado con cantidades crecientes de la antitoxina purificada. La mezcla DNA-proteína fue resuelta en un gel nativo de poliacrilamida al 8% y posteriormente teñido con bromuro de etidio para visualizar el DNA. La antitoxina EttB-Myc-6XHis se unió específicamente con la región promotora a una concentración de 400 nM (0.4  $\mu$ M) observándose retardamiento del DNA y la formación de complejos DNA-proteína. Como control negativo se usó el DNA del gen *fbpA* que codifica para una fimbria de *Mycobacterium*



*tuberculosis*. A una concentración de 400 nM no se observó ni retardo ni formación de complejos DNA-proteína por lo que la interacción de la antitoxina EttB-*Myc*-6XHis con su propia región promotora fue específica.

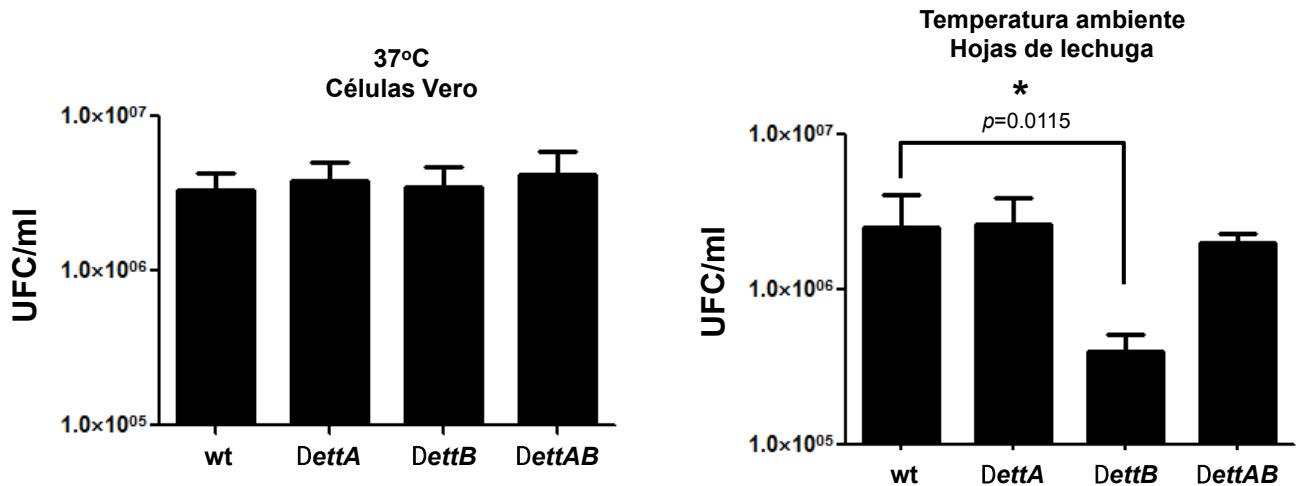


**Figura15.**La antitoxina EttB-*Myc*-6XHis se unió específicamente a su propio promotor. La región promotora fue amplificada por PCR y se incubó con diferentes concentraciones de antitoxina purificada (0-0.4  $\mu$ M). Se observa la formación de complejos DNA-proteína a una concentración de 0.4  $\mu$ M. El gen *fbpA* de *Mycobacterium tuberculosis* fue usado como control negativo.

### **La mutante antitoxina $\Delta$ *ettB* está afectada en la adherencia a células vegetales pero no a células animales**

Para caracterizar las mutantes en el sistema TA tipo II EttAB, se evaluó la capacidad de las mutantes para adherirse a células Vero y a hojas de lechuga. Las células Vero son células epiteliales de riñón de macaco y es el modelo celular más usado para los ensayos de infecciones con EHEC (50-52). Las hojas de lechuga es un modelo que recientemente fue usado debido a que ha sido demostrado que esta bacteria es capaz de adherirse a este tipo de células vegetales (53, 54) y sobre todo por los brotes

epidemiológicos donde EHEC fue encontrada en lechugas y espinacas (55-57). Las mutantes sencillas y dobles en el sistema EttAB no estuvieron afectadas en su adherencia a células Vero, sin embargo, la mutante antitoxina *ettB* estuvo afectada en la adherencia a hojas de lechuga. Este dato es relevante ya que muestra la importancia de la antitoxina EttB en la adherencia de EHEC a células vegetales.



**Figura 16. Adherencia de EHEC y derivadas mutantes en el sistema TA tipo II EttAB.** Las cepas *wt*, *ΔettA*, *ΔettB*, *ΔettAB* fueron analizadas en su capacidad de adherirse a células Vero y hojas de lechugas. La adherencia es mostrada como las UFC/mL de las diferentes bacterias obtenidas por conteo de diluciones seriadas. Los datos representan la media de tresexperimentos repetidos en diferentes días, por triplicado. \**p*=0.0115 estadísticamente significativo.

## 9. ANALISIS DE RESULTADOS

Los sistemas TA tipo II han emergido como potenciales factores de virulencia en diversas bacterias patógenas. El presente estudio identificó y caracterizó el papel del sistema TA tipo II EttAB (Z1060-Z1059) en la patogénesis de *Escherichia coli* enterohemorrágica. Dicho sistema no ha sido ni identificado y mucho menos caracterizado por lo que los datos generados en este trabajo son novedosos e interesantes en el campo tanto de los sistemas TA como de la patogénesis de EHEC. Usando el sistema de mutagénesis de Datsenko y Wanner (46), fuimos capaces de generar mutantes sencillas y nulas en los genes *ettAB*, los cuales codifican para la toxina (*ettA*, z1060) y antitoxina (*ettB*, z1059) de un sistema TA tipo II. Debido a que estos sistemas regulan el crecimiento y el metabolismo bacteriano (58-60), evaluamos su efecto sobre el crecimiento de EHEC mediante una cinética de crecimiento tanto a 37°C como a temperatura ambiente (Fig. 12). La ausencia de la antitoxina EttB afectó el crecimiento de EHEC a temperatura ambiente pero no a 37°C; la doble mutante *ettAB* restableció el crecimiento similar a la cepa silvestre, indicando que la toxina libre afecta el crecimiento a temperatura ambiente. Estas observaciones sugerían un efecto de la temperatura en la actividad y/o transcripción de la toxina EttA. Para evaluar la expresión del sistema EttAB, evaluamos la fusión transcripcional *ettAB-gfp* en la cepa silvestre y derivadas mutantes  $\Delta ettA$ ,  $\Delta ettB$  y  $\Delta ettAB$  tanto a 37°C como a temperatura ambiente. Interesantemente, la expresión de la fusión *ettAB-gfp* fue estimulada a temperatura ambiente con respecto a 37°C mostrando termoregulación (Figura 13). Similar a otros sistemas TA tipo II, la ausencia de la antitoxina EttB desreprimió la expresión del sistema indicando que la antitoxina regula negativamente su propia

expresión. En ausencia de la toxina EttA y de la antitoxina EttB ( $\Delta ettAB$ ) la expresión transcripcional fue similar a la ausencia de la antitoxina EttB indicando que solamente la antitoxina EttB y no la toxina EttA, reprime la transcripción de su propia expresión. Sorprendentemente, el efecto de termoregulación se perdió en la mutante sencilla toxina  $\Delta ettA$  pero continuó observándose en la mutante sencilla antitoxina  $\Delta ettB$  y doble mutante  $\Delta ettAB$ . Estos datos muestran la complejidad del efecto de la temperatura en la expresión de los genes *ettAB*.

En un sistema “clásico” TA tipo II, la antitoxina es capaz de unirse a su propio promotor (59, 60). Efectivamente, la antitoxina EttB-*Myc*-6XHis se unió específicamente a una concentración de 400 nM observándose la formación de complejos DNA-proteína (Figura 15). Este dato es concluyente respecto a que el sistema EttAB es un sistema TA tipo II.

EHEC es capaz de adherirse tanto a células animales como vegetales (15, 39, 53, 54, 61). La unión a células Vero no mostró algún fenotipo relacionado a la adherencia de la bacteria a las células eucarióticas. En contraste, usando el modelo vegetal con hojas de lechuga, pudimos observar que la mutante antitoxina  $\Delta ettB$  resultó afectada en la adherencia a este tipo de células (Figura 16). La disminución de la adherencia probablemente sea por el efecto de la mutante antitoxina  $\Delta ettB$  visto en el crecimiento a temperatura ambiente, sin embargo, no se puede descartar que dicho sistema regule algunos factores de virulencia, tales como la isla LEE o algún factor de adherencia. Futuros experimentos en el laboratorio, buscarán mostrar si dicho sistema TA tipo II está relacionado con otros factores de virulencia.

Interesantemente, los genes TA tipo II *ettAB* están presentes en las cepas patogénicas de EHEC y EAEC (Fig. 11, datos no mostrados). La presencia de dicho sistema en ambas cepas podría sugerir una ventaja patoadaptativa en células vegetales, correlacionado que solamente dichos patotipos han sido encontrados en organismos vegetales, tales como espinacas y lechugas (53, 54).

Los datos generados en este trabajo ayudarán a mejorar el entendimiento de los sistemas TA tipo II, tanto en la regulación de su expresión como su papel en la virulencia. Este trabajo abre la perspectiva de la importancia del sistema EttAB en la patogénesis de EHEC, donde experimentos futuros como la relación estructura-función de dichas proteínas, nos demostrarán la relevancia de estos genes en la virulencia de esta bacteria patógena.

## 10. CONCLUSIONES

El presente trabajo generó las siguientes conclusiones:

- El sistema EttAB en EHEC codificó para un sistema “clásico” TA tipo II, en el cual la antitoxina EttB reprimió directamente su propia expresión, uniéndose específicamente a su región promotora.
- Los genes *ettAB* presentaron termorregulación a nivel transcripcionales, estimulándose su expresión a temperatura ambiente con respecto a 37°C.
- La ausencia de la antitoxina EttB afectó el crecimiento de EHEC a temperatura ambiente y no a 37°C
- La mutante antitoxina  $\Delta ettB$  estuvo afectada en la adherencia a células vegetales pero no a células animales, sugiriendo el papel relevante de dicho sistema en su colonización a células vegetales.
- El sistema EttAB le confirió una ventaja adaptativa a EHEC cuando la bacteria crece a temperatura ambiente y cuando dicha bacteria se adhiere a células vegetales.

## 11. PERSPECTIVAS

El trabajo generó las siguientes perspectivas:

- Evaluar la estabilidad de las proteínas EttA y EttB a 37°C y a temperatura ambiente para evaluar el efecto de la temperatura a nivel post-traducciona.
- Analizar el papel de las proteasas Lon y ClpXP en la transcripción-traducción del sistema EttAB, analizando la expresión de la fusión *ettAB-gfp* en los fondos mutantes de proteasas antes mencionadas.
- Identificar los residuos aminoacídicos relevantes para la función del sistema EttAB por medio de mutagénesis sitio-dirigida en sistemas plasmídicos.

## 12. GLOSARIO

**Actina** Proteína contráctil que forma parte de los filamentos finos de las fibras musculares.

**Anemia** Trastorno de la sangre en el cual el número de glóbulos rojos funcionales o su contenido de hemoglobina están por debajo de lo normal.

**Anemia hemolítica microangiopática** Anemia en la cual se fragmenta y destruyen glóbulos rojos por varios tipos de traumatismos mecánicos en los pequeños vasos sanguíneos.

**Bacteriemia** Descarga pasajera de bacterias en la sangre a partir de un foco infeccioso, que se manifiesta por temblores y aumentos de temperatura.

**Citotóxica** Que tiene un efecto tóxico sobre determinadas células.

**Coagulación intravascular diseminada** Es un trastorno grave en el cual las proteínas que controlan la coagulación de la sangre se vuelven demasiado activas

**Colitis hemorrágica** Tipo de gastroenteritis en la que EHEC infecta al intestino grueso y produce toxinas que causan diarrea súbita con sangre. Se caracteriza por retortijones abdominales intensos y de comienzo súbito, junto con diarrea acuosa que se vuelve sanguinolenta en las primeras 24 horas.

**Disuria** Dificultad o dolor en la evacuación de la orina.

**EMSA (Ensayos de Cambio en la Movilidad Electroforética)** Técnica electroforética para identificación de ligaciones de un compuesto al otro. Márcase un compuesto para seguir su movilidad durante la electroforesis. Si el compuesto marcado presentarse unido a un otro compuesto, entonces la movilidad del compuesto marcado por el medio electroforético será retardada.

**Enzimas EcoRI** Enzima de restricción producida por *E. coli* que posee una diana de restricción en el ADN de cadena doble dependiente de una secuencia metiladapalindrómica y asimétrica, sobre la cual su actividad catalítica hidrolasa genera extremos cohesivos.

**Enzimas BamHI** Enzima de restricción de tipo II producida por el microorganismo *Bacillus amyloliquefaciens* que posee una diana de restricción en el ADN de cadena doble dependiente de una secuencia no metilada, palindrómica y asimétrica, sobre la cual su actividad catalítica hidrolasa genera extremos cohesivos.

**Factor de necrosis tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ )** es miembro de un grupo de otras citocinas que estimulan la fase aguda de la reacción inflamatoria.



**Fagosoma** Es una vesícula que se forma en el interior de la célula unida a la membrana, formada durante el proceso de la fagocitosis, contiene microorganismos o material extracelular, fusionándose con otras estructuras intracelulares como los lisosomas, conducen a la degradación enzimática del material ingerido.

**Globotriaosilceramida (GB3)** está constituido por una ceramida unida a una cadena de azúcares formada por una glucosa y dos galactosas...

**Hematuria** Presencia de sangre en la orina.

**Hemolisina** Destrucción de los hematíes o glóbulos rojos de la sangre que va acompañada de liberación de hemoglobina.

**Interleucina-6 (IL-6)** La IL-6 es una glucoproteína segregada por los macrófagos, células T, células endoteliales y fibroblastos. Su liberación está inducida por la IL-1 y se incrementa en respuesta a TNF $\alpha$ . Es una citocina con actividad antiinflamatoria y proinflamatoria.

**Islas de patogenicidades** una fracción del ADN genómico de un microorganismo patógeno que le faculta como virulento. Suele estar contenido en plásmidos, y su origen es una transferencia horizontal de material genético.

**Lactato Deshidrogenasa (LDH)** es una enzima catalizadora que se encuentra en muchos tejidos del cuerpo, pero su presencia es mayor en el corazón, hígado, riñones, músculos, glóbulos rojos, cerebro y pulmones. Su análisis se utiliza, por lo general, para detectar si existen lesiones en el tejido.

**Proteínas Lon y ClpP** son dos proteasas mitocondriales ATP-dependientes

**Marco de lectura abierto (ORF)** Secuencia de ARN comprendida entre un codón de inicio (AUG) de la traducción y un codón de terminación, una vez establecido el marco de lectura por el codón de iniciación, la secuencia se encuentra "abierta" para la traducción porque carece de codón de terminación.

**Meningitis** Inflamación de las meninges debida a una infección vírica o bacteriana.

**Microangiopatía** Afectación de los pequeños vasos sanguíneos

**Módulo TA GhoS/GhoT** Sistema Toxina-Antitoxina tipo V, donde GhoT codifica para la toxina y GhoS es la proteína antitoxina que inhibe la toxina escindiendo específicamente su mRNA.

**Operón** Unidad genética funcional formada por un grupo o complejo de genes capaces de ejercer una regulación de su propia expresión por medio de los sustratos con los que interaccionan las proteínas codificadas por sus genes.

**Pielonefritis** Infección del riñón y de la pelvis renal.

**Piuria** Presencia de pus en la orina.

**Polaquiuria** Es un signo urinario, componente del síndrome miccional, caracterizado por el aumento del número de micciones durante el día, que suelen ser de escasa cantidad y que refleja una irritación o inflamación del tracto urinario.

**Proteínas YeeU/YeeV (CtbA/CtbB)** . Sistemas TA de *E.coli*, inhibe la polimerización de las proteínas del citoesqueleto bacterianas. La antitoxina YeeU, funciona como un antagonista de la toxicidad YeeV.

**Ribonucleasa** Es una enzima (nucleasa) que cataliza la hidrólisis de ARN en componentes más pequeños.

**Septicemia** Infección grave y generalizada de todo el organismo debida a la existencia de un foco infeccioso en el interior del cuerpo del cual pasan gérmenes patógenos a la sangre.

**Síndrome Urémico Hemolítico (HUS)** es un trastorno que ocurre generalmente cuando una infección en el aparato digestivo produce sustancias tóxicas que destruyen los glóbulos rojos, causando lesión a los riñones.

**Sistema Hok/sok** Es un mecanismo de eliminación postsegregational empleado por el plásmido R1 en *E. coli*. Es un sistema de tipo I debido a que la toxina es neutralizada por un ARN complementario.

**Toxina Shiga (Stx)** Es una familia de toxinas relacionadas con dos grupos principales, Stx1 y Stx2, cuyos genes se considera que son parte del genoma de los profagos lambdaoides

**Transferencia Horizontal de Genes (HGT)** Es un proceso en el que un organismo transfiere material genético a otra célula que no es descendiente.

**Transposones** Secuencia de ADN que puede moverse de manera autosuficiente a diferentes partes del genoma de una célula, un fenómeno conocido como transposición.

**Trombocitopenia** Disminución del número de trombocitos o plaquetas por debajo de 100.000/mm<sup>3</sup>

**Trombopenia** Disminución de la cantidad de plaquetas circulantes en el torrente sanguíneo inferior a 100.000/mm<sup>3</sup>.

**VapBC.** (Proteínas de virulencia asociados B y C, por sus siglas en inglés) es la mayor familia de sistema toxina-antitoxina tipo II en procariontes. Las toxinas es inhibida por la co-expresión de la antitoxina, de una manera análoga a un veneno y antídoto.

### 13. REFERENCIAS

1. Abbott SL, O'Connor J, Robin T, Zimmer BL, Janda JM. Biochemical properties of a newly described *Escherichia* species, *Escherichia albertii*. *Journal of Clinical Microbiology*. 2003;41(10):4852-4.
2. Iman ST, Friedmann HC, Sims RH. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2007;45(8):1025-9.
3. Cummings JH, Macfarlane GT. Role of intestinal bacteria in nutrient metabolism. *JPEN Journal of Parenteral and Enteral Nutrition*. 1997;21(6):357-65.
4. Welch Ra. *The Genus Escherichia*. 2006.
5. Croxen MA, Finlay BB. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2010;8(1):26-38.
6. Rangel JM, Sparling PH, Crowe C, Griffin PM, Swerdlow DL. Epidemiology of *Escherichia coli* O157:H7 outbreaks, United States, 1982-2002. *Emerging Infectious Diseases*. 2005;11(4):603-9.
7. Cieslak et al. 1997. Hamburger-Associated *Escherichia coli*.
8. Zhou Z, Ogasawara J, Nishikawa Y, Seto Y, Helander A, Hase A, et al. An outbreak of gastroenteritis in Osaka, Japan due to *Escherichia coli* serogroup O166:H15 that had a coding gene for enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 (EAST1). *Epidemiology and Infection*. 2002;128(3):363-71.
9. Charatan F. New York outbreak of *E coli* poisoning affects 1000 and kills two. *Bmj*. 1999;319(7214):873.
10. Luna-Gierke RE, Wymore K, Sadlowski J, Clogher P, Gierke RW, Tobin-D'Angelo M, et al. Multiple-aetiology enteric infections involving non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli*--FoodNet, 2001-2010. *Zoonoses and Public Health*. 2014;61(7):492-8.
11. Mellmann A, Harmsen D, Cummings CA, Zentz EB, Leopold SR, Rico A, et al. Prospective genomic characterization of the German enterohemorrhagic *Escherichia coli* O104:H4 outbreak by rapid next generation sequencing technology. *PloS One*. 2011;6(7):e22751.

12. Kaper JB. Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. Current opinion in microbiology. 1998;1(1):103-8.
13. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. Molecular Microbiology. 1998;30(5):911-21.
14. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 1998;11(1):142-201.
15. Rendon MA, Saldana Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vazquez A, Kaper JB, et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. 2007;104(25):10637-42.
16. Torres AG, Zhou X, Kaper JB. Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. Infection and Immunity. 2005;73(1):18-29.
17. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2004;2(2):123-40.
18. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 2013;26(4):822-80.
19. Keir LS. Shiga toxin associated hemolytic uremic syndrome. Hematology/oncology clinics of North America. 2015;29(3):525-39.
20. Agger M, Scheutz F, Villumsen S, Molbak K, Petersen AM. Antibiotic treatment of verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC) infection: a systematic review and a proposal. The Journal of Antimicrobial Chemotherapy. 2015;70(9):2440-6.
21. Murray PR, Rosenthal KS, Pfaller MA. Medical microbiology. 6th ed. Philadelphia: Mosby/Elsevier; 2009. x, 947 p. p.
22. Gerlach RG, Hensel M. Protein secretion systems and adhesins: the molecular armory of Gram-negative pathogens. International Journal of Medical Microbiology : IJMM. 2007;297(6):401-15.
23. Costa TR, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. Nature reviews Microbiology. 2015;13(6):343-59.

24. McDaniel TK, Kaper JB. A cloned pathogenicity island from enteropathogenic *Escherichia coli* confers the attaching and effacing phenotype on *Escherichia coli* K-12. *Molecular Microbiology*. 1997;23(2):399-407.
25. Collins JW, Keeney KM, Crepin VF, Rathinam VA, Fitzgerald KA, Finlay BB, et al. *Citrobacter rodentium*: infection, inflammation and the microbiota. *Nature Reviews Microbiology*. 2014;12(9):612-23.
26. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, et al. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Molecular Microbiology*. 1998;28(1):1-4.
27. Elliott SJ, Yu J, Kaper JB. The cloned locus of enterocyte effacement from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 is unable to confer the attaching and effacing phenotype upon *Escherichia coli* K-12. *Infection and Immunity*. 1999;67(8):4260-3.
28. Burkinshaw BJ, Deng W, Lameignere E, Wasney GA, Zhu H, Worrall LJ, et al. Structural analysis of a specialized type III secretion system peptidoglycan-cleaving enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*. 2015;290(16):10406-17.
29. Haack KR, Robinson CL, Miller KJ, Fowlkes JW, Mellies JL. Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity*. 2003;71(1):384-92.
30. Deng W, Puente JL, Gruenheid S, Li Y, Vallance BA, Vazquez A, et al. Dissecting virulence: systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2004;101(10):3597-602.
31. Connolly JP, Finlay BB, Roe AJ. From ingestion to colonization: the influence of the host environment on regulation of the LEE encoded type III secretion system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Frontiers in Microbiology*. 2015;6:568.
32. Sperandio V, Mellies JL, Delahay RM, Frankel G, Crawford JA, Nguyen W, et al. Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler. *Molecular microbiology*. 2000;38(4):781-93.

33. Bustamante VH, Santana FJ, Calva E, Puente JL. Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Molecular Microbiology*. 2001;39(3):664-78.
34. Rosenshine I, Ruschkowski S, Finlay BB. Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature, and protein synthesis upon contact with epithelial cells. *Infection and Immunity*. 1996;64(3):966-73.
35. Roe AJ, Yull H, Naylor SW, Woodward MJ, Smith DG, Gally DL. Heterogeneous surface expression of EspA translocon filaments by *Escherichia coli* O157:H7 is controlled at the posttranscriptional level. *Infection and Immunity*. 2003;71(10):5900-9.
36. Wong AR, Pearson JS, Bright MD, Munera D, Robinson KS, Lee SF, et al. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: even more subversive elements. *Molecular Microbiology*. 2011;80(6):1420-38.
37. Griffin PM, Ostroff SM, Tauxe RV, Greene KD, Wells JG, Lewis JH, et al. Illnesses associated with *Escherichia coli* O157:H7 infections. A broad clinical spectrum. *Ann Intern Med*. 1988;109(9):705-12.
38. Nataro JP, Kaper JB. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998;11(1):142-201.
39. Xicohtencatl-Cortes J, Monteiro-Neto V, Ledesma MA, Jordan DM, Francetic O, Kaper JB, et al. Intestinal adherence associated with type IV pili of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *The Journal of Clinical Investigation*. 2007;117(11):3519-29.
40. GRNAett JA, Martinez-Santos VI, Saldana Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012;109(10):3950-5.
41. Zielenkiewicz U, Ceglowski P. The toxin-antitoxin system of the streptococcal plasmid pSM19035. *Journal of Bacteriology*. 2005;187(17):6094-105.
42. Norton JP, Mulvey MA. Toxin-antitoxin systems are important for niche-specific colonization and stress resistance of uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*. 2012;8(10):e1002954.
43. Marles-Wright J, Lewis RJ. Stress responses of bacteria. *Current opinion in structural biology*. 2007;17(6):755-60.

44. Pandey DP, Gerdes K. Toxin-antitoxin loci are highly abundant in free-living but lost from host-associated prokaryotes. *Nucleic Acids Research*. 2005;33(3):966-76.
45. Goulard C, Langrand S, CRNAiel E, Chauvaux S. The *Yersinia pestis* chromosome encodes active addiction toxins. *Journal of Bacteriology*. 2010;192(14):3669-77.
46. Audoly G, Vincentelli R, Edouard S, Georgiades K, Mediannikov O, Gimenez G, et al. Effect of rickettsial toxin VapC on its eukaryotic host. *PLoS One*. 2011;6(10):e26528.
47. De la Cruz MA, Zhao W, Farenc C, Gimenez G, Raoult D, Cambillau C, et al. A toxin-antitoxin module of *Salmonella* promotes virulence in mice. *PLoS Pathogens*. 2013;9(12):e1003827.
48. Datsenko KA, Wanner BL. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2000;97(12):6640-5.
49. Valdivia RH, Falkow S. Bacterial genetics by flow cytometry: rapid isolation of *Salmonellatyphimurium* acid-inducible promoters by differential fluorescence induction. *Molecular Microbiology*. 1996;22(2):367-78.
50. Kongmuang U. Studies on shiga-like toxin produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli*: purification and characterization of the toxin and development of methods for identifying the toxin. *Medical Journal of Osaka University*. 1989;38(1-4):39-49.
51. Takeda Y, Kurazono H, Yamasaki S. Vero toxins (Shiga-like toxins) produced by enterohemorrhagic *Escherichia coli* (verocytotoxin-producing *E. coli*). *Microbiology and immunology*. 1993;37(8):591-9.
52. Eitzinger C, Ehrlenbach S, Lindner H, Kremser L, Gottardi W, Debatov D, et al. N-chlorotaurine, a long-lived oxidant produced by human leukocytes, inactivates Shiga toxin of enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *PloS One*. 2012;7(11):e47105.
53. Macarisin D, Patel J, Bauchan G, Giron JA, Ravishankar S. Effect of spinach cultivar and bacterial adherence factors on survival of *Escherichia coli* O157:H7 on spinach leaves. *Journal of Food Protection*. 2013;76(11):1829-37.



54. Saldana Z, Sanchez E, Xicohtencatl-Cortes J, Puente JL, Giron JA. Surface structures involved in plant stomata and leaf colonization by shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Frontiers in Microbiology*. 2011;2:119.
55. Fruth A, Prager R, Tietze E, Rabsch W, Flieger A. Molecular epidemiological view on Shiga toxin-producing *Escherichia coli* causing human disease in Germany: Diversity, prevalence, and outbreaks. *International Journal of Medical Microbiology : IJMM*. 2015.
56. Tabuchi A, Wakui T, Yahata Y, Yano K, Azuma K, Yamagishi T, et al. A large outbreak of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157, caused by low-salt pickled Napa cabbage in nursing homes, Japan, 2012. *Western Pacific Surveillance and Response Journal : WPSAR*. 2015;6(2):7-11.
57. Askar M, Faber MS, Frank C, Bernard H, Gilsdorf A, Fruth A, et al. Update on the ongoing outbreak of haemolytic uraemic syndrome due to Shiga toxin-producing *Escherichia coli* (STEC) serotype O104, Germany, May 2011. *Euro surveillance : bulletin Europeen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin*. 2011;16(22).
58. Gerdes K, Christensen SK, Lobner-Olesen A. Prokaryotic toxin-antitoxin stress response loci. *Nature Reviews Microbiology*. 2005;3(5):371-82.
59. Yamaguchi Y, Park JH, Inouye M. Toxin-antitoxin systems in bacteria and archaea. *Annual Review of Genetics*. 2011;45:61-79.
60. Yamaguchi Y, Inouye M. Regulation of growth and death in *Escherichia coli* by toxin-antitoxin systems. *Nature Reviews Microbiology*. 2011;9(11):779-90.
61. Samadder P, Xicohtencatl-Cortes J, Saldana Z, Jordan D, Tarr PI, Kaper JB, et al. The *Escherichia coli* ycbQRST operon encodes fimbriae with laminin-binding and epithelial cell adherence properties in Shiga-toxicogenic *Escherichia coli* O157:H7. *Environmental Microbiology*. 2009;11(7):1815-26.