



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

Maestría y Doctorado en Ciencias Bioquímicas

Efecto de un campo magnético en el fenómeno de autoagregación de *E. coli* enteropatógena

TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

Doctor en Ciencias

PRESENTA:

María Alejandra Quiñones Peña

TUTOR PRINCIPAL:

Dr. Carlos A. Eslava Campos
Facultad de Medicina UNAM

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:

Dr. Gustavo Tavizón Alvarado
Facultad de Química UNAM

Dr. José Luis Puente García
Instituto de Biotecnología UNAM

Ciudad de México. Febrero, 2018



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.

Índice

| | |
|--|----|
| Introducción | 1 |
| Antecedentes | 1 |
| <i>Escherichia coli</i> | 1 |
| <i>E. coli</i> enteropatógena | 4 |
| Modelo de patogenicidad | 4 |
| Autoagregación | 5 |
| Adherencia inicial y BFP..... | 5 |
| Adherencia inicial y filamentos EspA..... | 8 |
| Adherencia inicial y flagelo..... | 10 |
| Antecedentes | 11 |
| Campo magnético | 11 |
| Respuesta biológica ante el campo magnético | 15 |
| Efecto del campo magnético sobre células | 15 |
| Efecto del campo magnético en la interacción hospedero – parásito..... | 17 |
| Justificación..... | 18 |
| Pregunta de investigación | 18 |
| Hipótesis..... | 18 |
| Objetivos | 18 |
| Objetivo general | 18 |
| Objetivos específicos..... | 18 |
| Metodología..... | 19 |
| Cepas utilizadas en el estudio | 20 |
| Determinación de la magnitud de campo magnético..... | 21 |
| Tratamiento por campo magnético..... | 21 |
| Ensayo de la viabilidad | 22 |
| Ensayo de autoagregación | 23 |
| Ensayo de modificación sobre la estructura externa de E2348/69 | 26 |
| Análisis estadístico | 28 |
| Resultados..... | 28 |
| Caracterización de las cepas evaluadas en el estudio | 28 |
| Campos magnéticos | 30 |
| Efectos de campos magnéticos en la viabilidad de E2348/69 | 31 |
| Efecto del tratamiento con diferentes magnitudes de campo magnético en la autoagregación de E2348/69 | 31 |
| Efecto del tratamiento de un campo magnético sobre la adherencia en células HEp-2 de la cepa E2348/69..... | 33 |
| Efecto de un campo magnético sobre la modificación de la estructura externa de E2348/69..... | 34 |
| Análisis de resultados..... | 35 |

| | |
|--------------------|----|
| Conclusiones | 39 |
| Bibliografía | 40 |
| Anexos..... | 45 |

Índice de Cuadros

| | |
|--|---|
| Cuadro 1. Características de las cepas diarrogénicas patógenas de <i>E. coli</i> | 3 |
|--|---|

Índice de Diagramas

| | |
|--|----|
| Diagrama 1. Metodología general..... | 19 |
| Diagrama 2. Efecto de diferentes magnitudes de campo magnético sobre la viabilidad de EPEC E 2348/69..... | 22 |
| Diagrama 3. Efecto sobre la autoagregación de E 2348/69 de campos magnéticos de diferentes magnitudes | 23 |
| Diagrama 4. Efecto del campo magnético sobre la adherencia de E 2348/69 en células HEp-2 | 25 |
| Diagrama 5. Ensayo de microscopía electrónica de transmisión, para evaluar el efecto sobre la membrana externa de la bacteria posterior al tratamiento con un campo magnético..... | 27 |
| Diagrama 6. Ensayo para evaluar el efecto de campos magnéticos sobre la permeabilidad de la membrana de E-2348/69 | 28 |

Índice de Figuras

| | |
|---|----|
| Figura 1. Patrones de adherencia. Fotos tomadas para este estudio. | 2 |
| Figura 2. Modificación del patrón de adherencia localizada de EPEC por efecto de la inhibición en la expresión de BFP. | 6 |
| Figura 3. Ensayos de autoagregación de diferentes cepas de EPEC. | 7 |
| Figura 4. Efecto de la activación de Cpx sobre BFP y la autoagregación | 8 |
| Figura 5. Adherencia mediada por EspA..... | 9 |
| Figura 6. Modificación de la expresión de EspA por CpxR..... | 9 |
| Figura 7. Adherencia mediada por <i>fliC</i> | 10 |
| Figura 8. Campo magnético..... | 12 |
| Figura 9. Campo magnético de un imán. | 14 |
| Figura 10. Producción de campos magnéticos. | 22 |
| Figura 11. Productos de PCR de <i>bfpA</i> y <i>eaeA</i> para las cepas E 2349/69 y JEPE30 | 29 |
| Figura 12. Productos de PCR de <i>bfpA</i> y <i>eaeA</i> para las cepas E 2349/69 y Δ escN..... | 29 |
| Figura 13. Ensayo de adherencia en células HEp-2..... | 34 |
| Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de EPEC E2348/69 sometida a un campo magnético. | 35 |

Índice de Gráficas

| | |
|---|----|
| Gráfica 1. Distribución de las magnitudes de los diferentes campos magnéticos | 30 |
| Gráfica 2. Efecto de campos magnéticos en la viabilidad de E 2348/69..... | 31 |
| Gráfica 3.Efecto sobre la inhibición de la Autoagregación inducida por campos magnéticos..... | 32 |
| Gráfica 4. Efecto del campo magnético en la autoagregación de distintas cepas de <i>E. coli</i> | 33 |

Índice de Anexos

Anexo 1. Soluciones, medios y gel.....45
Anexo 2. Publicación50

Introducción

Antecedentes

La diarrea es una enfermedad que afecta a nivel internacional a diferentes sectores de la población, se caracteriza por un aumento en el número y una disminución de la consistencia de las evacuaciones del individuo afectado. Los principales agentes que producen esta enfermedad son bacterias, virus y parásitos. Se considera que al año se presentan aproximadamente 1700 millones de casos de diarrea alrededor del mundo en personas de todas las edades y más de 700 mil niños al año mueren a causa de este padecimiento (WHO, 2015).

El principal tratamiento de esta enfermedad es la rehidratación oral, que ha disminuido la mortalidad por este padecimiento, sin embargo, la morbilidad se mantiene elevada, teniendo mayor relación con niños en estado de desnutrición severa, haciendo un binomio que condiciona y afecta su crecimiento (Thiam et al., 2017).

El objetivo de la rehidratación oral consiste en reponer los fluidos y electrolitos perdidos, factor importante para mantener la homeostasis del paciente. Aunque en la mayoría de los casos de diarrea la rehidratación es el único tratamiento recomendado, en muchas ocasiones se administran antimicrobianos. Sin embargo, el empleo de éstos tiene efectos adversos sobre el individuo ya que puede eliminar parte de su microbiota normal, la cual tiene dentro de sus funciones mantener el equilibrio de los microorganismos presentes en el tracto digestivo. Por otro lado, el uso de antibióticos para ésta y otras enfermedades contribuye en forma importante en la selección de cepas resistentes o multiresistentes, lo que en algunos casos da lugar al desarrollo de microorganismos como *Clostridium difficile* que como patógeno oportunista ocasiona cuadros severos de colitis hemorrágica (Rogaski et al., 2015). En México se estima que se recetan antibióticos al 70% de los pacientes con infecciones, ya sean respiratorias o diarreicas agudas, aunque solamente se justifiquen en un 15% de los casos (Dreser et al., 2008).

Las bacterias y virus son los principales agentes responsables de la diarrea; *Escherichia coli spp* es una de las bacterias más relevantes relacionadas con la patogénesis de la enfermedad, aunque existen otras no menos importantes, como *Campylobacter spp*, *Salmonella spp* y *Shigella spp* (Bern et al., 1992).

Escherichia coli

En 1885, Theodore Escherich, un pediatra alemán, aisló por primera vez la bacteria *E. coli* a la que denominó *Bacterium coli commune*, por el hecho de su presencia universal en el intestino de individuos sanos y enfermos de diarrea. Aunque esta bacteria forma parte de la microbiota intestinal normal del hombre y otras especies animales, en la actualidad se conoce de la existencia de cepas patógenas responsables de distintos cuadros clínicos, incluida la diarrea.

E. coli forma parte de la familia Enterobacteriaceae, es un bacilo Gram negativo móvil, anaerobio facultativo, entre otras funciones metabólicas fermenta la glucosa y lactosa, reduce nitratos a nitritos y es catalasa positiva. Posee una pared celular compleja conocida también como membrana externa, la cual está conformada por polisacáridos, lipoproteínas, proteínas porinas y

otras proteínas, la bacteria además presenta flagelos pertricos y fimbrias que participan en la adherencia a diferentes epitelios.

Al respecto, se ha identificado en la bacteria que su capacidad para adherirse a células se relaciona con diferentes estructuras, incluidos diferentes tipos de fimbrias, los flagelos e incluso la cápsula (Nataro y Kaper, 1998). En el caso de las cepas de *E. coli* que causan diarrea, se han descrito diferentes patrones o fenotipos de adherencia que por sus características se han denominado localizada, difusa y agregativa (Cravioto et al., 1979; Nataro et al., 1987; Scaletski et al., 1984). La adherencia localizada de interés para el presente trabajo se distingue por la formación de microcolonias de bacterias que se encuentran en áreas de poca extensión de la superficie de la célula hospedero; las microcolonias son agrupamientos de la bacteria que presentan poco espacio entre las bacterias que la conforman (Figura 1. A).

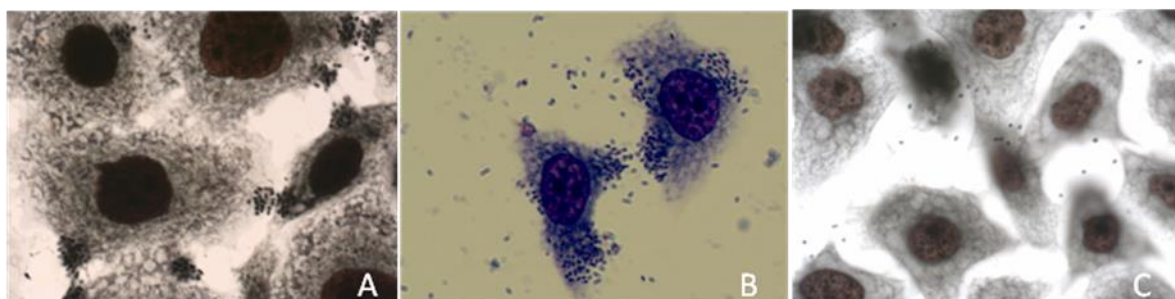


Figura 1. Patrones de adherencia. Fotos tomadas para este estudio.

(A) Adherencia localizada, (B) Adherencia Difusa y (C) Sin adherencia. Células HEp-2, Objetivo 100x.

La adherencia es el primer paso en el proceso de colonización de las bacterias, ésta puede ser por efecto de interacciones inespecíficas (puentes de hidrógeno, fuerzas de Van der Waals), o por estructuras de la superficie bacteriana que pueden ser fimbriales o no fimbriales, las presentan adhesinas que interaccionan con receptores celulares específicos.

Las fimbrias son estructuras proteicas en forma de varillas que pueden ser cortas o muy largas con diferente grosor, algunas codificadas por genes presentes en el cromosoma o en plásmidos. Los receptores son estructuras transmembranales diseñadas para reconocer factores de crecimiento, hormonas o ligandos.

Kauffmann (1994) Describió a los grupos de *E. coli* asociados con la etiopatogenia de la diarrea (DEC), se integraron de acuerdo a su estructura antigénica (antígenos somáticos O y flagelar H), el tipo de cuadro clínico producido y grupos etarios a los que afectan, así como su distribución epidemiológica (Kaper et al., 2004). De forma más reciente se han considerado la presencia de genes relacionados con la patogenicidad por medio de la expresión de componentes asociados a la virulencia de la bacteria como son los factores genéticos de patogenicidad, el conjunto de todas las características (factores genéticos de patogenicidad, mecanismos de patogenicidad y serogrupos) ha permitido integrar a las cepas DEC en seis diferentes tipos patógenos o patotipos (Cuadro 1).

| Grupo patógeno | Mecanismos de patogenicidad | Factores genéticos de patogenicidad | Serogrupos | Manifestaciones clínicas | Epidemiología |
|------------------------|-----------------------------|--|---|--------------------------|--|
| Enteroroxigénica ETEC | Producción de enterotoxina | CFA, ST y LT | O8:H9, O15:H11, O20:H-, O25:H-O27:H7, O78:H12, O148:H28, O159:H20 | Diarrea acuosa | Niños, viajeros, adultos Países en desarrollo |
| Enteroinvasiva EIEC | Invasión | Plasmido de invasividad de 140MDa | O28:H, O112ac:H-, O144:H-, O152:H-, 164:H-O167:H- | Disentería | Niños mayores de 1 año, preescolares Mundial |
| Enterohemorrágica EHEC | Producción de citotoxinas | STX, pO157, intimina | O157:H7, O26:H11, O103:H2, O113:H21, O119, O128, O145 | Colitis hemorrágica | Niños de 2 a 7 años Países en desarrollo, Latinoamérica |
| Enterogregativa EAEC | Adherencia agregativa | Plasmido de 60MDa, Citotoxina, OMP, Fimbria AAFI y II y EAST | O44:H18 | Diarrea con moco | Menores de 2 años |
| Adherente Difusa DAEC | Adherencia difusa | Fimbria 1845, OMP | O126:H27 | Diarrea acuosa | Preescolares Sin Distribución específica |
| Enteropatógena EPEC | Adherencia localizada | Plásmido EAE, y BFP | O55, O86, O142, O111:H-O127 | Diarrea acuosa | Bebes menores de 6 meses Países en desarrollo |

Cuadro 1. Características de las cepas diarrogénicas patógenas de E. coli

CFA: Factor de colonización antigénico, ST: Toxina termoestable, LT: Toxina termolábil; STX: Toxina Shiga, pO157: ME FALTA; AAFI y II: fimbria I y II de adherencia agregativa, EASTI: Toxina ST de cepas enteroagregativas; OMP: Proteína de membrana externa; EAE: Factor de adherencia de EPEC y BFP: Pili con forma rizada. Fuente: Rodríguez-Angeles, 2002

***E. coli* enteropatógena**

E. coli enteropatógena (EPEC) fue el primero grupo asociado a diarrea en infantes. Cravioto et al. (1979) reportaron que las llamadas cepas enteropatógenas mostraban capacidad para adherirse a células HEp-2 (Carcinoma faríngeo humano, por sus siglas en inglés), formando microcolonias, fenotipo al que posteriormente se le dio el nombre de adherencia localizada (Nataro y Kaper, 1998). Levine et al. (1984) describieron una proteína de 94 kDa con un papel importante en dicho evento, misma que se denominó intimina, por su relación con la adherencia íntima de la bacteria a la superficie de la célula. En años posteriores se describieron varios genes involucrados en el mecanismo de patogenicidad de EPEC, los cuales se localizan en el plásmido EAF (Enter Adherent Factor) y en la isla de patogenicidad LEE (Locus of Enterocyte Effacement). En la actualidad se hace referencia de dos variedades de cepas de EPEC, las llamadas típicas que presentan los genes *eae*⁺ y *bfpA*⁺ relacionados con la adherencia localizada y las lesiones histopatológicas que se llaman “attaching and effacing (A/E) y las atípicas que son *eae*⁺ *bfpA*⁻. Los genes *eae* y *bfpA* se encuentran en la isla LEE y el plásmido EAF, respectivamente.

Modelo de patogenicidad

La interacción entre EPEC y la célula del epitelio intestinal se da en 3 etapas importantes:

Adherencia inicial

El primer contacto de EPEC con la célula eucarionte es por la acción de BFP (bundle-forming pilus), esta estructura da la capacidad de adherencia localizada. Las fimbrias BFP forman haces que permiten la interacción tridimensional entre las bacterias para formar los agregados bacterianos conocidos como microcolonias (de 5 a 200 bacterias). Además, BFP se unen a las microvellosidades de los enterocitos del epitelio, lo que permite adherirse herméticamente a la superficie de la mucosa del intestino con la participación del flagelo y los filamentos EspA (Girón et al., 1991; Girón et al., 1993; Mellies et al., 2007).

Las cepas EPEC atípicas, que no presentan el plásmido EAF, presentan una modificación en su patrón de adherencia conocido como “adherencia parecida a la localizada”, donde los filamentos EspA y el flagelo permiten la interacción con la mucosa, lo cual es menor a la interacción presentada por BFP, ya que son menos la cantidad de bacterias que quedan unidas por adherencia inicial, generando un patrón de adherencia donde las microcolonias se dispersan un poco. Se ha observado que a falta de BFP los filamentos EspA son los principales promotores de la adherencia en la colonización de la EPEC (Vuopio-Verkila et al., 1991; Cleary, 2004; Girón, 2002.).

Sistema de secreción tipo III

Una vez que EPEC se ha adherido, se genera la maquinaria que permitirá anclarse por completo sobre el enterocito, así como para el paso de información para la activación de señales en el hospedero por proteínas efectoras. El sistema de secreción tipo III (“type III secretion system” [TTSS]), también conocido como inyectorio, favorece la introducción de diferentes moléculas del interior de EPEC a la célula del hospedero (Jarvis et al., 1995). La mayor parte de las proteínas

de esta maquinaria y de las proteínas que se van a secretar se encuentran codificadas en la isla de patogenicidad LEE. Una vez que se ha generado la adherencia inicial, la estructura del TTSS se polimeriza en el extremo cercano a la célula epitelial, lo que permite la formación de un puente físico entre EPEC y la membrana de la célula, formando un conducto cilíndrico por cuyo interior pasarán las proteínas efectoras. Entre las proteínas transferidas se encuentran Tir, el receptor de la intimina, proteína de la membrana externa de EPEC que contribuye a la adherencia íntima de la bacteria (Kenny y Finlay, 1995).

Adherencia íntima

La unión de Tir con la intimina produce la última etapa de la adherencia de EPEC, se caracteriza por la unión estrecha bacteria-célula y la formación de un pedestal que alberga a la bacteria. Una vez que se introdujeron las proteínas efectoras de la bacteria a la célula epitelial, se activan diferentes señales, lo que favorece el aumento de la concentración de Ca^{++} y de inositol trifosfato (IP_3) en la célula epitelial. El aumento de intimina en la célula epitelial induce la fosforilación de la fosfolipasa $Cy1$ (PLC- $\gamma 1$), lo que aumenta los niveles de IP_3 , lo que a su vez incrementa la concentración de Ca^{++} , generando daño a las microvellosidades de la célula epitelial, lo que es parte de las características de la lesión A/E. La adherencia de EPEC a la célula epitelial también produce la fosforilación de otras proteínas de la célula epitelial, entre las que se encuentra la miosina, lo que induce la permeabilidad de la célula epitelial. Así mismo, al encontrarse EPEC adherida a la célula, se disminuye la capacidad de adsorción del epitelio del intestino, lo que genera pérdida de agua y algunos iones. Un efecto más es la activación del proceso inflamatorio por medio de la interleucina 8 (IL-8), la cual recluta a los neutrófilos comenzando todo el proceso. Por su parte Tir, una vez unida a la intimina, se fosforila, lo que recluta a proteínas reguladoras del citoesqueleto (WASP y Arp2/3) para la polimerización de actina hacia donde está Tir fosforilada (Lommel et al., 2004). El pedestal se forma por debajo de donde se encuentra adherida EPEC, gracias a la actina polimerizada y proteínas relacionadas con la misma. Esto genera los arreglos del citoesqueleto, modificando su morfología y fisiología, lo que produce la pérdida de las microvellosidades intestinales y por consecuencia su función se altera (Finlay et al., 1992).

Autoagregación

La adherencia de EPEC se ha relacionado con otros fenómenos como la formación de agregados bacterianos, propiedad conocida como autoagregación, dicha propiedad contribuye a la supervivencia y permanencia de *E. coli* en el tracto gastrointestinal. El evento se puede analizar por microscopía o al analizar la turbidez que producen suspensiones de bacterias en medios líquidos estáticos. La autoagregación en las cepas EPEC, se relaciona directamente con la expresión de BFP (Bieber, 1998).

Adherencia inicial y BFP

Como se mencionó anteriormente, se ha relacionado la adherencia inicial con tres estructuras bacterianas, BFP, filamentos de EspA y el flagelo. Con respecto a lo descrito entre la adherencia y BFP, Anantha et al. (1998) en un estudio relacionaron BFP con la adherencia localizada mostrando

que el patrón de adherencia localizada de EPEC se modifica al inhibir la expresión de la proteína BfpF en la cepa UMD916 (Figura 2).

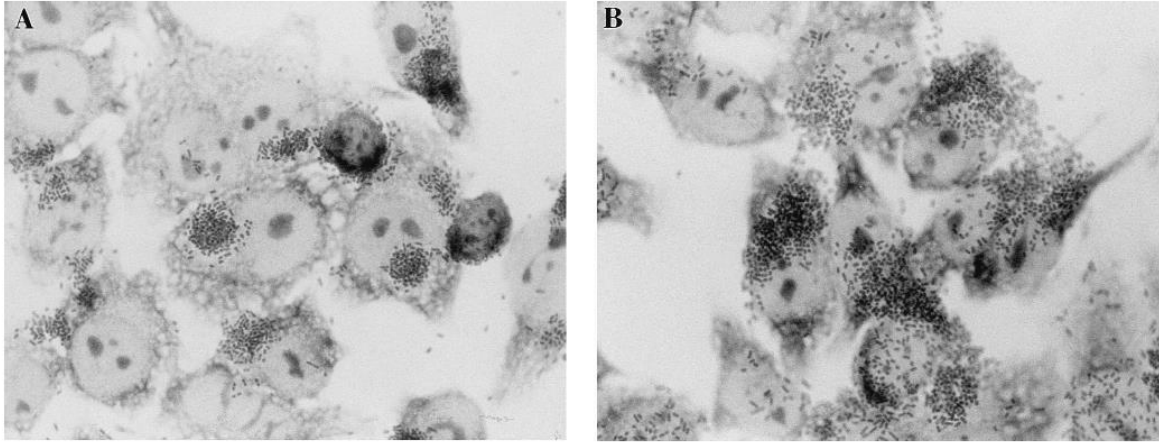


Figura 2. Modificación del patrón de adherencia localizada de EPEC por efecto de la inhibición en la expresión de BFP.

Ensayo de adherencia localizada en células HEp-2. Cepa silvestre EPEC (A) y cepa modificada en *bfpF*, cepa UMD916 (B). Fuente: Anantha, 1998

Siguiendo con el interés de conocer el papel de BFP en la adherencia inicial, en otro estudio Humphries et al. (2010), al utilizar N-acetilactosamina durante un ensayo de autoagregación, observaron que BFP interacciona con este compuesto, lo que interfiere la unión entre las células bacterianas y genera el abatimiento de la autoagregación, pero este fenómeno no se observa en la cepa UMD916, mencionada anteriormente. Por lo cual se propuso que BfpF tiene un papel importante en el fenómeno de autoagregación en la adherencia inicial, ya que su ausencia no permite la acción del inhibidor N-acetilactosamina. La gráfica de autoagregación de dicho artículo se presenta a continuación (Figura 3) y se observa que la cepa sin BfpF tiene una autoagregación similar con el compuesto o sin él.

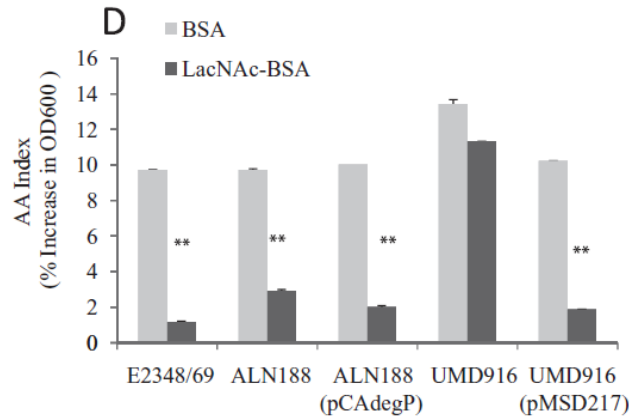


Figura 3. Ensayos de autoagregación de diferentes cepas de EPEC.

Efecto de 0.8mg/ml de LacNAc-BSA en la autoagregación de diferentes cepas. Las barras de error representan desviación estándar, ** P< 0.001, n=3. Fuente: Humphries et al., 2010

La adherencia inicial es un fenómeno que se presenta en condiciones específicas del ambiente. La respuesta bacteriana ante los cambios del ambiente está mediada por la regulación de múltiples factores, por lo general a partir de una proteína que funciona como regulador y puede señalar para inducir o reprimir genes (Blumenthal et al., 1996.). Entre los sistemas que reconocen las señales del medio y modifican la expresión de genes se encuentran los sistemas de dos componentes. En *E. coli* se han descrito, entre otros, los sistemas EnvZ/OmpR, CpxRA y RcsCDB, los cuales responden a múltiples estímulos, activando de diferentes vías de señalización para responder a los estímulos. De forma generaliza EnvZ/OmpR está relacionado con la respuesta al cambio osmótico, modificando la expresión de porinas de membrana; CpxRA actúa ante el estrés del ambiente, como modificaciones de pH, regulando la expresión de proteínas de degradación, plegamiento y unión; RscCDB se asocia al estrés del ambiente y la sobreexpresión de proteínas del periplasma (Clarke y Voigt, 2011).

El sistema CpxRA está compuesto por CpxA, una histidina cinasa de membrana interna, y CpxR, un regulador citoplasmático de respuesta. Al presentarse estrés en el medio, CpxA se autofosforila y transfiere el grupo a CpxR para fosforilarlo. Dentro de los efectos conocidos del sistema CpxRA se encuentran la regulación negativa de distintas proteínas, una de ellas BFP, lo cual da lugar a la disminución de la autoagregación (Figura 4) de EPEC (Vogt et al., 2010). Lo anterior se confirmó al utilizar una cepa mutada en el dominio de CpxA con lo que se genera un efecto de señalización de estrés constante y se observó la modificación en la expresión de distintas proteínas de BFP y fenotípicamente la disminución del índice de autoagregación.

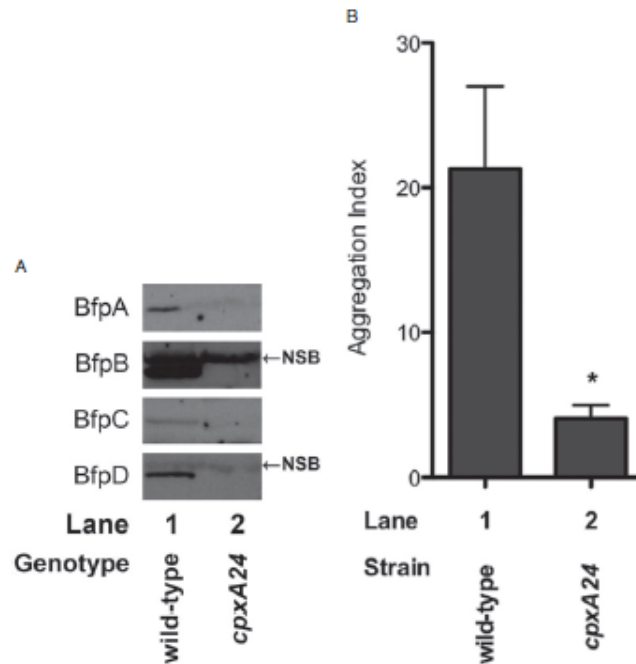


Figura 4. Efecto de la activación de Cpx sobre BFP y la autoagregación

Inhibición de la formación de BFP por cpxA24. A. Análisis por Western blot de la expresión de proteínas de BFP en la cepa silvestre y cpxA24. (NSB banda inespecífica). B. Índice de autoagregación (*diferencia significativa $P < 0.0001$, $n = 3$). Fuente: Vogt et al., 2010

Adherencia inicial y filamentos EspA

Los filamentos EspA son estructuras proteicas del TTSS, éstos son monómeros de la proteína EspA de 25kDa, su principal función dentro del SSTT es la de generar conductos para conectar a EPEC con la célula eucarionte, así mismo se ha reconocido la participación de estas proteínas en la adherencia inicial (Cleary et al., 2004). La adherencia relacionada con EspA (Figura 4) es más débil que la descrita para BFP, pero participa en el proceso de adherencia de EPEC.

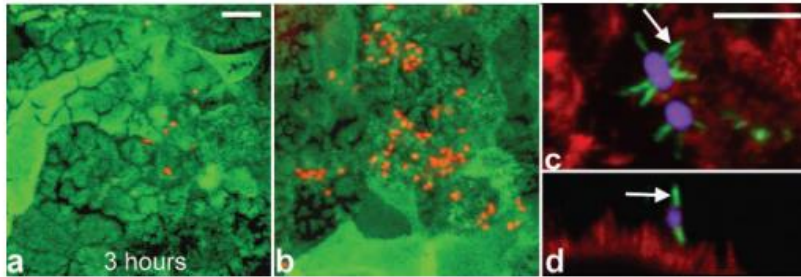


Figura 5. Adherencia mediada por EspA

Imágenes de microscopía confocal de la cepa UMD886 (*bfpA⁻ espA⁺ eae⁻*) infectando células Caco-2. A. Adherencia escasa de bacterias después de tres horas de incubación (bacterias en color rojo por ioduro de propidio). B. Aumento de la adhesión después de un procedimiento de lavado. C. filamentos EspA marcado con verde, de forma horizontal. D. En forma vertical, bacterias adheridas a las células del borde del epitelio. Barras de 5µ. Fuente: Cleary et al., 2004

La relación entre TTSS y CpxR fue descrita por Mac Ritchie et al. (2008), quienes mostraron que la cepa E2348/69 modificada para sobreexpresar CpxR (E2348/69 pUC-19cpxR) disminuye la expresión de varias proteínas del TTSS, entre las que se encuentra EspA, al ocupar una cepa que sobre-expresa CpxR (E2348/69 pUC-19cpxR) se disminuye drásticamente la expresión de varias de las proteínas del TTSS, entre las que se encuentra EspA (Figura 6).

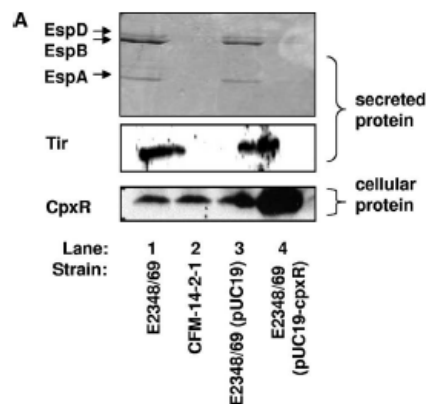


Figura 6. Modificación de la expresión de EspA por CpxR

Western blot para conocer la expresión de diversas proteínas en distintas cepas. A. Expresión de proteínas; carriles: 1 E2348/69; 2 CFM 14-2-1 mutante en TTSS; 3 E2348/69 pUC19 control del vector; 4 E2348/69 pUC19-cpxR. Los niveles de EspA, EspB y EspD se determinaron por SDS-PAGE y azul de Coomassie. Fuente: MacRitchie 2008

Adherencia inicial y flagelo

Con respecto a la adherencia inicial y su relación con el flagelo, Girón et al. (2002) refieren que la delección del gen de la proteína estructural del flagelo (*fliC*), conocida como flagelina, disminuye la autoagregación, además señalan que dicha delección también evita la expresión de *bfpA*. Sin embargo, al reconstituir *fliC* se observa que parte de la adherencia se restaura, aunque no se da la expresión correcta de BFP (Figura 7). Por lo anterior concluyen que el flagelo funcional participa en la adherencia inicial de EPEC.

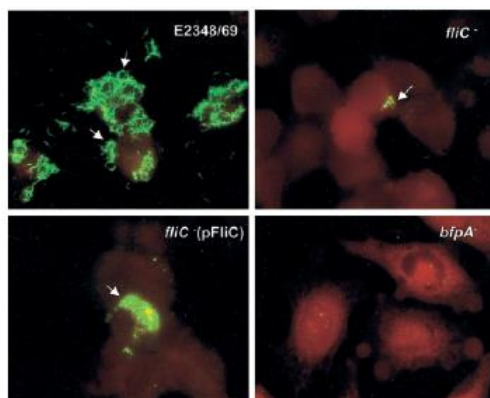


Figura 7. Adherencia mediada por *fliC*

Adherencia de EPEC en células HeLa. E2348/69; *fliC*⁻; *fliC*⁻ (pFliC); *bfpA*⁻. Fuente: Girón, 2002

Raivio et al. (2013) demostraron que la activación de CpxRA regula la expresión de diversos genes. Al respecto, refiere la disminución de la expresión del operon maestro del flagelo (*flhDC*) lo que disminuye la expresión de *fliC*, lo anterior se concluyó de forma indirecta al observar disminución de la motilidad de la bacteria.

Control de la diarrea

La diarrea es un proceso complejo relacionado con diferentes microorganismos, la patogénesis del padecimiento depende de cada agente causal y de la complejidad de los mecanismos de virulencia de cada una de las bacterias. Un aspecto relevante en el manejo del padecimiento es el uso inadecuado de los antimicrobianos y la multirresistencia de los microorganismos a estos, situación que se ha convertido en la actualidad en un problema de salud pública. La mortalidad asociada a la diarrea ha disminuido en forma importante, principalmente porque el manejo de las diarreas es simple, ya que sólo se requiere mantener rehidratado al paciente. Sin embargo, la morbilidad del padecimiento se mantiene en niveles elevados lo que, en conjunto con el estado nutricional deficiente principalmente de los niños, hace que las diarreas continúen representando un problema importante de salud pública. Por lo antes mencionado es que se ha incrementado el interés de la comunidad científica por encontrar tratamientos alternos para el control de estas infecciones. Entre las características principales que deben tener dichos tratamientos es que sean específicos y que su aplicación no dañe a la microbiota normal del individuo.

Si se considera que un aspecto relevante en la patogénesis de las bacterias es la colonización de los epitelios, una alternativa para su control sería inhibir la adherencia. Sin embargo, para dicho propósito se tendrían que bloquear los receptores celulares con los que interaccionan las adhesinas, desafortunadamente al bloquearlos además de inhibir la adherencia de la bacteria se puede alterar el funcionamiento normal de la célula. Ante tales dificultades se debe considerar la búsqueda de procedimientos alternativos de tipo no invasivo.

Antecedentes

Campo magnético

Se dice que los imanes fueron descubiertos por un pastor de la tribu de los Magnetos, al respecto se menciona que cuando el pastor caminaba por el monte Ida de la isla de Creta, de repente su caminar se detuvo al ser atraído por el suelo, tal hecho se atribuyó a los clavos de sus zapatos y la punta de su bastón. El pastor removió la tierra para buscar la razón de dicha atracción y fue así que encontró que una piedra conocida en la actualidad como Magnetita, era la responsable del efecto atrayente sobre los materiales metálicos que portaba el pastor (Rodríguez, 2004). La actividad de estos compuestos, no solo se han utilizado para atraer metales, los chinos la emplearon en la elaboración de la brújula (121 a.C.); Tales de Mileto (624-548 a.C.) describe en sus escritos el uso de los magnetos para el tratamiento de algunas enfermedades. Lo anterior muestra que el magnetismo ha estado presente en la vida del ser humano desde dichas épocas.

El fenómeno de generar fuerzas de atracción o repulsión con otros materiales es llamado magnetismo, y en general se denominan magnetos a los materiales que generan dicha fuerza de forma visible. Lo que generan dichos materiales es un campo magnético (**B**), o campo de inducción magnética. Para establecer la presencia y magnitud de un campo magnético, se considera la interacción que éste produce sobre una partícula puntual con un valor de carga eléctrica (q) y que se desplaza a cierta velocidad (\mathbf{v}). Presentando el efecto de esta interacción por el vector fuerza (**F**) sobre la partícula cargada, se tiene experimentalmente que es una cantidad vectorial cuya dirección es perpendicular tanto al vector velocidad como al campo **B**. La ecuación que mejor describe esta interacción y que establece el valor de la magnitud de este vector es:

$$\mathbf{F} = q(\mathbf{v} \times \mathbf{B})$$

Donde **F** y **B** son magnitudes vectoriales para la fuerza (newton) y la inducción magnética (Tesla), cuando la velocidad tiene unidades de m/s y la carga coulombios. Debe notarse que entre \mathbf{v} y **B** existe un producto vectorial (\times) que el vector resultante es simultáneamente perpendicular a \mathbf{v} y a **B**.

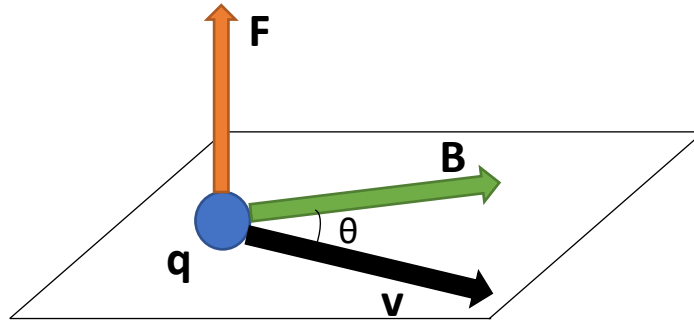


Figura 8. Campo magnético

En el caso de las partículas con carga, un campo magnético asociado con su movimiento, también vendrá acompañado por un campo eléctrico y la suma de la fuerza de estos dos campos es la fuerza de Lorentz descrita como:

$$\Sigma F = qE + q(v \times B)$$

Donde qE es la fuerza eléctrica que está dada por el producto directo de q y el campo eléctrico (E).

Para describir las características de un campo magnético existen las siguientes leyes:

- Ley de Biot Savart, describe que el campo magnético en la vecindad de un conductor portador de una corriente (I) y está en función del valor de dicha corriente y de las magnitudes de los vectores asociados con la dirección de la corriente (positiva) y el vector unitario de posición, dirigido desde un elemento diferencial del conductor y hasta el punto P en el que se desea estimar el valor del campo de inducción magnética.

Carga puntual

$$\delta B = \frac{\mu_0}{4\pi} \frac{I(\delta s \times \hat{r})}{r^2}$$

Campo total

$$B = \frac{\mu_0 I}{4\pi} \int \frac{\delta s \times \hat{r}}{r^2}$$

μ_0 = Permeabilidad del espacio libre $4\pi \times 10^{-7}$ Tm/A.

δs = Elemento de longitud del conductor, con dirección asociada a la de la corriente.

\hat{r} = vector unitario desde δs al punto de interés.

r = distancia de δs al punto de interés.

y el valor de la integral debe considerar la longitud total del conductor.

- Ley de Ampere, donde se menciona que la integral para una trayectoria cerrada que considere el producto escalar entre el vector B y un elemento de longitud de un portador de corriente I (ds), será igual al producto de la corriente y la permeabilidad magnética del vacío.

$$\int B \cdot ds = \mu_0 I$$

- La ley de Gauss del magnetismo establece que la integral evaluada para toda la superficie cerrada del flujo del vector campo magnético es cero ya que la misma cantidad de líneas que entran salen de la misma superficie.

$$\oint \mathbf{B} \cdot d\mathbf{A} = 0$$

donde $d\mathbf{A}$ representa un vector de superficie, perpendicular a un elemento de área en el contorno de la superficie.

- Ley de Faraday, señala que el valor de la fuerza electromotriz (fem, ϵ) se induce a partir de los cambios de flujo magnético (Φ_B) en el tiempo.

$$\epsilon = - \frac{\delta \Phi_B}{\delta t}$$

Los campos magnéticos como se han descrito ahora se originan gracias al flujo de carga eléctrica. En términos de los campos que frecuentemente se usan en un laboratorio, existen aquellos asociados con un flujo constante de carga (una corriente directa) que también se llaman campo magnético DC; por el contrario, cuando se tiene un campo producido por una corriente alterna, y las características mismas de la corriente, en lo que refiere a intensidad y dirección de la misma, tiene asociado un campo magnético alterno o campo AC. Existen, por otro lado, aquellos campos magnéticos que son producidos por los imanes permanentes que frecuentemente se llaman magnetos permanentes, y con los que ahora se pueden conseguir intensidades de campo importantes, especialmente si se usan los “superimanes” de tierras raras. En el trabajo que aquí se describe se han utilizado imanes permanentes como fuentes de campo magnético y para ellos se utilizaron, tanto ferritas comerciales como imanes a base de samario. Según sea la respuesta de una substancia ante un campo magnético, se le clasifica como no magnético o magnético. En términos de la estructura de las sustancias que lo componen, se sabe que el material es paramagnético (con momentos magnéticos sin interacción entre ellos), diamagnéticos (con momentos exactamente cancelados, pero con una respuesta magnéticos que los hace expulsar el flujo del campo magnético), y finalmente aquellos con momentos magnéticos ordenados y los de momentos no cancelados (ferromagnéticos los primeros y ferrimagnéticos los segundos). Los cuerpos paramagnéticos presentan buena permeabilidad magnética, como consecuencia de que a través de ellos pueden penetrar líneas de campo magnético. En general, la magnetización de los materiales, que implica un ordenamiento de los momentos magnéticos individuales, depende fuertemente de la temperatura; la dependencia es inversa y cuando la temperatura es suficientemente alta, los materiales son incapaces de ordenar sus momentos magnéticos por encima de una constante característica que se denomina temperatura de Curie. En general, el magnetismo de los materiales es un fenómeno colectivo que es mejor entendido desde la perspectiva de la termodinámica estadística de los sólidos. Como principales contribuyentes en la formación de los momentos magnéticos individuales, se tiene el movimiento orbital de los electrones (momento angular orbital) y el momento angular de espín. De estos se origina el momento magnético orbital y el momento magnético de espín, ambos están cuantizados y el de

mayor magnitud es el de espín. Cada una de estas dos contribuciones debe considerarse en interacción con la otra, para producir un momento angular total; a este momento angular total es posible asociar un momento magnético total. En general, la magnetización de una sustancia depende importantemente de la temperatura de manera inversa; cuando los sólidos están en baja temperatura los materiales ceden ante la interacción de ordenamiento, mientras que si la temperatura es elevada, la agitación térmica impide el establecimiento de un orden magnético que se extienda por todo el sólido. Por encima de la temperatura de Curie, los materiales no pueden retener su magnetización y una vez que se consigue esta, la magnetización se pierde.

Los sólidos ferromagnéticos son aquellos que aún en ausencia de un campo magnético externo ellos presentan orientación neta en su magnetización. Las ferritas son materiales que para ciertos fines se comportan como los materiales ferromagnéticos, especialmente cuando la temperatura es constante. Son ferrimagnéticos porque, aunque la orientación de sus momentos magnéticos individuales es opuesta, dichos momentos no tienen la misma magnitud y resulta un momento magnético no cancelado. Existen muchas ferritas naturales y sintéticas, las más importantes presentan una estructura de espinela, donde la existencia de estados de oxidación mezclados de los cationes implicados les confiere una complejidad adicional.

Un auxiliar gráfico para el estudio de los materiales “con campo” (principalmente eléctrico o magnético) son las líneas de campo. El campo magnético de un imán se representa por dos polos, el polo norte magnético se considera como una fuente de líneas de campo al exterior del mismo; éstas, en el vacío, se dirigirán hacia el polo sur magnético. La interacción entre estos polos es atractiva cuando la polaridad es opuesta, y repulsiva cuando son iguales. La magnitud de la interacción es, como en el caso eléctrico, inversamente proporcional al cuadrado de la distancia que separa a dichos polos. Una representación de estas líneas de campo puede verse en la figura 9.

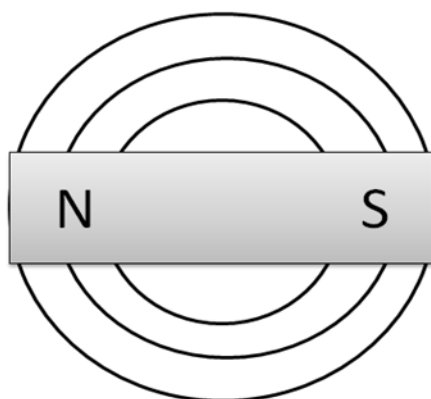


Figura 9. Campo magnético de un imán.

Sí se colocan dos imanes se puede sentir la atracción o repulsión de ellos, dependiendo de las polaridades que estén más cerca entre los imanes. Si un par de placas de material magnetizado se colocan con polaridad opuesta de forma que el polo norte de uno, encara el polo norte del otro, se producirá entre ellos un campo magnético que es de buena homogeneidad (dirección y magnitud);

si por el contrario, los polos fueran opuestos, el campo en el interior entre ellos, quedará prácticamente cancelado. Lo anterior describe el tipo de campo que se ha utilizado en los experimentos de este reporte. Con un par de placas de material magnetizado se produjo un campo entre ellos, cuya magnitud y dirección se describe en detalle los experimentos de esta tesis.

Las unidades con las que se miden los campos magnéticos son principalmente Tesla y gauss, estas se definen como la densidad de líneas magnéticas por unidad de superficie, donde la densidad magnética puede estar dada por las unidades Weber o Maxwell. A partir de esto, 1 Tesla = 1 Weber/m² y 1 Gauss = 1 Maxwell / cm²; y la relación entre ellas es 1T = 10,000G. Para definir un Tesla se dice que es el campo magnético que ejerce un Newton de fuerza sobre una carga de un coulombio que se mueve a la velocidad de un metro sobre segundo.

Respuesta biológica ante el campo magnético

Estudios relevantes que relacionan el campo magnético con la biología se han dado desde hace ya varios años, entre ellos se encuentra el trabajo desarrollado por el Dr. Karl von Frisch premio nobel de medicina en 1973, quien estudió la orientación de las abejas por medio de campos magnéticos. Poco tiempo después en 1975 Richard P. Blakmore reportó como algunas bacterias son orientadas en sus movimientos, mediante el empleo de campos magnéticos. En general se ha observado que un campo magnético genera un momento magnético, en la sustancia colocada en forma perpendicular al campo y que los diferentes compuestos, principalmente las estructuras proteicas y con anillos, se alinean y se orientan en paralelo con respecto al campo.

Entre las posibles formas de interacción de un campo magnético con la materia viva se mencionan:

- Atracción / repulsión de iones o moléculas cargadas.
- Concentración de material con hierro o ferromagnéticos.
- Modificaciones en la polarización de las membranas (diferencia de cargas dentro y fuera de éstas).
- Modificaciones en la capacidad de movimiento dentro de la célula debido a las alteraciones del movimiento Browniano.

Además, se ha demostrado un efecto sobre la reacción enzimática, la interacción de oxígeno con otras moléculas, incremento en ácidos nucleicos, modificación de estructuras de colágena y de transportadores de la membrana, entre muchos otros. Estos efectos demostrados han generado mayor interés para conocer sus diferentes acciones sobre las células de distintos organismos.

Efecto del campo magnético sobre células

Existen diversos trabajos que refieren la acción de campos magnéticos AC sobre diferentes organismos, tejidos y líneas celulares, pero estos a su vez han generado controversias. Por otro lado, también existen estudios del efecto de un campo magnético DC sobre estructuras celulares, sin embargo, al momento estos se han elaborado con menor frecuencia.

Algunos estudios se han realizado en líneas celulares, en éstos se ha observado la inducción de cambios estructurales (Xu et al., 2008; Pagliaria et al., 2005; Chionna, et al., 2003; Kroupavá et al., 2007), interiorización de Ca (Chionna et al., 2005), modificación de la membrana celular (Chionna et al. 2005) e incluso la inducción de apoptosis (Fanelli et al., 1999). Sin embargo, también existe controversia sobre el efecto de los campos magnético ya que en otros reportes se menciona que no han sido observados los cambios antes referidos (Sato, 1992, Tenuzzco et al., 2009; Wang et al., 2010). Un aspecto relevante al respecto, es que al realizar la mayoría de dichos estudios no existe una constante de los datos relacionados con la intensidad de campo y el tiempo de exposición, sino que los diferentes autores emplean distintas condiciones, lo que pudiera estar influyendo en la variabilidad de sus resultados.

Los campos magnéticos no solo ejercen efecto sobre líneas de células en cultivo, también se ha observado que inducen cambios sobre microorganismos y entre ellos las bacterias. Al igual que lo reportado en los ensayos sobre células eucariontes, los efectos de los campos magnéticos que se han identificado en la interacción de éstos con las bacterias en cultivo son diversos. Entre los efectos observados se refieren modificaciones en la proliferación, alteraciones sobre la pared celular, en la estructura de proteínas, en la actividad de enzimas, en la expresión de genes y en la resistencia a los antimicrobianos. Existen diversos trabajos que refieren la acción de campos magnéticos AC, aunque, también se ha estudiado el efecto de campos magnéticos DC, esto ha sido con menor frecuencia.

Analizando la bibliografía encontramos algunos reportes de trabajos que han utilizado campos magnéticos AC en bacterias. Okuno et al. (1993) emplearon tiempos de exposición de una y hasta 4 horas con 11.7 T, en su ensayo observaron un incremento en las unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/ml). Resultados similares fueron obtenidos por Tsuchiya et al. (1999), quienes refieren que en presencia de un campo magnético de 5.2 – 6.1 T por 10 horas, cultivos de *E. coli* presentan incrementos en el crecimiento cuando comparan con los testigos sin tratar. Con la misma intensidad de carga Horiuchi et al. (2002), encontraron que las UFC/ml de *E. coli* son mayores al control hasta las 72 horas, aunque el estímulo solo fue entre las 20 y 32 horas. También ha sido observado que la exposición a tiempos cortos disminuye el crecimiento, al respecto Fojt et al. (2004) reportaron que una carga de 10mT aplicada en la fase logarítmica por 5 minutos disminuye aproximadamente entre un 10% y 20% el crecimiento de *E. coli*.

En bacterias no sólo se han estudiado las modificaciones con respecto al crecimiento, también se ha analizado el efecto de los campos magnéticos AC sobre proteínas de la membrana. She et al. (2009), refieren que después de aplicar un campo magnético de 14T durante una hora, se observaron modificaciones en la estructura secundaria de una proteína de *E. coli*. También se ha observado que campos de 5.2 – 6.1 T modifican la actividad de enzimas como la β -galactosidasa (Tsuchiya et al., 1999). En otro estudio se identificó que en el extracto celular de un cultivo de *E. coli* tratado con un campo de 1.1mT por 5 minutos, se presentaba un aumento transcripcional del gen *c-myc* colocado en un plásmido (Tuinstra et al., 1997).

Con respecto a campos magnéticos DC, Ji et al. (2009) refieren que al evaluar la respuesta de *E. coli* 10032 expuesta a un campo magnético de 450 mT, después de la fase de crecimiento exponencial, observaron que las UFC disminuyen de forma considerable a partir de los 5 minutos, y si se expone a diferentes campos durante su fase de crecimiento exponencial también se ve una disminución, pero menos marcada. Por su parte, Dai y Dong (2009) con tratamientos de 120 y 40mT por 2 horas, observaron aumento de las UFC y después de 8 horas identificaron que la superficie de la membrana sufría modificaciones. Lo antes referido muestra que los efectos inducidos con campos magnéticos AC son diferentes a los respectivos inducidos por campos magnéticos DC. En general nos dejan reconocer que existe un efecto del campo magnético sobre las UFC, el cual se modifica con respecto al tiempo de exposición y la magnitud del campo; siguiendo con la modificaciones, en la membrana se observó una respuesta con respecto a la presencia de un campo magnético DC y AC, y esto ha sugerido que tiene relación con otros cambios que se han identificado, como son el incremento de la resistencia a la penicilina, tal observación se identificó en cultivos de *E. coli* (WHMC4202) tratados con un campo magnético DC entre los 8 y 60mT después de 12 horas (Stansell et al., 2001).

También ha sido reportado cómo las ondas magnéticas ocasionan alteraciones transcripcionales. Potenza et al. (2004) refieren que al analizar por electroforesis fragmentos de cDNA de bacterias tratadas con un campo magnético DC de 300mT por 50 horas, observaban cambios en el perfil de bandas con respecto al obtenido con el DNA de bacterias no tratadas.

Por otro lado, se han observado diferencias en el comportamiento de diferentes géneros de bacterias. Al respecto, el tratamiento de *Serratia marcescens* por un tiempo prolongado en un campo magnético DC de 8mT, proveniente de un imán, disminuye su tasa de crecimiento al parecer por cambios en la respuesta al estrés oxidativo (Piatti et al., 2002).

Efecto del campo magnético en la interacción hospedero – parásito

Ensayos realizados por Kimura et al. (1994) mostraron que la exposición a un campo magnético DC de 450mT a de *E. coli* en diferentes fluidos humanos, no modificaba el desarrollo de la bacteria, pero al someter los cultivos a un cambio osmótico después de la exposición de dicho campo magnético, se observa disminución de la cantidad de bacterias. Saito et al. (1997a) al realizar ensayos de adherencia de *E. coli* en células HeLa, observaron que al tratar con un campo magnético DC de 450 mT se presentaba aumento de la adherencia, pero solo si el tratamiento se realizaba mientras bacterias y células están en contacto, ya que si se tratan ambas (bacterias y células) por separado antes del ensayo, no se observa el efecto de incremento de la adherencia. En otro estudio realizado por los mismos autores (Saito et al., 1997b) con una *E. coli* aislada de infección de vías urinarias, observaron resultados similares a los de su estudio anterior, sin embargo, cuando la intensidad del campo magnético era más pequeña se observó disminución en la adherencia de la bacteria a las células HeLa.

Justificación

Las diarreas representan un importante problema de salud pública, cada año se reportan en el mundo cerca de 2 billones de casos de diarrea infecciosa, principalmente en los países subdesarrollados. Es en estos países en los que la enfermedad suele ser causa importante de morbilidad en todas las edades y de mortalidad en lactantes y niños pequeños. En el mundo industrializado, los lactantes y niños pequeños tienen menos episodios de diarrea, siendo la mayor parte de ellos leves. En adultos son menos frecuentes, salvo en epidemias específicas o en brotes con un origen común debido a alimentos o agua contaminados. Sin embargo, algunos viajeros han experimentado, al visitar países en vías de desarrollo, una incidencia extraordinariamente alta de enfermedades diarreicas (diarrea del viajero) y los microorganismos causantes suelen ser los mismos que provocan la mayor parte de las diarreas infantiles en el país visitado. Aunque la etiología del padecimiento es diversa, las bacterias y en particular *E. coli* se consideran entre los más frecuentes agentes responsables del padecimiento.

El mecanismo relacionado con la patogénesis de la diarrea causada por EPEC es complejo y no obstante que existen un importante número de investigaciones que tratan de dilucidarlo, hasta el momento no se han presentado avances al respecto. Por tal motivo, es necesario buscar alternativas que permitan por un lado conocer que sucede con la bacteria durante el proceso de colonización y por otro lado que ocurre con la célula colonizada. El empleo de campos magnéticos es un procedimiento que se ha venido utilizando de forma independiente, para conocer el efecto que tienen sobre células en cultivo y sobre EPEC. En el presente proyecto proponemos evaluar el efecto de diferentes campos magnéticos sobre EPEC, un patógeno asociado a un problema de salud pública. En el estudio proponemos analizar el efecto de campos magnéticos sobre dos eventos que participan en la colonización del microorganismo al hospedero, la adherencia y la autoagregación.

Pregunta de investigación

¿Qué alteraciones en el fenómeno de adherencia y en particular en la autoagregación de *E. coli* cepa E2348/69 induce un campo magnético producido por un imán en un intervalo de 50 a 400mT por una exposición entre 5 y 45 minutos?

Hipótesis

La aplicación de campos magnéticos sobre cultivos de EPEC cepa E2348/69, que causa enfermedad en humanos, modificará la capacidad de adherencia y autoagregación de la bacteria.

Objetivos

Objetivo general

Conocer el efecto del campo magnético producido por un imán sobre la autoagregación y adherencia de EPEC E2348/69.

Objetivos específicos

- Conocer el efecto de diferentes magnitudes de campo magnético y durante diferentes tiempos de exposición sobre la autoagregación.

- Conocer el efecto en la viabilidad de diferentes magnitudes de campo magnético durante 30 minutos de exposición de la cepa EPEC E2348/69, previo a la evaluación del crecimiento durante tres horas por medición de su masa y en la capacidad de formar unidades de colonias.
- Conocer el efecto de un campo magnético en la adherencia *in vitro*.
- Conocer si el efecto se relaciona con alteración de la estructura bacteriana.
- Proponer cuál o cuáles pudieran ser los eventos involucrados en la alteración del la autoagregación.

Metodología

De forma general se evaluó en función de los objetivos el efecto del campo magnético DC en la autoagregación de la cepa EPEC E2348/69 a diferentes magnitudes y por diferentes tiempos de exposición, así como en otras cepas modificadas para confirmar los posibles mecanismos involucrados. También se evaluó el efecto del campo magnético en la viabilidad de la cepa de estudio, en la adherencia y de forma visual sobre las estructuras externas (Diagrama 1)

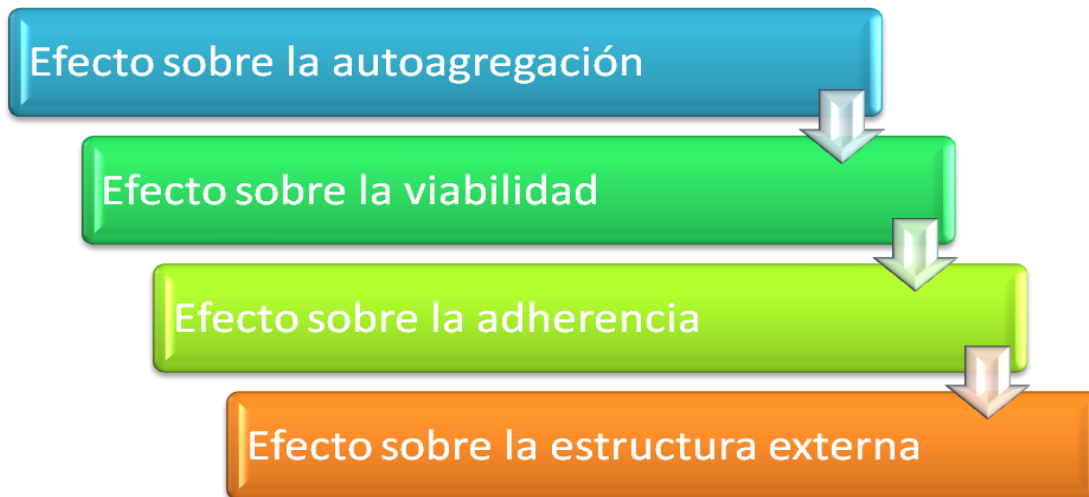


Diagrama 1. Metodología general

Procedimientos generales.

Efecto de diferentes campos magnéticos sobre la autoagregación de E2348/69.

- Evaluación de la autoagregación de E2348/69 en el medio de cultivo del ensayo de adherencia (MEM) con y sin tratamiento con diferentes campos magnéticos por diferentes intervalos de tiempo.
- Evaluación de la autoagregación en cepas mutadas en TTSS de E2348/69 y sin BFP.

Efecto de diferentes campos magnéticos sobre la viabilidad de E2348/69.

- Evaluación del crecimiento de EPEC después de transferir al medio de cultivo del ensayo de adherencia (MEM preacondicionado) con y sin tratamiento con campos magnéticos.

Efecto de un campo magnético sobre la adherencia de E2348/69.

- Evaluación de la adherencia de E2348/69 en células HEp-2 con la presencia del campo magnético.

Efecto de un campo magnético sobre la morfología de la estructura externa de E2348/69.

- Observación por microscopía electrónica.
- Evaluación de la permeabilidad de la membrana.

Cepas utilizadas en el estudio

EPEC E2348/69, JPEP30 (EPEC E2348/69 sin pEAF - StpR), Δ escN (EPEC E2348/69 sin el componente de la ATPasa del TTSS- StpR), Δ escN + pAEscN (Δ escN complementada - StpR KanR), donadas por la Dra. Bertha González Pedrajo. La cepa *E. coli* HB101 (no agregativa, no adherente), donada por el Dr. Armando Navarro, se usó como control negativo. Los genotipos de las cepas se corroboraron por PCR con la amplificación de los genes *eaeA* y *bfpA*.

Obtención de DNA y PCR

Muestras del cultivo de bacterias se mezclaron con 1ml de agua desionizada en tubo eppendorf el cual se colocó en agua hirviendo por 5 minutos, después las muestras se pasaron a hielo y se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 minutos y se conservan en hielo las muestras de DNA al terminar.

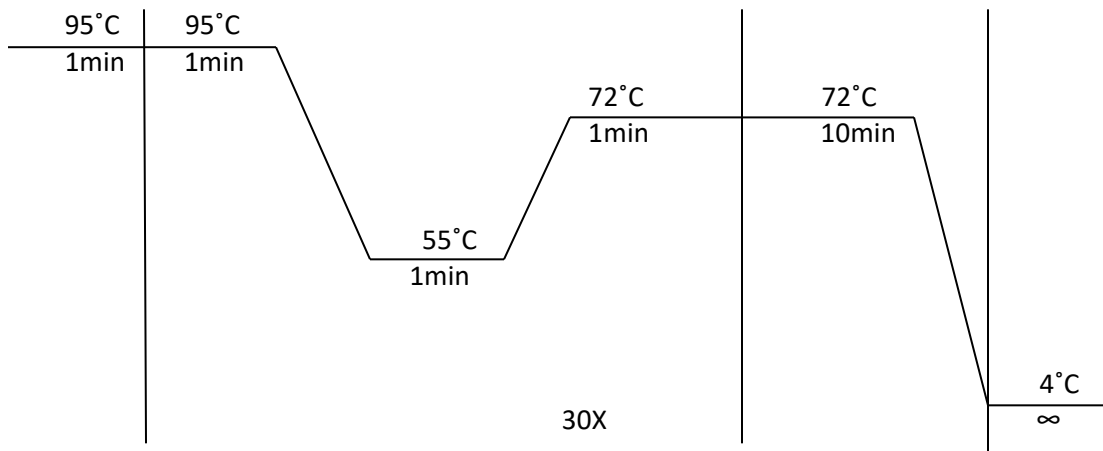
Mezcla de reacción para PCR

| Marca | Mezcla de reacción | Volumen |
|----------------------------|--------------------|------------------|
| Vivantis USA | Buffer | 2.5 μ l |
| Vivantis USA | MaCl | 0.75 μ l |
| Fermentas USA | dNTPS | 0.5 μ l |
| Sigma-Aldrich USA TX | Primers | 1.25 μ l c/u |
| Vivantis USA | Taq | 0.1 μ l |
| | H2O | 16.65 μ l |
| | DNA | 2 μ l |
| Volumen final de reacción. | | 25 μ l |

Iniciadores empleados para la amplificación de *eaeA* y *bfpA*

| Gen | | Secuencia (López et al., 2003) | Producto esperado |
|-------------|---|--------------------------------|-------------------|
| <i>eaeA</i> | F | gacccggcacaagcataagc | 384 |
| | R | ccacctgcagcaacaagagg | |
| <i>bfpA</i> | F | aatggtgcttgcgcttgctgc | 324 |
| | R | gccgctttatccaacctggta | |

Termociclador Thermal Cycler C 1000™ BIO-RAD condiciones para la amplificación



Una vez que se tuvo la amplificación los productos se analizaron por electroforesis en un gel de agarosa (1%), la electroforesis se realizó en una cámara (BioRad) a 100 Volts durante 35 minutos. Las bandas fueron reveladas con solución de bromuro de etidio (0.02% en agua) y se observó en un transiluminador UV (Benchtop).

Determinación de la magnitud de campo magnético

Las magnitudes de los campos magnéticos utilizados se definieron al realizar tres mediciones en distintos días en las mismas condiciones, en el área entre los dos imanes se realizó una cuadrícula con una separación de 0.5 cm tanto de forma vertical como horizontal, en cada uno de los puntos de intersección de la cuadrícula se hicieron las mediciones con una sonda Hall, (DC Gaussmeter, GM-1-HS). Los resultados se graficaron de forma tridimensional y se obtuvo el promedio, así como la desviación estándar.

Tratamiento por campo magnético

El tratamiento por campos magnéticos consistió en colocar la muestra en la caja de cultivo (Nunc cell, USA) con pozos entre un par de imanes (de ferrita $BaF_{12}O_{19}$ ó neodimio $Nd_2Fe_{14}B$), donde el campo magnético que se generó entre ellos fue homogéneo (Figura 10), las muestras se mantuvieron por 30 minutos a temperatura ambiente con en el campo magnético y posteriormente se retiraron los imanes, las placas se incubaron (Riossa) a 37°C por un lapso de dos horas y media para completar tres horas de duración del experimento. Pasado el periodo las muestras se sacaron de la incubadora y se procesaron.

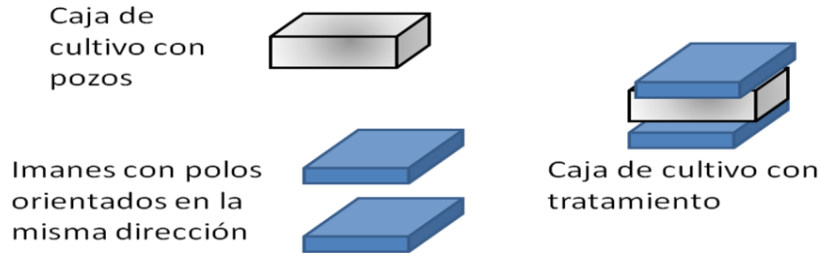


Figura 10. Producción de campos magnéticos.

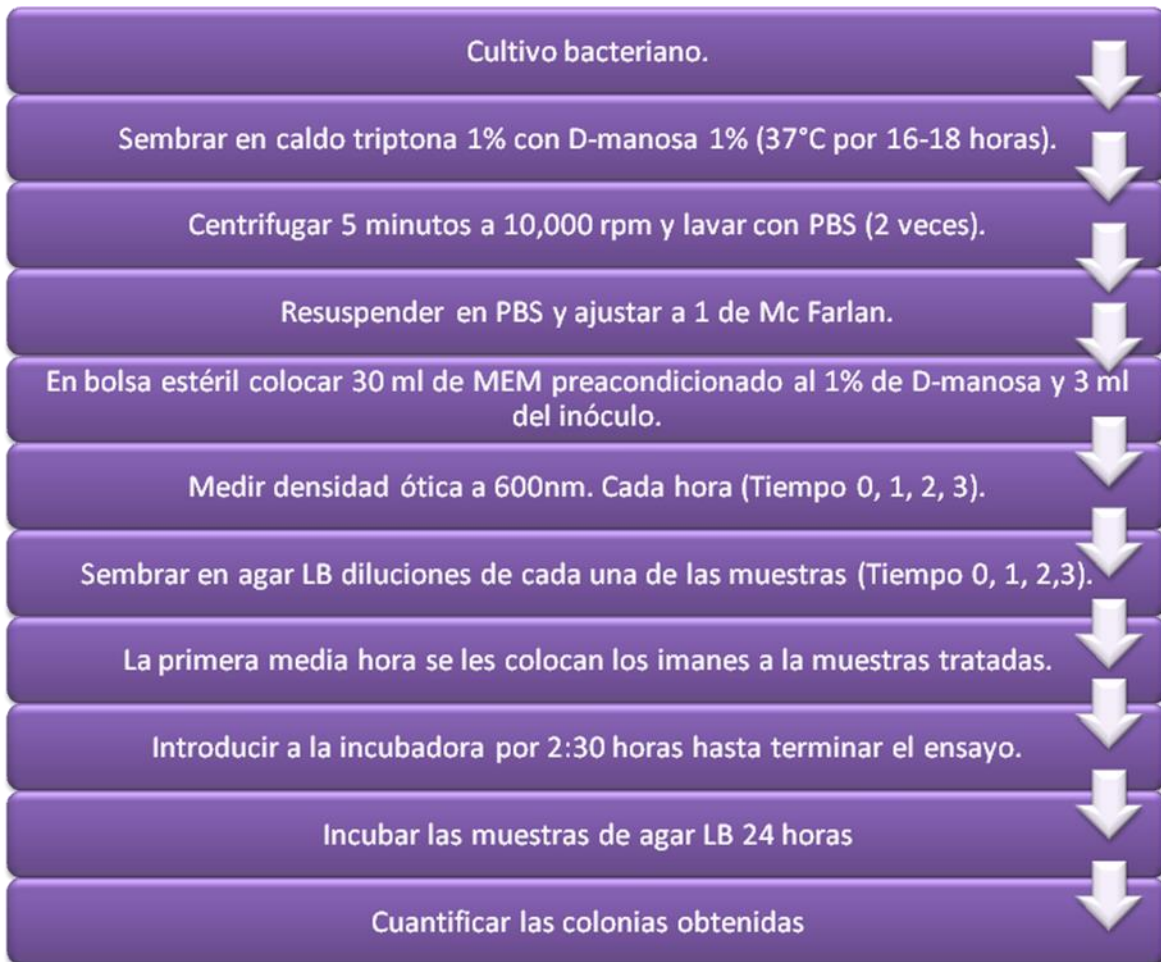


Diagrama 2. Efecto de diferentes magnitudes de campo magnético sobre la viabilidad de EPEC E2348/69

Ensayo de la viabilidad

Para evaluar si la viabilidad de E2348/69 se modificaba por efecto de los campos magnéticos se realizó un cultivo de la bacteria en medio MEM precondicionado. El día previo al ensayo se creció la bacteria por 18 horas a 37°C sin agitación en caldo triptona al 1% con D-manosa al 1%, concluido el periodo de incubación se centrifugó por 5 minutos a 10,000 rpm (Centrifuge 5415C

ependorf país), se retiró el sobrenadante, se suspendió en PBS 1x y se volvió a centrifugar, el paquete de bacterias suspendió en PBS 1x y se ajustó al 1 de la escala de Mc. Farland que corresponde a 3×10^8 UFC/ml (Versalovic et al., 2011). Para el ensayo se utilizaron 27ml de MEM o MEM preacondicionado con 1% de D-manosa, se agregaron 3ml de inóculo ajustado por muestra en bolsas tipo ziploc estériles cerradas herméticamente. Las muestras, excepto el control, fueron tratadas con los diferentes campos magnéticos (94 y 96.4 mT) por 30 minutos, al terminar los 30 minutos todas las muestras se introdujeron a la incubadora a 37°C. A partir del momento en que se colocó el inóculo de bacterias y hasta el final del ensayo (3 horas), se tomaron muestras cada hora a las cuales se les midió la densidad óptica (DO) a 600 nm en el espectrofotómetro (Genesys 2 Spectronic). Para conocer el número de UFC's alícuotas de diferentes diluciones (cuantas) en PBS se sembraron en cajas petri con agar LB, las cajas se incubaron (37°C/24 hrs.) y al concluir el tiempo de incubación se realizó la cuenta de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) por mL.

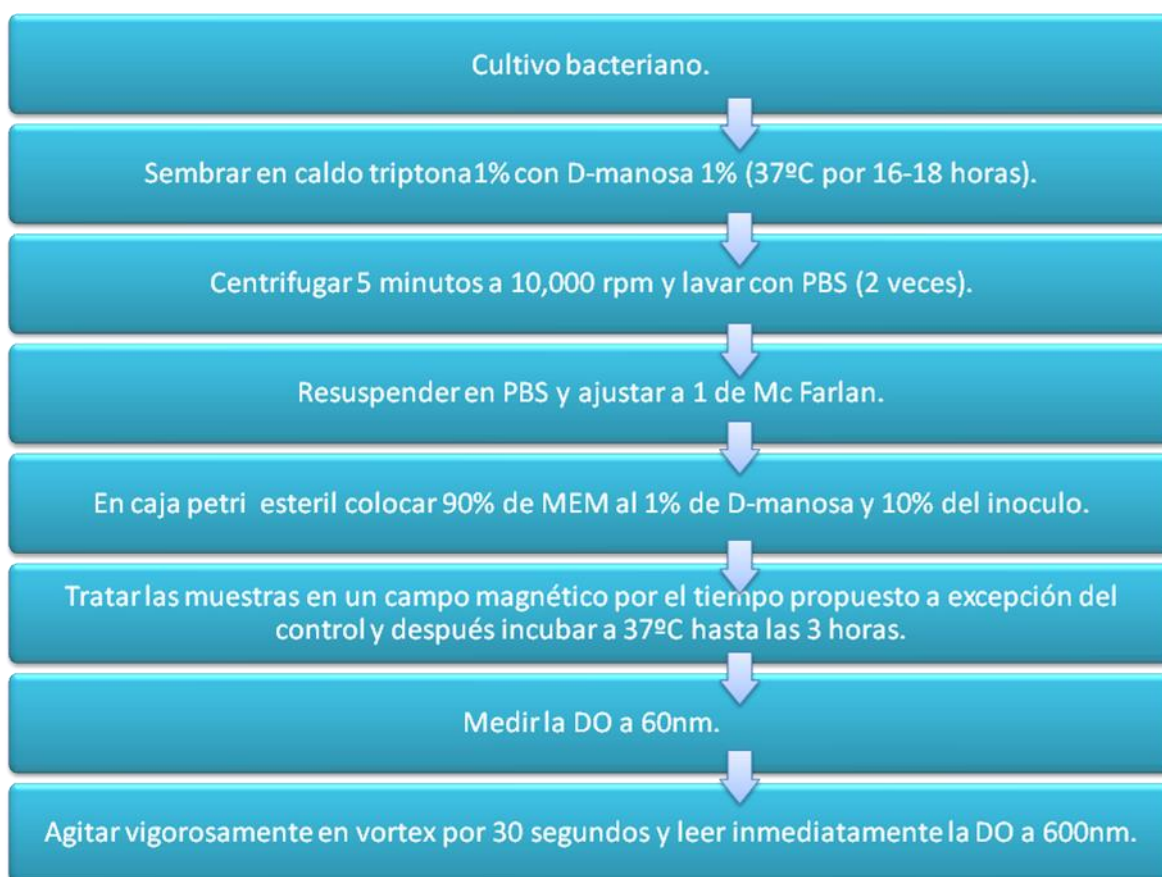


Diagrama 3. Efecto sobre la autoagregación de E2348/69 de campos magnéticos de diferentes magnitudes

Ensayo de autoagregación

Para conocer el efecto del tratamiento con campos magnéticos de diferente intensidad y a diferentes tiempos de exposición sobre la autoagregación de EPEC E2348/69 se utilizó el procedimiento descrito por Anantha et al. (1998) con pequeñas modificaciones. La bacteria se

creció durante 18 horas a 37°C en caldo triptona con D-manosa; el cultivo obtenido se centrifugó 5 minutos a 10,000 rpm (5415C Eppendorf), se retiró el sobrenadante y se lavó 2 veces con PBS, después del segundo lavado con PBS se ajustó el inóculo al tubo uno del nefelómetro de Mc Farland, se preparó un pozo o caja petri con medio MEM al 1% de D-manosa, se colocó el antibiótico que le correspondiera a la cepa en caso de ser necesario (según lo indicado en el apartado de cepas utilizadas en el estudio) y se inoculó la bacteria en una relación de 10% con respecto al volumen total. Se utilizaron las condiciones de campo que les correspondieran y posteriormente se les introdujo sin los campos a la incubadora a 37°C, pasadas 3 horas se retiraron de la incubadora y se les midió la DO a 600 nm se recuperó la muestra en un tubo eppendorf estéril y se le agitó en vórtex por 30 segundos y se le volvió a medir la DO a 600 nm a cada tubo, se tomó la primera lectura como el 100% y en función de eso se evaluó el índice de autoagregación como el aumento en la DO.

En una primera etapa fueron evaluadas las siguientes magnitudes 53.6 mT, 106.7 mT ó 399.8 mT por tiempos de 5, 10, 15, 30 o 45 minutos, para lo cual solo se utilizó la cepa EPEC E2348/69 y el control. Y ya con las condiciones establecidas para este estudio de 106.7 mT por 30 minutos se trataron todas las cepas.

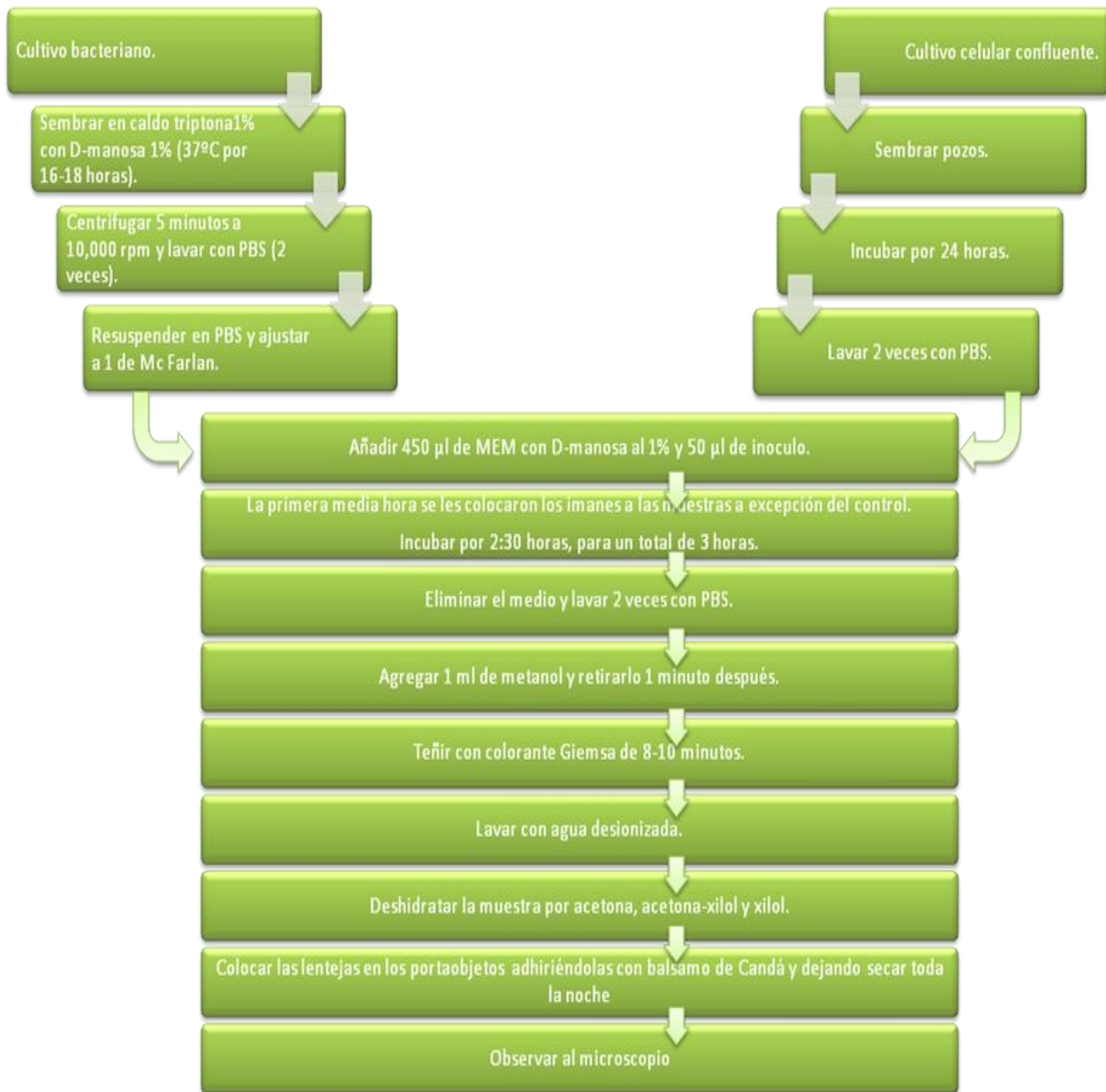


Diagrama 4. Efecto del campo magnético sobre la adherencia de E2348/69 en células HEp-2

Ensayos de adherencia de EPEC E2348/67 en células HEp-2

Se utilizó el método reportado por Cravioto et al. (1979) con algunas modificaciones. Se realizó un cultivo de la bacteria incubando 18 horas a 37°C sin agitación en caldo triptona al 1% con D-manosa al 1%. Al concluir el lapso se centrifugó a 10,000 rpm por 5 minutos, se retiró el sobrenadante, el paquete de bacterias se suspendió en PBS (pH 7.2) estéril y se volvió a centrifugar, el paquete de bacterias suspendió nuevamente en PBS estéril y se ajustó la concentración de bacterias con el tubo 1 de la escala de Mc. Farlan. En forma paralela las células HEp-2 crecidas en botella con medio MEM adicionado y confluentes al 90%, se despegaron con tripsina para preparar la placa de experimentación (4-well Multi-Dish plates Nunco), que en cada

pozo contenía una lenteja de vidrio al fondo de cada pozo, las células se ajustaron 500,000 por pozo y se incubaron a 37°C en cámara de CO₂ (5%) en ambiente húmedo. Al día siguiente se analizaron las placas para evaluar confluencia y viabilidad de las células. Se eliminó el medio MEM y se colocaron a cada pozo 450 µl de MEM con D-manosa (1%) sin suero y sin antibióticos. A cada uno de los pozos se les agregó 50 µl del cultivo de bacterias previamente preparado, las placas se mantuvieron a temperatura ambiente durante 30 minutos y posteriormente se incubaron por dos y media horas a 37°C. En el caso de las placas tratadas con campos magnéticos se les aplicó un imán arriba y otro debajo de la placa del ensayo, los magnetos se orientaron para obtener el campo magnético de 106.7, durante 30 minutos. Concluido el lapso se retiraron y las placas se incubaron por dos y media horas en las mismas condiciones referidas para las placas no tratadas. Concluido el tiempo de incubación las placas se sacaron se retiró el medio de los pozos, se lavaron con PBS 2 veces, después del último lavado las células se fijaron adicionando a los pozos 0.5 ml de metanol por 1 minuto, se tiñó con colorante Giemsa por un lapso de 10 minutos, se retiró el colorante y se lavó con agua destilada estéril hasta quitar el exceso de colorante. Se retiró el PBS y las lentejas se colocaron sobre un portaobjetos adhiriéndolos con Bálsamo de Canadá, se dejó secar y se observaron al microscopio las laminillas.

Ensayo de modificación sobre la estructura externa de E2348/69

Para evaluar el efecto del tratamiento con un campo magnético sobre la morfología de la bacteria, después de un tratamiento similar al anteriormente descrito los cultivos se analizaron por microscopía electrónica de transmisión.



Diagrama 5. Ensayo de microscopía electrónica de transmisión, para evaluar el efecto sobre la membrana externa de la bacteria posterior al tratamiento con un campo magnético

Muestras de la cepa EPEC E2348/69 con el tratamiento del campo magnético seleccionado y sin el se ocuparon tomando una alícuota de 10 µl después de los 30 minutos de exposición y a las 3 horas. Estas muestras se colocaron sobre la rejilla para microscopia correspondiente y se dejó secar por 10 minutos a temperatura ambiente, se recogió el exceso de medio y se le agregó a cada muestra 5 µl de acetato de uranilo al 3% para dejar secar las muestras a temperatura ambiente en oscuridad. Una vez que se secaron las muestras se observaron en el microscopio electrónico Libra 120 (Zeiss).

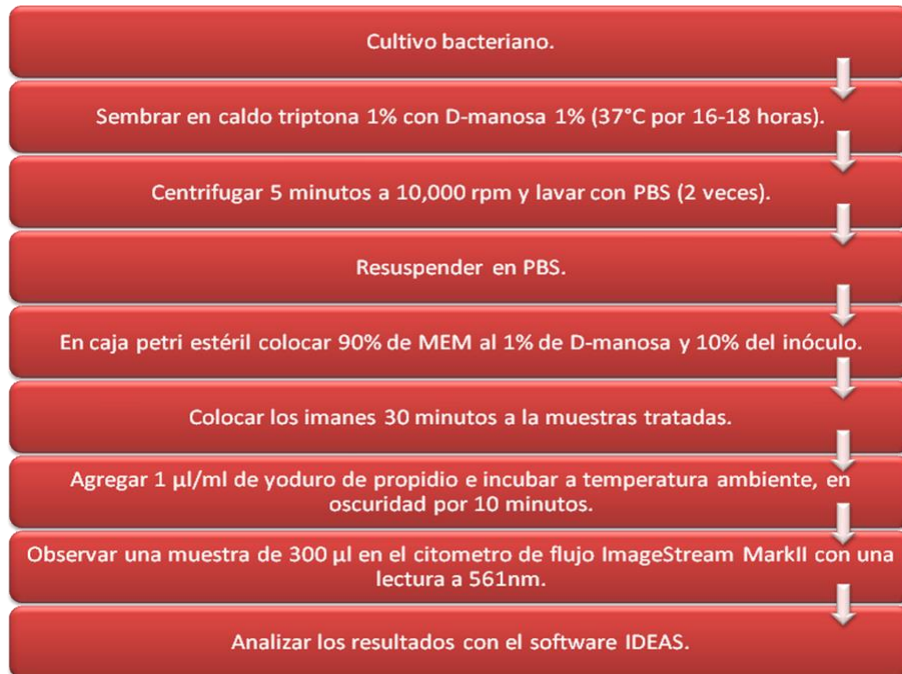


Diagrama 6. Ensayo para evaluar el efecto de campos magnéticos sobre la permeabilidad de la membrana de E2348/69

Siguiendo el mismo procedimiento del ensayo de auto-agregación con la diferencia de que al terminar la exposición al campo magnético las muestras se trataron con yoduro de propidio a una concentración de 1µl/ml del stock a una concentración de 10 mg/ml. Las muestras se incubaron por 10 minutos a temperatura ambiente en oscuridad. Para el control positivo de permeabilidad se utilizó una alícuota de la cepa E2348/69 tratada de la misma manera, sin exposición al campo magnético pero tratada durante cinco minutos con 0.1% de tritón (100X). La muestra se lavó con PBS y se suspendió con RNAsa (20mg/ml) diluida 1:5000, y posteriormente se le agregó el yoduro de propidio en las mismas condiciones que al resto de las muestras. Las imágenes y el conteo de las células se realizaron con Citometro de flujo (ImageStream Mark II Amnis), los datos para obtener los resultados se analizaron con el software IDEAS.

Análisis estadístico

Se utilizó el programa Origin Pro (Origin Lab) para obtener los análisis estadísticos de desviación estándar, líneas de tendencia, ajuste de las curvas, ANOVA de dos vías y error estándar.

Resultados

Caracterización de las cepas evaluadas en el estudio

Detección de genes en cepas control.

Los genes *eaeA* (384pb) y *bfpA* (324pb) fueron amplificados por las cepas de estudio. Para el gen *eaeA* se observó que sólo el control HB101 no lo presento como se esperaba (Figura 11)

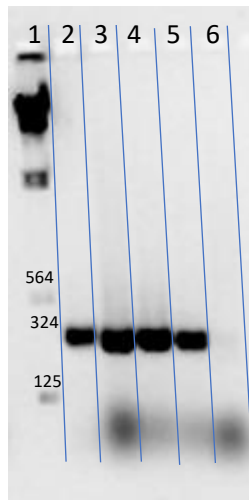


Figura 11. Productos de PCR de *eaeA* para las cepas de estudio

Electroforesis en Gel de agarosa (1%). Productos del ensayo de PCR para *eaeA* (324pb). Carriles 1 marcador de peso molecular, 2 EPEC E2346/69, 3 JPEP30, 4 $\Delta escN$, 5 $\Delta escN$ + pAEscN, 6 HB101.

La presencia del gen *bfpA* en los resultados de PCR confirma que se encuentra presente en las cepas, con excepción de JPEP30 y HB101, tal como se esperaba (Figura 12).

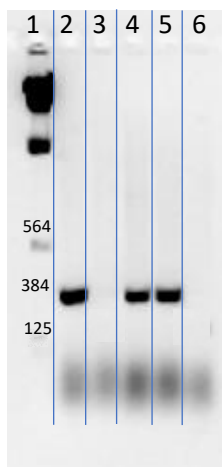
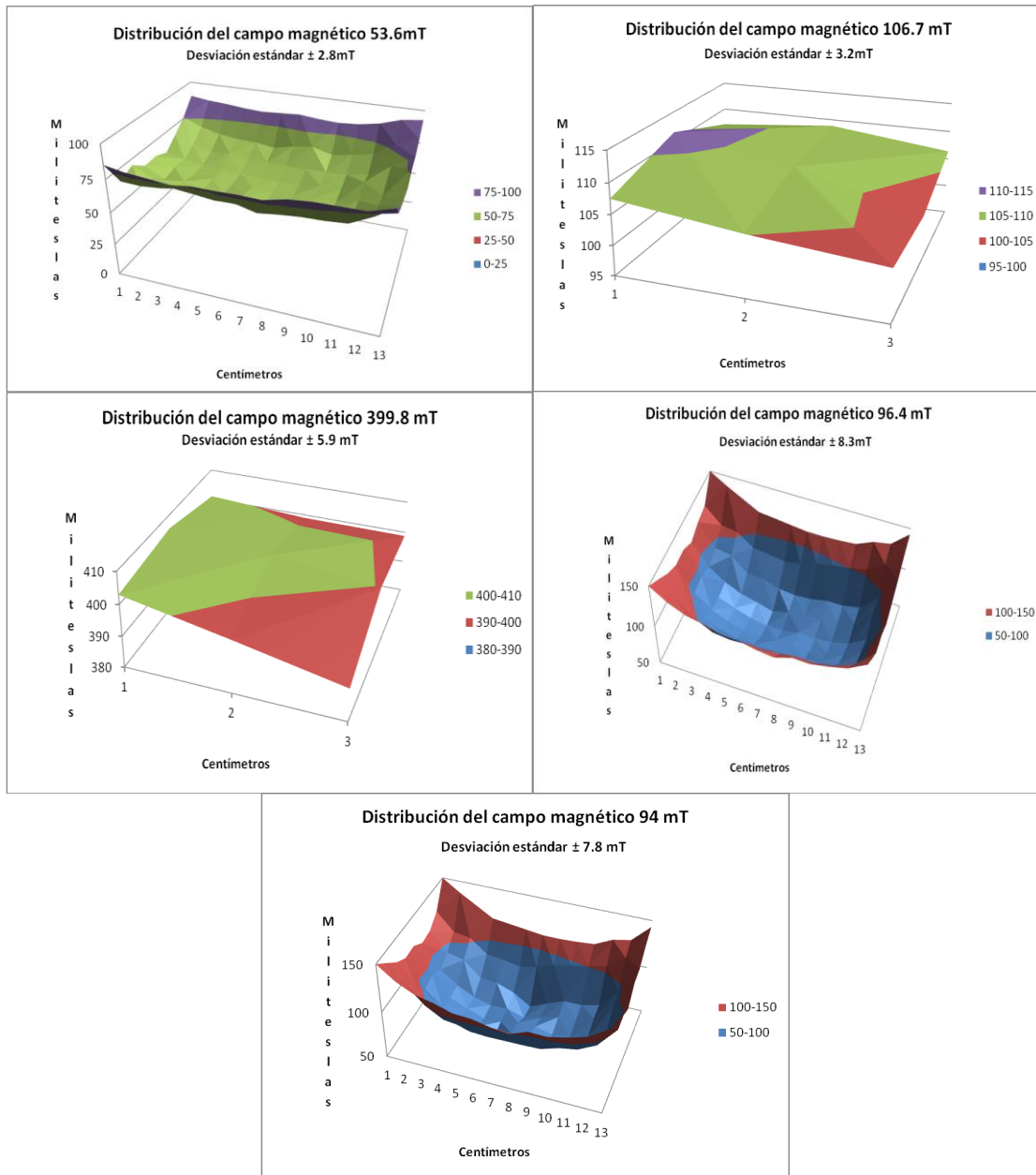


Figura 12. Productos de PCR de *bfpA* para las cepas de estudio

Electroforesis en Gel de agarosa (1%). Productos del ensayo de PCR para *bfpA* (384pb). Carriles: 1 marcador de peso molecular, 2 EPEC E2346/69, 3 JPEP30, 4 $\Delta escN$, 5 $\Delta escN$ + pAEscN, 6 HB101.

Campos magnéticos

Las figuras generadas de las mediciones de los campos magnéticos con el promedio de la medición y su desviación estándar muestran que en el centro de las áreas se tiene un campo homogéneo.

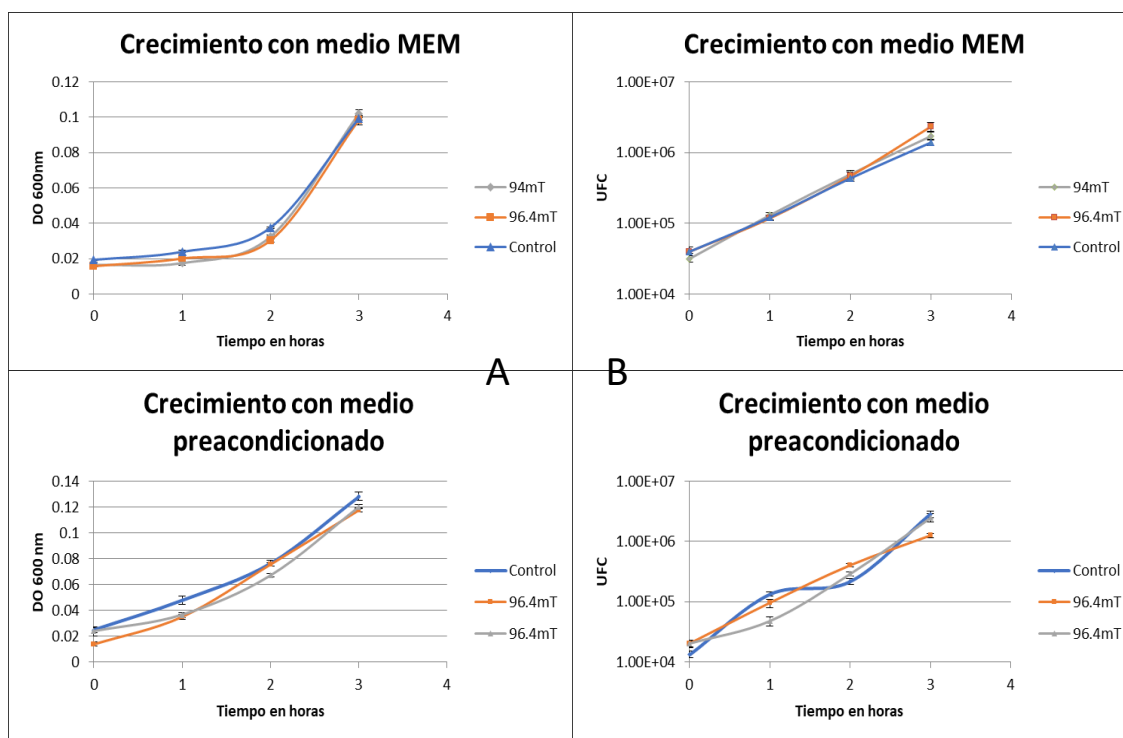


Gráfica 1. Distribución de las magnitudes de los diferentes campos magnéticos

Los resultados corresponden a 3 mediciones para cada punto del área entre los imanes (0.5 cm de separación) Desviación estándar del área en el título.

Efectos de campos magnéticos en la viabilidad de E2348/69

Existen datos controversiales con respecto al efecto de campos magnéticos sobre la viabilidad de las bacterias. Para conocer el efecto de dos diferentes campos magnéticos sobre la viabilidad de la cepa E2348/69, se implementó un ensayo bajo las condiciones de una prueba de adherencia con un tratamiento previo de las bacterias por 30 minutos con los campos magnético. Al analizar los datos de densidad óptica y de UFC (Figura 4 A y B) se observó que el crecimiento de EPEC no se modificaba con ninguna de las dos intensidades (94mT y 96mT) de campos magnéticos empleadas. Los resultados obtenidos se compararon con los correspondientes de la bacteria sin tratar crecida en las mismas condiciones que las tratadas.

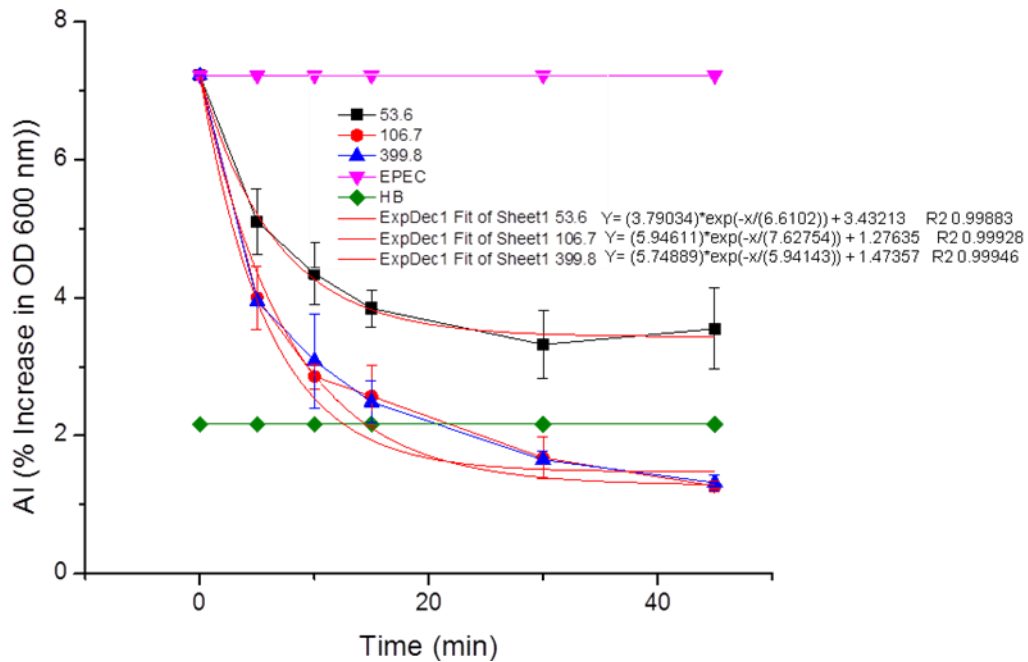


Gráfica 2. Efecto de campos magnéticos en la viabilidad de E2348/69

Curvas de crecimiento de E2348/69 (D.O y UFC), posterior al tratamiento con dos diferentes campos magnéticos con tiempo de exposición de 30 minutos y en dos diferentes medios de cultivo. Las barras de error presentan el error estándar de tres ensayos.

Efecto del tratamiento con diferentes magnitudes de campo magnético en la autoagregación de E2348/69

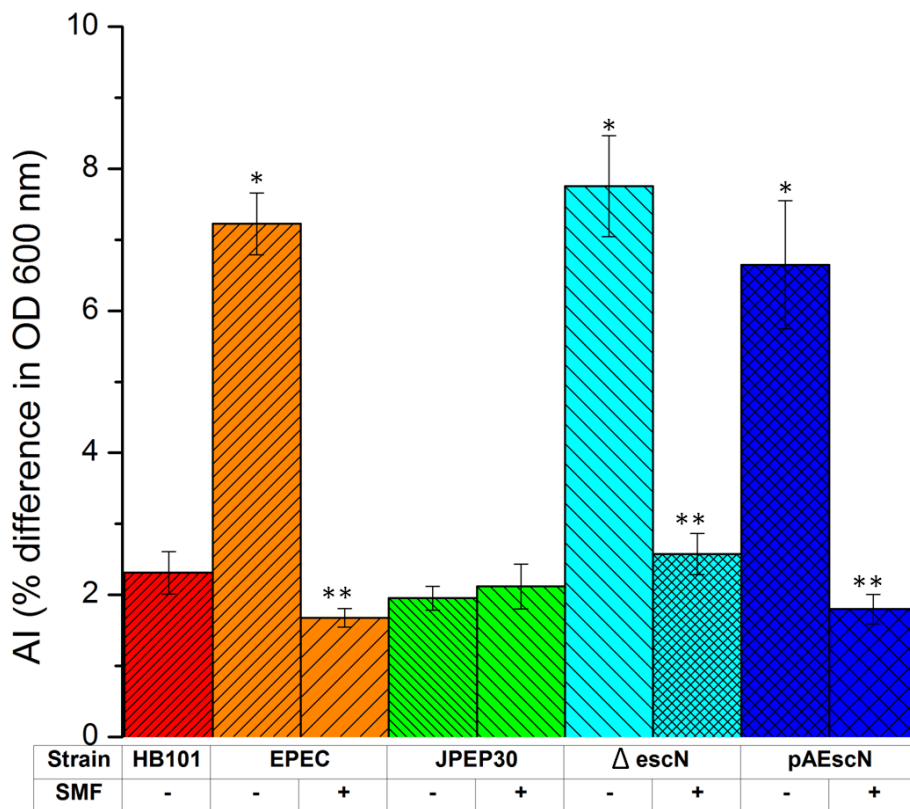
Se analizó el índice de autoagregación (AI) en diferentes tiempos e intensidad de los campos magnéticos. Para estandarizar las condiciones se utilizó inicialmente la cepa de referencia (Figura 2), en ésta se observa que con la intensidad de 53.6 mT no se afecta la autoagregación durante el tiempo que duró el ensayo. Con relación a los otros dos tratamientos (106.7 mT y 399.8 mT), en los cuales no se afecta la viabilidad, se identifica a los 30 minutos un índice de autoagregación por abajo del 2% que es el que se obtiene con la cepa HB101 que es el control negativo. En la parte superior, la línea continua es el valor de la cepa silvestre sin el tratamiento con campo magnético.



Gráfica 3. Efecto sobre la inhibición de la Autoagregación inducida por campos magnéticos

El tratamiento con dos de los campos magnéticos evaluados disminuyó el índice de autoagregación por debajo de los resultados obtenidos con la cepa HB101 utilizada como control negativo. Las barras de desviación estándar representan los datos de tres ensayos.

Para definir el o los componentes de EPEC que pudieran estar involucrados con la inhibición de la autoagregación inducida por los campos magnéticos, se realizó un ensayo con las cepas EPEC E2348/69, JPEP30 (pEAF -), $\Delta escN$ (componente de la ATPasa del sistema de secreción tipo tres) y $\gamma \Delta escN + pAescN$ ($\Delta escN$ complementada). Los resultados obtenidos mostraron que las cepas $\Delta escN$ y su complementada mostraron un comportamiento similar al obtenido con la cepa silvestre. Sin embargo, la cepa JPEP30 que carece del plásmido EAF involucrado en la expresión de BFP no muestra autoagregación, incluso sin tratamiento con el campo magnético (Figura 3).



Gráfica 4. Efecto del campo magnético en la autoagregación de distintas cepas de *E. coli*

Las cepas utilizadas fueron HB101 como control, EPEC E2348/69, una cepa sin el plásmido EAF (JPEP30), una mutante en el componente de la ATPasa del sistema de secreción tipo tres (Δ escN) y la reconstituida de la misma pAEscN. Los ensayos de autoagregación para las diferentes cepas con o sin un tratamiento con un campo magnético (106.7 mT) con tiempo de exposición de 30 minutos. Las barras de error representan la desviación estándar de tres ensayos.

Efecto del tratamiento de un campo magnético sobre la adherencia en células HEp-2 de la cepa E2348/69

Estudios previos en los que se evaluó la adherencia de EPEC en células HeLa refieren cambios en el perfil de adherencia debido a la acción de un campo magnético (Saito et al., 1997a y b), dicho ensayo se realizó utilizando exposición a un campo magnético DC de 450mT. En nuestro estudio se empleó un campo magnético DC menor (106.7 mT) que se obtienen con imanes comerciales. Los resultados obtenidos mostraron modificación del patrón de adherencia localizada (Figura 19 A) después de la exposición al campo magnético, con la formación de acúmulos dispersos de bacterias, en lugar de microcolonias bien definidas (Figura 19 B). Esto como resultado de la única variable que se modificó que fue el campo magnético.

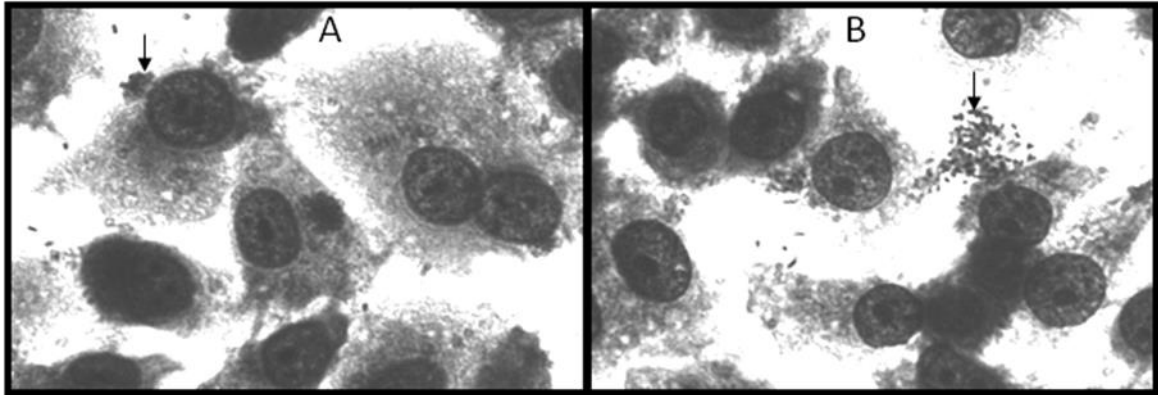


Figura 13. Ensayo de adherencia en células HEp-2.

Se observa un cambio del patrón de adherencia localizada (A cepa sin tratar) a un patrón no definido (B cepa tratada) en el que las bacterias se dispersan sobre la superficie de la preparación). Objetivo 100X. Fotos representativas de tres experimentos independientes por duplicado.

Efecto de un campo magnético sobre la modificación de la estructura externa de E2348/69

Se analizó el efecto sobre EPEC E2348/69 de un campo magnético de 107 mT por microscopía electrónica de transmisión, para conocer si se inducían alteraciones visibles en la estructura que estuviesen contribuyendo a la inhibición de la autoagregación y en la adherencia. Como complemento para evaluar el daño potencial del tratamiento con el campo magnético se analizó si la permeabilidad de la membrana se modificaba.

Microscopía electrónica de Transmisión

Las imágenes de la microscopía obtenidas después de 30 minutos de tratamiento con el campo magnético muestran alteraciones en 89% de 257 bacterias analizadas. Las alteraciones consisten en arreglos que dan la apariencia de invaginaciones en diferentes partes de la bacteria (Figura 20 C y D). Alteraciones similares se observaron solo en 25 % de 229 bacterias no tratadas (Figura 20 A y B). Preparaciones elaboradas 3 horas después de haber tratado el cultivo de EPEC con el campo magnético, solo presentaron modificaciones 8% de 245 bacterias analizadas (Figura 20 G y H), resultado similar al obtenido sin tratamiento que presentaron morfología normal en 90% de 229 bacterias (**Figura 14 E y F**).

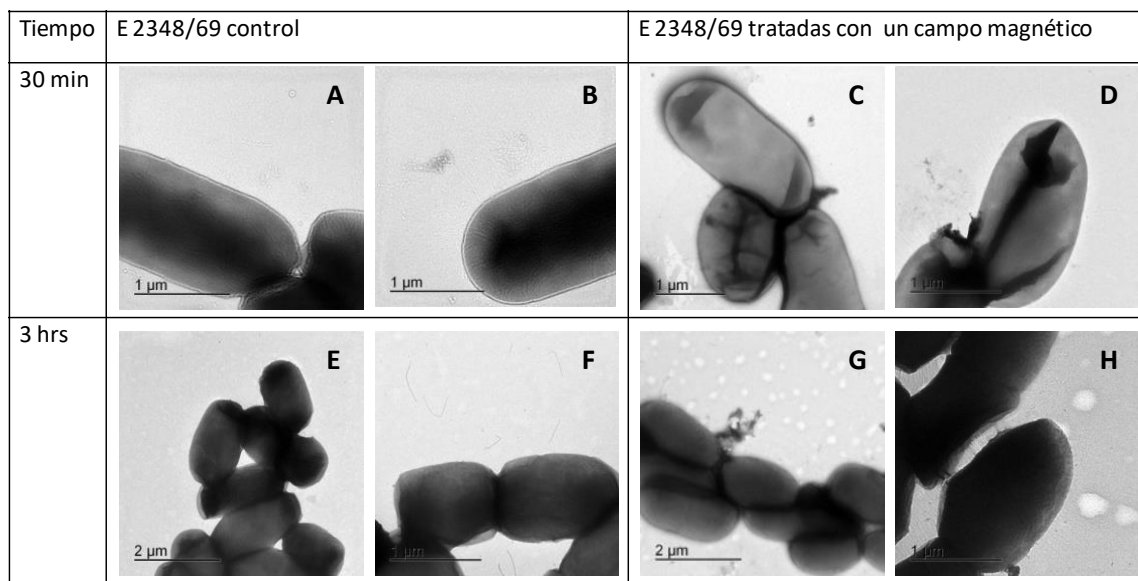


Figura 14. Microscopía electrónica de transmisión de EPEC E2348/69 sometida a un campo magnético.

A y B Control a los 30 minutos de EPEC no tratadas; C y D EPEC observadas después de haber sido tratadas 30 minutos con un campo magnético de 1078 mT; E y F Control de EPEC a las 3 horas del ensayo; G y H EPEC tratadas 3 horas después del tratamiento con el campo magnético.

Permeabilidad de la membrana

Para conocer si las alteraciones de la membrana observadas en el ensayo anterior afectaban la permeabilidad de EPEC se utilizó un ensayo con yoduro de propidio. Al realizar las lecturas de las cepas tratadas con el campo magnético y los controles no tratados no se observaron diferencias significativas, dando sólo 2% de células fluorescentes. Sin embargo, al comparar los datos anteriores con los obtenidos en el control positivo permeabilizado las diferencias fueron altamente significativas, dando 75% de células fluorescentes.

Análisis de resultados

EPEC es uno de los patógenos bacterianos importantes responsables de la diarrea en niños a nivel mundial, su patogénesis está caracterizada por eventos de adherencia inicial mediada por fimbrias y adherencia íntima relacionada con el sistema de secreción tipo III. Un aspecto relevante de las diarreas es el impacto que tienen sobre el desarrollo y crecimiento de los niños, aunque la mortalidad por el padecimiento ha disminuido considerablemente por el empleo de la rehidratación oral, continúa siendo un padecimiento con elevada morbilidad que representa un importante problema de salud pública. Ante esto surge la necesidad de buscar alternativas para su tratamiento y control, el tratamiento con antimicrobianos está contraindicado y a la fecha no existen vacunas que prevengan la colonización del intestino por EPEC.

Desde hace varios años se ha evaluado el efecto del magnetismo sobre células procariontas y eucariotas (Okuno et al., 1993; Bondemark et al., 1995; Fojt et al., 2004; Ji et al., 2009; Nguyen et

al., 2015). Aunque, con resultados variables se ha logrado observar que dependiendo de la intensidad (mT) de los campos magnéticos y el tiempo de tratamiento se inducen cambios en las bacterias que podrían ser útiles para el control de las diarreas.

En este trabajo se evaluó el efecto de diferentes campos magnéticos sobre diferentes propiedades relacionadas con la patogenicidad de *E. coli* enteropatógena E2348/69. Para ello inicialmente fue necesario estandarizar las condiciones para generar diferentes intensidades de los campos magnéticos, lo anterior por el hecho de que se estaban empleando imanes de uso comercial. Los resultados al respecto fueron interesantes y se logró generar intensidades desde 93 mT hasta 399 mT. Con estos resultados se decidió analizar el efecto de la magnitud del campo y el tiempo sobre una de las propiedades EPEC relacionadas con su patogénesis, la autoagregación. En este ensayo se observó que entre mayor era la magnitud del campo magnético, la capacidad de autoagregación de EPEC disminuía; sin embargo, esto no se da en una relación lineal ya que EPEC como todos los organismos vivos presenta un límite. Con respecto al tiempo se observó un comportamiento similar, es decir, a mayor tiempo de exposición menor autoagregación, con una relación no lineal. Por lo antes referido es que se decidió continuar el estudio utilizando solo una magnitud de campo magnético (106.7 mT), con una exposición de 30 minutos, ya que bajo estas condiciones la autoagregación de la cepa E2348/69 se abatía, teniendo valores similares a los de la cepa control *E. coli* HB101, que no se autoagrega.

En otros estudios se ha reportado que el tratamiento con campos magnéticos de baja intensidad, como los utilizados en este estudio, por periodos de tiempo corto pueden disminuir la viabilidad de *E. coli* (Fojt et al., 2004). Ante esta posibilidad se evaluó la viabilidad de EPEC E2348/69 con magnitudes de campo magnético similares a las condiciones que presentaron la disminución de la autoagregación. Los resultados de crecimiento de EPEC después del tratamiento con campos magnéticos indicaban que la inhibición de la autoagregación observada en EPEC E2348/69, no era debida a la muerte de la bacteria. Por lo que consideramos necesario indagar, que componentes eran los que se modificaban o alteraban por el tratamiento de EPEC con los campos magnéticos.

Girón, et al. (1993), mostraron la participación de BFP en la adherencia y autoagregación de EPEC. Utilizando la autoagregación como un ensayo indirecto del correcto funcionamiento de BFP. Para analizar si BFP era el componente de EPEC que se alteraba por efecto de los campos magnéticos se utilizó como control de no autoagregación a *E. coli* HB101 y como EPEC no autoagregativa a la cepa JPEP30 (EAF⁻) que no expresa BFP. Los resultados corroboraron que la cepa no se autoagrega y presenta un comportamiento de autoagregación similar al de la cepa HB101. En este ensayo se observó que el tratamiento con los campos magnéticos no modifica el comportamiento de la cepa JPEP30, ya que el ensayo con y sin exposición a los campos magnéticos dio el mismo resultado de no autoagregación. Otro elemento importante en la patogénesis de EPEC lo constituye el TTSS, que participa en la adherencia íntima de EPEC. El TTSS está codificado por genes presentes en la isla de patogenicidad LEE (Jarvis et al., 1995). Para analizar si el efecto del tratamiento con imanes pudiera tener efecto sobre la isla de patogenicidad LEE se utilizó la cepa EPEC Δ escN a la cual se mutó el gene de la ATPasa relacionado con la translocación de los efectores de EPEC a la célula hospedera (Andrade, 2007); asimismo, se usó también la cepa EPEC Δ escN complementada con el

plásmido pAEscN, el cual expresa el gen previamente mutado. Los resultados del AI reflejan que al no tener el estímulo de los imanes y con el estímulo se comportan de forma similar a los AI obtenidos con la cepa EPEC E2348/69, lo anterior confirma que la alteración inducida por los imanes ¿se debe a probables cambios relacionados con BFP y no afecta componentes expresados por LEE.

En el estudio se analizó además el efecto del tratamiento con campos magnéticos sobre la adherencia a células HEp-2 de EPEC E2348/69. Los resultados obtenidos mostraron la modificación en el patrón de adherencia localizada, generando un fenotipo de adherencia difuso con dispersión de las bacterias. Esta observación coincide con lo reportado por Saito et al. (1997a; b), quienes describen un patrón de adherencia difusa en una cepa EPEC que fue sometida a un campo magnético. Humphries et al. (2010), para reafirmar el patrón que permite el plásmido EAF, utilizaron una cepa EAF⁻ en ensayos de adherencia y observaron pérdida del fenotipo de adherencia localizada, esta observación en conjunto con los referido previamente por Girón, et al. (1993), apoyan el efecto de los imanes sobre BFP y su participación en la adherencia y autoagregación de EPEC.

Un estudio previo realizado por Ji et al. (2009) refiere que el tratamiento de una cepa de *E. coli* no patógena con un campo magnético DC de 450 mT produjo modificaciones en la superficie de la bacteria ocasionando la ruptura en los límites de la misma. Para saber si esto pudiera tener alguna relación con nuestros resultados, se propuso conocer el efecto directo sobre la estructura de EPEC. Al respecto nos planteamos dos posibles situaciones relacionadas con las modificaciones en las propiedades antes mencionadas. Una de ellas es el efecto directo sobre la estructura de EPEC.

Para evaluar si los cambios observados en la autoagregación y la adherencia de EPEC E2348/69 pudieran relacionarse con daño sobre la estructura de la bacteria, se realizó la observación por medio de microscopía electrónica de transmisión de muestras de un ensayo de autoagregación. Los resultados obtenidos en las preparaciones inmediatamente después del tratamiento de 30 minutos con el campo magnético, mostraron la presencia de modificaciones en la superficie de EPEC. En un estudio similar, Ji et al. (2009) reportaron alteraciones muy parecidas a las identificadas por nosotros. Para evaluar si los cambios en la superficie de EPEC eran permanentes, se analizaron muestras obtenidas después de tres horas de aplicado el tratamiento con los campos magnéticos. Los resultados observados en estas preparaciones mostraron que EPEC recupera la forma de su superficie, por lo cual se puede considerar que la inhibición de la autoagregación no depende de modificaciones estructurales de EPEC.

Para confirmar que no existe daño y que la integridad de la superficie de EPEC se mantiene, se realizó un ensayo para evaluar la permeabilidad de la membrana. Siguiendo el procedimiento descrito por Nguyen et al. (2015), se analizó la permeabilidad al yoduro de propidio y se observó que el porcentaje de fluorescencia en las células tratadas no tenía diferencia significativa con las células sin tratar. Como fue descrito previamente, la integridad de la membrana de EPEC no se altera por efecto del tratamiento con campos magnéticos, lo que confirma que no se ocasiona daño estructural.

Los resultados obtenidos en nuestro trabajo experimental permiten reconocer que, aunque existe modificación en la superficie de EPEC por el tratamiento del campo magnético, los cambios son reversibles. Sin embargo, los cambios inducidos interfieren en dos propiedades importantes relacionadas con la patogénesis de EPEC la autoagregación y la adherencia.

Las modificaciones en ambos eventos se relacionan con BFP que al parecer no se expresa o lo hace en forma deficiente. Existen diferentes sistemas de regulación de la bacteria para responder ante estímulos externos como son cambios en el pH, la temperatura o las concentraciones de diferentes sustancias en el medio, entre otros. Se ha descrito que estos pueden afectar tanto la membrana externa como la interna (Raivio, 2005). Un ejemplo de esto es el complejo CpxRA que es un sistema de señalización de dos componentes. La estructura de Cpx contiene CpxA histidina cinasa localizada en la membrana interna; CpxR que se encuentra en el citoplasma y que es la proteína reguladora de la respuesta; y CpxP, proteína accesoria de regulación que se encuentra en el espacio periplásmico. Cpx es un mecanismo que regula la expresión de diversas proteínas de la superficie de la bacteria, entre las que se encuentran el flagelo y los pili, estructuras importantes para la patogénesis de EPEC (Vogt et al., 2010).

Se sabe que durante la colonización de EPEC a las células del hospedero los niveles de actividad de Cpx disminuyen, lo que promueve la síntesis de BFP, la autoagregación y la adherencia íntima. Cuando EPEC reconoce una situación de estrés, la actividad de Cpx aumenta, lo cual inhibe la expresión de estructuras de superficie como BFP, el flagelo y SSTT reprimiendo su transcripción (Raivio, 2004; Hunke et al., 2012).

Con las modificaciones identificadas en la cepa E2348/69, podemos sugerir que el efecto del campo magnético es censado por EPEC, generando modificaciones que se pueden ver en la microscopia y señalizando en los sensores de membrana, generando la respuesta al estrés. She et al. (2009) observaron que un campo magnético mayor a 5T por una hora, modifica la estructura secundaria de proteínas de *E. coli*. La respuesta de activación de señales genera modificaciones no solo estructurales, Potenza et al. (2004) en un estudio en el que utilizaron magnitudes de campo magnético similares a las de nuestro trabajo, observaron que se modifica la expresión de genes de *E. coli*. Por lo cual podemos suponer que el campo genera una condición que es reconocida por EPEC y genera una o más señales de cambio, lo cual es interpretado por la cepa como señales de alerta ante la modificación del medio.

Aunque los resultados de otros autores dan soporte a la hipótesis de este trabajo, se requieren estudios para confirmar que la actividad de Cpx u otros sensores de membrana se alteran por efecto de los campos magnéticos, con la respuesta consecuente en relación a la expresión de BFP, TTSS o flagelo, que son las estructuras involucradas en los eventos de adherencia y esfacelamiento en el daño ocasionado por EPEC a las células hospedero.

Conclusiones

Diferentes magnitudes de campo magnético DC utilizadas sobre la cepa E2348/69 generan un efecto inverso en la autoagregación ya que, a mayor magnitud de campo, menor autoagregación. El tiempo de exposición a los campos magnéticos también tiene una relación inversa: a mayor tiempo de exposición menor autoagregación, con límite a los 30 minutos.

La exposición de E2348/69 a un campo magnético DC de 100 mT no altera la viabilidad de la cepa.

El efecto del campo magnético DC en la disminución de la autoagregación y cambio en el fenotipo de adherencia se relaciona con el correcto funcionamiento de BFP.

Las alteraciones en la estructura de EPEC ocasionadas por el tratamiento con campos magnéticos no modifican sus funciones de permeabilidad.

El efecto del tratamiento con un campo magnético de EPEC E2348/69 genera una modificación que sugiere la activación de sistemas de respuesta como los de estrés, lo que puede modificar la expresión de BFP y otros factores relacionados con la patogenicidad de EPEC.

Bibliografía

Anantha RP, Stone KD, Donnengerg MS. Role of BfpF, a member of the Pil T family of putative nucleotide-binding proteins, in type IV pilus biogenesis and in interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host cells. *Infect Immun*. 1998 Jan;66(1):122-31.

Andrade A, Pardo JP, Espinosa N, Pérez-Hernández G, González-Pedrajo B. Enzymatic characterization of the enteropathogenic *Escherichia coli* type III secretion ATPaseEscN. *Arch Biochem Biophys*. 2007 Dec 1;468(1):121-7.

Bern C, Martines J, de Zoysa I, Glass RI. The magnitude of the global problem of diarrhoeal disease: a ten-year update. *Bull World Health Organ*. 1992;70(6):705-14.

Bieber D, Ramer SW, Wu CY, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, Schoolnik GK. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science*. 1998 Jun 26;280(5372):2114-8.

Blumenthal RM, Borst DW, Matthews RG. Experimental analysis of global gene regulation in *Escherichia coli*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*. 1996;55:1-86.

Bondemark L, Kurol J, Wisten A. Extent and flux density of static magnetic fields generated by orthodontic samarium-cobaltmagnets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop*. 1995 May;107(5):488-96.

Clarke EJ, Voigt CA. Characterization of combinatorial patterns generated by multiple two-component sensors in *E. coli* that respond to many stimuli. *Biotechnol Bioeng*. 2011 Mar;108(3):666-75.

Cleary J, Lai LC, Shaw RK, Straatman-Iwanowska A, Donnenberg MS, Frankel G, Knutton S. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology*. 2004 Mar;150(Pt 3):527-38.

Chionna A, Tenuzzo B, Panzarini E, Dwikat MB, Abbro L, Dini L. Time dependent modifications of Hep G2 cells during exposure to static magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 2005 May;26(4):275-86.

Chionna A, Dwikat M, Panzarini E, Tenuzzo B, Carlà EC, Verri T, Pagliara P, Abbro L, Dini L. Cell shape and plasma membrane alterations after static magnetic fields exposure. *Eur J Histochem*. 2003;47(4):299-308.

Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Current Microbiology* 1979;3:95-99.

Dai Q, Dong F. Biology response of the kind of human normal flora under different static magnetic fields. *Bioinformatics and Biomedical Engineering, 2009. ICBBE 2009. 3rd International Conference* 1-4.

Dresler A, Wirtz VJ, Corbett KK, Echániz G. Antibiotic use in Mexico: review of problems and policies. *Salud Publica Mex.* 2008;50 Suppl 4:S480-7.

Fanelli C, Coppola S, Barone R, Colussi C, Gualandi G, Volpe P, Ghibelli L. Magnetic fields increase cell survival by inhibiting apoptosis via modulation of Ca²⁺ influx. *FASEB J.* 1999 Jan;13(1):95-102.

Finlay BB, Rosenshine I, Sonnenberg MS, Kaper JB. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* adherence to HeLa cells. *Infect Immun.* 1992 Jun;60(6):2541-3.

Fojt L, Strasák L, Vetterl V, Smarda J. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adacarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry.* 2004 Jun;63(1-2):337-41.

Girón JA, Ho AS, Schoolnik GK. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 1991 Nov 1;254(5032):710-3.

Girón JA, Sonnenberg MS, Martin WC, Jarvis KG, Kaper JB. Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis.* 1993 Oct;168(4):1037-41.

Girón JA, Torres AG, Freer E, Kaper JB. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 2002 Apr;44(2):361-79.

Horiuchi S, Ishizaki Y, Okuno K, Ano T, Shoda M. Chaperone in broth culture is associated with significant suppression of *Escherichia coli* death under high magnetic field. *Bioelectrochemistry.* 2002 Sep;57(2):139-44.

Humphries RM, Griener TP, Vogt SL, Mulvey GL, Raivio T, Sonnenberg MS, Kitov PI, Surette M, Armstrong GD. N-acetyllactosamine-induced retraction of bundle-forming pili regulates virulence-associated gene expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol.* 2010 Jun 1;76(5):1111-26.

Hunke S, Keller R, Müller VS. Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett.* 2012 Jan;326(1):12-22.

Jarvis KG, Girón JA, Jerse AE, McDaniel TK, Sonnenberg MS, Kaper JB. Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1995 Aug 15;92(17):7996-8000.

Ji W, Huang H, Deng A, Pan C. Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*. *Micron.* 2009 Dec;40(8):894-8.

Kaper JB. Pathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol.* 2005 Oct;295(6-7):355-6.

Kauffmann F. Zur Serologie der Coli-Gruppe. *Acta path microbiol scand* 1944;21-20.

Kenny B, Finlay BB. Protein secretion by enteropathogenic *Escherichia coli* is essential for transducing signals to epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1995 Aug 15;92(17):7991-5.

Kimura, K., Saito, A., Arisawa, J. Influences of the static magnetic field on behaviors of *Escherichia coli* cultured in similar environment of human body. *IEEE International Symposium on Electromagnetic Compatibility*. 1994;410-412.

Kroupová J, Bártová E, Fojt L, Strasák L, Kozubek S, Vetterl V. Low-frequency magnetic field effect on cytoskeleton and chromatin. *Bioelectrochemistry*. 2007 Jan;70(1):96-100.

Lommel S, Benesch S, Rohde M, Wehland J, Rottner K. Enterohaemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli* use different mechanisms for actin pedestal formation that converge on N-WASP. *Cell Microbiol*. 2004 Mar;6(3):243-54.

López-Saucedo C, Cerna JF, Villegas-Sepulveda N, Thompson R, Velazquez FR, Torres J, Tarr PI, Estrada-García T. Single multiplex polymerase chain reaction to detect diverse loci associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 2003 Jan;9(1):127-31.

Macritchie DM, Ward JD, Nevesinjac AZ, Raivio TL. Activation of the Cpx envelope stress response down-regulates expression of several locus of enterocyte effacement-encoded genes in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2008 Apr;76(4):1465-75.

Mellies JL, Barron AM, Carmona AM. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun*. 2007 Sep;75(9):4199-210.

Nataro JP, Kaper JB, Robins-Browne R, Prado V, Vial P, Levine MM. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J*. 1987 Sep;6(9):829-31.

Nataro JP, Kaper JB Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 1998 Jan;11(1):142-201.

Nguyen TH, Shamis Y, Croft RJ, Wood A, McIntosh RL, Crawford RJ, Ivanova EP. 18 GHz electromagnetic field induces permeability of Gram-positive cocci. *Sci Rep*. 2015 Jun 16;5:10980.

Okuno K, Tuchiya K, Ano T, Shoda M. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli* under various medium compositions and temperatures. *J Ferment Biobng* 1993;75(2):103-106.

Pagliara P, Lanubile R, Dwikat M, Abbro L, Dini L. Differentiation of monocytic U937 cells under static magnetic field exposure. *Eur J Histochem*. 2005 Jan-Mar;49(1):75-86.

Piatti E, Albertini MC, Baffone W, Fraternali D, Citterio B, Piacentini MP, Dachà M, Vetrano F, Accorsi A. Antibacterial effect of a magnetic field on *Serratia marcescens* and related virulence to *Hordeumvulgare* and *Rubus fruticosus* callus cells. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*. 2002 Jun;132(2):359-65.

Potenza L, Ubaldi L, De Sanctis R, De Bellis R, Cucchiaroni L, Dachà M. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli*. *Mutat Res*. 2004 Jul 11;561(1-2):53-62.

Raivio TL. Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochim Biophys Acta*. 2014 Aug;1843(8):1529-41.

Raivio TL. Envelope stress responses and Gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol*. 2005 Jun;56(5):1119-28.

Raivio TL, Leblanc SK, Price NL. The *Escherichia coli* Cpx envelope stress response regulates genes of diverse function that impact antibiotic resistance and membrane integrity. *J Bacteriol*. 2013 Jun;195(12):2755-67.

Rodríguez, J. *Electroterapia en fisioterapia*. Madrid: Panamericana. 2004

Rodríguez-Angeles G. Principal characteristics and diagnosis of the pathogenic groups of *Escherichia coli*. *Salud Publica Mex*. 2002 Sep-Oct;44(5):464-75.

Rogawski ET, Westreich D, Becker-Dreps S, Adair LS, Sandler RS, Sarkar R, Kattula D, Ward HD, Meshnick SR, Kang G. The effect of early life antibiotic exposures on diarrheal rates among young children in Vellore, India. *Pediatr Infect Dis J*. 2015 Jun;34(6):583-8.

Saito, A., Kimura, K., Misawa, K., Arisawa, J. Influence of static magnetic field on infection of *Escherichia coli* to HeLa cells. *Biomed Eng-App Bas C*. 1997a;9:242-246.

Saito, A., Kimura, K., Misawa, K., Arisawa, J. Effect of magnetic field on adherence of pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary infection patients HeLa cells. *Iyodenshi to seitai kogaku*. 1997b;35:20-26.

Sato K, Yamaguchi H, Miyamoto H, Kinouchi Y. Growth of human cultured cells exposed to a non-homogeneous static magnetic field generated by Sm-Co magnets. *Biochim Biophys Acta*. 1992 Sep 9;1136(3):231-8.

Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun*. 1984 Aug;45(2):534-6.

She, Z., Hu, X., Zhao, X., Ren, Z., Ding, G. FTIR investigation of the effects of ultra-strong static magnetic field on the secondary structures of protein in bacteria. *Infrared Phys Techn*. 2009;52:138-142.

Stansell MJ, Winters WD, Doe RH, Dart BK. Increased antibiotic resistance of *E. coli* exposed to static magnetic fields. *Bioelectromagnetics*. 2001 Feb;22(2):129-37.

Tenuzzo B, Vergallo C, Dini L. Effect of 6mT static magnetic field on the bcl-2, bax, p53 and hsp70 expression in freshly isolated and in vitro aged human lymphocytes. *Tissue Cell*. 2009 Jun;41(3):169-79.

Thiam S, Diène AN, Fuhrmann S, Winkler MS, Sy I, Ndione JA, Schindler C, Vounatsou P, Utzinger J, Faye O, Cissé G. Prevalence of diarrhoea and risk factors among children five years old in Mbour, Senegal: a cross-sectional study. *Infect Dis Poverty*. 2017 Jul 6;6(1):109.

Tsuchiya K, Okuno K, Ano T, Tanaka K, Takahashi H, Shoda M. High magnetic field enhances stationary phase-specific transcription activity of *Escherichia coli*. *Bioelectrochem Bioenerg*. 1999 May;48(2):383-7.

Tuinstra R, Greenebaum B, Goodma E. Effects of magnetic fields on cell-free transcription in *E. coli* and HeLa extracts. *Bioelectrochem Bioenerg*. 1997;43:7-12.

Versalovic, J., Jorgensen, J.H., Funke, G., Warnock, D.W., Landry, M.L., Carroll, K.C. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press. 2011:1126-1127.

Vogt SL, Nevesinjac AZ, Humphries RM, Donnenberg MS, Armstrong GD, Raivio TL. The Cpx envelope stress response both facilitates and inhibits elaboration of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus. *Mol Microbiol*. 2010 Jun 1;76(5):1095-110.

Vuopio-Varkila J, Schoolnik GK. Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J Exp Med*. 1991 Nov 1;174(5):1167-77.

Wang Z, Che PL, Du J, Ha B, Yarema KJ. Static magnetic field exposure reproduces cellular effects of the Parkinson's disease drug candidate ZM241385. *PLoS One*. 2010 Nov 8;5(11):e13883.

WHO. WHO estimates of the global burden of foodborne diseases. Foodborne diseases burden epidemiology reference group 2007-2015. Geneva.

Xu C, Fan Z, Chao YL, Du L, Zhang FQ. Magnetic fields of 10mT and 120 mT change cell shape and structure of F-actins of periodontal ligament cells. *Bioelectrochemistry*. 2008 Feb;72(1):41-6.

Anexos

Anexo 1. Soluciones, medios y gel.

MEM (Medio Mínimo Esencial)

Para 1 litro de agua desionizada estéril.

9.2 gramos de MEM (GIBCO) en polvo.

Reactivo al 2%.

Bicarbonato (Microlab) 20 ml.

Reactivos al 1%.

Glutamina (In Vitro S.A.) 10 ml.

HEPES (In Vitro S.A.) 10 ml.

Se mezclan todos los componentes y se filtran por un filtro de poro de 0.22µm Millipore y se deja a prueba de esterilidad por 24 horas en la incubadora de CO₂. Se conserva en refrigeración en frasco cerrado

MEM adicionado

Para 1 litro de agua desionizada estéril.

9.2 gramos de MEM (GIBCO) en polvo.

Suero Fetal Bobino (SFB) (Bio Whitaker) 50ml.

Reactivo al 2%.

Bicarbonato (Microlab) 20 ml.

Reactivos al 1%.

Glutamina (In Vitro S.A.) 10 ml.

HEPES (In Vitro S.A.) 10 ml.

Se mezclan todos los componentes, se esterilizan por filtración y se deja a prueba de esterilidad. Se conserva en refrigeración en frasco cerrado.

MEM preacondicionado

Al retirarse el medio de las botellas de cultivo celular en el proceso de crecimiento se guardó dicho medio que contiene metabolitos que secretan las células HEp-2. Se conserva en refrigeración en frasco cerrado.

PUK's

Para 1 litro de agua desionizada estéril.

Cloruro de sodio (J.T. Baker) 8 gramos.

Cloruro de potasio (Merk) 0.4 gramos.

Bicarbonato de sodio (Merk) 0.35 gramos.

EDTA (Sigma-Aldrich) 0.336 gramos.

Se mezclan todos los componentes, se esterilizan por filtración y se deja a prueba de esterilidad. Se conserva en refrigeración en frasco cerrado.

PBS

Para 1 litro de agua destilada.

Cloruro de sodio 8 gramos.

Cloruro de potasio 0.2 gramos.

Fosfato de sodio dibásico (J.T. Baker) 1.15 gramos.

Fosfato de sodio monobásico (J.T. Baker) 0.2 gramos.

En un matraz aforado de 1 litro se colocan todos los sólidos y 800 ml de agua destilada, se mezclan y se llevan a un pH de 7.2, posterior mente se afora a 1 litro con agua destilada. Se pasa la solución a un frasco con rosca y se esteriliza en autoclave. Se conserva en el frasco cerrado.

Giemsa

Giemsa Azul Eosin (Meyer) 1 gramo.

Glicerol (J.T. Baker) 54 ml.

Metanol 84 ml.

Se mezclan el Giemsa Azul Eosin y el glicerol por agitación durante una hora, después se le agrega el metanol y se agita por otra hora la mezcla y se filtra en frasco ámbar 2 veces con filtro Whatman No. 10. Se conserva en un frasco ámbar cerrado.

Caldo triptona al 1%

Se diluye 1 gramo de triptona (BD Difco) en 100 ml de agua destilada, se coloca en los recipientes con tapa donde se ocupen, frascos o tubos de vidrio y se esterilizan en autoclave. Se conservan cerrados.

D-manosa al 10%

Se agregan 5 gramos de D-manosa (Sigma-Aldrich) a 50 ml de agua destilada, se agitan hasta disolver y se esterilizan por filtración utilizando una jeringa de 50 ml (BD) y un filtro de 0.22µm (Millex). Se conserva en refrigeración en frasco o tuvo cerrado.

Caldo triptona al 1% con D-manosa al 1%

A un mililitro de caldo triptona al 1% se le agregan 100 µl de D-manosa al 10%.

Agar LB

Para 1 litro de agua destilada.

Extracto de levadura (Fluka) 5 gramos.

Bacto triptona (Fluka) 10 gramos.

Cloruro de sodio 10 gramos.

Agar bacteriológico (BD Difco) 15 gramos.

Se mezclan todos los componentes en un matraz del doble de su capacidad y se calientan con un mechero hasta obtener una mezcla homogénea y cristalina, después se esteriliza en la autoclave, al salir de la autoclave se espera a que la temperatura de la mezcla llegue a los 50°C aproximadamente y se vierten aproximadamente 20-25 ml en cajas petri estériles, una vez que ha solidificado el medio se invierten las cajas y se dejan en prueba de esterilidad por 24 horas en incubación a 37°C y después de haber probado su esterilidad se pueden usar o guardar a 4°C.

Tritón 0.01% en PBS

Tritón (Amresco) 0.5 ml.

PBS 50 ml.

Se mezclan los componentes hasta obtener la mezcla más homogénea posible y se guarda a 4°C.

Gel de agarosa al 1%

Agarosa (Bio-Rad) 0.8 gramos.

TBE (Tris/Borate/EDTA buffer marca Sigma-Aldrich) 80 ml.

Se mezclan en un matraz y se calientan en mechero agitando manualmente, hasta disolver todos los cristales, después se coloca a temperatura ambiente y cuando se puede tomar el matraz con la mano sin quemarse se vierte en el molde del gel y se le coloca el peine, una vez que solidificó se puede retirar del molde para utilizarse.

Antibióticos

Stock de 100mg/ml

Estreptomicina, Kanamicina y Ampicilina

1g de antibiótico

10 ml de agua destilada estéril

Al diluir 1µl por mililitro de medio queda la concentración deseada de 100 µl/ml

Se conserva en refrigeración en tubo cerrado.

Anexo 2. Publicación

Effects of Static Magnetic Fields on the Enteropathogenic *Escherichia coli*

María A. Quiñones-Peña,^{1,2} Gustavo Tavizon,³ José L. Puente,¹
Claudia Martínez-Anaya,⁵ Ulises Hernández-Chiñas,^{1,2}
and Carlos A. Eslava^{1,2*}

¹Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina UNAM, Ciudad de México, México

²Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Unidad de Hemato-Oncología e Investigación Hospital Infantil de México Federico Gómez/División de Investigación, Facultad de Medicina UNAM, Ciudad de México, México

³Facultad de Química, UNAM, Ciudad de México, México

⁴Departamento de Microbiología Molecular/Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México

⁵Instituto de Biotecnología, UNAM, Cuernavaca, México

This study reports the effects of exposing cells of the prototypical enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) strain E2348/69 to static magnetic fields (SMF) of varying intensities to observe their capacity to autoaggregate and the effect on cell adherence. The results showed that bacteria exposure over the course of 5 min to an intensity of 53 mT reduced autoaggregation by 28%. However, with intensities of up to 100 mT with the same exposure time, bacteria autoaggregation was reduced by approximately 50%; and after 30 min at the same intensity, it was indistinguishable from that observed in a non-autoaggregative strain. Furthermore, it was observed that SMF treatment also modified the typical localized adherence pattern of EPEC E2348/69. The observed effects are not related to bacteria damage. The above was confirmed because, after a 107 mT SMF treatment over the course of 30 min, cell viability and membrane permeability were the same to that observed in untreated controls. The obtained results suggest that the SMF effect on the E2348/69 EPEC strain alters the expression of the bundle-forming pilus (BFP), due to the fact that the same strain without the EPEC adherence factor plasmid that encodes the BFP operon was unable to autoaggregate. Electron microscopic analyses revealed structural differences between cells exposed to SMF with respect to untreated controls. In conclusion, the SMF treatment of 107 mT for 30 min reduced EPEC E2348/69 autoaggregation and modified its adherence pattern, with both events likely being associated with changes in BFP expression. *Bioelectromagnetics*. 38:570–578, 2017. © 2017 Wiley Periodicals, Inc.

Keywords: BFP; EPEC; SMF; adherence; autoaggregation

INTRODUCTION

The high plasticity of the *Escherichia coli* (*E. coli*) genome has contributed to its clonal diversity and has resulted in a number of different strains, including commensal strains of the intestinal microbiota and pathogenic strains that cause extraintestinal (extraintestinal pathogenic *E. coli*, ExPEC) or intestinal (diarrheogenic *E. coli*, DEC) infections [Nataro and Kaper, 1998; Clermont et al., 2000; Escobar-Páramo et al., 2004; Chaudhuri and Henderson, 2012; Clermont et al., 2013]. According to their antigenic characteristics, epidemiology, and virulence factors, members of the DEC group are further classified into different pathotypes: enteropathogenic (EPEC), enterotoxigenic (ETEC), enteroinvasive (EIEC), enterohemorrhagic (EHEC), enteroaggregative (EAEC),

and diffusely adherent (DAEC) [Kaper et al., 2004; Chaudhuri and Henderson, 2012; Croxen et al., 2013].

Conflicts of interest: None.

*Correspondence to: Carlos A. Eslava, Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana, Unidad de Hemato-Oncología e Investigación, Hospital Infantil de México Federico Gómez, División de Investigación, Facultad de Medicina UNAM, Dr. Márquez 162, Col. Doctores, CP 06720, CD de México, México. E-mail: eslava@unam.mx; carlos_01eslava@yahoo.com.mx

Received for review 14 September 2016; Accepted 26 July 2017

DOI: 10.1002/bem.22077

Published online 25 August 2017 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com).

EPEC is a significant cause of morbidity and mortality in children under the age of 2 years and was the first group identified as involved in the pathogenesis of diarrhea in infants. Genes localized in the EAF plasmid (EPEC adherence factor) and pathogenicity island LEE (locus of enterocyte effacement) act in a coordinated manner to express different components with roles in cell adherence and the formation of histopathological alterations known as attaching and effacing (A/E) lesions [Kaper et al., 2004; Pearson et al., 2016]. Adherence is a key event in the bacterial colonization process. EPEC adherence to the epithelia depends on surface components, such as the flagellum, capsule, and fimbriae [Girón et al., 2002; Humphries and Armstrong, 2010; Humphries et al., 2010]. The bundle-forming pilus (BFP) is of particular relevance for EPEC virulence and survival within the host, as it mediates localized adherence and autoaggregation phenotypes [Vuopio-Varkila and Schoolnik, 1991; Anantha et al., 1998; Bieber et al., 1998]. Autoaggregation is a characteristic of *E. coli* that determines its survival and permanence within the gastrointestinal tract. Autoaggregation results in characteristic groupings of cells that can be observed under a microscope or by flocculation and sedimentation of cell suspensions in static liquid cultures. In EPEC, this process depends on BfpA [Bieber et al., 1998]. The effects of different physicochemical cues on EPEC adherence and autoaggregation have been previously studied [Humphries and Armstrong, 2010]; however, the response of EPEC cells to static magnetic fields (SMF) is not known. Biological properties such as proliferation, cell wall integrity, protein structure, enzyme activity, gene expression, and antibiotic resistance become modified upon exposure to magnetic fields [Okuno et al., 1993; Tsuchiya et al., 1999; Horiuchi et al., 2002; She et al., 2009]. Furthermore, increased adherence to HeLa cells by uropathogenic and non-pathogenic *E. coli* strains from cultures exposed to a 450 mT magnetic field has been reported [Saito et al., 1997a,b]. In contrast, bacterial adherence to HeLa cells diminished with exposure to low-intensity magnetic fields [Saito et al., 1997b].

In this work, we analyzed the effects of SMF of different intensities on the autoaggregation, adherence, and morphology of EPEC.

MATERIALS AND METHODS

Bacterial Strains

Strains used in the study included the wild-type EPEC strain E2348/69 and its derivatives JPEP30 (pEAF-), Δ escN (Type 3 Secretion System ATPase

mutant), Δ escN pAEescN (complemented strain kindly provided by Dr. Bertha González-Pedrajo, Molecular Genetics Department, Cellular Physiology Institute, UNAM), and the unrelated, non-pathogenic laboratory strain *E. coli* HB101 as a negative control (kindly provided by A. Navarro, Bacterial Laboratory, School of Medicine, UNAM). Cells were propagated in LB broth containing 100 μ g/ml streptomycin when required.

Magnetic Field Treatments of Cell Cultures

For the exposure of cell cultures to SMFs, two types of magnet modules were employed, using the configuration shown in Figure 1. The experimental setup consisted of four components: permanent magnet plates with the same pole orientation (BaFe₁₂O₁₉-based magnets for the 53 and 107 mT magnetic fields and Nd₂Fe₁₄B-based magnets for 400 mT magnetic fields), samples, culture plates, and rubber stoppers. The SMF strength at the site of the samples was determined with a Hall probe DC Gaussmeter, GM-1-HS (AlohaLab, Salt Lake, UT) by sensing at the H height every 5 mm in the area between the magnet plates (50 \times 30 mm²). The intensities of the SMF strengths were selected using the following criteria: (i) the intensities could be achieved with standard commercial magnets; and (ii) after several assays, their effects on cell cultures were distinguishable under the autoaggregation criteria. Figure 2 shows the homogeneity values of SMF strength, illustrating that the gradient of the SMF at the center of the plate was negligible. At separation distances of 18.5 mm and 13.5 mm, the SMF strengths were 53 (\pm 3.0) mT and 107 (\pm 3.2) mT, respectively. The strongest field 400 (\pm 5.9) mT was obtained with two neodymium magnets (Nd₂Fe₁₄B) that were separated by 13.5 mm. Once the distance between the magnets

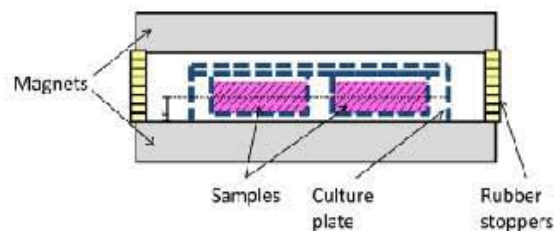


Fig. 1. Horizontal view of the structure of SMF exposure system; in this arrangement culture plate was at the center of the magnets. Permanent magnets were separated by rubber stoppers and samples were introduced in their cell culture plates. SMF ranges from 50 to 400 mT. In order to determine SMF values for several regions, surface was scanned with Hall probe at H height.

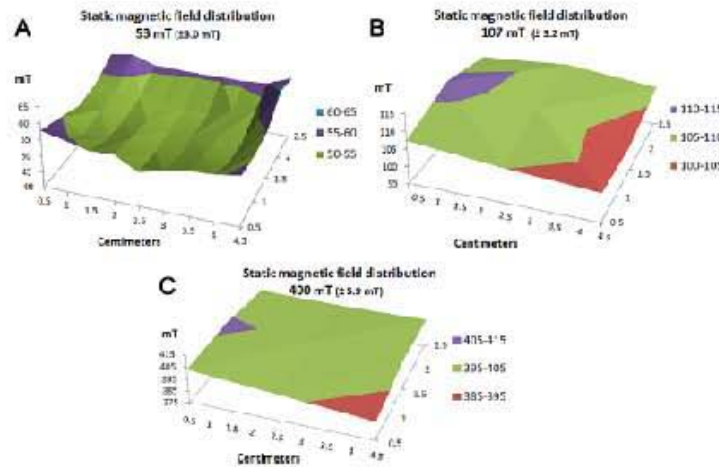


Fig. 2. Measured values of SMF strength as a function of the position in the vicinity of the zone in which cell culture was exposed to SMF. In the three cases, (A) 53 mT, (B) 107 mT, and (C) 400 mT, SMF ranges have been marked with different colors. As can be observed, at the center zone SMF gradient was practically null.

was adjusted with the rubber stoppers to fit the strength of the SMF [Bondemark et al., 1995], the culture plate (a Nunc 4-well Multi Dish, Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA) was placed between the magnets for the indicated times. Since the viability assays required more volume, different plates were used (Nunc cell culture dishes, Thermo Fisher Scientific) that were separated from the magnet plates by 10 mm; in this case, the measured SMF was 95 (± 3.1) mT.

Viability Assays

EPEC E2348/69 cells were grown overnight in 1% tryptone broth containing 1% D-mannose at 37 °C. Cell pellets were then obtained by centrifugation at 8161g (5415C, Eppendorf, Westbury, NY) for 5 min and washed twice with 1X PBS, pH 7.2. Cultures were adjusted to 3×10^8 colony-forming units (CFU)/ml using McFarland Standards [Versalovic et al., 2011], incubated in sterile plastic bags containing 27 ml of Minimal Essential Medium (MEM) with 1% D-mannose for 30 min at room temperature with an SMF treatment (53, 107, and 400 mT), and were then transferred to 37 °C for an additional 2.5 h. Growth was monitored every hour by measuring the OD at 600 nm with a spectrophotometer (GENESYS 2, Spectronic Instruments, Rochester, NY) and by plating serial dilutions on LB agar to determine the CFU. The assays with cultures of SMF-untreated EPEC E2348/69 used as control were carried out in the

same location and under the same conditions (30 min at room temperature and 2.5 h at 37 °C).

Autoaggregation

A previously described method to determine autoaggregation [Anantha et al., 1998] was followed with some modifications. Briefly, 100 μ l of cell suspensions containing 1×10^8 cells was obtained as previously described and was used to inoculate 900 μ l of MEM-mannose medium in 4-well Multi-Dish plates. The cells were then exposed to the magnetic field (107 mT) for 0, 5, 10, 15, 30, and 45 min at room temperature. After treatment, the bacteria cultures were incubated at 37 °C for 3 h, and the OD 600 nm was then measured, after which a second OD 600 nm measurement was immediately taken after vigorous shaking (Vortex Scientific Industries Gene2, Bohemia, NY) for 30 s. The autoaggregation index (AI) was calculated with the OD values before (OD1, considered 100% autoaggregation) and after dispersion by vigorous shaking of the sample (OD2) using the formula $(OD2 \times 100)/OD1$ to report it as the percentage of the change between readings, and was compared against fresh culture medium (MEM-mannose) and the aggregative-deficient strain HB101 (SMF untreated). According to our results, increases above 2.5% after cell dispersion were considered positive autoaggregation, whereas values below 2.5% were considered negative autoaggregation. The significance of the AI values was evaluated by one-way ANOVA at $P < 0.05$.

HEp-2 Cell Adherence Assay

The adherence assay was performed as previously described [Cravioto et al., 1979] with some modifications. HEp-2 cells (Lot number 6050217, ATCC CCL-23, American Type Culture Collection, Manassas, VA) were grown in a 25 cm² tissue culture flask at 37°C with a 5% CO₂ atmosphere in MEM containing 10% fetal bovine serum. HEp-2 cells at a density of 2.5×10^5 cells/ml were seeded onto cover slips in the wells of 4-well plates 24 h before the assay to form a semi-confluent monolayer. After a 24 h incubation, the cover slips were washed three times with PBS, and MEM (900 µl) plus 1% D-mannose without fetal bovine serum was added. Bacterial strains were grown overnight at 37°C in 1% tryptic broth with 1% D-mannose. The overnight culture was washed three times with PBS, suspended in PBS and adjusted to 1 of McFarland Standard (3×10^8 CFU/ml), then 100 µl of each bacterial suspension was added to different wells containing HEp-2 cells. The SMF was applied to the cell preparations as previously described (30 min at room temperature), and then the infected cells were further incubated for 2.5 h at 37°C. The same procedure was applied to SMF-untreated EPEC E2348/69 used as control, performing in the same location and under the same conditions (30 min at room temperature and 2.5 h at 37°C). After incubation, the cover slips were washed three times with PBS, fixed with 70% methanol, and stained with 10% Giemsa, then mounted on glass slides with Permount resin (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ) and dried at room temperature for 1 day. The preparations were examined with a light microscope (100×) by two different observers (the bacterial cultures were similarly positioned but without exposure to SMF).

Electron Transmission Microscopy

Ten microliters of EPEC E2348/69 SMF-treated and untreated (without SMF exposure) were taken after recovery of 30 min or 3 h growth in MEM. Aliquots were placed on a grid for electron transmission microscopy for 10 min, after which excess medium was removed, and 5 µl of 3% uranyl acetate was added. Samples were then dried at room temperature in the dark. Cells were observed using a Libra 120 microscope (Zeiss, Jena, Germany). A one-way ANOVA ($P < 0.05$) was performed to determine the differences in the number of cells with altered morphologies by two independent assays in duplicate.

Propidium Iodide Permeability Assay

Samples of 300 µl of EPEC E2348/69 SMF-treated (30 min) and untreated (without SMF

exposure) were mixed with 1 µl/ml propidium iodide (10 mg/ml) and were further incubated for 10 min at room temperature in the dark. As a positive control for cell permeability, a sample of untreated EPEC E2348/69 cells was incubated with 0.1% Triton X-100 for 5 min and then washed with PBS and suspended in MEM with RNase (20 mg/ml) diluted at 1:5000, to which propidium iodide was added. Cell images were acquired using a 60× objective and at 561 nm in an Image Stream Mark II Imaging Flow Cytometer (EMD Millipore, Seattle, WA). Data were analyzed with IDEAS Application software, version 6.2.64.0 (EMD Millipore).

Statistical Analysis

Data were statistically analyzed using Origin Pro software, version 8.6 (Origin Lab, Northampton, MA).

RESULTS

Cell Viability Was Not Affected

Because magnetic fields alter different properties of cell behavior, we evaluated whether SMF exposure compromised bacterial cell growth or viability by comparing SMF-treated and untreated bacteria (without SMF). Cells exposed to SMFs of approximately 95 mT grew and formed colonies similarly to the untreated cells, suggesting that cell integrity and viability were unaffected (Fig. 3A and B).

Autoaggregation Decreased After SMF Treatment

We were interested in assessing the effects that exposure to magnetic fields of varying intensities had on cell autoaggregation of EPEC strain E2348/69. It has been reported that the optical densities of cell suspensions of autoaggregative strains increased after vigorous shaking, most likely due to cell dispersion. We found that the autoaggregation of the E2348/69 strain exposed to SMFs of 53, 107, and 400 mT decreased exponentially over time compared with SMF untreated cells (Fig. 4). SMFs of 107 and 400 mT resulted in autoaggregation indexes below that of the non-aggregative HB101 strain after 30 min of exposure (1.8 and 2, respectively).

Previous work has shown that autoaggregation depends on the BFP operon contained within the EAF plasmid of some virulent *E. coli* strains [Bieber et al., 1998]. We next determined whether the EAF plasmid had a role in the decreased autoaggregation produced by the SMF treatment by analyzing the plasmid-cured strain JPEP30. No

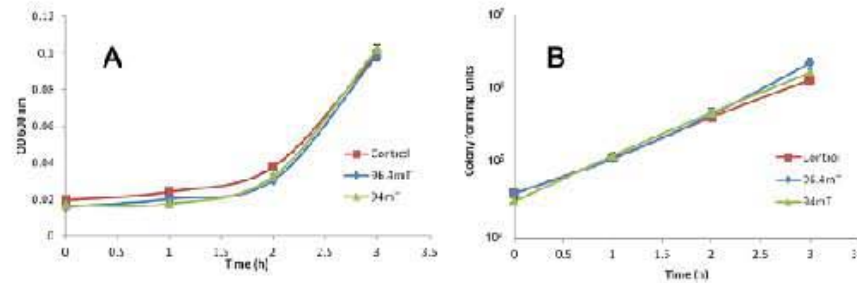


Fig. 3. Effect of SMF at different strengths on viability of EPEC E2348/69 exposed from 0 to 3 h. (A) Growth in optical density. (B) Colony forming units (CFU). Points represent the mean for three independent experiments, with error bars representing standard deviations from the means of the three independent experiments by duplicate.

further reduction of the already non-aggregative JPEP30 was observed (autoaggregation index of 1.9 vs. 2.1, respectively), suggesting that the SMF effect acts through the EAF plasmid, likely via BFP expression (Fig. 5). Another characteristic of the E2348/69 strain is the presence of a type 3 secretion system (T3SS); thus, we also analyzed the involvement of the T3SS-associated. An SMF treatment (107 mT/30 min) of the $\Delta escN$ mutant (which limits the activity of the injectosome) produced a similar reduction in the autoaggregation index to that observed in the wild-type strain E2348/69 (2.6 vs. 7.75, respectively), suggesting that the T3SS system is not involved in autoaggregation. The complemented $\Delta escN$ strain harboring a plasmid carrying the wild-type *escN* gene (pAEscN)

did not show any significant difference with respect to the wild-type strain, confirming that the T3SS does not participate in autoaggregation (Fig. 5).

Effect of SMF on EPEC Adherence

The adherence assay resulted in modifications after exposure to SMF. The preparations of SMF-untreated cells showed typical bacterial clusters forming microcolonies of localized adherence (Fig. 6A). In contrast, in SMF-treated EPEC E2348/69 samples, the microcolonies formed by cell clusters disintegrated, and the bacteria were scattered (Fig. 6B). When taking the microcolonies into account in the SMF-untreated cells, 80% showed typical aggregates of localized

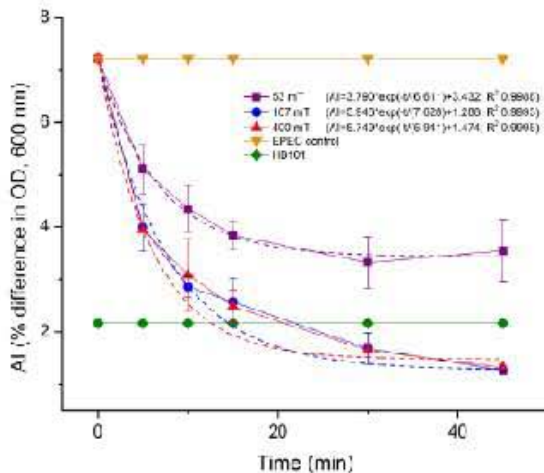


Fig. 4. Dependence of EPEC Autoaggregation index (AI) for different SMF values for 5–45 min exposure. Points of the plot represent mean AI for three independent experiments by triplicate, with error bars representing standard deviations from the mean.

Bioelectromagnetics

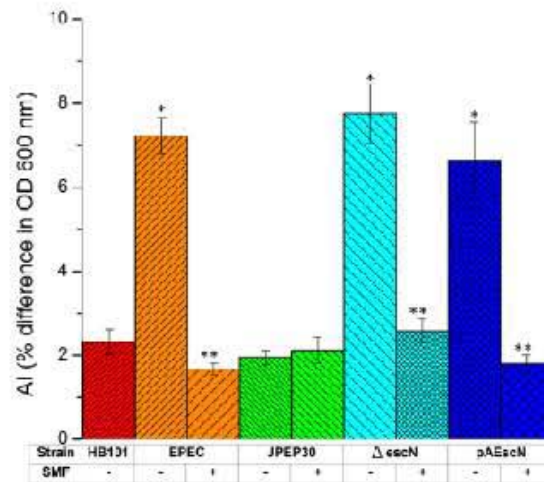


Fig. 5. Effect of 107 mT SMF treatment on different EPEC strains (E2348/69), JPEP30 (E2348/69 plasmid minus), E2348/69 $\Delta escN$, E2348/69 (pAEscN), and HB101. Bars represent autoaggregation index (AI) for three independent experiments by triplicate, with error bars representing standard deviations from the means. * $P < 0.05$ with HB101 ** $P < 0.05$ versus the strain without SMF.

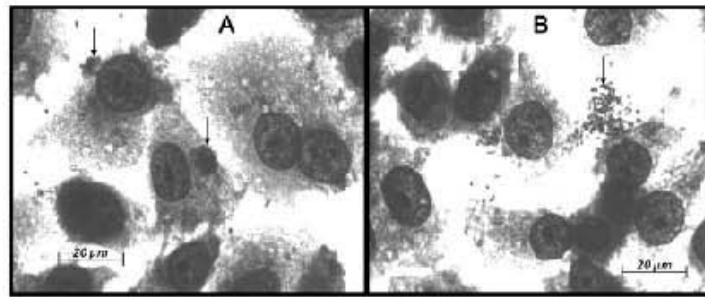


Fig. 6. EPEC E2348/69 HF β -2 cells adherence assay with and without 107 mT SMF treatment. (A) Localized adherence pattern (arrows showing microcolonies) in EPEC E2348/69 not exposed to SMF. (B) Modification of localized adherence pattern (arrows showing scattered bacteria) in EPEC E2348/69 SMF treated (100 \times). Representative sample of three independent experiments performed by duplicate.

adherence, while in the SMF-treated bacteria, only 40% exhibited microcolonies.

Transmission Electron Microscopy

To determine whether SMF treatment could be associated with alterations to the bacterial cell surface, the cells were analyzed by electron transmission microscopy under two conditions: (i) immediately after 30 min SMF treatment; and (ii) when the previous 30 min SMF treatment was finished after 2 h 30 min, to complete 3 h total, under autoaggregation assay conditions [Anantha et al., 1998]. After 30 min of SMF treatment, 89% of the cells ($n = 257$) showed alterations of opaque arrangements on bacterial cell surfaces, although similar alterations were observed in the untreated controls in approximately 25% of the bacteria, while the peripheries of these cells looked normal. Micrograph analysis revealed that untreated strain E2348/69 had no morphological modifications, and its membranes were intact (Fig. 7A and B), whereas in SMF-treated bacteria, dark areas within the cells were abundant, suggesting that an alteration to the bacteria occurred (Fig. 7C and D). Observation of the preparations after a 3 h recovery period showed that both untreated (Fig. 7E and F) and SMF-treated (Fig. 7G and H) cells had normal morphologies.

Membrane Permeability

Increased cell permeability has been observed in Gram-positive cells exposed to an 18 GHz electromagnetic field [Nguyen et al., 2015]. Therefore, we were interested to determine whether SMF treatment could result in similar changes, especially after observing modifications in cell morphology after 30 min of SMF exposure. The incubation of E2348/69 cells with propidium iodide after SMF treatment followed by a 30 min recovery did not show cell

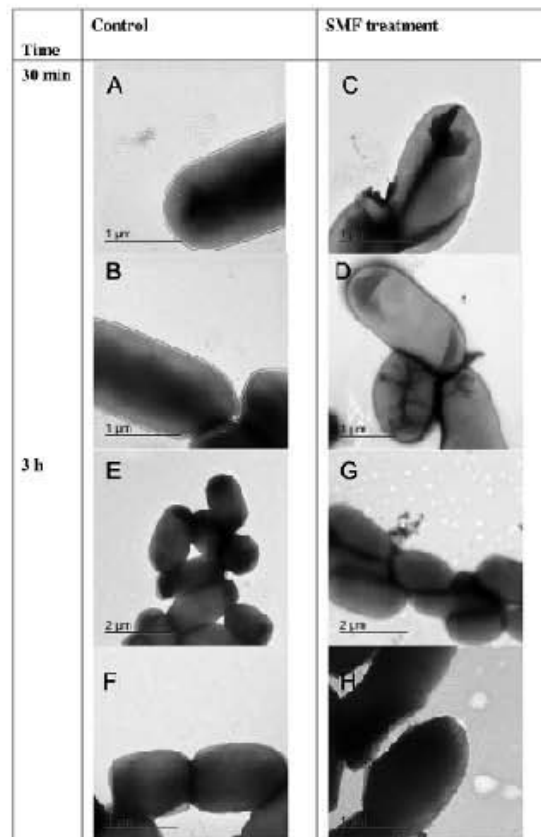


Fig. 7. Electron transmission microscopy of SMF treated and untreated EPEC E2348/69 at 30 min and after recovery period of 3 h. (A, B) 30 min control, (C, D) 30 min with 107 mT SMF treatment; (E, F) 3 h control; and (G, H) after the recovery period of 3 h. Representative samples of two independent assays by duplicate.

permeability alterations as analyzed by flow cytometry, compared with the permeability positive control of the E2348/69 strain incubated with 0.1% Triton X-100 (data not shown).

DISCUSSION

EPEC is responsible for cases of diarrhea in children; adhesion is a key event in the pathogenesis of this bacterium. In this work, the effects of exposing the EPEC strain E2348/69 to different intensities of an SMF were evaluated. Some studies have reported that treatment with low electromagnetic field intensities for short periods decreased the viability of certain bacteria [Fojt et al., 2004]. In our study, exposure to SMFs of 94 and 96 mT for 30 min, conditions under which the AI decreased, did not affect EPEC E2348/69 viability.

The first step in EPEC adherence involves the expression of plasmid-borne EAF genes encoding BFP, a set of pili that interconnect the bacteria and form autoaggregated microcolonies. Different authors have noted the importance of EPEC autoaggregation and their localized adherence to epithelial cells for virulence [Girón et al., 1991, 1993; Blank and Donnenberg, 2001; Mellies et al., 2007]. The second step is known as intimate adhesion and occurs between the bacterium and host cell [Vuopio-Varkila and Schoolnik, 1991]. The genes that have been implicated in this type of adhesion are localized on the LEE pathogenicity island. In this work, treatment of the EPEC E2348/69 strain at different times and SMF intensities altered the levels of bacterial autoaggregation. Modification of the localized adherence pattern to HEp-2 cells was also found, with adherent bacteria observed yet scattered over the cell and without the formation of microcolonies, which occurred in a similar pattern to the diffused adherence. The observed effect shows a similar behavior as shown by EPEC strains that do not have the EAF plasmid, which are described as atypical enteropathogenic *E. coli* [Rodrigues et al., 1996]. The participation of BFP in bacterial interconnection as it relates to both autoaggregation and micro-colony formation by EPEC has been described elsewhere [Girón et al., 1993]. The autoaggregation assay of the JPEP30 strain (pEAF-) and EPEC E2348/69 treated with SMF (107 mT) showed the same AI without significant differences in either strain, suggesting that treatment with SMF could be related to BFP expression. A previous study by Ji et al. [2009] reported that when performing a TME analysis after treatment of a non-pathogenic *E. coli* strain with high intensities of SMF (450 mT), the surface of the bacteria was modified, showing ruptures

that occurred principally at the edges. In our study, a TME analysis after 30 min of SMF treatment with 107 mT of the E2348/69 strain showed the presence of alterations of the bacterial surfaces, principally on the edges of the bacteria, similar to those described by Ji et al. [2009]. To determine whether the damage was permanent, observations of samples were performed at different times which showed that at 3 h after treatment, the structure of the bacteria was recovered. This finding suggests that although the SMF treatment modified the structure of the bacteria, altering its AI, the cell walls were not disrupted. To corroborate this observation, a permeability test was performed with propidium iodide [Nguyen et al., 2015] after treatment with 107 mT for 30 min, the results of which show that permeability to the dye did not increase compared to that of an untreated strain (data not shown). These results suggest that observed alterations in the morphology of the SMF-treated E2348/69 strain could be interpreted as a response to stress, triggered by the effects of the SMF treatment that may activate certain signaling pathways. Different enterobacteria, including *E. coli*, have developed different regulatory systems that allow them to detect and respond to external stimuli (pH, temperature, osmolality, etc.), which affect their cell coatings (external and inner membranes) [Raivio, 2005]. An example of this type of response to stress is the CpxRA system, a two-component signal transduction system consisting of a CpxA histidine kinase located in the inner membrane, a cytoplasmic CpxR response regulator and CpxP accessory regulator that are present in the periplasmic space. Cpx regulates the expression of different surface proteins of the bacteria, including flagella, secretion systems, and pili, all of which are important for the pathogenesis of microorganisms [Vogt et al., 2010]. When EPEC is colonizing the host cells, the level of Cpx activity is low, which promotes BFP synthesis and autoaggregation events. However, during stress, Cpx activity is increased, inhibiting BFP expression as a result of the repression of BFP transcription [Hunke et al., 2012; Raivio, 2014]. One hypothesis could be based on the observed modifications on the surface of the EPEC E2348/69 strain, resulting from cell stress, which activates a sensor membrane. The effect of an SMF higher than 5 T for 1 h can modify the secondary structure of *E. coli* proteins [She et al., 2009]. In contrast, in a study with a similar SMF treatment used in our work, Potenza et al. [2004] reported that such a treatment induced changes in *E. coli* gene expression. The observations of She et al. [2009] and Potenza et al. [2004] support our hypothesis that the increase in membrane sensor activity due to effect of the SMF treatment leads to

decreased expression of surface structures, possibly including BFP.

CONCLUSIONS

The EPEC strains are among the principal agents associated with the etiology of diarrhea in children, mainly in developing countries. The effect of an SMF (107 mT) on the EPEC strain E2348/69 decreased autoaggregation rates of the bacterium, altering the localized adherence pattern and modifying their membrane structures. The observed effect did not modify the viability of the bacteria, and the external structure was recovered by 3 h after treatment. These results suggest the possibility that SMF treatment on EPEC E2348/67 may activate some of the stress sensors of the bacteria, which modify the expression profiles of genes related to its adherence properties.

ACKNOWLEDGMENTS

The first author (QPMA) gratefully acknowledges a current CONACYT scholarship for PhD studies and the Biochemical Sciences Program, UNAM. The authors gratefully acknowledge Dr. Norma Espinosa Sánchez of the Molecular Genetic Laboratory of the Cellular Physiology Institute, UNAM, for her technical advice; M.C. Armando Navarro Ocaña and coworkers of the Medicine Faculty, UNAM, for the HB101 strain; Dr. Juan Xicotencatl-Cortés and Dr. Ariadna Cruz-Cordova of the Intestinal Bacteriologic Research Laboratory HIMFG; Dr. Guadalupe Zavala of the IBT UNAM; and M.C. Andres Saralegui of LMNA UNAM for their technical support.

REFERENCES

- Anantha RP, Stone KD, Donnenberg MS. 1998. Role of BfpF, a member of the PflT family of putative nucleotide-binding proteins, in type IV pilus biogenesis and in interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host cells. *Infect Immun* 66:122–131.
- Bieber D, Ramer SW, Wu CY, Murray WJ, Tobe T, Fernandez R, Schoolnik GK. 1998. Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 280:2114–2118.
- Blank TF, Donnenberg MS. 2001. Novel topology of BfpF, a cytoplasmic membrane protein required for type IV fimbrial biogenesis in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 183:4435–4450.
- Boulemark I, Kuroi J, Wisten A. 1995. Extent and flux density of static magnetic fields generated by orthodontic samarium-cobalt magnets. *Am J Orthod Dentofacial Orthop* 107:488–496.
- Chaudhuri RR, Henderson IR. 2012. The evolution of the *Escherichia coli* phylogeny. *Infect Genet Evol* 12:214–226.
- Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E. 2000. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl Environ Microbiol* 66:4555–4558.
- Clermont O, Christenson JK, Denamur E, Gordon DM. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylogroups. *Environ Microbiol Rep* 5:58–65.
- Cravioto A, Gross RJ, Scotland SM, Rowe B. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Curr Microbiol* 3:95–99.
- Croxen MA, Law RI, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26:822–880.
- Escobar-Páramo P, Clermont O, Blanc-Potard AB, Bui H, Le Bouguérec C, Denamur E. 2004. A specific genetic background is required for acquisition and expression of virulence factors in *Escherichia coli*. *Mol Biol Evol* 21:1085–1094.
- Fojt L, Strásák L, Vetterl V, Smarda J. 2004. Comparison of the low-frequency magnetic field effects on bacteria *Escherichia coli*, *Leclercia adecarboxylata* and *Staphylococcus aureus*. *Bioelectrochemistry* 63:337–341.
- Girón JA, Donnenberg MS, Martin WC, Jarvis KG, Kaper JB. 1993. Distribution of the bundle forming pilus structural gene (bfpA) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Infect Dis* 168:1037–1041.
- Girón JA, Ho AS, Schoolnik GK. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 254:710–713.
- Girón JA, Torres AG, Freter F, Kaper JB. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol* 44:361–379.
- Horiuchi S, Ishizaki Y, Okuno K, Aino T, Shoda M. 2002. Change in broth culture is associated with significant suppression of *Escherichia coli* death under high magnetic field. *Bioelectrochemistry* 57:139–144.
- Humphries RM, Armstrong GD. 2010. Sticky situation: localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to the small intestine epithelium. *Future Microbiol* 5:1645–1661.
- Humphries RM, Griener TP, Vogt SL, Mulvey GL, Raivio T, Donnenberg MS, Kitov PI, Surette M, Armstrong GD. 2010. N-acetyllactosamine-induced retraction of bundle-forming pili regulates virulence-associated gene expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol Microbiol* 76:1111–1126.
- Hünke S, Keller R, Müller VS. 2012. Signal integration by the Cpx-envelope stress system. *FEMS Microbiol Lett* 326:12–22.
- Ji W, Huang H, Deng A, Pan C. 2009. Effects of static magnetic fields on *Escherichia coli*. *Micron* 40:894–898.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2:123–140.
- Mellies JL, Barron AMS, Carmona AM. 2007. Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infect Immun* 75:4199–4210.
- Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11:142–201.
- Nguyen TH, Shamis Y, Croft RJ, Wood A, McIntosh RL, Crawford RJ, Ivanova EP. 2015. 18GHz electromagnetic field induces permeability of Gram-positive cocci. *Sci Rep* 5:10980.

- Okuno K, Tuchiya K, Aro T, Shoda M. 1993. Effect of super high magnetic field on the growth of *Escherichia coli* under various medium compositions and temperatures. *J Ferment Bioeng* 75:103–106.
- Pearson JS, Ghugta C, Wong Fok Lung T, Hartland EJ. 2016. The genetics of enteropathogenic *Escherichia coli* virulence. *Annu Rev Genet* 50:493–513.
- Potenza I, Ubaldi I, De Sanctis R, De Bellis R, Cucchiaroni I, Dachà M. 2004. Effects of a static magnetic field on cell growth and gene expression in *Escherichia coli*. *Mutat Res* 561:53–62.
- Raivio TL. 2005. Envelope stress responses and gram-negative bacterial pathogenesis. *Mol Microbiol* 56:1119–1128.
- Raivio TL. 2014. Everything old is new again: an update on current research on the Cpx envelope stress response. *Biochim Biophys Acta—Mol Cell Res* 1843:1529–1541.
- Rodrigues J, Scaletsky IC, Campos LC, Gomes TA, Whittam TS, Trabulsi LR. 1996. Clonal structure and virulence factors in strains of *Escherichia coli* of the classic serogroup O55. *Infect Immun* 64:2680–2686.
- Saito A, Kimura K, Misawa KAJ. 1997a. Influence of static magnetic field on infection of *Escherichia coli* to HeLa cells. *Biomed Eng-App Bas* 9:242–246.
- Saito A, Kimura K, Misawa KAJ. 1997b. Effect of Magnetic Field on adherence of pathogenic *Escherichia coli* isolated from urinary infection patients to HeLa cells. *Jpn J Med Electron Biol Eng* 35:20–26.
- She Z, Hu X, Zhao X, Ren Z, Ding G. 2009. FTIR investigation of the effects of ultra-strong static magnetic field on the secondary structures of protein in bacteria. *Infrared Phys Technol* 52:138–142.
- Tsuchiya K, Okuno K, Aro T, Tanaka K, Takahashi H, Shoda M. 1999. High magnetic field enhances stationary phase-specific transcription activity of *Escherichia coli*. *Bioelectrochem Bioenerg* 48:383–387.
- Versalovic J, Jorgensen JH, Funke G, Warnock DW, Landry ML, Carroll KC. 2011. *Manual of Clinical Microbiology*. Washington, DC: ASM Press. pp 1126–1127.
- Vogt SL, Nevešinjac AZ, Humphries RM, Donnenberg MS, Armstrong GD, Raivio TL. 2010. The Cpx envelope stress response both facilitates and inhibits elaboration of the enteropathogenic *Escherichia coli* bundle-forming pilus. *Mol Microbiol* 76:1095–1110.
- Vaupio-Varkila J, Schoolnik GK. 1991. Localized adherence by enteropathogenic *Escherichia coli* is an inducible phenotype associated with the expression of new outer membrane proteins. *J Exp Med* 174:1167–1177.