

00381
50



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTONOMA DE MEXICO

FACULTAD DE CIENCIAS
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO

“EFECTO DE LA TOXINA Pet DE *Escherichia coli* ENTEROAGREGATIVA (EA_ggEC) SOBRE EL ESQUELETO MEMBRANAL DE DIFERENTES CELULAS”

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADEMICO DE

DOCTOR EN CIENCIAS (BIOLOGIA)

P R E S E N T A:

JORGE MATEO VILLASECA FLORES

DIRECTOR DE TESIS:

DR. ALEJANDRO RAFAEL CRAVIOLO QUINTANA

MEXICO, D. F.

2002

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



**"EFECTO DE LA TOXINA Pet DE *Escherichia coli*
ENTEROAGREGATIVA (EAggEC) SOBRE EL ESQUELETO
MEMBRANAL DE DIFERENTES CELULAS"**

El presente trabajo se realizó en el Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el laboratorio de Patogenicidad Microbiana con la asesoría de los Doctores: Alejandro Rafael Cravioto Quintana y Carlos Alberto Eslava Campos.

México D. F. 2002

DEDICATORIA

**Dedico este trabajo con todo mi amor y cariño a mis hijos: Jorge, Elizabeth,
Patricia y Claudia.**

Con todo cariño y amor a mi esposa Maria Guadalupe.

Con todo cariño y respeto a mis padres Pablo y Delfina.

**A mis hermanos Sergio, Jaime, Silvia y Ana Maria,
por la amistad siempre que nos une.**

A la memoria de mi tía Angela por su consejos y comprensión.

**A los maestros de la querida Facultad de Ciencias de la UNAM, a la cual le debo
mi formación.**

México D. F. 2002.

AGRADECIMIENTOS I

Al comité evaluador:

Al Dr. Alejandro Rafael Cravioto Quintana, Director de la Facultad de Medicina, UNAM, le agradezco su apoyo en el dirección, planteamiento y realización de este trabajo.

Al Dr. Carlos Alberto Eslava Campos del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, mi agradecimiento por su apoyo, paciencia y dedicación para la realización de esta tesis.

Al Dr. Javier Francisco Torres López del Centro Medico Nacional Siglo XXI por sus comentarios y observaciones en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Guillermo Mendoza Hernández del Departamento de Bioquímica de la Facultad de Medicina, UNAM, por sus observaciones, comentarios y por su valiosa ayuda en la secuenciación de proteínas.

Al Dr. José Manuel Hernández Hernández del Centro de Investigación y Estudios Avanzados (CINVESTAV) del IPN, por sus observaciones y comentarios en la revisión de este trabajo.

Al Dr. Hipolito Angel Manjarrez Hernández del Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM, por sus sugerencias y comentarios en la revisión de este trabajo.

A la Dra. Cecilia Teresa Ximenez García del Departamento de Medicina Experimental, Facultad de Medicina, UNAM, por sus observaciones y sugerencias en la revisión del mismo.

AGRADECIMIENTOS II

Al Dr. James P. Nataro del Center for Vaccine Development, Department of Pediatrics, University of Maryland School of Medicine, Baltimore, Maryland, por sus observaciones, comentarios y por las estancias en su laboratorio.

Al la Q. I. Maritoña Ramírez Pérez por su apoyo técnico y gráfico en la escritura de la tesis, sin el cual no hubiera sido posible realizarla.

Al M. en C. José Molina López por su ayuda en el ensayo de toxicidad de proteínas bacterianas a células en cultivo.

Al Q. F. B. Ulises Hernández Chiñas por su apoyo técnico en la purificación y análisis de proteínas.

Al Dr. Fernando Navarro García del CINVESTAV del IPN, por las sugerencias y comentarios a este trabajo y por proporcionarme la clona productora de la proteína mutante Pet.

A la Q. F. B. Ruth Beatriz García Gámez por su apoyo técnico en cultivos celulares.

A Ing. Javier Calderón Albor, Jefe de Servicios y Productos de Información, Unidad de Información para la Investigación y el Posgrado de la Facultad de Medicina, por su apoyo en la impresión de este trabajo.

A todo el personal del Departamento de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM.

México D. F. 2002

INDICE

Resumen

	Pagina
Introducción	1
Características generales	2
Mecanismos de patogenicidad	2
<i>E. coli</i> Enterotoxigénica (ETEC)	3
<i>E. coli</i> Enteropatógena (EPEC)	5
<i>E. coli</i> Enterohemorrágica (EHEC)	9
<i>E. coli</i> Enteroinvasora (EIEC)	12
<i>E. coli</i> Enteroagregativa (EAaggEC)	14
Epidemiología	14
Manifestaciones clínicas	17
Estudios con voluntarios	17
Mecanismos de patogenicidad	18
Características histopatológicas de las lesiones inducidas por EAaggEC	20
Diagnostico	21
Modelos <i>In Vitro</i>	22
Toxinas	22

Planteamiento del problema	26
Objetivo general	28
Objetivos específicos	28
Hipótesis	29
Material y métodos	30
Bacterias	30
Obtención de proteínas	30
Purificación de proteínas	31
Cuantificación de proteínas totales	32
Electroforesis en geles de poliacrilamida con SDS	32
Secuencia amino-terminal	33
Cultivos celulares	34
Obtención de membranas celulares	35
Efecto de Pet sobre proteínas de membrana	35
Actividad de Pet sobre espectrina pura	36
Anticuerpos policlonales	36
Efecto de Pet sobre células HEp-2 en cultivo	37
Inmunoelectrotransferencia	38
Alteraciones celulares inducidas por Pet	39
Resultados	41
Purificación y secuencia N-terminal de la toxina Pet	41

Actividad de Pet sobre membranas de eritrocitos	41
Participación del motivo de serina proteasa de Pet en la degradación de espectrina	43
Efecto de Pet sobre la membrana de células epiteliales HEp-2	44
Actividad de Pet sobre células epiteliales viables en suspensión	44
Alteraciones inducidas por Pet sobre la membrana de células HEp-2	45
Discusión	48
Referencias	59
Apéndice	Número
Cuadros	1 - 3
Figuras	1 - 17

RESUMEN

Escherichia coli enteroagregativa (EAggEC) es un patógeno intestinal que causa diarrea persistente y diarrea con sangre; principalmente en niños de países en desarrollo. La adherencia y la producción de toxinas se consideran entre los más importantes mecanismos de patogenicidad de la bacteria. Pet (Plasmid-encoded toxin) es una toxina producida por cepas EAggEC, que ha sido involucrada en el daño al intestino. Esta toxina posee un motivo de serina proteasa y muestra alta homología con la familia de proteínas autotransportadoras de clase tipo V, de la subfamilia SPATE ("serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*"); secretadas por diferentes bacterias patógenas.

Aunque diversos estudios han mostrado que tanto las cepas EAggEC productoras de Pet, así como la toxina purificada, inducen rearrreglos del citoesqueleto e inducen efecto enterotóxico y citotóxico, los procesos intracelulares involucrados no han sido dilucidados.

En este trabajo se muestra como las moléculas de espectrina y fodrina (espectrina no eritroide), que forman parte del citoesqueleto membranal, son degradadas por Pet. La toxina Pet se obtuvo del sobrenadante de cultivo de la clona HB101(pCEF1) (*Escherichia coli* HB101 que lleva el plásmido pCEF1, el cual porta el gen *pet*). La proteína se purificó por precipitación con sales y cromatografía en FPLC (Mono S HR 5/5), y la secuencia de aminoácidos del extremo amino-terminal resultó similar a la deducida del gen.

Para la caracterización de la actividad de Pet, sobre el esqueleto membranal de la células, se utilizaron tanto membranas celulares aisladas como células vivas. El efecto de Pet sobre membranas aisladas de células rojas sanguíneas de carnero, analizado por SDS-PAGE, mostró degradación de las cadenas α - y β - de la molécula de

espectrina. El efecto observado fue dosis- y tiempo-dependiente, como producto del rompimiento de la molécula se generó una fracción proteica de 120 kDa. La identidad de la molécula de espectrina, así como la del subproducto de 120 kDa, se confirmó mediante un ensayo de inmunotransferencia con anticuerpos específicos contra las cadenas de α - y β -espectrina. El efecto de degradación sobre la espectrina, inducido por Pet, se observó en eritrocitos de diferentes especies. Al evaluar la actividad de Pet sobre membranas purificadas de células HEp-2, HeLa, CaCo y Vero, se observó degradación de la fodrina, el equivalente de la espectrina en células epiteliales. El efecto de Pet sobre componentes del citoesqueleto se analizó en células vivas, los resultados obtenidos confirmaron la degradación de la fodrina hasta las 36 h de incubación. Por microscopía de fluorescencia, utilizando anticuerpos anti-fodrina marcados con fluoresceína, se demostró que las células tratadas con toxina sufrieron cambios en su morfología y distribución irregular de la fluorescencia. Además, se evaluó la participación del motivo de serina proteasa en la actividad de Pet empleando PMSF, el resultado obtenido confirmó que el sitio activo de Pet se ubica en dicho motivo. Una mutante sitio-dirigido de Pet (cambio la serina 260 por una isoleucina) no indujo los efectos enterotóxicos y citotóxicos observados con Pet, ésta pierde la capacidad para degradar la espectrina y la fodrina, lo que confirma que el motivo de serina proteasa es el sitio activo de Pet. El efecto inducido por Pet sobre componentes del citoesqueleto de la célula y el daño celular consecuente, sugieren una actividad semejante al de las proteasas caspasas y calpainas, que están relacionadas con apoptosis, evento definido como muerte celular programada.

INTRODUCCION

Escherichia coli (*E. coli*) es un microorganismo anaerobio facultativo, predominante de la microbiota del colon humano (1). La bacteria coloniza el tracto digestivo dentro de las primeras horas de vida y se establece una asociación benéfica con su hospedero. Theodore Escherich, bacteriólogo alemán, fue el primero en aislar la bacteria a partir de heces de un infante y la llamó *Bacterium coli commune*. *E. coli* es un microorganismo inocuo cuando está confinado al lumen intestinal; su hábitat natural. Sin embargo, cuando el huésped se encuentra en estados de debilidad o inmunosupresión, o cuando la bacteria sale del tracto gastrointestinal y coloniza otros órganos, pueden causar enfermedad. Es importante señalar que en el proceso evolutivo de *E. coli*, en el cual ha jugado un papel importante la transferencia horizontal de información genética, han surgido clones de la bacteria que tienen la capacidad para causar un amplio espectro de enfermedades. Las infecciones por *E. coli* puede ser limitadas a la superficie de las mucosas o pueden presentarse en diferentes órganos y tejidos. Tres síndromes clínicos generales resultan inherentemente de la infección por la bacteria: (i) infección del tracto urinario, (ii) septicemia/meningitis y (iii) enfermedad diarreica. La participación *E. coli* como patógeno intestinal (1) fue reconocida hasta la década de los años cincuenta del siglo veinte, más de medio siglo después de su aislamiento e identificación inicial.

En el manual Bergey's incluye a este microorganismo en la familia *Enterobacteriaceae*, dentro del género *Escherichia*. Aunque *E. coli* es la especie tipo, actualmente se conocen otras cuatro: *E. harmannii*, *E. blattae*, *E. vulneris* y *E. fergusonii* (2). Mediante la técnica de hibridación del DNA se ha demostrado que el género *Shigella* está íntimamente relacionado con *E. coli*, pero la separación entre las dos especies se mantiene por razones prácticas (2).

CARACTERISTICAS GENERALES

E. coli es un bacilo corto, Gram negativo, no esporulado, generalmente con flagelos peritricos y fimbrias. Frecuentemente presenta una cápsula, por lo que algunas cepas producen colonias mucoides. Es un anaerobio facultativo, crece en medios de cultivo simples y sintéticos, donde utiliza glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía. Fermenta la glucosa para dar ácido y gas. Los cultivos en medio líquido de cepas lisas producen una turbiedad uniforme, mientras que las cepas rugosas presentan un sobrenadante claro con un depósito granular de crecimiento. Sobre medios sólidos, las colonias son circulares y lisas, con borde bien definido. Al crecer la bacteria en un medio con eritrocitos lavados se observa la producción de α - o β -hemólisis, relacionadas con la producción de hemolisinas (3).

E. coli es una especie que muestra gran diversidad antigénica, esto ha permitido utilizar diferentes antígenos para su tipificación. La caracterización serológica de la bacteria se realiza analizando 175 antígenos somáticos (O) y 56 flagelares (H). Mediante este procedimiento se pudieron establecer inicialmente los grupos patógenos asociado con la generación de enfermedad (4-7). Otros métodos para caracterizar la bacteria son: tipificación por fagos (8), colicinas (9), antígenos fimbriales (F) y capsulares (K) (10).

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

A semejanza de muchos patógenos de mucosas, *E. coli*, causante de enfermedad en el intestino, sigue una secuencia de infección, y sus mecanismos básicos de patogenicidad son de tres tipos: 1) Adherencia, ésta permite que la bacteria pueda acercarse, pegarse y colonizar el epitelio de ciertas áreas del

intestino; 2) Producción de proteínas bacterianas (toxinas); éstas son liberadas una vez que la bacteria ha colonizado el intestino. Dependiendo de las características de éstas, su efecto pueden ser la estimulación de secreción de agua y electrólitos (enterotoxinas) o la destrucción celular (citotoxinas), entre otros; 3) Invasión, éste mecanismo permite la reproducción bacteriana dentro del citoplasma de las células epiteliales del intestino, con esta propiedad la bacteria evade los mecanismos de protección del hospedero. La participación de cada uno de estos eventos celulares conducen al daño de órganos y/o tejidos del hospedero (1).

Los factores de virulencia que poseen las cepas de *E. coli* causantes de diarrea en conjunto con su distribución, epidemiología y los síndromes clínicos que ocasionan han permitido clasificarlas en la actualidad (cuadro 1) en los grupos:, Enterotoxigénico (ETEC), enteropatógeno (EPEC), enterohemorrágico (EHEC), enteroinvasor (EIEC), y enteroagregativo (EAaggEC) (11-13).

Las islas de patogenicidad (pathogenicity islands, PAIs) son elementos genéticos inestables, adquiridos por transferencia genética lateral, que contribuyen a la virulencia de las bacterias patógenas. Estas se asocian con genes de RNA de transferencia o secuencias de inserción y, además, contienen genes con movilidad potencial tales como genes de trasposasa e integrasa. Diferentes islas de patogenicidad se han identificado en los grupos de *E. coli* patógenas (14).

***E. coli* ENTEROTOXIGENICA (ETEC)**

Las cepas ETEC elaboran al menos uno de los dos grupos de enterotoxinas: toxina termolábil (LT) y toxina termoestable (ST). Estas cepas fueron primero reconocidas como causantes de enfermedad diarreica letal en cerdos recién nacidos. Las cepas ETEC son causa frecuente de diarrea severa en lactantes en

países en desarrollo (15-17), así como la causa más común de diarrea en individuos de países industrializados que viajan a zonas menos desarrolladas del mundo; síndrome conocido como diarrea del viajero (18).

La toxina termolábil es una proteína dimerica de 86.5 kiloDaltones (kDa) de peso molecular, compuesta por dos subunidades conocidas como A y B; la subunidad B es un pentámero que tiene la propiedad de unirse a las células del epitelio intestinal a través de receptores celulares (gangliósido GM1) de superficie (19). La subunidad A posee la actividad enzimática y tiene como función inducir una adenosín difosfato ribosilación (ADP ribosilación), que da lugar al incremento en los niveles de adenosín monofosfato cíclico (cAMP) intracelular, en consecuencia, la proteína cinasa A dependiente de cAMP es activada, induciéndose la fosforilación de canales de cloro localizados en la membrana apical de células epiteliales. Los canales de cloro mayormente activados por LT son CFTR (20). El resultado es la estimulación de la secreción de iones de cloro (Cl⁻) de las células de las criptas e inhibición de absorción de NaCl por las células de la punta de las vellosidades intestinales. El incremento de iones en el lumen drena agua pasivamente a través de la vía paracelular, resultando en una diarrea osmótica. Un mecanismo alternativo, por el cual LT puede actuar, involucra las prostaglandinas de las series E (PGE₁ y PGE₂) y el factor activador de las plaquetas. La síntesis y liberación de metabolitos del ácido araquidónico, tales como las prostaglandinas y leucotrienos, también contribuyen a estimular el transporte de electrolitos y la motilidad intestinal. Un mecanismo alternativo secundario involucra el sistema nervioso entérico (SNE), el cual regula la motilidad intestinal y la secreción de iones. La serotonina y el polipéptido intestinal vasoactivo estimulan la secreción de las células epiteliales a través del SNE (21). Otro mecanismo que se ha descrito, relacionado con LT, puede involucrar una respuesta inflamatoria intestinal, por estimulación de citocinas, que activan el sistema inmune entérico y la generación

potencial de metabolitos del ácido araquidónico, que de manera consecuente estimulen la secreción (22).

La enterotoxina termoestable (ST) es un péptido de bajo peso molecular, entre 1 a 6 kDa, no inmunogénicas, que puede ser o no solubles en metanol y como su nombre lo sugiere, resistentes al calentamiento (23-24). ST incrementa los niveles de guanosín monofosfato cíclico (cGMP) al estimular la enzima guanilato ciclasa (20, 24-25). Dicha actividad tiende a estimular la secreción de cloro y/o inhibición de la absorción de cloruro de sodio, resultando en una secreción del fluido intestinal. La activación de canales CFTR conduce a la secreción de iones Cl⁻ dentro del lumen intestinal. La respuesta secretoria a ST puede también involucrar la liberación de fosfatidilinositol y diacilglicerol, activación de proteína cinasa C (PKC), elevación de los niveles de calcio intracelular y el rearrreglo de microfilamentos como la F-actina (20).

EPEC producen proteínas fimbriadas con las cuales se adhiere a receptores celulares específicos. Hasta la fecha, se han descrito cuando menos 15 diferentes tipos de estos factores adhesivos, tales como los CFAs (26-27) y el Longus (28). Al igual que las enterotoxinas, la producción de los factores de adherencia en EPEC están codificados en genes de plásmidos (26-30).

***E. coli* ENTEROPATOGENA (EPEC)**

Cravioto y col. (31) observaron que diferentes cepas de *E. coli* tenían la propiedad de adherirse a células HEp-2 en cultivo. Posteriormente, Scaletsky y col. (32) y Nataro y col. (33) reportaron la existencia de diferentes patrones de adherencia, definidos como: 1) Localizada, caracterizada por la formación de microcolonias en la superficie celular; 2) Difusa, cuando las bacterias se adhieren

en toda la superficie celular y 3) Agregativa, en ésta las bacterias forman cúmulos, con apariencia de ladrillos apilados tanto en la superficie celular, como en el vidrio de la preparación (32-33).

Las cepas EPEC se adhieren a las células HEp-2 en cultivo en un patrón de adherencia localizado (31). La observación de necropsias de niños fallecidos a consecuencia de diarrea severa, causada por estas cepas, muestra la destrucción del epitelio del intestino delgado (34). El análisis por microscopía electrónica, de estas lesiones, muestra como las cepas EPEC se adhieren a la membrana del enterocito de manera íntima, observándose, además, destrucción importante de las vellosidades intestinales (35).

Knutton y col. (35) propusieron que la adherencia de tipo localizado de las cepas EPEC tiene dos fases: una inicial mediada por adhesinas de tipo fimbriado, que permiten a la bacteria acercarse a sus receptores celulares y una segunda fase de adherencia íntima. Esta última se relaciona con la destrucción del epitelio, pérdida de las microvellosidades y la formación de imágenes en pedestal.

Girón y col. (36) encontraron que cuando una cepa EPEC se crecía repetidas veces en agar sangre, ésta expresaba haces de fimbrias parecidos a los que elaboran *V. cholerae* y *Neisseria gonorrhoeae*. La presencia de estas estructuras se relaciona con la capacidad de cepas EPEC para adherirse en forma localizada y para causar diarrea en voluntarios humanos (37).

Diferentes estudios señalan que las cepas de *E. coli*, con adherencia de tipo localizado, se aíslan significativamente con mayor frecuencia de niños con diarrea secretora aguda (15, 38-39).

El factor involucrado en la adherencia localizada es una estructura fimbriada de 7 nm de diámetro, la cual tiende a agregarse y formar un haz, por lo que se sugirió el nombre pilis formadores de haces ("bundle-forming pilus", BFP) (40). La codificación genética para la producción de estos haces está controlada por genes presentes en un plásmido de 60 MDa, designado: plásmido que contiene el factor de adherencia de EPEC (EPEC adherence factor, EAF) (37, 40).

Un grupo de 13 genes localizados en el plásmido EAF es requerido para la expresión y ensamblaje del BFP (41-42). La expresión y ensamblaje también requiere un elemento regulador global de patogenicidad de EPEC llamado *Per* o *BfpTwv*, y el gen cromosomal *dsbA*, que codifica para una enzima que contribuye a la formación de puentes disulfuro (43).

Knutton y col. (44) y Baldwin y col. (45) han señalado que la adherencia íntima, de las cepas EPEC, da lugar a que se polimerice la actina del citoesqueleto, como respuesta a un incremento en los niveles intracelulares de calcio y a la activación de PKC. El proceso de adherencia íntima entre la bacteria y la membrana de las células del epitelio intestinal, seguida de la destrucción de las microvellosidades con alteración del citoesqueleto en el sitio de unión de la bacteria, han sido denominados adherencia y destrucción (attaching-and-effacing, A/E) (46-48). La composición de la lesión A/E contiene altas concentraciones de filamentos de actina (F-actina), fenómeno que condujo al desarrollo del ensayo de la tinción de actina fluorescente (FAS). En este ensayo, la faloidina marcada con isotiocianato de fluoresceína (FITC) combina específicamente a los filamentos de actina de células epiteliales cultivadas, directamente debajo del sitio de adherencia de las bacterias (44). En adición a la F-actina, la composición de la lesión A/E incluye otros componentes del citoesqueleto tales como α -actinina, talina y la cadena ligera de la miosina (49).

La adherencia de EPEC a las células epiteliales induce una variedad de vías de transducción de señales en las células eucariontes. Los genes responsables para esta actividad de señales de transducción están codificados sobre una isla de patogenicidad de 3.5 kb, en el cromosoma bacteriano, llamada locus de destrucción del enterocito (LEE, locus of enterocyte effacement), el cual codifica para un sistema de secreción tipo III (*sep* y *esc*), para múltiples proteínas que son secretadas, así como para la adhesina bacteriana llamada intimina y el receptor para la misma intimina que recibe el nombre de Tir (receptor de intimina traslocado) (50).

La fase íntima de adherencia, posterior al esfacelamiento de las microvellosidades intestinales, está relacionada con la producción de la intimina, proteína de membrana externa de 94 kDa (51-53). La producción de esta proteína está controlada genéticamente por el locus *eae* (*E. coli* attaching and effacing), dentro de isla de patogenicidad LEE.

Tir, el receptor para la intimina de EPEC, es una proteína de membrana de 90 kDa (Hp 90) se expresa sobre la superficie de las células epiteliales. El gen que codifica para esta proteína también se encuentra localizado en la isla de patogenicidad LEE de EPEC. Después de ser sintetizada por la bacteria, Tir es traslocada a la célula epitelial a través del sistema de secreción tipo III, es necesario que esté fosforilada en residuos de tirosina para funcionar como receptor (54).

Al menos cuatro proteínas son secretadas extracelularmente por EPEC, tres son esenciales para el evento histológico de A/E. Las proteínas que participan en el proceso de transducción de señales, esenciales para el fenotipo A/E son : EspA (25 kDa), EspB (38 kDa) y EspD (40 kDa) (1, 50, 54). La cuarta proteína llamada EspC (110 kDa) muestra homología con otras proteínas secretadas del grupo de autotransportadoras, de tipo V, de la subfamilia SPATE (serine protease

autotransporters of *Enterobacteriaceae*), ésta no participa en el proceso de transducción de señales y su función principal no ha sido dilucidada aún (55).

Para la expresión del locus LEE se requiere de ciertos genes presentes en el plásmido EAF, el cual tiene la información que codifica para la adherencia localizada y para la producción de haces de fimbrias en algunas cepas EPEC (47-48, 51, 53)

Los cambios bioquímicos relacionados con estos procesos son los que probablemente inducen a la célula intestinal a secretar agua y electrólitos (cloro y potasio); al espacio intraluminal. El efecto fisiológico secundario a estas alteraciones, así como la deficiente absorción de líquidos por la falta de microvellosidades en segmentos importantes del intestino, son los principales responsables del cuadro de diarrea.

***E. coli* ENTEROHEMORRAGICA (EHEC)**

EHEC incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características clínicas, epidemiológicas y patogénicas del serotipo O157:H7; considerado como prototipo de este grupo (11). EHEC se asocia con la etiopatogenia de la colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico (56). Las cepas responsables de estos cuadros tienen la capacidad para elaborar una o más citotoxinas y son portadoras de un plásmido (50-70 MDa). En modelos animales inducen distintas lesiones en la mucosa intestinal caracterizadas por el daño de A/E; semejante al causado por las cepas EPEC (46-48, 56).

Al igual que en EPEC, en cepas de *E. coli* O157:H7, está presente la isla de patogenicidad LEE de 35 kb, la cual confiere el fenotipo A/E. Esta isla de

patogenicidad contiene genes que codifican para la intimina Tir, para las proteínas secretadas EspA, EspB y EspD, y para una vía de secreción tipo III. Se ha identificado un locus cromosomal llamado *eae*, cuya expresión es regulada por genes presentes en el plásmido. Este locus codifica para la proteína de membrana externa llamada intimina, la cual confiere a la bacteria la capacidad para adherirse e inducir el efecto de destrucción de las microvellosidades (53, 47-48). El receptor de la intimina es la proteína denominada Tir, semejante al encontrado en EPEC. También, se ha identificado una serina proteasa extracelular, llamada EspP (57), la cual está codificada por un plásmido de EHEC O157:H7. El gen *espP* consiste de un fragmento de lectura abierto de 39,000 bp que codifica para una proteína de 1,300 aminoácidos. EspP es sintetizada como un largo precursor, el cual es procesado en el N- y C-terminal durante la secreción. Esta proteína puede ser agrupada dentro de la familia de autotransportadores tipo V. La secuencia de aminoácidos deducida del gen *espP* muestra homología con varias proteínas secretadas o proteínas expuestas en la superficie de bacterias patógenas, en particular EspC de EPEC y la proteasa de IgA1 de *Neisseria ssp.* y *Haemophilus influenzae*. EspP está ampliamente distribuida en cepas EHEC de los serogrupos O157 y O26. El análisis funcional demuestra que EspP es una proteasa capaz de romper pepsina A y el factor de coagulación V humano. La degradación del factor V puede contribuir a la hemorragia de la mucosa observada en pacientes con colitis hemorrágica.

Las citotoxinas que produce EHEC, por sus características antigénicas y por su actividad sobre cultivos celulares; reciben dos diferentes denominaciones aceptadas en la actualidad: citotoxina semejante a la de Shiga (SLT), por la característica que tiene una de las variedades de cruzar antigénicamente con la toxina de *Shigella dysenteriae* tipo 1 y el término de verotoxina (VT), por su efecto citotóxico sobre monocapas de células Vero.

Se conocen tres tipos antigénicos de las citotoxinas, dos de ellas afectan específicamente a humanos, refiriéndose como VT1 o SLT-I y VT2 o SLT-II (58), y una variedad antigénica de VT2, que afecta a animales denominada VTe o SLT-IIv (59). Estas toxinas tienen estructura y mecanismo de acción similar, son proteínas compuestas por dos subunidades. La conocida como A tiene la función enzimática y se encuentra unida al oligómero B, que es un pentámero que tiene como función específica: unirse a receptores presentes en la superficie celular (60-61). La actividad específica de estas toxinas consiste en inhibir la síntesis de proteínas a través de interferir con la unión del aminoacil t-RNA con la subunidad 60S del ribosoma (62).

Scotland y col. (63) inicialmente y posteriormente otros investigadores (64-65), observaron que los genes que controlan la expresión de la citotoxina era mediada por fagos en estado lisogénico, integrados al cromosoma bacteriano.

Diferentes serotipos de EHEC se han relacionado con la etiología de la diarrea esporádica en adultos, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico y púrpura trombocitopénica (66-69). Estos padecimientos se han observado con mayor frecuencia en países con climas templados como son: Estados Unidos, Canadá, Inglaterra, Argentina, Australia y Alemania; entre otros (66-70). Los serogrupos involucrados son diversos, encontrándose más frecuentemente: O26, O111, O121, O145 y particularmente O157 (66-71).

En México, Cravioto y col. (69) encontraron que este tipo de microorganismos sólo se relacionan con diarrea de tipo secretor, leve o moderada. Los serogrupos identificados en este estudio, incluyen además de algunos de los observados en otras partes del mundo, otros como O119 y O128.

***E. coli* ENTEROINVASORA (EIEC)**

Las cepas EIEC tienen características bioquímicas, genéticas y patogenéticas relacionadas con las del género *Shigella*, agente etiológico de la disentería bacilar. A semejanza del género *Shigella*, las cepas EIEC son generalmente lisina descarboxilasa negativas, no móviles y no fermentadores de la lactosa (72).

Estudios basados en el análisis de híbridos de una cepa de *E. coli* K12 con *Shigella flexneri* (*S. flexneri*) 2a, demostraron que, por lo menos, dos regiones del cromosoma de estas bacterias son indispensables para la virulencia: una es el locus *kcp*, que se relaciona con la capacidad de *S. flexneri* para producir queratoconjuntivitis y otra es una región cercana al operón de la histidina, que codifican para los antígenos somáticos O (73).

Para que estas bacterias invadan y se multipliquen en el interior de las células, se requiere que posean un lipopolisacárido liso, ya que las cepas rugosas son incapaces de producir queratoconjuntivitis en la cornea de cobayo (Prueba de Sereny) (74).

Diversos estudios han concluido que, además de los genes cromosomales involucrados en la virulencia de estas bacterias, son necesarios locus extracromosomales (75-76). Se ha podido establecer que un plásmido de 140 MDa presente en las cepas de EIEC y de *Shigella*, es indispensable junto con los genes cromosomales antes señalados para conferir el fenotipo invasivo a estos microorganismos.

En *Shigella spp.*, cuatro distintos elementos semejantes a islas de patogenicidad (pathogenicity islands-like, PAI-like) han sido identificados (77). Esos incluyen el grupo de genes de naturaleza plasmídica *mxi-spa*, la recientemente

descrita isla de patogenicidad SHI-2 (SHI-2 PAI), que codifica para el sistema aerobactina de captación de hierro, un elemento semejante a isla de patogenicidad (PAI-like), que codifica múltiple resistencia a antibióticos en *Shigella flexneri* 2a y la isla de patogenicidad *she* (*she* PAI) de *S. flexneri* 2a (77). A semejanza de otras islas de patogenicidad, *she* PAI es un locus cromosomal inestable, que se deleta espontáneamente a una frecuencia de 10^{-5} - 10^{-6} . Esta isla lleva un número de genes con funciones establecidas (putativos) en virulencia bacteriana. El gen *she* o *pic* ("protein involved in intestinal colonization", presente también en cromosoma de *E. coli* enteroagregativa), codifica para una proteasa autotransportadora tipo V, de la subfamilia SPATE, con actividad de mucinasa y hemaglutinina; los genes *set1A* y *set1B* que se encuentran sobrelapados sobre el gene *she* o *pic*, codifican las dos subunidades de la enterotoxina ShET1; el gen *sigA* codifica para otra proteasa, la cual presenta alta homología con el gen *pet* ("plasmid-encoded toxin", de origen plasmídico en *E. coli* enteroagregativa), también de la subfamilia SPATE. La proteína SigA posee actividad citopática, que contribuye a la acumulación de fluidos intestinales (77).

La participación patogénica de la toxina de Shiga, en el caso de *Shigella dysenteriae* (*S. dysenteriae*) tipo 1, o toxinas semejantes en el caso de *S. flexneri* y EIEC, no es muy clara. Estudios histológicos realizados por Hale y Formal (78) mostraron que las cepas de *Shigella* se establecen en las células epiteliales, causando destrucción de la mucosa y la formación de abscesos. Estas alteraciones fueron atribuidas a la acción de las citotoxinas, cuya actividad específica es la inhibición de la síntesis proteica (79). Sin embargo, San-Sonetti y col. (80), al realizar estudios cinéticos de crecimiento intracelular, demostraron que cepas de *E. coli* que tenían el plásmido de 140 MDa, pero que no producían la toxina semejante a la de *Shiga*, presentaron un crecimiento mucho mayor que una cepa altamente productora de esta toxina.

Estudios epidemiológicos, realizados por Cravioto y col. (15, 81), muestran que las cepas EIEC se aíslan con poca frecuencia de pacientes con diarrea y se identifican preferentemente después del sexto mes de vida.

***E. coli* ENTEROAGREGATIVA (EAggEC)**

Las cepas EAggEC derivan su nombre por la forma de adherencia que presenta en células HEp-2 en cultivo (32-33). Esta adherencia se caracteriza por la formación de agregados bacterianos, con una apariencia de ladrillos apilados ("stacked brick"), que se observa tanto sobre las células como en la superficie del vidrio de la preparación (figura 1). La adherencia agregativa está relacionada con la presencia de un plásmido de 65 MDa (33). Este patrón de adherencia fue descrito por Scaletsky y col. (32) y por Nataro y col. (33). Mathewson y col. (82) observaron que cepas de *E. coli* que se adherían a células HEp-2, pero que no pertenecían a los serotipos de EPEC, se asociaron con enfermedad diarreica en adultos que viajaban a México. Estos investigadores demostraron que una de las cepas era capaz de causar diarrea en voluntarios adultos (83). En dicho estudio estas cepas de *E. coli* diarrogénicas que se adherían a células HEp-2, pero con serotipos diferentes de EPEC, fueron nombradas "*E. coli* enteroadherentes". Vial y col. (84) demostraron que el prototipo de *E. coli* enteroadherente reportado por Mathewson y col. presentaban el fenotipo agregativo.

EPIDEMIOLOGIA

El grupo EAggEC ha adquirido relevancia en los últimos años por considerársele responsable de cuadros de diarrea persistente (duración de 14 o más días) en niños de diversas regiones geográficas, principalmente de países en

desarrollo (12, 85-89). Diversos estudios epidemiológicos han demostrado que existe asociación entre el aislamiento de EAggEC y la presencia de diarrea, comparado con lo observado en individuos sanos ($p < 0.05$). Bhan y col. (86) en un estudio realizado en niños de 3 años de edad y menores, de una comunidad rural en Anapur-Palla, al Norte de la India, reportó la asociación entre EAggEC y diarrea persistente. En dicho estudio se encontró que en 18/61 (30%) niños con diarrea, contra 20/201 (10%) de asintomáticos, se aislaron cepas EAggEC. El mismo investigador (90), en 1989, realizó en Nueva Delhi un estudio sobre diarrea persistente en niños de 2 años y menores, en éste encontró en 18/92 (20%) de los casos y en 6/92 (7%) de los controles cepas EAggEC.

Un estudio realizado en Fortaleza, Brasil (91), reportó que en niños menores de 5 años con cuadros de diarrea se aislaba con mayor frecuencia cepas EAggEC (20%) que de niños asintomáticos (5%).

En México, Cravioto y col. (39) en un estudio realizado en el Estado de Morelos, observaron una estrecha asociación entre el aislamiento de cepas EAggEC y la presencia de diarrea persistente en niños de 2 años o menos.

Otros estudios epidemiológicos que demuestran la asociación de EAggEC y diarrea han sido realizados en países como Bangladesh (92), India (93-95), Brasil (96-97), Irán (98), y Venezuela (99).

Sin embargo, Huppertz y col. (100) en Wurzburg, Alemania, realizaron la primera descripción de casos de diarrea asociados con el aislamiento de EAggEC en países industrializados. Este estudio se realizó en niños de 16 años y menores, en los cuales se aisló EAggEC en 16/798 (2%) de niños con diarrea persistente, contra ningún aislamiento de 580 niños asintomáticos.

El primer brote de diarrea asociado con EAggEC fue reportado en un cunero en Nis, Serbia (101). En éste, 19 niños fueron infectados por la bacteria, presentando un cuadro grave de diarrea. Smith y col. (102) describieron un brote de diarrea acuosa asociado a EAggEC, en 53 adultos, que ingirieron agua de la red en un Centro de Conferencias en el Reino Unido. Pai y col. (103) reportaron un brote de diarrea acuosa, que afectó a niños y adultos, en el Sur de la India, la cual se relacionó con EAggEC.

En México, Eslava y col. (104) reportaron dos brotes de diarrea asociados a la infección por cepas EAggEC, en niños internados en la sala de nutrición del Instituto Nacional de Pediatría. Durante estos brotes 5 niños afectados murieron a consecuencia de la diarrea inducida por dos diferentes cepas de EAggEC.

Uno de los brotes más severos, asociados a la infección por EAggEC, fue reportado por Itoh y col. (105) en Japón. En éste, 2,697 niños de 16 escuelas de Gifu (Japón), se vieron afectados después del consumo de un desayuno escolar contaminado con la bacteria.

La caracterización de EAggEC, mediante tipificación serológica, no ha resultado práctica debido a que existe una gran heterogeneidad en los serotipos de las cepas de EAggEC, algunas de éstas presentan un antígeno somático diferente a los que conforman el esquema de tipificación de *E. coli* (O?). Las cepas que se han logrado tipificar incluyen una gran variedad de serogrupos, de los cuales los más frecuentemente identificados son: O44, O111ab, O86 y O126 (106-107). Un serotipo que se ha considerado de los más comunes es O44:H18 (108). Al respecto, Smith y col. (108) realizaron un estudio, en el que después de analizar 113 cepas con el fenotipo de adherencia agregativa, aisladas de casos clínicos, de diversas regiones, encontraron que todos pertenecían al mismo serotipo O44:H18. También, se ha

encontrado en diferentes estudios (104-105) que cepas con el serotipo O?:H10 presentan el patrón de adherencia agregativa.

MANIFESTACIONES CLINICAS

Las características clínicas de la infección intestinal por EAggEC muestran una diarrea secretora acuosa con moco, fiebre en bajo grado y en ocasiones vómito (86, 94). La presencia de sangre en heces se ha reportado en un poco más de la tercera parte de pacientes con diarrea asociada a EAggEC (39). Voluntarios infectados con la cepa EAggEC O42 (O44:H18) presentaron diarrea escasa, con moco, sin sangre ni leucocitos fecales ocultos; en este estudio se observó que todos los voluntarios permanecieron afebriles. Durante este estudio se observó que el periodo de incubación de la bacteria era de 8-18 horas (109). Por otro lado, en un estudio en Anapur-Palla, en el norte de la India (86), realizado con niños menores de 3 años, se encontró que la duración de la diarrea asociada con EAggEC era de 17 días. Recientemente, Steiner y col. (110) observaron que un porcentaje elevado de los pacientes infectados con cepas EAggEC, que estudiaron, presentaban lactoferrina fecal (un indicador sensitivo de leucocitos fecales) y niveles elevados de IL-8 en las heces. Lo anterior sugiere que la infección por EAggEC puede ser acompañado por una forma sutil de inflamación de la mucosa.

ESTUDIOS CON VOLUNTARIOS

Mathewson y col. (83) desafiaron voluntarios adultos por vía oral con cepas EAggEC, aisladas de un cuadro clínico, con lo cual se demostró que la cepa JM221 era capaz de producir diarrea. En otro estudio, Nataro y col. (111) inocularon 19 voluntarios adultos por vía oral, con la cepa EAggEC 17-2, a una dosis de 10^{10}

unidades formadoras de colonias (cfu). En este estudio se observó que sólo uno de los voluntarios presentaba diarrea. En otro ensayo, realizado por el mismo Nataro y col. (109), se inocularon cuatro grupos de 5 voluntarios adultos, con una de 4 diferentes cepas EAggEC. Los resultados de este estudio mostraron que sólo una de las cepas, designada como JPN10 (O42), causó diarrea en 3 de 5 adultos.

MECANISMOS DE PATOGENICIDAD

Para explicar el mecanismo por el cual EAggEC causa diarrea, se ha recurrido a la observación de pacientes infectados, se han realizado estudios con voluntarios, se han utilizado modelos con animales y se han realizado ensayos *in vitro*. Con los resultados obtenidos, se ha propuesto un modelo hipotético que comprende tres estados (1, 112). El I, involucra la adherencia inicial de la bacteria a la mucosa intestinal y/o a la capa de moco, a través de estructuras fimbriadas. En la etapa II, se plantea la participación de un proceso que incrementa la producción de moco, el depósito de una capa gruesa de moco en la que está incrustada la bacteria, formando una biopelícula. El estado III, propone la elaboración de toxinas y/o la inflamación (sugerido por las evidencias histológicas y moleculares), lo cual conduce al daño de la mucosa y a la secreción intestinal. Aunque varios factores de patogenicidad han sido propuestos, para explicar el daño intestinal producido por EAggEC, hasta el momento no existe nada concreto al respecto.

Considerando los diferentes factores de patogenicidad que se han identificados y utilizando el modelo de 3 etapas propuesto, uno de los elementos importantes en la patogénesis de EAggEC es la adherencia. La adherencia de tipo agregativo ha sido asociada con un plásmido de 65 MDa (33, 84), éste codifica tanto para un tipo de haces de fimbrias llamada AAF/1, de 2 a 3 nm de diámetro (113), como para las fimbrias AAF/II (114), que son diferente en sus características

antigénicas, morfológicas y de codificación genética con la fimbria AAF/1. En la cepa EAggEC 17-2, AAF/I media la adherencia a células HEp-2, así como hemaglutinación de eritrocitos humanos (113). Los genes para esta fimbria están organizados en dos regiones sobre el plásmido de 65 MDa, separados por un fragmento 9 Kb de DNA (115-116). Los genes de la región 1 codifican para el componente estructural de la fimbria, el análisis de la secuencia de nucleótidos sugiere que AAF/I está relacionado con la familia de adhesinas Dr (115). La región 2 codifica para un activador transcripcional de la expresión de AAF/I (AggR), éste es miembro de la familia de proteínas Ara C, que combinan DNA (116). AAF/I son fimbrias formadoras de haces pero que no muestran homología con miembros de la familia de tipo 4 (116).

Se ha observado que la fimbria AAF/II media la adherencia de la cepa O42 a la mucosa de colon humano, en el modelo *in vitro* de cultivo de órganos (114). AAF/II mide 5 nm de diámetro. Mutaciones en los genes AAF/II de EAggEC ocasiona que la bacteria no se adhiera de manera importante a la mucosa del colon. El análisis por hibridización con sondas de DNA sugiere que AAF/I y AAF/II están cada una presentes en sólo una minoría de cepas EAggEC, lo que sugiere que la colonización intestinal por esta bacteria puede estar mediada por más de un antígeno fimbrial.

Por su parte, Knutton y col. (106) utilizando el ensayo *in vitro* de cultivo de órganos, encontraron que las cepas EAggEC expresan cuatro tipos morfológicos de fimbrias (observadas por microscopía electrónica), con las que se adhieren a la mucosa del colon humano. A diferencia de lo observado en EPEC (89), EAggEC no se adhieren íntimamente a la membrana de la célula.

Debroy y col. (117) han sugerido que una proteína de membrana externa, no fimbriada, puede ser la responsable de la adherencia agregativa. Wai y col. (118)

describieron una proteína de membrana externa de 38 kDa en cepas EAggEC, con propiedades hidrofóbicas, que puede estar participando en la agregación bacteriana y que favorece la colonización de grandes extensiones del epitelio intestinal.

Se ha sugerido que la invasión celular pudiera ser otro mecanismo de patogenicidad de algunas cepas EAggEC (119). Sin embargo, el análisis de muestras de intestino humano no reportan que las cepas EAggEC se internalicen en las células, por otro lado, las evidencias clínicas que sugieren que esta bacteria sea invasiva no están bien fundamentadas (120).

CARACTERISTICAS HISTOPATOLOGICAS DE LAS LESIONES INDUCIDAS POR EAggEC

Tickoo y col. (121) demostraron que cepas EAggEC de origen humano, administradas vivas por vía oral a conejos, eran capaces de colonizar el intestinos delgado y grueso, causando diarrea, acortamiento moderado de las vellosidades intestinales y cariorrexis.

Estudios realizados por Vial y col. (84) demostraron que al inocular las cepas EAggEC O42 y 17-2 en asas ligadas de la porción ileal de intestino de conejo y rata, producían alteraciones histológicas semejantes a las causadas por cepas de *E. coli* productoras de SLT; ensayadas en el mismo modelo. El daño observado se caracterizó por acortamiento y necrosis hemorrágica de las vellosidades intestinales, además por una respuesta inflamatoria intermedia, con edema e infiltración de la submucosa por células mononucleares.

Tzipori y col. (122) realizaron estudios con un modelo animal en cerdos gnotobioticos, a los cuales se les administraron las cepas EAggEC JM221 (aislada

de un adulto con diarrea en México) y 17-2 (aislada de un niño con diarrea en Chile); los resultados obtenidos mostraron la aparición de un cuadro diarreico e incluso la muerte de algunos cerdos. El examen histológico del intestino mostró hiperemia moderada de la porción distal del intestino delgado y del ciego, así como dilatación de las vellosidades del intestino delgado, en ausencia de una respuesta inflamatoria, además de agregados bacterianos junto con una matriz mucoide sobre el epitelio intacto.

DIAGNOSTICO

La colonización por EA_ggEC es determinada por el aislamiento de la bacteria de las heces de pacientes y al demostrar que presenta el patrón agregativo en el ensayo de adherencia a células HEp-2 (31-33).

Un fragmento de DNA. de 1.0 Kb (Sau3a), derivado empíricamente del plásmido de las cepas 17-2 y 042, ha sido utilizado como sonda para la detección de cepas EA_ggEC. La sonda fue desarrollada por Braudry y col. (123) y muestra alta especificidad, ya que hibridiza con el 89% de las cepas que fueron definidas como EA_ggEC por el ensayo de adherencia a células. La secuencia de nucleótidos de la sonda para adherencia agregativa representa un marco de lectura abierto criptico el cual está adyacente al replicón del plásmido. Un ensayo de PCR utilizando iniciadores derivados de la secuencia de la sonda para adherencia agregativa ha mostrado sensibilidad y especificidad similar (124).

MODELOS IN VITRO

Estudios con cepas EAggEC: JM221, 17-2 y O42 (JPN10), realizados por Hicks, Nataro y col. (120, 125), en el modelo *in vitro* de cultivo de órganos, de biopsias de yeyuno, íleon y colon obtenidos de niños, observaron efecto citotóxico severo sobre las células del colon. Los resultados refieren la presencia de vacuolización de las vellosidades intestinales, ampliación de la apertura de las criptas, la formación de grietas entre las criptas y desprendimiento de las células epiteliales. Por otro lado, empleando células polarizadas T84 (derivadas de células epiteliales humanas), las mismas cepas ocasionaron vacuolización de la membrana apical, vacuolización subnuclear del citoplasma, en algunos casos separación del núcleo del citoplasma que lo rodea y desprendimiento de las microvellosidades (125).

TOXINAS

Los estudios antes referidos proponen la participación de factores tóxicos, liberados por EAggEC, causantes del daño intestinal, por lo cual se procedió a realizar su búsqueda de manera dirigida en las mismas bacterias.

Savarino y col. (126-127) reportaron que la cepa 17-2 elabora una toxina termoestable de aproximadamente 10 kDa, ésta por sus características se denominó enterotoxina termoestable 1 de EAggEC (EAST1). El gen que codifica para esta proteína (*astA*) se localiza en el plásmido de 65 kDa, previamente mencionado (126-127). Estudios posteriores mostraron que EAST1 incrementa los niveles de cGMP y en el modelo *in vitro* de cámaras de Ussing se observó que produce incremento en la corriente de corto circuito (debido a la secreción de líquidos), que sugiere un efecto enterotóxico semejante al producido por la enterotoxina

termoestable de ETEC (STa). Estudios recientes muestran que EAST1 se expresa de igual manera por los diferentes grupos patogénicos de *E. coli*, así como por cepas no patógenas, lo que cuestiona su participación como factor de virulencia.

Baldwin y col. (128) observaron que el sobrenadante del cultivo de diferentes cepa EAggEC, precipitado con sulfato de amonio, incrementaba los niveles de calcio intracelular en células HEP-2. El factor identificado era una proteína de 120-140 kDa que reaccionaba con anticuerpos preparados contra la porción carboxilo terminal (RTX) de la hemolisina alfa producida por *E. coli*. Los autores propusieron que esta proteína, a semejanza a la hemolisina alfa de *E. coli*, era capaz de inducir la elevación del calcio intracelular libre, ocasionado por la entrada de calcio extracelular, asociado con un proceso de fosforilación proteica, probablemente originado por la acción de cinasas calcio dependientes. Heque y col. (129) han reportado que las cepas EAggEC poseen actividad hemolítica por contacto, aunque este efecto posiblemente es debido a la α -hemolisina de *E. coli* (HlyA), previamente reportada por Welch y col. (130-131). Knutton y col. (106) han observado propiedades de hemolisina alfa en algunas cepas EAggEC, cuando se realizaron ensayos de citotoxicidad en monocapas de células HEP-2 en cultivo. Elliot y col. (132) propusieron que cepas EAggEC produce hemolisina alfa, apoyados en observaciones realizadas en ensayos de hemólisis de eritrocitos, sondas de DNA y anticuerpos monoclonales.

En un estudio reciente (104), se reportó la existencia de dos proteínas de alto peso molecular (116 y 108 kDa) en los sobrenadantes de los cultivos del 40% de las cepas EAggEC aisladas de niños con diarrea. Al evaluar la actividad de dichos sobrenadantes en el modelo de asa ligada de intestino de rata (133), se observó que se presentaba acortamiento de las vellosidades intestinales, hemorragia, necrosis y ulceración del epitelio superior. Las alteraciones histológicas son semejantes a las

descritas previamente en otros estudios, en los que se utilizaron cepas EAaggEC vivas.

El gene que codifica para la proteína de 108 kDa está localizado en el mismo plásmido de virulencia de 65-MDa. Dicho gen fue clonado y nombrado *pet*, el producto proteico, a su vez, recibió la misma nominación (Pet), por ser una toxina codificada por plásmido (“plasmid-encoded toxin”) (134). El peso molecular de Pet se calculo a partir de la secuencia de la proteína que se dedujo del gen, encontrando que es de 104 kDa. El gen que codifica para la proteína de 116 kDa se localiza en el cromosoma, tanto de las cepas EAaggEC, como en las cepas de *Shigella flexneri*. Este gen se nombró *she* o *pic* (135), y el peso molecular deducido de la proteína es de 110 kDa. La proteína codificada por éste gen se ha relacionado con la colonización al intestino, por lo que se le denominó Pic por ser una proteína involucrada en colonización al intestino (“protein involved in intestinal colonization”). Ambas proteínas (Pet y Pic) mostraron alta homología con las proteínas autotransportadoras de tipo V, todas ellas incluidas dentro de la subfamilia nombrada SPATE, por sus siglas en ingles (“serine protease autotransporters of *Enterobacteriaceae*”). Estas toxinas tienen como característica común un motivo de serina proteasa y se han relacionado con las proteasas para inmunoglobulina A de bacterias de las especies *Neisseria* y *Haemophilus*.

Las proteínas autotransportadoras (136) poseen una estructura unificada compuesta por la secuencia líder amino-terminal, la proteína madura secretada (dominio pasajero), que posee los dominios funcionales, incluyendo el motivo de serina proteasa (G²⁵⁶DSGSGV) y un dominio carboxilo terminal (beta) que forma un poro barril-β para permitir la secreción de la proteína pasajera. El gen *pet* codifica para una proteína de 1,295 aminoácidos, con una masa molecular predicha de 140 kDa y un punto isoeléctrico de 6.71. El análisis de la secuencia de aminoácidos deducida de Pet (GeneBank) muestra 58% de identidad (83% de

similaridad) con la proteína EspP de EHEC (57); 55% de identidad (70% de similaridad) y 44% de identidad (60% de similaridad) con el producto del gen *espC* de EPEC (137) y con SepA (138), la mayor proteína secretada de *Shigella flexneri*, respectivamente. También, se observa homología significativa con otros miembros de la familia de autotransportadores considerados como factores de virulencia bacteriana, como es el caso de SigA, She y ShMu de *Shigella*, proteína que participa en la invasión a los tejidos (77, 136, 138) y con Tsh, una hemaglutinina de cepas de *E. coli* patógenas de aves (139).

La actividad biológica de Pet y Pic evaluada en el modelo *in vitro* de cámaras de Ussing (140), con preparaciones de yeyuno de rata, reportó que Pet incrementa la diferencia de potencial y la corriente de corto circuito, acompañado de una disminución de la resistencia eléctrica. El estudio histopatológico de las muestras de intestino mostró incremento de la liberación de moco, exfoliación de células y desarrollo de abscesos de las criptas. Pic, por el contrario, no indujo alteraciones electrofisiológicas sobre las preparaciones de intestino, sin embargo, se ha reportado que posee actividad de mucinasa, induce resistencia al suero y posee actividad de hemaglutinina (135).

Experimentos de infección con cepas EAggEC en el modelo de cultivo de órganos (120) y en el cultivo de células T84 polarizadas (125), mostraron que estas bacterias inducen efecto vacuolizante de las vellosidades intestinales, ampliación de la apertura de las criptas y formación de grietas entre ellas, así como desprendimiento de las células epiteliales, vacuolización subnuclear del citoplasma y, en algunos casos, separación del núcleo del citoplasma que lo rodea, además, desprendimiento de las microvellosidades (120, 125). Estos efectos sobre las células sugieren actividad citotóxica de EAggEC, de cual Pet podría ser el componente responsable.

Experimentos en cultivos de células HEp-2 y HT29 C1 tratadas con Pet (141), mostraron que la proteína induce alteraciones sobre el citoesqueleto de las células. Los efectos observados en ambas líneas celulares consistieron en: liberación del contacto celular focal del substrato del vidrio, redondeamiento y desprendimiento de las células; aunque la viabilidad de las mismas se conserva. Al emplear faloidina marcada con fluoresceína, para analizar las células tratadas con Pet (44), se observó contracción del citoesqueleto y disminución de las fibras de estrés (141). El empleo del inhibidor específico de serina proteasa, fenilmetilsulfonil fluoruro (PMSF), mostró ausencia de los efectos citopáticos inducidos por Pet. La participación del motivo de serina proteasa, en la actividad citotóxica de Pet, se corroboró al utilizar el producto de una clona a la que se indujo una mutación puntual en el sitio catalítico de la enzima y cambiar el residuo de serina proteasa por isoleucina (S260I). La proteína mutada no indujo las alteraciones celulares descritas previamente cuando se utilizó Pet.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Pet es una proteína de alto peso molecular (104 kDa), cuyo gen (*pet*) se encuentra localizado en el plásmido de 65 MDa de EAggEC. Esta proteína es elaborada por un alto porcentaje de las cepas EAggEC que se aíslan de pacientes con diarrea (133,142-143). Pet tiene actividad citotóxica sobre monocapas de células epiteliales y sobre cultivo de órganos de intestino y colon. Por otro lado, se ha observado que Pet se internaliza a las células (144) e induce alteraciones celulares, incluidos cambios en la morfología celular (alargamiento y redondeamiento), disminución de las uniones intercelulares y desprendimiento de la monocapa de células. Las alteraciones observadas en la membrana celular se caracterizan por ampollamiento, vesiculación, destrucción de las microvellosidades y la pérdida de membrana citoplasmática. También, se ha observado que las alteraciones del

citoesqueleto incluyen disminución de las fibras de estrés de actina y retracción del citoplasma. Aunque se han descrito los efectos de Pet sobre células y tejidos, el mecanismo específico por el cual altera las células epiteliales no ha sido descrito aún. En este trabajo se presentan evidencias que indican que el daño celular inducido por Pet podría estar relacionado con la destrucción de la espectrina y fodrina (145-147). Ambas proteínas forman parte del esqueleto membranal (figura 2), espectrina en eritrocitos y fodrina en la mayoría de las células epiteliales, cuya función principal es dar forma y sostén a la membrana celular, además de servir de andamio, ya que están conectadas con la red de actina citoplásmica (148-149). Las alteraciones sobre el citoesqueleto, de las células del intestino, inducidas por Pet podrían estar relacionadas directamente con los cuadros de diarrea ocasionados por la infección con EA_gEC.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad proteolítica de Pet sobre el esqueleto membranaral de diferentes células e investigar la participación de esta serina proteasa en la patogénesis de la diarrea producida por EA_ggEC.

OBJETIVOS ESPECIFICOS

1. Purificar Pet a partir del sobrenadante del cultivo de la clona HB101(pCEF_N1).
2. Determinar la secuencia amino-terminal de la toxina Pet y compararla con la secuencia deducida del gen *pet*.
3. Obtener anticuerpos policlonales contra la toxina Pet, para ensayos de neutralización.
4. Evaluar la actividad proteolítica de Pet sobre las proteínas de membranas purificadas de eritrocitos y células epiteliales.
5. Caracterizar la actividad proteolítica de Pet sobre las moléculas de espectrina y fodrina.
6. Evaluar la participación del motivo de serina proteasa en la patogénesis de Pet, utilizando inhibidores específicos y la mutante de Pet, en dicho motivo.
7. Obtener anticuerpos policlonales contra la molécula de espectrina.
8. Evaluar la actividad de Pet sobre la molécula de fodrina en cultivo de células vivas.
9. Analizar mediante microscopia de fluorescencia el efecto de Pet sobre la distribución de fodrina de células HEp-2.

HIPOTESIS

Pet induce rearrreglos en el citoesqueleto, los cuales alteran la membrana de las células intestinales, dichas alteraciones probablemente están relacionadas con la degradación de alguna de las proteínas que conforman el citoesqueleto membranal.

MATERIAL Y METODOS

BACTERIAS

Las características de las cepas utilizadas en este trabajo son las siguientes: la cepa HB101(pCEF1), construida por clonación del gen *pet* de la cepa EAggEC 042 (O44:H18), dentro del sitio *Bam*HI/*Kpm*I del plásmido pSPORT1 y expresado en *E. coli* HB101 (134); La cepa HB101(pCEF2) construida al inducir una mutación dirigida en el gen *pet* para cambiar un residuo de serina por isoleucina (S260I) y obtener una proteína mutada en el motivo de serina proteasa (141). Las cepas bacterianas se conservaron en medio de Dorset, su pureza se comprobó cultivándolas en medio de gelosa sangre y Mac Conkey y mantenidas en agar y caldo Luria con 100 µg/ml de ampicilina.

OBTENCION DE PROTEINAS

Para la producción de Pet y de la proteína mutante (S260I), las cepas HB101(pCEF1) y HB101(pCEF2) se crecieron en caldo Luria. Ambas clonas se sembraron previamente por separado en cajas con agar Luria y del cultivo obtenido se inocularon tubos con 5 ml de caldo Luria, que se incubaron por 4 h a 37°C (agitación continua). De estos tubos se tomaron 100 µl y se inocularon matraces con 100 ml de mismo medio y se incubaron durante 18 h a 37°C en agitación continua (150 r.p.m.). Los cultivos se centrifugaron (12,000 X g) durante 30 min. a 4°C, el paquete bacteriano se descartó y el sobrenadante se precipitó con sulfato de amonio, a una saturación de 75% (470 g de sal/l). El sulfato de amonio se adicionó al sobrenadante libre de bacterias, con agitación suave hasta su total disolución, para finalmente dejar en reposo durante toda la noche a 4°C (150). El precipitado se colectó por centrifugación a 12,000 X g (30 min. a 4°C).

Posteriormente, se resuspendió con solución amortiguadora de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2 (151), se colocó en membranas de diálisis para dializarse contra el mismo amortiguador durante tres días, haciendo dos cambios por día (152). El producto dializado se estabilizó con glicerol a una concentración final del 20% (v/v) y se guardó en alícuotas a -20°C hasta su uso.

PURIFICACION DE PROTEINAS

El precipitado obtenido en el proceso antes descrito se fraccionó con una solución de fosfatos de potasio 3.5 M pH 6.8 (K1/K2) (151). Primero, se fraccionó a 1.15 M durante 18 h. El sobrenadante, que contiene la proteína Pet, se obtuvo por centrifugación (12,000 X g durante 30 min. a 4°C). El sobrenadante (1.15 M) se fraccionó ahora a 1.75 M (K1/K2), durante 18 h. El precipitado (1.75 M), que contiene Pet, se separó del sobrenadante (12,000 X g durante 30 min. a 4°C) y se dializó contra el amortiguador de fosfatos de sodio 0.07 M pH 8.2 y después con 0.05 M Tris-HCl en 0.01 M EDTA.2Na a pH 8.0. Este preprecipitado (1.75 M) se sometió a cromatografía (152-154), primero en una columna de intercambio aniónico de Q-Sepharose (Pharmacia Fine Chemical No 17-0510-01) y posteriormente se le realizó cromatografía de intercambio catiónico en FPLC en una columna Mono S HR 5/5 (152-154).

La columna de Q-Sepharose tenía 1.4 cm de diámetro por 57.5 cm de largo, la velocidad de flujo se ajustó a 50 ml/h para obtener fracciones de 10 ml. Para la columna Mono S HR 5/5, la velocidad de flujo fue de 60ml/h y las fracciones de 1 ml.

Las columnas fueron equilibradas con amortiguador 0.05 M Tris-HCl en 0.01 M EDTA.2Na a pH 8.0. Algunas proteínas fueron eluidas en el mismo

amortiguador y las fracciones proteicas retenidas por las columnas se eluyeron aumentando la fuerza iónica del sistema con 0.5 M de NaCl.

Los perfiles de elución se determinaron utilizando una muestra de cada fracción que se mezcló con el reactivo de Bradford (155) para obtener una reacción colorida que se leyó a 575 nm en espectrofotómetro (Dynatech MR 580). Como alternativa, las muestras se leyeron a 280 nm en un espectrofotómetro Genesis 2 (Spectronic Instruments).

Las fracciones proteicas obtenidas se estabilizaron con glicerol al 20% (v/v) y se congelaron hasta su uso.

CUANTIFICACION DE PROTEINAS TOTALES

La concentración de proteínas de los productos obtenidos se determinó por el método de Bradford (155), por microensayo en placa, con seroalbúmina bovina (fracción V) como estándar. La reacción colorida se midió a 575 nm en espectrofotómetro (Dynatech MR 580).

ELECTROFORESIS EN GELES DE POLIACRILAMIDA CON SDS

La toxina Pet purificada y la proteína mutante (S260I), se analizaron por electroforesis convencional en una dimensión, bajo condiciones desnaturizantes, en geles de poliacrilamida con 0.1% (p/v) de dodecil-sulfato de sodio (SDS-PAGE), en presencia de β -mercaptoetanol (152, 156). Las dimensiones del gel resolutor (separador) fueron de 10 cm de altura por 1.5 mm de espesor (10 X 1.5). La

corriente aplicada al gel concentrador fue de 100 V y de 200 al gel resolutor; en ambos casos con el amperaje variable.

El desplazamiento de las proteínas en SDS-PAGE fue comparada con marcadores preteñidos de peso molecular conocido (157) (Sigma Kit No. MW-SDS-BLUE).

Para analizar los perfiles proteicos los geles fueron teñidos con azul de Coomassie R (Coomassie Brilliant Blue R, Sigma Chemical Co., cat No B 0630) y con nitrato de plata (Sigma Chemical Co. Kit No AG-25, Silver stain) (152).

SECUENCIA AMINO-TERMINAL

La secuencia amino-terminal (N-terminal) de Pet se determinó por el procedimiento de degradación de Edman (158), en un sistema automatizado, sobre un secuenciador de proteínas de fase gaseosa (LF 3000; Beckman Instruments), equipado con una línea para cromatografía líquida de alta resolución (Beckman System Gold high-performance liquid chromatography, HPLC, system). El equipo HPLC incluye una bomba modelo 126 y un detector diodo 168, fijado a 268 y 293 nm para señal y referencia, respectivamente. La columna HPLC usada fue de Beckman Sherogel Micro PTH (2 por 150). Los patrones de secuenciación Beckman fueron usados para el análisis.

Las muestras de proteína para su secuenciación fueron obtenidas por SDS-PAGE y electrotransferidas sobre membranas de polivinilideno difluoruro (Millipore Co.), como fue descrito por Towbin y col. (159).

CULTIVOS CELULARES

Monocapas de las líneas celulares HEp-2 y HeLa se cultivaron en medio mínimo esencial (MEM), las células CaCo se cultivaron en medio Dulbecos modificado (DMEM) y las células Vero se cultivaron en medio 199. Los medios fueron suplementados con 10% (v/v) de suero fetal de ternera (inactivado a 56°C por 30 min.), 2 mM de L-glutamina, 10 mM de HEPES, 0.075% (p/v) de bicarbonato de sodio y una mezcla de antibióticos (penicilina-estreptomicina a una concentración final de 100 U/mg/ml). Las células se crecieron en atmósfera con 90% de humedad y en presencia de una mezcla de CO₂:O₂ (5%:20%; [v/v]); a temperatura de 37°C. Previo al ensayo de citotoxicidad, la monocapa obtenida se lavó con PBS pH 7.4 en medio libre de suero fetal y antibióticos.

OBTENCION DE MEMBRANAS CELULARES

Se utilizaron eritrocitos de bovino, ovino, equino, caprino y ave (pollo), obtenidos por punción venosa. La sangre se mezcló con solución anticoagulante-amortiguadora de Alsever's y los eritrocitos se lavaron con PBS pH 7.2, tres veces, a 2,000 X g a 4°C. Para el caso de las líneas celulares se emplearon monocapas de células HEp-2, Vero, Caco y HeLa, al igual que en el caso anterior, después de lavar el medio de cultivo, se lavó en tres ocasiones con PBS. Posteriormente, las células se desprendieron con solución quelante de Puck's (Puck's, Gibco BRL), incubándose a 37°C por 10 min. Las células desprendidas se lavaron en tres ocasiones con PBS a 1,000 X g durante 10 min., cada vez.

Una vez cosechados los eritrocitos y las líneas celulares se resuspendieron en solución isotónica de amortiguador de fosfatos de sodio (310 mosM) y se lavaron 3 veces por centrifugación a 1,000 X g por 10 min. (160). Los paquetes de

células obtenidos se incubaron con solución hipotónica amortiguadora de fosfatos de sodio (20 mosM), por 10 min., a 4°C. Las células tratadas se centrifugaron a 20,000 X g por 40 min. (4°C) para obtener las membranas celulares, que se depositaron en el fondo del tubo, éstos se lavaron en tres ocasiones con el mismo amortiguador y se recuperaron por centrifugación (20 min.) en las mismas condiciones (20,000 X g). Las membranas se resuspendieron en el mismo amortiguador, en el mínimo volumen posible. La concentración de proteínas se determinó por Bradford (155) y se congelaron a -70°C hasta su uso.

EFFECTO DE Pet SOBRE PROTEINAS DE MEMBRANA

Las membranas de eritrocitos de carnero y de células HEp-2 se incubaron con diferentes concentraciones tanto de Pet, así como de la proteína mutante (S260I). Como control se utilizó un concentrado del sobrenadante del cultivo de la cepa de *E. coli* HB101. Las mezclas de reacción fueron preparadas en un volumen de 100 µl, éstas contenían 10 µg de membranas de eritrocitos o 100 µg de membranas células HEp-2 con concentraciones de 0.1 a 10 µg de las proteínas. Las preparaciones se incubaron a 37°C durante diferentes tiempos: 0, 3, 6, 12, 18 y 24 h, y se analizaron por SDS-PAGE a 37°C.

También, el mismo ensayo se realizó con eritrocitos de diferentes especies animales (bovino, equino, caprino y de ave) y con diferentes líneas celulares (HeLa, CaCo y Vero). Muestras que contenían 10 µg de membranas de eritrocitos y 100 µg de membranas de células epiteliales fueron tratadas con 5 µg de Pet e incubadas por 24 h a 37°C. Las mezclas de reacción se analizaron por SDS-PAGE e inmunotransferencia para determinar el efecto inducido por Pet.

En el mismo sistema y utilizando anticuerpos anti-Pet (IgG) de conejo, se realizó un ensayo de neutralización de Pet para determinar su participación en el proceso de daño a las proteínas de membranas del eritrocitos. La toxina Pet (5 μ g) fue incubada con IgG anti-Pet (5 μ g) durante 3 h y después se incubó con membranas de eritrocitos (10 μ g) para formar la mezcla de reacción.

ACTIVIDAD DE Pet SOBRE ESPECTRINA PURA

Espectrina purificada (Sigma Co, St. Louis, Mo) se utilizó para determinar y analizar el efecto de Pet sobre la molécula. Mezclas de reacción, preparadas en un volumen de 20 μ l, que contenían 2 μ g de α - y β -espectrina y 1 μ g de Pet purificada se procesaron de la misma manera como fue descrito para las membranas purificadas.

ANTICUERPOS POLICLONALES

Para los ensayos de inmunotransferencia se obtuvieron anticuerpos en conejos (Nueva Zelanda) inmunizados con las cadenas de α - y β -espectrina (161). El antígeno se obtuvo de membranas de eritrocitos de carnero que se separaron por SDS-PAGE (6% de acrilamida). Los geles teñidos con azul de Coomassie permitieron identificar las bandas correspondientes a las cadenas de α - y β -espectrina (240 y 220 kDa). Cada una de dichas fracciones se cortó del gel y se homogeneizaron para inocular a los conejos. El inmunógeno se administró sin adyuvante, cada 15 días, en un total de 5 dosis, por vía subcutánea, en el dorso.

Previo a la inmunización se tomaron muestras de sangre de cada uno de los conejos para emplear estos sueros como controles negativo.

Concluido el proceso de inmunización los conejos se sangraron a blanco, la sangre se dejó coagular durante varias horas a temperatura ambiente, se removió el coágulo con un aplicador de madera y se permitió su contracción durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, se centrifugó a 2000 X g durante 30 min. a 4°C y se recuperó el suero del sobrenadante.

La fracción gamaglobulina del suero se obtuvo por precipitación con sulfato de amonio (150, 152), inicialmente, al 50% (p/v) de saturación y, posteriormente, al 33% (p/v). La gamaglobulina precipitada se dializó contra PBS pH 7.4, a 4°C, para eliminar el exceso de sulfato de amonio, haciendo dos cambios al día, de cuatro litros cada uno, por 3 días. Las muestras se guardaron en alícuotas de 1 ml a -70°C hasta su uso.

La especificidad de los anticuerpos obtenidos se evaluó al utilizar anticuerpos anti-espectrina comerciales (Sigma Chemical).

EFEECTO DE Pet SOBRE CELULAS HEp-2 EN CULTIVO

Monocapas de células HEp-2 en cultivo se desprendieron como fue previamente descrito en el ensayo de obtención de membranas. Las células desprendidas se lavaron y se ajustaron a una concentración de 3×10^5 /ml en medio Eagle modificado Dulbecco's (DMEM), con glucosa, pero libre de suero y antibióticos. La suspensión de células viables se inoculó con Pet a concentraciones de 10, 50 y 100 µg/ml y se incubaron por 3, 6, 12, 18, 24 y 36 h a 37 °C, en ambiente húmedo y en presencia de 5% de CO₂. Pasados los diferentes periodos de incubación, las células se lavaron tres veces (15 min. cada uno) con PBS por centrifugación a 1,000 X g por 10 min. a 4 °C. Después del último lavado se eliminó el sobrenadante y el paquete celular se trató con amortiguador de Leammlí para

lizar las células. La concentración de proteínas de las muestras se ajustó a 30 µg de proteínas totales y se realizó SDS-PAGE.

INMUNOELECTROTRANSFERENCIA

Después de realizar la separación de las proteínas de las muestras por SDS-PAGE, se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Immunobilon-N C, Millipore HAHY 304 FO) de acuerdo al procedimiento descrito por Towbin y col. (159). La solución de transferencia se preparó con 0.25% (p/v) de Trizma-base, 1.2% (p/v) de glicina y 16.6% (v/v) de metanol. Se aplicaron 200 mA constantes a voltaje variable, por 7 h, para geles de 10 cm de altura por 1.5 mm de espesor, y 2 h para minigeles, bajo las mismas condiciones. Para determinar la efectividad de la transferencia a la membrana de nitrocelulosa se trató con amido negro al 0.001% (p/v) en 0.5% (v/v) de ácido acético glacial. Una vez visualizadas las proteínas, las membranas se lavaron con Tween-20 al 0.05% (v/v) en H₂O destilada y amortiguador 0.01 M Tris-HCl y 0.15 M NaCl pH 7.4 (TBS) en 0.05% (v/v) de Tween-20 (TBS-Tween). Para visualizar el efecto, las membranas se bloquearon con leche descremada al 5% (p/v) en TBS-Tween durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se lavó cinco veces (5 min. cada uno) con TBS-Tween. Después, las membranas se incubaron con los anticuerpos de conejo anti-α y anti-β espectrina (Sigma Chemical Co.), a una dilución de 10⁻², en leche descremada al 5% en TBS-Tween. Las membranas en presencia del anticuerpo se incubaron durante toda la noche (12 h) a 4 °C y después se lavaron con TBS-Tween. La detección de la reacción antígeno-anticuerpo se realizó con anticuerpos anti-IgG de conejo (162), marcados con peroxidasa (Kirkegaard & Perry Laboratories, Gaithersburg, Md), diluidos en leche descremada al 5% en TBS-Tween (5 × 10⁻³); se incubó una hora con el segundo anticuerpo y se lavó con TBS-Tween. Por último, se incubó durante 5 min. en 0.01 M Tris-HCl pH 6.8 (TB). La reacción se visualizó al agregar H₂O₂ en

presencia de 4-cloro-1-naftol, mostrándose bandas de un precipitado insoluble oscuro; la reacción se detuvo lavando con agua.

Para detectar la α -fodrina de células HEp-2 en suspensión, se emplearon anticuerpos contra α -fodrina de cerebro, producidos en conejo (anticuerpo 9095 anti-fodrina de conejo, gentilmente proporcionado por el Dr. R. Block), la concentración de estos anticuerpos fue 100 ng/ml. La reacción en este caso se analizó con anticuerpos anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa, diluidos en leche descremada (5%) en TBS-Tween (10^{-4}) y se visualizó por quimioluminiscencia (Western-light chemiluminescent reagent, Du Pont, NEN).

ALTERACIONES CELULARES INDUCIDAS POR Pet

Las células HEp-2 se obtuvieron como fue previamente descrito. Las células mantenidas en suspensión se trataron con 5, 10, 50 y 100 $\mu\text{g/ml}$ de Pet y se incubaron durante 3, 6, 12, 18, 24 y 36 h a 37 °C. Las células tratadas (con la toxina y los controles) se procesaron como previamente descrito, sólo que en este ensayo se depositaron por goteo en portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente.

En otro ensayo se emplearon monocapas de células HEp-2 con 10 $\mu\text{g/ml}$ de Pet durante 3, 6, 12, 18, 24 y 36 h a 37 °C, cada una de las monocapas de células se lavó con PBS pH 7.4 frío por tres veces.

Las preparaciones de células se fijaron con glutaraldehído (3% en PBS pH 7.4) por 10 min. y se lavaron con PBS pH 7.4, frío, tres veces. Las células se permeabilizaron con Tritón X-100 (0.1% en PBS, pH 7.4) por 10 min. y se lavaron con PBS pH 7.4, frío, por tres veces más.

Para visualizar las alteraciones inducidas por Pet sobre las células se utilizó microscopia de fluorescencia (163). Para ésta, las preparaciones se bloquearon con albúmina sérica bovina (BSA) al 1% en PBS por 10 min. y se lavaron con PBS pH 7.4, frío. Las células se incubaron con los anticuerpos anti- α y anti- β espectrina (Sigma Chemical Co.) a una dilución de 10^{-2} o con anti- α fodrina 9095 a la misma dilución. Se incubaron por 1 hora, colocando las preparaciones en cámara húmeda a 37°C, se lavaron con PBS pH 7.4, frío, por tres veces y se procedió a tratar con anti-IgG de conejo (producido en cabra) marcada con fluoresceína, diluido 10^{-2} (Kirkegaard & Perry Laboratories). Las preparaciones se observaron en microscopio de luz y de epifluorescencia (Karl Zeiss) (163).

Se realizaron, además, preparaciones que se tiñeron con azul de Coomasie (Sigma Chemical Co.), por 10 min. Y se destiñeron con una solución de 5% metanol y 10% de ácido acético para observarlas en microscopio de luz (Karl Zeiss).

RESULTADOS

PURIFICACION Y SECUENCIA N-TERMINAL DE LA TOXINA Pet

La proteína Pet se purificó a partir del sobrenadante del cultivo de la clona HB101(pCEF_{N1}), por tratamiento con sulfato de amonio y precipitación fraccionada (1.15-1.75 M) con amortiguador de fosfatos de potasio (K1/K2). El precipitado a 1.75 M con K1/K2 que mostró enriquecimiento de la proteína, al ser sometido a cromatografía en columna, en Q-Sepharosa, mostró tres picos en el perfil de elución (figura 3). En el primero eluyó la toxina Pet, sin necesidad de aumentar la fuerza iónica del sistema, observando aumento de la concentración (figura 4). Este producto al ser sometido a cromatografía en HPLC (Mono S HR 5/5), mostró fracciones homogéneas, la toxina se retuvo en la matriz de la columna y se liberó en el segundo pico del perfil de elución, al aumentar la fuerza iónica del sistema (figura 4).

El rendimiento final del proceso de purificación de Pet fue de 3.14%, obteniéndose 3.3 mg de proteína (cuadro 2). Con la proteína se procedió a identificar la secuencia N-terminal para corroborar si era coincidente con la que se dedujo previamente del gen (134). La secuencia obtenida ANMDISKAWARDYLDLAQN, nos confirmó que era la previamente predicha a partir de gen, por lo que se procedió a continuar con los ensayos de caracterización de Pet.

ACTIVIDAD DE Pet SOBRE MEMBRANAS DE ERITROCITOS

La actividad de Pet sobre células se analizó inicialmente utilizando membranas de eritrocitos. Las membranas (10 µg) se incubaron con cantidades

crecientes de Pet (0.1 a 10 μg), en una mezcla de reacción (100 μl) y se analizaron por SDS-PAGE. Los resultados obtenidos mostraron degradación de proteínas de alto peso molecular (240 y 220 kDa). Por su movilidad electroforética, estas proteínas hicieron suponer que correspondían a las cadenas α - y β - de la molécula de espectrina, respectivamente (figura 5). Durante la degradación de las proteínas de 240 y 220 kDa se observó la formación de una fracción de 120 kDa, el cual se incrementa en relación al incremento de la concentración de Pet utilizada (figura 5). La degradación de las proteínas de membrana de eritrocito es dosis y tiempo dependiente, ya que a mayor tiempo de incubación la degradación de las cadenas de 240 y 220 kDa fue más aparente (figura 6).

Para conocer si las fracciones proteicas de 240 y 220 kDa, degradadas por Pet, correspondían a las cadenas de α - y β -espectrina, se realizó un análisis comparativo de los patrones electroforéticos de las membranas de eritrocitos con espectrina purificada. Los resultados mostraron el mismo perfil electroforético, lo que sugería que el blanco de Pet era la espectrina (datos no mostrados). Para confirmar estas observaciones se utilizaron anti-espectrina en un ensayo de inmunotransferencia. Con este resultado se pudo demostrar que las bandas de 240 y 220 kDa eran las cadenas de α - y β -espectrina, presentes en las membranas de eritrocitos degradadas por la toxina Pet (datos no mostrados).

La actividad específica de Pet sobre las cadenas de α - y β -espectrina se confirmó al desafiar la espectrina comercial pura con Pet, en donde nuevamente se observó la degradación de ambas cadenas y la formación del subproducto de 120 kDa, previamente referido (figura 7). El empleo de anticuerpos anti-espectrina específicos demostró que el subproducto referido es una fracción de la espectrina degradada, el cual se incrementa en relación directa a la degradación (figura 8).

PARTICIPACION DEL MOTIVO DE SERINA PROTEASA DE Pet EN LA DEGRADACION DE ESPECTRINA

Pet forma parte de la subfamilia de serina proteasas autotransportadoras (SPATE) y no se sabe si el motivo de serina proteasa puede estar implicado en el proceso de degradación de la espectrina. Para evaluar su participación se utilizó PMSF (un inhibidor específico del motivo de serina proteasa), el cual se incubó con Pet, previo al ensayo de degradación. Como también se contaba con la cepa HB101(CEFN2), que produce la proteína mutante de Pet (S260I), en el motivo de serina proteasa, entonces se utilizó el sobrenadante del cultivo de ésta cepa para realizar el ensayo de degradación de espectrina. Tanto la toxina Pet inocuada con PMSF, como el sobrenadante de la cepa mutante HB101(CEFN2), no causaron la degradación de la espectrina (figura 9). El ensayo de neutralización de la toxina Pet, con anticuerpos específicos obtenidos de conejo, mostró que el subproducto de 120 kDa no se forma y que la degradación de las cadenas de α - y β -espectrina se inhibe parcialmente. Aunque se observó la formación de subproductos, éstos fueron de diferente peso molecular, sugiriendo que al inhibir el sitio activo, la actividad de la toxina se neutraliza (figura 9).

Para establecer el sitio de rompimiento de la espectrina, inducido por Pet, el subproducto de 120 kDa obtenido tanto de la degradación de la espectrina purificada, como el correspondiente de la espectrina de las membranas de eritrocitos, se analizaron para determinar su secuencia N-terminal. El resultado obtenido reportó la misma secuencia de la α -espectrina madura, lo cual sugiere que el sitio de rompimiento ocurre hacia el sitio C-terminal.

EFEECTO DE Pet SOBRE LA MEMBRANA DE CELULAS EPITELIALES HEp-2

Para conocer si el efecto degradante inducido por Pet sobre la espectrina se presentaba sobre su homólogo, la fodrina de células epiteliales, se realizaron ensayos con membranas de diferentes líneas de células epiteliales. En un primer ensayo se utilizaron células HEp-2, en éste se observó que la toxina Pet al igual que lo observado con las membranas de eritrocitos degradaba proteínas de 240 y 220 kDa, que a su vez corresponden a las cadenas α - y β - de la fodrina (figura 10). Para corroborar que el efecto de degradación era específico de Pet, se utilizó el sobrenadante del cultivo bacteriano de la cepa HB101 (control negativo), concentrado con sulfato de amonio. El tratamiento de las membranas de células HEp-2 con éste no ocasionó alteración en el perfil electroforético, confirmando la actividad degradante de Pet sobre la fodrina (figura 10).

La actividad de Pet sobre la espectrina/fodrina es universal. Lo anterior se demostró al ensayar membranas de eritrocitos de diferentes especies (bovino, equino, caprino y ave), así como las correspondientes de diferentes células epiteliales (HeLa, CaCo y Vero). Los resultados obtenidos al respecto mostraron la capacidad de Pet de degradar las cadenas α - y β - de la espectrina de los diferentes eritrocitos y células epiteliales (figura 11).

ACTIVIDAD DE Pet SOBRE CELULAS EPITELIALES VIABLES EN SUSPENSION

Con los ensayos previos se pudo demostrar la actividad degradante de Pet sobre la espectrina y fodrina, sin embargo, con estos resultados no es posible evaluar la actividad de la toxina en la célula íntegra. Para conocer si el efecto tóxico

asociado a Pet, en células cultivadas, se relaciona con la degradación de fodrina. Células HEp-2 en suspensión se desafiaron con diferentes concentraciones de Pet y a diferentes tiempos. Para visualizar el efecto se utilizaron anticuerpos policlonales preparados en conejo contra la fodrina de células de cerebro. Utilizando inmunotransferencia del lizado de las células tratadas con Pet, se observó que las fracciones correspondientes a la α -fodrina empiezan a desaparecer a las 18 h de incubación (figura 12A) y la degradación de ambas, α -fodrina y otra proteína de 220 kDa (β -) se hace completa a las 36 h (figura 12B). Con el ensayo realizado no fue posible observar productos de degradación específicos, sin embargo, una fracción de aproximadamente 83 kDa se fue incrementando en relación al tiempo de incubación (figura 12B). Como en todos los ensayos realizados, en éste se observó que el efecto de Pet sobre la fodrina es concentración y tiempo dependientes. Por el tiempo que se requiere para la degradación de la fodrina, se puede considerar que Pet requiere ser internalizada.

ALTERACIONES INDUCIDAS POR Pet SOBRE LA MEMBRANA DE CELULAS HEp-2

Células HEp-2 en suspensión, tratadas con la toxina Pet y teñidas con azul de Coomassie, al observarse por microscopia de luz mostraron alteraciones de la membrana celular, que ocasionaba deformación de las células (figura 13B). El efecto observado se pudo atribuir a Pet, ya que células no tratadas (figura 13A) y otras tratadas con la proteína Pet mutada (S260I) (figura 13C) no presentaron alteraciones morfológicas, manteniéndose su forma.

Células HEp-2 tratadas con Pet y analizadas con anticuerpos anti-espectrina fluorescentes, mostraron, además de la deformación de las células, una distribución irregular de la fluorescencia, lo que hace suponer que la fodrina se

encuentra fragmentada (figura 13E). Cuando las células HEp-2 se trataron con el sobrenadante de la mutante de Pet (S260I), las células no sufrieron alteraciones, observándose como las células control (figura 13D y 13F).

Al igual que en los ensayos con membranas, el efecto de Pet sobre la fodrina de células en suspensión es dosis y tiempo dependiente. La incubación con Pet durante 36 h ocasiona cambios en la morfología celular, que confirma la fragmentación de la fodrina (figuras 14B-14D, 14F-14H). Cultivos de células incubadas durante el mismo lapso de 36 h presentan distribución homogénea de la fluorescencia, lo que confirma que Pet es responsable del daño a las células tratadas con la toxina (figuras 14A y 14E).

Para definir el tipo de alteración que ocasiona Pet sobre la fodrina de células HEp-2 en monocapa, éstas se incubaron con 10 µg/ml y se observaron al microscopio. Las principales alteraciones se presentaron en las uniones celulares a partir de las 6 h de incubación, observándose hasta las 18 horas (figura 15). La tinción con anticuerpos anti-fodrina mostró como la red de fodrina tiende a hacerse más laxa en las células tratadas. La liberación de contactos celulares focales del substrato de vidrio se observó a partir de las 12 h de incubación, mostrando alargamiento y desprendimiento celular del vidrio. A las 24 h de incubación con la toxina, la red de fodrina en las células tratadas se observó menos conservada y el citoplasma se mostró colapsado (figura 16). Las células tienden a hacerse más redondas y de mayor tamaño a las 36 h de incubación con Pet, el citoplasma se observa en general más distendido y la red de fodrina se observa laxa y discontinua, comparado con lo observado en las células control (figura 17).

Se estudió la viabilidad de las células (cuadro 3), en ésta se observó que las células tratadas con la toxina a tiempos cortos y a dosis bajas (10 µg/ml) no muestran alteraciones en su viabilidad, aunque sí en la morfología. A

concentraciones elevadas (50-100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) y tiempos de exposición prolongados, la viabilidad disminuye, ésto correlaciona con las dosis requeridas para inducir el rompimiento de la fodrina y las alteraciones celulares.

DISCUSION

Diferentes estudios realizados con cepas EAggEC indican que estas bacterias ocasionan daño celular importante. Estos trabajos refieren la probable participación de una citotoxina elaborada por la bacteria. En relación con esta propuesta, se ha determinado que cepas EAggEC elaboran toxinas que inducen diferentes efectos sobre células (84, 104, 120-122, 125, 127, 134-135, 140-141). En el laboratorio, se han identificado dos proteínas de alto peso molecular que son secretadas por cepas EAggEC, aisladas de pacientes con diferentes cuadros clínicos (104, 133, 142-143). Diversos estudios han demostrado que Pet, una de las dos proteínas, participan en el daño celular (104, 134, 140-141), caracterizado por la formación de vacuolas, alteraciones de la morfología celular y rearrreglos del citoesqueleto (141). No obstante que se ha demostrado que la proteína participa en el daño a las células, el sitio específico sobre el cual esta toxina actúa, para ocasionar las alteraciones celulares, no se ha identificado.

En este trabajo se presentan resultados que muestran como Pet produce rompimiento de las moléculas de espectrina y fodrina. Proteínas que forman parte del esqueleto membranal, cuya función es servir de andamio a la red de actina citoplásmica y de sostén a la membrana celular (147- 149). La espectrina contiene el 75% de la masa de las proteínas del esqueleto membranal en el eritrocito, en proporción semejante se encuentra la análoga de espectrina (fodrina), distribuida entre la mayoría de los tipos celulares. El esqueleto membranal basado en espectrina es submembranoso, espacialmente limitado, formando un enrejado bidimensional que combina a un subtipo de proteínas de membrana (148, 149). Alteraciones directas sobre la espectrina o la fodrina, pueden explicar los cambios celulares en el intestino durante la colonización por EAggEC (84, 104, 120-122, 125, 127, 134-135, 140-141).

Diversos estudios muestran como el citoesqueleto de las células es el blanco de bacterias y parásitos patógenos (164-165). Al respecto, se ha descrito que el protozooario *Trichomonas vaginalis* produce una cisteína proteasa que degrada la espectrina. Esta proteasa, cuyo peso molecular es de 30 kDa, degrada la espectrina, produciendo pequeños subproductos. El mecanismo por el cual se internaliza esta proteína, al parecer se da por el contacto íntimo entre el parásito y la célula del huésped, que produce una fusión de membranas, que facilita el evento. Al respecto, también se ha propuesto que la internalización de la toxina se da a través de la liberación de microvesículas (166). El efecto de la toxina de *T. vaginalis*, sobre cultivos celulares, se presenta como redondeamiento y desprendimiento de células, conduciendo a la muerte celular (167). Esta propiedad para dañar la espectrina, también ha sido reportado para los protozoarios intracelulares *Plasmodium falciparum* y *Plasmodium bergeri* (168).

En el trabajo se demostró también la importancia del motivo de serina proteasa de Pet, para inducir degradación de la espectrina. Lo anterior se determinó utilizando el inhibidor PMSF, específico para bloquear dicho motivo y no observar la degradación de la fodrina/espectrina (figura 9). La participación del motivo de serina proteasa de Pet, sobre la degradación de espectrina, se confirmó, además, al utilizar la proteína mutante Pet S260I, que tiene modificado dicho motivo (figura 9). Aunque el rompimiento de la espectrina inducido por Pet generara un subproducto de 120 kDa, no se pudo establecer el sitio de corte, ya que éste se encuentra hacia el sitio C-terminal. Lo anterior se confirmó al analizar la secuencia de aminoácidos (N-terminal), del subproducto de 120 kDa, ésta fue la misma reportada para la cadena de α -espectrina madura. Cuando se realizó el ensayo de inhibición con anticuerpos anti-Pet, se observó que éstos neutralizan parcialmente la degradación de espectrina (figura 9), sin embargo, el ensayo permitió conocer que se forman subproductos diferentes al de 120 kDa, lo que sugiere que la toxina reconoce más de un sitio sobre las cadenas de espectrina.

La actividad de degradación, inducida por Pet, incluye a la espectrina y sus análogos como la fodrina de células epiteliales (148-149). Lo anterior se determinó al utilizar membranas purificadas de diferentes células epiteliales y observar la degradación de la cadena α -fodrina (figura 11), lo que sugiere que éste es un proceso amplio. La especificidad del efecto de Pet se demostró al utilizar como control el sobrenadante de la cepa HB101, precipitado con sulfato de amonio, el cual no indujo ningún efecto sobre la espectrina y fodrina (figura 10). La actividad de Pet sobre la fodrina no es un proceso que se da sólo en condiciones estáticas, éste se presenta utilizando condiciones *in vitro* con células vivas. Esta observación apoya la posible participación de Pet en el daño celular del intestino, en individuos infectados con la bacteria (104, 147). Al utilizar membranas purificadas de células HEp-2, tratadas con Pet, no se observa la formación de subproductos, esto probablemente se debe a la gran cantidad de proteínas de membrana que se obtiene, lo que dificulta una adecuada visualización (figura 10). Sin embargo, utilizando el ensayo con células en suspensión, tratadas con Pet y analizado las muestras por inmunotransferencia, con anticuerpos anti-fodrina, se observó el incremento de una fracción proteica de aproximadamente 83 kDa (figura 12). No se pudo separar esta fracción para determinar su secuencia, lo que hubiera permitido establecer de manera contundente que es subproducto de la fodrina.

La actividad de Pet, en todos los ensayos, demostró que ésta es dosis y tiempo dependientes. Esta observación podría estar relacionada con la diarrea de tipo persistente, ya que a mayor tiempo de estancia de la bacteria, mayor producción de toxina y mayor daño celular, que ocasiona trastornos en los procesos de repitelización, prolongando la duración de la diarrea.

La degradación de la fodrina en células en suspensión no se observa a tiempos cortos, esto apoya que la toxina debe internalizarse (144) y activar cinasas intracelulares antes de que se de el evento de degradación de la fodrina.

En un estudio previo (141) se describe que células HEp-2 y HT29 C1 tratadas con Pet presentan cambios en su morfología y alteraciones sobre la membrana citoplasmática. Sin embargo, no se menciona cual o cuales pueden ser los efectos directos de la toxina que ocasionan dichas alteraciones. Los estudios de microscopía de células en suspensión, tratadas y no tratadas con Pet, así como con la toxina mutada S260I, muestran que el daño al citoesqueleto origina la deformación celular (figura 13). Por su parte, el ensayo de inmunofluorescencia con anticuerpos anti-espectrina permitió confirmar la participación de Pet en la alteración del citoesqueleto, relacionado principalmente con la degradación de la fodrina (figuras 13-17).

Para establecer que la disminución en las fibras de estrés, observada en células HEp-2 y HT29 C1 tratadas con Pet (141), se asocia con la ruptura de la molécula de fodrina, monocapas de células HEp-2 se incubaron con 10 µg/ml de Pet a diferentes tiempos. Los resultados obtenidos mostraron alteraciones a nivel de las uniones intercelulares y desprendimiento de la monocapa a tiempos cortos de incubación y alteraciones en la red de fodrina, cuando se incubaba por periodos más largos (figuras 15-17). La espectrina y fodrina mantienen la conexión de la membrana plasmática al citoesqueleto, esto da forma y estabilidad mecánica a la célula. Por lo que se puede sugerir que las alteraciones al citoesqueleto observadas en las células tratadas con Pet son una consecuencia de la ruptura de la espectrina/fodrina y de la conexión de los filamentos de actina (148-149, 169).

El que Pet ocasione degradación de componentes del citoesqueleto, como la espectrina, sugiere que las alteraciones histopatológicas observadas en diferentes modelos animales, inoculados con cepas EAggEC vivas de humano, podrían ser inducidos en gran medida por esta toxina. Tal es el caso de lo reportado por Tickoo y col. (121), quienes observaron que conejos inoculados con EAggEC presentaban diarrea y alteraciones del intestino caracterizado por acortamiento

moderado de las vellosidades y cariorrexis. Efectos similares fueron descritos por Vial y col. (84), utilizando el modelo asas ligadas de íleon de intestino de conejo y rata. Las lesiones histopatológicas en este estudio se caracterizan por acortamiento y necrosis hemorrágica de las vellosidades intestinales, respuesta inflamatoria intermedia, con edema e infiltración de la submucosa por células mononucleares.

Por otro lado, la diarrea aguda descrita en pacientes infectados con EA_gEC correlaciona los efectos enterotóxicos observados en cámaras de Ussing, al tratar con Pet la mucosa de yeyuno (140). Estos efectos pudieran a su vez estar relacionados con la degradación del citoesqueleto. La anquirina es una proteína periférica de la membrana celular que tiene alta afinidad por la espectrina (149), su función es la de adaptador entre la espectrina y la membrana plasmática. Las bombas de Na⁺/K⁺ y canales de Na⁺ son proteínas integrales que se colocan con la anquirina; este conjunto es parte de la organización que la espectrina soporta, indirectamente (170). Cuando la fodrina se altera, su participación como soporte integrador de este conjunto de proteínas se pierde y, en consecuencia, se altera la función de las bombas de Na⁺/K⁺ y de los canales de Na⁺; conduciendo a la salida de líquidos. Otro dato que apoya la propuesta de la participación de Pet en la diarrea y en el daño intestinal, son las alteraciones histológicas observadas en las mismas muestras de intestino (140), caracterizadas por incremento en la liberación de moco, exfoliación de células y desarrollo de abscesos de las criptas; efectos observados también en modelos animales y modelos *in vitro* en los que se utilizaron cepas EA_gEC productoras de Pet (104, 134, 140-141).

El aumento en la producción de moco, con la formación de acumulos de bacterias (120, 122), puede estar relacionado con la ruptura de la fodrina de las células caliciformes, seguido de la liberación de gránulos de secreción conteniendo mucinas y formando el biofilm moco-bacterias (171).

Como se ha mostrado, la exposición prolongada a Pet puede causar la muerte de las células epiteliales y éste evento contribuye de manera importante en la persistencia de la diarrea causada por EAaggEC. El daño que causa Pet en las células epiteliales sugiere la inducción de un fenómeno de apoptosis (172). La apoptosis define un tipo de muerte celular regulada, asociada con varias características morfológicas que incluyen: contracción, condensación de la cromatina, fragmentación nuclear/citoplásmica y formación de cuerpos densos, que son rápidamente removidas vía fagocitosis de células residentes (172). Las lesiones histopatológicas del intestino, que muestran los animales inoculados con cepas EAaggEC productoras de Pet y las alteraciones celulares de los ensayos en cultivos de células tratados con la toxina purificada, apoyan la hipótesis de que las células entran al estado de muerte celular (84, 104, 120-122, 125, 140-141, 147). El programa apoptótico favorece el incremento del calcio intracelular, desacoplamiento del potencial eléctrico mitocondrial, fragmentación de DNA internucleosomal y degradación proteolítica de substratos específicos, como la PARP (polimerasa poli-[ADP-ribosa], enzima involucrada en la vigilancia del genoma y reparación del DNA) y la alteración de proteínas del citoesqueleto tales como lamina (proteína de apoyo estructural en el núcleo), gelsolina, cinesina y fodrina (172). El proceso apoptótico incluye, además, la proteólisis inducida a través de la activación de cisteína proteasas llamadas caspasas, familia de enzimas relacionadas con la enzima beta-convertidora de interleucina 1 (interleukin 1 beta-converting enzyme, ICE) o proteasas ICE/CDE3 (172-174).

En condiciones normales, hay proteasas combinadas a membrana que preferentemente degradan proteínas de membrana de eritrocito dañadas, como defensa antioxidante secundaria (175). Este mecanismo, que participa en la remoción de proteínas de membrana dañadas, incluye la degradación de espectrina por una serina proteasa de 80 kDa, que está combinada a membrana y que forma un subproducto de alrededor de 120 kDa. Esta enzima es inhibida por el

disopropilfluorofosfato, DFP, inhibidor de serina proteasa (175). Pet, que es una serina proteasa, podría utilizar la misma vía para degradar espectrina de eritrocitos o fodrina de células epiteliales. Por otro lado, bajo condiciones fisiológicas, las cisteína proteasas activadas por calcio (calpainas), son importantes intermediarios en la conexión de calcio intracelular con la muerte de la célula (176), la cual es inducida a través de la degradación del sustrato preferido de la calpaina, la fodrina (177). Experimentalmente se ha demostrado que la infección de células HEP-2 en cultivo, con la cepa EAggEC O42 (JPN10) o la inoculación de éstas con el sobrenadante del cultivo de la misma bacteria, en el cual está presente Pet, inducen elevación del calcio intracelular y la fosforilación de proteínas dependientes de calcio (128).

El rompimiento de α -fodrina ha sido detectado durante la apoptosis, observada en una variedad de líneas celulares de ratón y humano. En los cultivos celulares que tienen apoptosis elevada, la fodrina es rota y forma un fragmento de 120 kDa. Sin embargo, cuando los cultivos contienen pocas células apoptóticas, el fragmento observado es de 150 kDa (178). Lo anterior sugiere que el fragmento menor (120 kDa) es un producto de rompimiento del fragmento mayor (150 kDa). Además, la formación de núcleos apoptóticos en células T JURKAT, después del pegado del antígeno Fas, fue bloqueado por inhibidores de serina proteasas, TPCK (tolilsulfonil fenilalanil clorometil cetona) y DCI, y por el inhibidor de la ICE, VAD-FMK, pero la degradación de cromatina y los cambios morfológicos fueron inhibidos sólo por TPCK (174, 179). Se ha observado que en necrosis celular (por ejemplo, células de neuroblastoma SH-SY5Y tratado con maitotoxina), el subproducto de 150 kDa de la α -fodrina es producido por calpainas celulares, mientras que en células neuronales en apoptosis, se aprecia un subproducto de 120 kDa. La formación del fragmento de 120 kDa fue insensible a inhibidores de calpainas, pero fue completamente bloqueado por inhibidores de proteasas semejantes a ICE. En dicho estudio se propuso que la calpaina e ICE pueden cada

uno romper α -fodrina en dos sitios, VY \downarrow GMMP para el fragmento de 150 kDa, el cual está localizado en una secuencia en repetición 11 y justo en la porción N-terminal del dominio de combinación a calmodulina, mientras que ICE forma un fragmento de 120 kDa que puede ser C-terminal, hacia la secuencia PEST, localizada entre las repeticiones 12 y 13 (173). Al realizar el análisis de la secuencia del subproducto de 120 kDa, en la degradación de espectrina inducida por Pet, la secuencia N-terminal correspondía a la α -espectrina madura, indicando que el sitio sobre el cual Pet rompe la molécula puede ser C-terminal, similar al sitio de rompimiento de ICE (ICE/CDE3 o caspasa-1)

Las células intestinales, así como todas las células, responden a señales extracelulares tales como: factores de crecimiento, citocinas, estrés del ambiente y factores tóxicos (toxinas bacterianas como Pet), para transmitir instrucciones para una respuesta coordinada apropiada. Entre las vías que frecuentemente usan para transducir esas señales están las cascadas de las proteínas cinasas activadas por mitogeno (MAPK) (180). Esas cascadas consisten de un modulo de tres cinasas que incluyen a MAPK, el cual es activado por una MAPK/ERK cinasa (MEK), que a su vez es activada por una MEK cinasa (MEKK). La activación de las cascadas de fosforilación de proteínas conduce finalmente a la regulación de factores de transcripción tales como ATF2, Elk-1 y c-Jun, para controlar la expresión de los genes. En la infección por EAggEC no se sabe que procesos intracelulares se activan y como éstos pueden relacionarse con las alteraciones celulares descritas.

Los miembros de la familia MAPK incluyen: las cinasas reguladas por señales extracelulares (ERK), las c-Jun NH2-terminal cinasas (JNK) y las cinasas p38 (180). La activación de MAPK requiere fosforilación dual sobre Treonina y Tirosina dentro del motivo Treonina-Xaa-Tirosina, donde Xaa representa Glutamina en ERK, Prolina en JNK, y Glicina en p38. Por otra parte, ERKs son activadas por agonistas para receptores con actividad de tirosina cinasa y por

receptores acoplados a proteínas G, que inducen mitogénesis, diferenciación o hipertrofia, mientras que los subgrupos JNK y p38 son activados por estrés celular (por ejemplo, radiaciones ultravioleta y gama, estrés osmótico, choque térmico, inhibidores de la síntesis de proteínas) y citocinas de la inflamación (por ejemplo, TNF-alfa e interleucina 1).

JNK y p38 son importantes moduladores del programa apoptótico. En algunas líneas celulares y en ciertos contextos, JNK es activada, río arriba, en una apoptosis mediada por caspasa 3, mientras que en otras, la activación de JNK es río abajo de la proteasa semejante a ICE. En la anoikis (muerte celular inducida por desprendimiento), las caspasas activan MEKK-1, un activador de JNK, indicando que JNK es río abajo de la caspasa, pero la activación de MEKK-1, mejora la activación de las caspasas, sugiriendo que esa cinasa puede amplificar o iniciar la cascada de caspasas. La activación de caspasas dependiente de cinasas incluye PAK2, MEKK-1 y PKC delta, que también promueven apoptosis citoplásmica y nuclear. p38 modula apoptosis mediada por salicilato de sodio en células Rat-1, glutamato en células granulares cerebrales y activación de Fas en la clona A3 Jukat. La inducción de Fas por actividad de p38 requiere la acción de ICE/CED3 en la clona A3 Jukat. Recientemente, una cinasa que regula la señal apoptótica (ASK1) ha sido identificada como una MAP cinasa cinasa cinasa (MAPKKK), que activa JNK y p38 durante la apoptosis inducida por TNF alfa. Mientras que JNK y p38 parecen estar involucradas en modular la apoptosis. ERK es generalmente considerada como un factor de sobrevivencia. En realidad, la privación de factores de crecimiento regulan a la baja ERK e inducen apoptosis en varios sistemas de células, mientras la activación de ERK durante el estrés puede ser protector. De la apoptosis se ha reportado que es regulada por un balance entre la activación de JNK-p38 y ERK. La activación de alguna de estas vías de señalización por Pet, nos darían elementos para conocer las rutas de activación inducidas por la toxina. Si estos efectos se presentan *in vivo* es factible proponer un modelo de daño intestinal

y el uso de inhibidores que bloqueen las vías de señalización de manera específica, capaces de elegir efectos anti-apoptóticos (180).

Por los resultados obtenidos en este trabajo emerge la posibilidad de estudiar la participación de Pet en la activación de MAPKs: ERK, JKN y p38 (181), como respuesta celular temprana a Pet, y su relación con la activación de las caspasas, proteasas intracelulares, que se relacionan con la degradación de la fodrina y que conduce, probablemente, a la muerte de la célula (182-185). De igual manera, resulta indispensable determinar si Pet induce a la célula a un estado apoptótico, a través de alterar la estructura de otros componentes del citoesqueleto y del núcleo celular (fragmentación de DNA) (182-183).

Otro evento importante que se ha observado en los diversos modelos animales, que se han empleado para evaluar la participación de EA_ggEC en daño intestinal, es la presencia de una respuesta inflamatoria intensa (84, 121). El mismo tipo de alteraciones se observaron al inocular asas ligadas de intestino de rata con fracciones purificadas de Pet. Las características de una respuesta inflamatoria intestinal sugieren que además de la actividad de proteasa, Pet induce un efecto quimioattractante sobre macrófagos y polimorfonucleares. Ensayos preliminares, en cámaras de Boyden (186), muestran que Pet ejerce efecto quimioattractante sobre macrófagos y polimorfonucleares. En dicho estudio se observó, además, que la toxina favorece el estallido respiratorio. Estos eventos, sumados al daño específico inducido por Pet sobre las células, participan de manera importante en el daño al epitelio intestinal.

El modelo de patogenicidad para EA_ggEC (1, 112) está basado en tres estados que incluye: I) adherencia a través de fimbrias (AAF/I y AAF/II), para la colonización del epitelio intestinal; II) la producción exagerada de moco por las células caliciformes, con acumulos de bacterias que forman una biopelícula,

ocasionando, probablemente, malabsorción; III) la elaboración de toxinas que ocasionan daño a la mucosa y favorecen secreción intestinal. La propuesta anterior se realizó antes de conocer la probable participación de las toxinas elaboradas por EAggEC. Con los resultados obtenidos en este trabajo y con las aportaciones de otros estudios, se puede plantear la participación de las dos toxinas, identificadas en el laboratorio (Pet y Pic), en la patogénesis de EAggEC. El primer estado no está aún totalmente dilucidado, ya que aunque el fenotipo de adherencia agregativa es importante para identificar estas bacterias, no está claro que adhesinas participan de manera específica en el evento. En relación con el segundo y tercer estado, la participación de la toxina Pic, facilitando la penetración de la capa de moco por la bacteria y la de Pet, por su actividad degradante de fodrina, pudieran alterar la morfología de la célula en general y, en particular, dañar las células caliciformes, situación que podrían incrementar la liberación de moco.

Estas alteraciones de manera indiscutible contribuyen al deterioro del epitelio intestinal, la liberación de líquidos que da lugar a la diarrea aguda y posteriormente dependiendo de la extensión del daño a problemas de diarrea persistente.

Falta por estudiar aspectos relacionados con posibles receptores celulares, así como la respuesta del huésped, para poder entender mejor la patología del proceso y así contar con elementos para implementar estrategias que ayuden a prevenir o tratar la infección por este patógeno.

REFERENCIAS

- 1.- Nataro, J. P., and J. B. Kaper. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. 11:142-201.
- 2.- Brenner, D. J. 1978. Characterization and clinical identification of *Enterobacteriaceae* by DNA hybridization. Prog. Clin. Pathol. 7:71-117.
- 3.- Sussman, M. 1985. *Escherichia coli* in human and animal disease. In: Sussman M. (ed.). The virulence of *Escherichia coli*. Academic Press, Inc., New York, p. 7-45.
- 4.- Kauffmann, F. and A. Dupont. 1950. *Escherichia coli* from infantile gastroenteritis. Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand. 27:552-564.
- 5.- Parry, S. H., S. N. Abraham, and M. Sussman. 1982. The biological and serological propieties of adhesion determinants of *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections. In: Schulte-Wissermann H. (ed.). Clinical, bacteriological and immunological aspects of urinary tract infection in children. Thieme. Stuttgart. p. 113-125.
- 6.- Orskov, I. and F. Orskov. 1983. Serology of *Escherichia coli* fimbriae. Progress in Allergy. 33:80-105.
- 7.- Orskov, F. and I. Orskov. 1984. Serotyping of *Escherichia coli*. In: Bergan T. (ed.). Methods in microbiology. Vol. 14, Academic Press, London. p. 43-112.
- 8.- Milch, H. 1978. Phage typing of *Escherichia coli*. In: Bergan T. and J. R. Norris (eds.). Methods in Microbiology. Vol. II. Academic Press, London, p. 87-155.
- 9.- Gillies, R. R. 1978. Bacteriocin typing of *Enterobacteriaceae*. In: Bergan T. and J. R. Norris (eds.). Methods in Microbiology. Vol. II, Academic Press, London, p. 78-86.
- 10.- Jann, K., and B. Jann. 1985. Cell surface components and virulence: *Escherichia coli* O and K antigens in relation to virulence and pathogenicity. In: Sussman M. (ed.). The virulence of *Escherichia coli*. Academic Press, Inc., New York, p. 157-177.
- 11.- Levine, M. M. 1987. *Escherichia coli* that cause diarrhea: enterotoxigenic, enteropathogenic, enteroinvasive, enterohemorrhagic, and enteroadherent. J. Infect. Dis. 155:377-389.
- 12.- Nataro, J. P., J. B. Kaper, R. Robins-Browne, V. Prado, P. A. Vial, and M. M. Levine. 1987. Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. J. Ped. Infect. Dis. 6:829-831.

- 13.- De, S. N., k. Bhattacharya, J. K. Sarkar. 1956. A study of the pathogenicity of strains of *Bacterium coli* from acute and chronic enteritis. *J. Pathol. Bacteriol.* **71**:201-206.
- 14.- Hacker J., G. Blum-Oehler, I. Muhldorfer, and H. Tschape. 1997. Pathogenicity islands of virulent bacteria: structure, function and impact and microbial evolution. *Mol. Microbiol.* **23**:1087-1097.
- 15.- Cravioto, A., R. E. Reyes, and F. Trujillo. 1990. Risk of diarrhea during the first year of life associated with initial and subsequent colonization by specific enteropathogens. *Am. J. Epidemiol.* **131**:886-904.
- 16.- Sack, R. B. 1975. Human diarrheal disease caused by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Annu. Rev. Microbiol.* **29**:333-353.
- 17.- Merson, M. H., G. K. Morris, and D. A. Sack. 1976. Travellers' diarrhea in Mexico: a prospective study of physicians and family members attending a congress. *N. Engl. J. Med.* **294**:1299-1305.
- 18.- Hyams, K. C., A. L. Bourgeois, and B. R. Merrell. 1991. Diarrheal disease during Operation Desert Shield. *N. Engl. J. Med.* **325**:1423-1428.
- 19.- Sprangler, B. D. 1992. Structure and function of cholera toxin and the related *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin. *Microbiol. Rev.* **56**:622-647.
- 20.- Sears, C. L., and J. B. Kaper. 1996. Enteric bacterial toxins: Mechanisms of action and linkage to intestinal secretion. *Microbiol. Rev.* **60**:167-215.
- 21.- Eklund, S., I. Brunsson, M. Jodal, and O. Lundgren. 1987. Changes in cyclic 3'5'-adenosine monophosphate tissue concentration and net fluid transport in the cat's small intestine elicited by cholera toxin, arachidonic acid, vasoactive intestinal polypeptide, and 5-hydroxytryptamina. *Acta Physiol. Scand.* **129**:115-125.
- 22.- Mc Gee, D. H., C. O. Elson, and J. R. Mc Ghee. 1993. Enhancing effect of cholera toxin on interleukin-6 intestinal epithelial cells: mode of action and augmenting effect of inflammatory cytokines. *Infect. Immun.* **61**:4637-4644.
- 23.- Yoshimura, S., H. Ikemura, H. Watanabe, et al. 1985. Essential structure for full enterotoxigenic activity of heat-stable enterotoxin produced by enterotoxigenic *Escherichia coli*. *FEBS Lett.* **181**:138-142.
- 24.- Kupersztoch, Y. M., K. Tachias, and C. R. Mooman. 1990. Secretion of methanol insoluble heat-stable enterotoxin (STb): energy-and-secA-dependent conversion of pre STb to an intermediate indistinguishable from the extracellular toxin. *J. Bacteriol.* **172**:2427-2432.
- 25.- Mezoff, A. G., R. A. Giannella, M. N. Eade, and M. B. Cohen. 1992. *Escherichia coli* enterotoxin (Sta) binds to receptor, stimulates guanylcyclase, and impairs absorption in rata colon. *Gastroenterology.* **102**:816-822.

- 26.- De Graff, F. K. 1990. Genetic of adhesive fimbriae of intestinal *Escherichia coli*. *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* **151**:29-53.
- 27.- Willshaw, G. A., M. M. McConnell, H. R. Smith, B. Rowe. 1990. Structural and regulatory genes for coli surface associated antigen 4 (CS4) are encoded by separate plasmids in enterotoxigenic *Escherichia coli* strains of serotype O25:H42. *FEMS Microbiol. Lett.* **68**:225-260.
- 28.- Girón, J. A., M. M. Levine, and J. B. Kaper. 1994. Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **12**:71-82.
- 29.- Caron, J., L. M. Coffield, and J. R. Scott. 1989. A plasmid-encoded regulatory gene, *rns* required for expression of CS1 and CS2 adhesins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **86**:963-967.
- 30.- Gastra, W., B. J. A. M. Jordi, and E. M. A. Mul. 1990. A silent regulatory gene *cfaD'* on region 1 of the CFA/I plasmid NTP113 of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Microbial. Pathogen.* **9**:285-291.
- 31.- Cravioto, A., R. J. Gross, S. M. Scotland, and B. Rowe. 1979. An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional enteropathogenic serotypes. *Curr. Microbiol.* **3**:95-99.
- 32.- Scaletsky, I. C. A., M. L. M. Silva, and L. R. Trabulsi. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **45**:534-536.
- 33.- Nataro, J. P., I. C. A. Scaletsky, J. B. Kaper, M. M. Levine, and L. R. Trabulsi. 1985. Plasmid-mediated factors conferring diffuse and localized adherence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **48**:378-383.
- 34.- Varela, C., A. Aguirre y J. Carrillo. 1946. *Escherichia coli* Gómez, nueva especie aislada de un caso mortal de diarrea. *Bol. Med. Hosp. Inf. Méx.* **3**:623-627.
- 35.- Knutton, S., D. R. Lloyd, and A. S. McNeish. 1987. Adhesion of enteropathogenic *Escherichia coli* to human intestinal enterocytes and cultured human intestinal mucosa. *Infect. Immun.* **55**:69-77.
- 36.- Girón, J. A., S. Y. Ho, and G. K. Schoolnick. 1991. An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Science* **254**:710-713.
- 37.- Sohel, I., J. L. Puente, W. J. Murray, J. Vuopio-Varkila, and G. K. Scholnik. 1993. Cloning and characterization of the bundle-forming pili gene of enteropathogenic *Escherichia coli* and its distribution in *Salmonella* serotypes. *Molec. Microbiol.* **7**:563-575.
- 38.- Levine, M. M., and R. Edelman. 1984. Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: epidemiology and pathogenesis. *Epidemiol. Rev.* **6**:31-51.

- 39.- Cravioto, A., A. Tello, A. Navarro, J. Ruiz, H. Villafan, F. Uribe, and C. Eslava. 1991. Association of *Escherichia coli* HEp-2 adherence patterns with type and duration of diarrhoea. *Lancet*. **337**:262-264.
- 40.- Girón, J. A., M. S. Donnenberg, W. C. Martin, K. G. Jarvis, and J. B. Kaper. 1993. Distribution of bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **175**:7391-7403.
- 41.- Sohel, I., J. L. Puente, S. W. Ramer, D. Bieber, C. Wu, and G. K. Schoolnik. 1996. Enteropathogenic *Escherichia coli*: identification of gene cluster coding for bundle-forming pilus morphogenesis. *J. Bacteriol.* **178**:2613-2628.
- 42.- Stone, K. D., H. Z. Zhang, L. K. Carlson, and M. S. Donnenberg. 1996. A cluster of fourteen genes from enteropathogenic *Escherichia coli* is sufficient for the BFP ultrastructure. *Mol. Microbiol.* **20**:325-338.
- 43.- Zhang, H. Z., and M. S. Donnenberg. 1996. *DsbA* is required for stability of the type IV pilin of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Microbiol.* **21**:787-797.
- 44.- Knutton, S., T. Baldwin, P. H. Williams, and A. S. McNeish. 1989. Actin accumulation at sites of bacterial adhesion to tissue culture cells: basis of a new diagnostic test for enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **57**:1290-1298.
- 45.- Baldwin, T. J., S. F. Brooks, S. Knutton, H. A. Manjarrez-Hernandez, A. Aitken, and P. H. Williams. 1990. Protein phosphorylation by protein kinase C in HEp-2 cells infected with enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **58**:761-765.
- 46.- Moon, H. W., S. C. Whipp, R. A. Argenzio, M. M. Levine, and R. A. Giannella. 1983. Attaching and effacing activities of rabbit and human enteropathogenic *Escherichia coli* in pig and rabbit intestines. *Infect. Immun.* **41**:1340-1351.
- 47.- Jerse, A. E., Y. Jun, B. D. Tall, and J. B. Kaper. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **87**:7839-7843.
- 48.- Jerse, A. E., K. G. Gicquelais, and J. B. Kaper. 1991. Plasmid and chromosomal elements involved in the pathogenesis of attaching and effacing *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **59**:3869-3875.
- 49.- Finlay, B. B., I. Rosenshire, M. S. Donnenberg, and J. B. Kaper. 1992. Cytoskeletal composition of attaching and effacing lesions associated with enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect. Immun.* **60**:2541-2543.
- 50.- Dytoc, M., L. Fedorko, and P. M. Sherman. 1994. Signal transduction in human epithelial cells infected with attaching and effacing *Escherichia coli* in vitro. *Gastroenterology.* **106**:1150-1161.

- 51.- Levine, M. M., J. P. Nataro, H. Karch, M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, M. L. Clements, and A. D. O'Brien. 1985. The diarrheal response of humans to some classic serotypes of enteropathogenic *Escherichia coli* is dependent on a plasmid-encoding an enteroadhesiveness factor. *J. Infect. Dis.* **152**:550-559.
- 52.- Nataro, J. P., M. M. Baldini, J. B. Kaper, R. E. Black, N. Bravo, and M. M. Levine. 1985. Detection of an adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli* with a DNA probe. *J. Infect. Dis.* **152**:560-565.
- 53.- Jerse, A. E., and J. B. Kaper. 1991. The *eae* gene of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes a 94-kilodalton membrane protein, the expression of which is influenced by the EAF plasmid. *Infect. Immun.* **59**:4302-4309.
- 54.- Rosenshine, I., M. S., Donnenberg, J. B. Kaper, and B. B. Finlay. 1992. Signal transduction between enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and epithelial cells: EPEC induces tyrosine phosphorylation of host cell proteins to initiate cytoskeletal rearrangement and bacterial uptake. *EMBO J.* **11**:3551-3560.
- 55.- Stein, M., B. Kenny, M. A. Stein, and B. B. Finlay. 1996. Characterization of EspC, a 110-Kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J. Bacteriol.* **178**:6546-6554.
- 56.- Tzipori, S., R. M. Robins-Browne, G. Gonis, J. Hayes, M. Withers, and E. McCarty col. 1985. Enteropathogenic *Escherichia coli* enteritis: evaluation of the gnotobiotic piglet as a model of human infection. *Gut.* **26**:570-578.
- 57.- Brunder W., H. Schmidt, and H. Karch. 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Mol. Microbiol.* **24**:767-778.
- 58.- Scotland, S. M., H. R. Smith, and B. Rowe. 1985. Two distinct toxins active on Vero cells from *Escherichia coli* O157. *Lancet* **ii**:885-886.
- 59.- Marquez, L. R. M., J. S. M. Peiris, S. J. Cryz, and A. D. O'Brien. 1987. *Escherichia coli* strains isolated from pigs with edema disease produce a variant of Shiga-like toxin II. *FEMS Microbiol. Lett.* **44**:33-38.
- 60.- Ito, H., T. Yutsudo, T. Hirayama, and Y. Takeda. 1988. Isolation and some properties of A and B subunits of Vero toxin 2 and in vitro formation of hybrid toxins between subunits of Vero toxin 1 and Vero toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7. *Microbiol. Pathogen.* **5**:188-195.
- 61.- Pellizzari, A., H. Pang, and C. A. Lingwood. 1992. Binding of verocytotoxin 1 to it's receptor is influenced by differences in receptor fatty acid content. *Biochemistry.* **31**:1363-1370.
- 62.- Igarishi, K., T. Ogasawara, and K. Ito. 1987. Inhibition of elongation factor 1 dependent aminoacyl-tRNA binding to ribosomes by Shiga-like toxin I (VT1)

- from *Escherichia coli* O157:H7 and by Shiga toxins. FEMS Microbiol. Lett. 44:91-94.
- 63.- Scotland, S. M., H. R. Smith, G. A. Willshaw, and B. Rowe. 1983. Verocytotoxin production in strains of *Escherichia coli* is determined by genes carried on a bacteriophage. Lancet. ii:216.
 - 64.- O'Brien, A. D., J. W. Newland, S. F. Miller, R. K. Holmes, H. W. Smith, and S. B. Formal. 1984. Shiga-like toxin converting phages from *Escherichia coli* strains that cause hemorrhagic colitis or infantile diarrhea. Science. 226:694-696.
 - 65.- Smith, H. R., N. P. Day, and S. M. Scotland. 1984. Phage-determined production of verocytotoxin in strains of *Escherichia coli* of serogroup O157. Lancet. i:1242-1243.
 - 66.- Scotland, S. M., N. P. Day, and B. Rowe. 1980. Production of a cytotoxin affecting Vero cells by strains of *Escherichia coli* belonging to traditional enteropathogenic serogroups. FEMS Microbiol. Lett. 7:15-17.
 - 67.- Karmali, M. A., M. Petric, B. T. Steele, and C. Lim. 1983. Sporadic cases of haemolytic-uraemic syndrome associated with faecal cytotoxin and cytotoxin-producing *Escherichia coli* in stools. Lancet. i:619-620.
 - 68.- Spika, J. S., J. E. Parson, and D. Nordenberg. 1986. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea associated with *Escherichia coli* O157:H7 in day care center. J. Peadiatr. 109:287-291.
 - 69.- Cravioto, A., V. Vazquez, and A. Soria. 1988. Producción de citotoxina tipo Shiga (SLT) 1 en cepas de *Escherichia coli* aisladas de niños con diarrea en una comunidad rural. Bol. Med. Hosp. Infant. Mex. 45:206-210.
 - 70.- Lopez, E. L., M. Diaz, and S. Grinstein. 1989. Hemolytic uremic syndrome and diarrhea in Argentine children: the role of Shiga-like toxins. J. Infect. Dis. 160:469-475.
 - 71.- Johnson, W. M., H. Lior, and G. S. Bezanson. 1983. Cytotoxic *Escherichia coli* O157:H7 associated with haemorrhagic colitis in Canada. Lancet. i:76.
 - 72.- Formal, S., and R. B. Hornick. 1978. Invasive *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 137:641-647.
 - 73.- Collins, H., and S. B. Formal. 1983. Alteraciones in the pathogenicity of *Escherichia coli* K12 after transfer of plasmid and chomosomal genes from *Shigella flexneri*. Infect. Immun. 39:1392-1402.
 - 74.- Sereny, B. 1975. Experimental kerato conjuntivitis Shigellosa. Acta Microbiol. Acad. Sci. Hung. 4:367-376.
 - 75.- Sansonetti, P., D. A. Kopecko, and S. B. Formal. 1982. Involment of a plasmid in the invasive ability of *Shigell flexneri*. Infect. Immun. 35:852-860.

- 76.- Sasakawa, C., K. Kamata, T. Sakai, S. Murayama, S. Makino, and Yoshikawa. 1986. Molecular alteration of the 140-megadalton plasmid associated with loss of virulence and Congo red binding activity in *Shigella flexneri*. *Infect. Immun.* 51:470-475.
- 77.- Al-Hasani, K., K. Rajakumar, D. Bulach, R. Robins-Browne, B. Adler, and H. Sakellaris. 2001. Genetic organization of the *she* pathogenicity island in *Shigella flexneri* 2a. *Microb. Pathog.* 30:1-8.
- 78.- Hale, T., and S. B. Formal. 1981. Protein Synthesis in HeLa of Henle 407 cells infect with *Shigella dysenteriae* 1, *Shigella flexneri* 2a or *Salmonella typhimurium* w 118. *Infect. Immun.* 32:137-144.
- 79.- Brow, E., and S. Rothman. 1980. Inhibition of protein synthesis in intact HeLa cells by *Shigella dysenteriae* toxin. *Infect. Immun.* 29:90-107.
- 80.- San-Sonetti, P., A. Ryter, P. Clerc, A. Maurilli, and J. Maunier. 1986. Multiplication of *Shigella flexneri* within HeLa cells: Lysis of the phagocytic vacuole and plasmid mediated contact hemolysis. *Infect. Immun.* 51:461-469.
- 81.- Cravioto, A., R. E. Reyes, R. Ortega, G. Fernandez, R. Hernandez, and D. Lopez. 1988. Prospective study of diarrhoeal disease in a cohort of rural Mexican children: incidence and isolated pathogens during the first two years of life. *Epidemiol. Infect.* 101:123-134.
- 82.- Mathewson, J. J., P. C. Johnson, H. L. DuPont, D. R. Morgan, S. A. Thornton, L. V. Wood, and C. D. Ericsson. 1985. A newly recognized cause of traveler's diarrhea: enteroadherent *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 151:471-475.
- 83.- Mathewson, J. J., P. C. Johnson, and H. L. DuPont. 1986. Pathogenicity of enteroadherent *Escherichia coli* in adult volunteers. *J. Infect. Dis.* 154:524-527.
- 84.- Vial, P. A., R. M. Robins-Browne, H. Lior, V. Prado, J. B. Nataro, D. Maneval, A. Elsayed, and M. M. Levine. 1988. Characterization of enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*, a putative agent of diarrheal disease. *J. Infect. Dis.* 158:70-79.
- 85.- Levine, M. M., V. Prado, R. Robins-Browne, H. Lior, J. B. Kaper, S. L. Moseley, K. Gicquelais, J. P. Nataro, P. Vial, and B. Tall. 1988. Use of DNA probes and HEp-2 cell adherence assay to detect diarrheogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* 158:224-228.
- 86.- Bhan, M. K., P. Raj, M. M. Levine, J. B. Kaper, N. Bhandari, R. Srivastava, R. Kumar, and S. Sazawal. 1989. Enteroadherent *Escherichia coli* associated with persistent diarrhea in a cohort of rural children in India. *J. Infect. Dis.* 159:1061-1064.
- 87.- Baqui, A. H., R. Bradley Sack, R. E. Black, K. Haider, A. Hossain, A. R. M. Abdul Alim, M. Yunus, H. R. Chowdhury, and A. K. Siddique. 1992.

Enteropathogens associated with acute and persistent diarrhea in Bangladesh in children < 5 years of age. *J. Infect. Dis.* **166**:792-796.

- 88.- Gomes, T. A. T., V. Rassi, K. L. MacDonald, S. R. T. S. Ramos, L. R. Trabulsi, M. A. M. Vieira, B. E. C. Guth, J. A. N. Candeias, C. Ivey, M. R. F. Toledo, and P. A. Blake. 1991. Enteropathogens associated with acute diarrheal disease in urban infants in Sao Paulo. *J. Infect. Dis.* **164**:331-337.
- 89.- Mathewson, J. J., R. A. Oberhelman, H. L. DuPont, F. J. de la Cabada, and E. V. Garybay. 1987. Enteroadherent *Escherichia coli* as a cause of diarrhea among children in Mexico. *J. Clin. Microbiol.* **25**:1917-1919.
- 90.- Bhan M. K., V. Khoshoo, H. Sommerfelt, P. Raj, S. Sazawal, and R. Srivastava. 1989. Enteroaggregative *Escherichia coli* and *Salmonella* associated with nondysenteric persistent diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**:499-502.
- 91.- Wanke C. A., J. B. Schorling, L. J. Barret, M. A. Desauza, and R. L. Guerrant. 1991. Potential role of adherence traits of *Escherichia coli* in persistent diarrhea in an urban Brazilian slum. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **10**:746-751.
- 92.- Henry F. J., A. S. Uday, C. A. Wanke, and K. M. A. Aziz. 1996. Epidemiology of persistent diarrhea and etiologic agents in Mirzapur, Bangladesh. *Acta Paediatr. Suppl.* **381**:27-31.
- 93.- Bhatnagar S., M. K. Bhan, H. Sommerfelt, P. Raj, S. Sazawal, and R. Srivastava. 1989. Enteroaggregative *Escherichia coli* and *Salmonella* associated with nondysenteric persistent diarrhea. *Pediatr. Infect. Dis. J.* **8**:499-502.
- 94.- Paul M., T. Tsukamoto, A. R. Ghosh, et al. 1994. The significance of enteroaggregative *Escherichia coli* in the etiology of hospitalized diarrhoea in Calcutta, India, and the demonstration of a new honey-combed pattern of aggregative adherence. *FEMS. Microbiol. Lett.* **117**:319-326.
- 95.- Kang G., M. M. Mathan, and V. I. Mathan. 1995. Evaluation of a simplified HEp-2 cell adherence assay for *Escherichia coli* isolated from South Indian children with acute diarrhea and controls. *J. Clin. Microbiol.* **33**:2204-2205.
- 96.- Lima A. A. M., G. Fang, J. B. Schorling, et al. 1992. Persistent diarrhea in Northeast Brazil: Etiologies and interactions with malnutrition. *Acta Paediatr. Scand.* **81** Suppl.381:39-44.
- 97.- Fang G. D., A. M. Lima, C. C. Martin, L. J. Barret, J. P. Nataro, and R. L. Guerrant. 1992. Aggregative HEp-2 cell adherent *Escherichia coli* and *Cryptosporidium*: important pathogens in hospitalized children with persistent diarrhea in Northeast Brazil. abstr. 686. In Abstracts of the 32nd Intersci. Conf. Antimicrob. Agents and Chemother. 1992.
- 98.- Bauzari S., A. Jafari, A. A. Farhoudi-Moghaddam, F. Shokouhi, and M. Parsi. 1994. Adherence of non-enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *J. Med. Microbiol.* **40**:95-97.

- 99.- Gonzalez R., C. Dias, M. Marino, R. Cloralt, M. Pequeneze, and I. Perez-Schael. 1997. Age-specific prevalence of *Escherichia coli* with localized and aggregative adherence in Venezuelan infants with acute diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **35**:1103-1107.
- 100.- Huppertz H. I., S. Rutkowski, S. Aleksic, and H. Karch. 1997. Acute and chronic diarrhoea and abdominal colic associated with enteroaggregative *Escherichia coli* in young children living in western Europe. *Lancet.* **349**:1660-1662.
- 101.- Cobeljic M., B. Miljkovic-Selimovic, D. Paunovic-Todosijevic, et al. 1996. Enteroaggregative *Escherichia coli* asociated with an outbreak of diarrhoea in a neonatal nursery ward. *Epidemiol. Infect.* **117**:11-16.
- 102.- Smith H. R., T. Cheasty, B. Rowe. 1997. Enteroaggregative *Escherichia coli* and outbreak of gastroenteritis in U. K. **350**:814-815.
- 103.- Pai M., G. Kang, B. S. Ramakrishna, A. Venkataraman, and J. Muliylil. 1997. An epidemic of diarrhoea in south India caused by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Indian J. Med. Res.* **106**:7-12.
- 104.- Eslava C., J. Villaseca, R. Morales, A. Navarro, and A. Cravioto. 1993. Identification of a protein with toxigenic activity produced by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. **B-105**. In Abstracts of the 93rd General Meeting of the American Society for Microbiology 1993. American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 105.- Itoh Y., I. Nagano, M. Kunishima, and T. Ezaki. 1997. Laboratory investigation of enteroaggregative *Escherichia coli* O untypeable:H10 asociated with a massive outbreak of gastrointestinal illness. *J. Clin. Microbiol.* **35**:2546-2550.
- 106.- Knutton, S., R. K. Shaw, M. K. Bhan, H. R. Smith, M. M. McConnell, T. Cheasty, P. H. Williams, and T. J. Baldwin 1992. Ability of Enteroaggregative *Escherichia coli* Strains To Adhere In Vitro To Humam Intestinal Mucose. *Infect. Immun.* **60**:2083-2091.
- 107.- Scotland, S. M., H. R. Smith, B. Said, G. A. Willshaw, T. Cheasty, and B. Rowe. 1991. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in Britain as enteroaggregative or as members of a subclass of attaching-and-effacing *E. coli* not hybridising with the EPEC adherence-factor probe. *J. Med. Microbiol.* **35**:278-283.
- 108.- Smith, H. R., S. M. Scotland, G. A. Willshaw, B. Rowe, A. Cravioto, and C. Eslava. 1994. Isolates of *Escherichia coli* O44:H18 of diverse origen are enteroaggregative. *J. Infect. Dis.* **170**:1610-1613.
- 109.- Nataro, J. P., D. Yikang, S. Cookson, A. Cravioto, S. J. Savarino, L. D. Guers, M. M. Levine, and C. O. Tacket. 1995. Heterogeneity of enteroaggregative

- Escherichia coli* virulence factors demonstrated in volunteers. J. Infect. Dis. 171:465-468.
- 110.- Steiner, T. S., A. A. M. Lima, J. P. Nataro, and L. R. Guerrant. 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. J. Infect. Dis. 177:88-96.
- 111.- Nataro, J. P., Y. Deng, D. R. Maneval, A. L. German, W. C. Martin and M. M. Levine. 1992. Aggregative adherence fimbriae I of enteroaggregative *Escherichia coli* mediate adherence to HEp-2 cell and hemagglutination of human erythrocytes. Infect. Immun. 60:2297-2303.
- 112.- Nataro, J. P., T. Steiner, and R. Guerrant. 1998. Enteroaggregative *Escherichia coli*. Emerg. Infect. Dis. 4:251-261.
- 113.- Nataro, J. P., D. Yikang, J. A. Giron, S. J. Savarino, M. H. Kothary, and R. Hall. 1993. Aggregative adherence fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli* requires two unlinked plasmid regions. Infect. Immun. 61:1126-1131.
- 114.- Czczulin, J. R., S. Balepur, S. Hicks, et al. 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 65:4135-4145.
- 115.- Nataro, J. P., D. Yikang, D. Yingkang, and K. Walker. 1994. AggR, a transcriptional activator of Aggregative Adherence Fimbria I expression in enteroaggregative *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 176:4691-4699.
- 116.- Savarino, S. J., P. Fox, D. Yikang, and J. P. Nataro. 1994. Identification and characterization of a gene cluster mediating enteroaggregative *Escherichia coli* aggregative adherence fimbria I biogenesis. J. Bacteriol. 176:4949-4957.
- 117.- Dedroy, C. J. Yealy, R. A. Wilson, M. K. Bhan, and R. Kumar. 1995. Antibodies raised against the outer membrane protein interrupt adherence of enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 63:2873-2879.
- 118.- Wai, S. N., A. Takade, and K. Amako. 1996. The hydrophobic surface protein layer of enteroaggregative *Escherichia coli* strains. FEMS Microbiol Lett. 135:17-22.
- 119.- Benjamin, P., M. Federman, and C. A. Wanke. 1995. Characterization of an invasive phenotype associated with enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 63:3417-3421.
- 120.- Hicks, S., D. C. K. Candy, and A. D. Phillips. 1996. Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa In vitro. Infect. Immun. 64:4751-4760.

- 121.- Tickoo, S. K., M. K. Bham, R. Srivastava, B. K. Dass, M. Shariff, S. Saini, and R. Kumar. 1992. Intestinal colonization and production of diarrhea by enteroadherent-aggregative *Escherichia coli*. *Indian J. Med. Res.* **95**:278-283.
- 122.- Tzipori, S., J. Montanaro, R. M. Robins-Browne, P. Vial, R. Gibson, and M. M. Levine. 1992. Studies with Enteroaggregative *Escherichia coli* in the Gnotobiotic Piglet Gastroenteritis Model. *Infect. Immun.* **60**:5302-5306.
- 123.- Baudry, B., S. J. Savarino, P. Vial, J. B. Kaper, and M. M. Levine. 1990. A sensitive and specific DNA probe to identify enteroaggregative *Escherichia coli*, a recently discovered diarrheal pathogen. *J. Infect. Dis.* **161**:1249-1251.
- 124.- Schmidt, H., C. Knop, S. Franke, S. Aleksic, J. Heeseman, and H. Karch. 1995. Development of PCR for screening of enteroaggregative *Escherichia coli*. *J. Clin. Microbiol.* **33**:701-705.
- 125.- Nataro, J. P., S. Hicks, A. D. Phillips, P. A. Vial, and C. L. Sears. 1996. T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect. Immun.* **64**:4761-4768.
- 126.- Savarino, S. J., A. Fasano, D. C. Robertson, and M. M. Levine. 1991. Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro rabbit intestinal model. *J. Clin. Invest.* **87**:1450-1455.
- 127.- Savarino, S. J., A. Fasano, J. Watson, B. M. Martin, M. M. Levine, S. Guandalini, and P. Guerry. 1993. Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin 1 represents another subfamily of *E. coli* heat-stable toxin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**:3093-3097.
- 128.- Baldwin, T. J., S. Knutton, L. Sellers, H. A. Manjarrez-Hernandez, A. Aitken, and P.H. Williams. 1992. Enteroaggregative *Escherichia coli* strains secrete a heat labile toxin antigenically related to *E. coli* hemolysin. *Infect. Immun.* **60**:2092-2095.
- 129.- Haque, M. A., K. Ohki, M. Kikuchi, and O. Kahashi. 1994. Contact hemolysin production by strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated from children with diarrhea. *J. Clin. Microbiol.* **32**:1109-1111.
- 130.- Welch, R. A., and S. Falkow. 1984. Characterization of *Escherichia coli* hemolysins conferring quantitative differences in virulence. *Infect. Immun.* **43**:156-160.
- 131.- Welch, R. A., 1991. Pore-forming cytolysins of Gram negative bacteria. *Mol. Microbiol.* **5**:521-528.
- 132.- Elliot, S. J., B. J. Mee, and B. J. Chang. 1995. Diarrhoea-associated alpha-hemolytic *E. coli* display both enteropathogenic and uropathogenic features, abstr. C-44, *In Abstracts of the 95th General Meeting of the American Society for Microbiology 1995*. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- 133.- Villaseca Flores Jorge Mateo. 1997. Factores bacterianos involucrados en la patogenicidad de *Escherichia coli* enteroagregativa. Tesis de Maestría en Ciencias (Biología Celular). Facultad de Ciencias, UNAM.
- 134.- Eslava, C., F. Navarro-Garcia, J. R. Czczulin, I. R. Henderson, A. Cravioto, and A. Cravioto. 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **66**:3149-3154.
- 135.- Henderson, I. R., J. Czczulin, C. Eslava, F. Noriega, and P. Nataro. 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **67**:5587-5596.
- 136.- Henderson, I. R., and J. P. Nataro. 1998. Virulence functions of autotransporter proteins. *Infect. Immun.* **69**:1231-1243.
- 137.- Stein, M., B. Kenny, M. A. Stein, and B. B. Finlay. 1996. Characterization of EspC, a 110-Kilodalton protein secreted by enteropathogenic *Escherichia coli* which is homologous to members of the immunoglobulin A protease-like family of secreted proteins. *J. Bacteriol.* **178**:6546-6554.
- 138.- Benjellountouimi, Z., P. J. Sansonetti, and C. Parsot. 1995. SepA, the major extracellular protein of *Shigella flexneri*-autonomous secretion and involvement in tissue invasion. *Mol. Microbiol.* **17**:123-135.
- 139.- Provence, D. L., and R. Curtiss. 1994. Isolation and characterization of a gene involved in hemagglutination by avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infect. Immun.* **62**:1369-1380.
- 140.- Navarro-Garcia, F., C. Eslava, J. M. Villaseca, R. Lopez-Revilla, J. R. Czczulin, S. Srinivas, J. P. Nataro, and A. Cravito. 1998. In vitro effects of a high-molecular weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **66**:3149-3154.
- 141.- Navarro-Garcia, F., C. Sears, C. Eslava, A. Cravioto, and J. P. Nataro. 1999. Cytoskeletal effects induced by Pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* **67**:2184-2192.
- 142.- Hernández Chiñas Ulises. 1996. Capacidad patogénica de diferentes proteínas identificadas en cepas de *Escherichia coli* enteroagregativa. Tesis de licenciatura (QFB). Unidad Académica de Ciencias Químicas, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.
- 143.- Hernández, U., J. Villaseca, A. Navarro, A. Cravioto, and C. Eslava. 2001. Expression of Pet and Pic the serine proteases from enteroaggregative *Escherichia coli* in strains isolated from Mexican children with and without diarrhea, abstr. B-226, p. 92. In Abstracts of the 101 General Meeting of the American Society for Microbiology 2001. American Society for Microbiology, Washington, D. C.

- 144.- Navarro-García, F., A. Canizalez-Roman, J. Luna, C. Sears, and J. P. Nataro. 2001. Plasmid-encoded toxin of enteroaggregative *Escherichia coli* is internalized by epithelial cells. *Infect Immun.* **69**:1053-1060.
- 145.- Villaseca, J., C. Eslava, U. Hernández, A. Navarro, R. García, and A. Cravioto. 1999. Effects induced by Pet on cell membrane skeleton, a protein secreted by enteroaggregative *Escherichia coli*, abstr. B/D-131, *In Abstracts of the 99th General Meeting of the American Society for Microbiology 1999.* American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 146.- Villaseca, J. M., J. Molina, R. Capello, J. P. Nataro, A. Cravioto, F. Navarro, and C. Eslava. 2000. Pet the serine protease from enteroaggregative *Escherichia coli*, induced cytoskeleton alterations of epithelial cells associated with fodrin disruption, abstr. GM00-a-019126-ASM, *In Abstracts of the 100th General Meeting of the American Society for Microbiology 2000.* American Society for Microbiology, Washington, D. C.
- 147.- Villaseca, J. M., F. Navarro-García, G. Mendoza-Hernández, J. P. Nataro, A. Cravioto, and C. Eslava. 2000. Pet toxin from enteroaggregative *Escherichia coli* produces cellular damage associated with fodrin disruption. *Infect. Immun.* **68**: 5920-5927.
- 148.- Dhermy, D. 1991. The spectrin super-family. *Biol. Cell.* **71**:249-254.
- 149.- Bennet, V., and D. M. Gilligan. 1993. The spectrin-based membrane skeleton and micron-scale organization of plasma membrane. *Annu. Rev. Cell Biol.* **9**:27-66.
- 150.- Green, A. A., and W. L. Hughes. 1955. Protein fractionation on the basis of solubility in aqueous solutions of salts and organic solvents. *Methods in Enzymology.* Colowick S. P. and N. O. Kaplan (ed.). Vol. 1. Academic Press, New York, p. 67-87.
- 151.- Bizzini, B., A. Turpin, and M. Raynaud. 1969. Production et purification de la toxine tétanique. *Annales de l'Institut Pasteur.* **116**:686-712.
- 152.- Ausubel, F. M., R. Brent, R. E. Kingston, D. D. More, J. G. Seidman, J. A. Smith, and K. Struhl. 1987. Analysis of Proteins. In: Ausubel, F. M., et al. (ed.). *Current Protocols in Molecular Biology.* Greene Publishing Associates and Wiley-Interscience, New York, Chap. 10, p. 10.0.1-10.12.9.
- 153.- Fahey J. L., and E. W. Terry. 1978. Ion exchange chromatography and gel filtration. In: Weir D. M. (ed). *Handbook of experimental immunology*, vol. 1: *Immunochemistry*, 3rd. Blackwell Scientific Publications Ltd., Oxford, chap. 8, p. 8.1-8.16.
- 154.- Ion Exchange Chromatography. Principles and methods. Pharmacia Fine Chemicals AB, Box 175, S-715 04 Uppsala 1, Sweden.

- 155.- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**:248-254.
- 156.- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* **22**:680-683.
- 157.- Weber, K., and M. Osborn. 1969. The reability of molecular weight determination by dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis. *J. Biol. Chem.* **244**:4406-4412.
- 158.- Edman, P., and G. Begg. 1967. A protein sequenator. *Eur. J. Biochem.* **1**:80-91.
- 159.- Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose shets: procedure and some applications. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **76**:4530-4534.
- 160.- Hanahan, D. J., and J. E. Ekholm. 1974. The preparations of red cell ghots (membranes). *Biomembranes: Part A (Methods in Enzymology, Vol. 31)*. New York: Academic Press.
- 161.- Freund, J. 1974. Some aspects of active immunization. *Ann. Rev. Microbiol.* **1**:291-298.
- 162.- Ishikawa, E., M. Imagawa, S. Hashida, S. Yoshitake, Y. Hamaguchi, and T. Ueno. 1983. Enzyme labeling of antibodies and their fragments for enzyme immunoassay and immunohistochemical staining. *J. Immunoassay.* **4**:209-327.
- 163.- Brown, A. 1997. Visualization of single neurofilaments by immunofluorescence microscopy of splayed axonal cytoskeleton. *Cell Motility and the Cytoskeleton.* **38**:133-145.
- 164.- Rodriguez, A., M. G. Rioult, A. Ora, and N. W. Andrews. 1995. A trypanosome-soluble factor induces IP3 formation, intracellular Ca²⁺ mobilization and microfilament rearrangement in host cells. *J. Cell Biol.* **129**:1269-1273.
- 165.- Rosqvist, R., A. Forsberg, and H. Wolf-Watz. 1991. Intracellular targeting of the *Yersinia* YopE cytotoxin in mammalian cells induces actin microfilament disruption. *Infect. Immun.* **59**:4562-4569.
- 166.- Fiori, P. L., P. Rappelli, M. F. Addis, F. Mannu, and P. Cappuccinelli. 1997. Contact-dependent disruption of the host cell membrane skeleton induced by *Trichomonas vaginalis*. *Infect. Immun.* **65**:5142-5148.
- 167.- Alderete, J. F., and E. Pearlman. 1984. Pathogenic *Trichomonas vaginalis* cytotoxicity to cell culture monolayers. *Br. J. Vener. Dis.* **60**:99-105.
- 168.- Degueyrcy, A., M. Hommel, and J. Schrevel. 1990. Purification and characterization of 37-kilodalton proteases from *Plasmodium falciparum* and

- Plasmodium berghei* which cleave erythrocyte cytoskeletal components. Mol. Biochem. Parasitol. 38:233-244.
- 169.- Djabali, K. 1999. Cytoskeletal proteins connecting intermediate filaments to cytoplasmic and nuclear periphery. Histol. Histopathol. 14:501-509.
- 170.- Piepenhagen, P. A., and J. Nelson. 1998. Biogenesis of polarized epithelial cells during kidney development in situ: roles of E-cadherin-mediated cell-cell adhesion and membrane cytoskeleton organization. Mol. Biol. Cell. 9:3161-3177.
- 171.- Oliver, M. G., and R. D. Specian. 1991. Cytoskeleton of intestinal goblet cells: role of microtubules in baseline secretion. Am. J. Physiol. 260:G850-G857.
- 172.- Thompson C. 1995. Apoptosis in the pathogenesis and treated of disease. Science. 267:1456-1462.
- 173.- Nath, R., K. J. Raser, D. Stafford, I. Hajimohammadrez, A. Posner, H. Allen, R. V. Talanian, P. Yuen, R. B. Gilbertsen, and K. K. Wang. 1996. Non-erythroid alpha-spectrin breakdown by calpain and interleukin 1 beta-converting-enzyme-like protease(s) in apoptotic cells: contributory roles of both protease families in neuronal apoptosis. Biochem. J. 319:683-690.
- 174.- Schlegel, J., I. Peters, and S. Orrenius. 1995. Isolation and partial characterization of a protease involved in Fas-induced apoptosis. FEBS Lett. 364:139-142.
- 175.- Beppu, M., M. Inoue, T. Ishikawa, and K. Kikugawa. 1994. Presence of membrane-bound proteinases that preferentially degrade oxidatively damaged erythrocyte membrane proteins as secondary antioxidant defense. Biochim. Biophys. Acta. 1196:81-87.
- 176.- del Cerro, S., A. Arai, M. Kessler, B. A. Bahr, P. Vanderklis, S. Rivera, and G. Lynch. 1994. Stimulation of NMDA receptors activates calpain in cultured hippocampal slices. Neurosci. Lett. 167:149-152.
- 177.- Chard, P. S., D. Bleakman, J. R. Savidge, and R. J. Miller. 1995. Capsaicin-induced neurotoxicity in cultured dorsal root ganglion neurons: involvement of calcium-activated proteases. Neuroscience 65:1099-1108.
- 178.- Martin, S. J., G. A. O'Brien, W. K. Nishioka, A. J. McGahon, A. Mahboubi, T. C. Saïdo, and D. R. Green. 1995. Proteolysis of fodrin (non-erythroid spectrin) during apoptosis. J. Biol. Chem. 270:6425-6428.
- 179.- Chow, S. C., M. Weis, G. E. Kass, T. H. Holmstrom, J. E. Erikson, and S. Orrenius. 1995. Involvement of multiple proteases during Fas-mediated apoptosis in T lymphocytes. FEBS Lett. 364:134-138.
- 180.- Martín-Blanco, E. 2000. p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. BioEssays 22:637-645.

- 181.- Jaffee, B. D., E. Manos. 2000. Inhibition of MAP Kinase Kinase (MEK) results in an anti-inflammatory response in vivo. *Bioch Bioph Res Com.* **268**:647-651.
- 182.- Grossmann, J., J. M. Maxson. 1998. New Isolation Technique to study apoptosis in human intestinal epithelial cells. *Am J Path.* **153**:53-62.
- 183.- Yamazaki, Y., M. Tsuruga. 2000. Cytoesqueletal disruption accelerates caspase-3 activation and alters the intracellular membrane reorganization in DNA damage-induced apoptosis. *Exp. Cell Res.* **259**:64-78.
- 184.- Alessi, D. R. P. Cohen, A. Ashworth, S. Cowley, S. J. Leever, C. J. Marshall. 1995. Assay and expresion of mitogen-actived protein kinase, MAP Kinase Kinase, and Raf. *Methods Enzymol.* **255**:279-290.
- 185.- Courtney, S. 1998. p38 mitogen-activated protein kinase-dependent and -independent intracelular signal transduction pathway leading to apoptosis in human neutrophils. *J. Biol. Chem.* **273**:8389-8397.
- 186.- Kretschmer, R. R, E. M. Castro, G. Pacheco, G. Rico, O. Diaz-Guerra, J. Arellano. 1991. The role of mannose in the receptor of the monocyte locomotion inhibitory factor produced by *Entamoeba histolytica*. *Parasitol Res.* **77**:374-378.

CUADRO 1
CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS DE *Escherichia coli* CAUSANTE DE DIARREA

GRUPO	SINDROMES CLINICOS	SINDROMES EPIDEMIOLOGICOS	SEROGRUPOS "O" MAS COMUNES	ASOCIACION CON ENTEROCITOS	TOXINAS ELABORADAS	DNA ASOCIADO
Enterotoxigénico (ETEC)	Diarrea acuosa	Diarrea en niños en países en desarrollo. Diarrea del viajero (adultos)	8, 15, 20, 25, 27, 63, 78, 80, 85, 115, 128, 148, 159	Se adhiere por medio de fimbrias CFAI, CFAII	Termolábil (LT) y / o termoestable (ST)	Plásmido 30-75 MDa
Enteroinvasivo (EIEC)	Diarrea con moco y sangre (disentería)	Afecta adultos principalmente, a veces brotes por alimentos contaminados	28, 112, 124, 136, 143, 144, 147, 152, 164	Invade y se multiplica en enterocitos; inflamación por PMN		Plásmido 140 Mda
Enterohemorrágico (EHEC)	Diarrea aguda y crónica en niños	Brotes de alimentos contaminados	157 (Serotipo O157:H7)	Se adhiere al enterocito por fimbrias	Citotoxina semejante a Shiga I y II (SLT)	Fagos lisogénicos
Enteropatógeno (EPEC)	Diarrea aguda y crónica en niños	Brotes de diarrea en cuneros, diarrea epidémica y esporádica en comunidades, es rara en adultos	26, 55, 86, 111, 114, 119, 125, 126, 127, 128, 142	Se adhiere íntimamente a enterocitos y destruye microvelocidades		Plásmido 60-65 Mda
Enterogregativo (EAggEC)	Diarrea persistente y con sangre en niños	Diarrea en niños en países en desarrollo	O44, O? (Serotipos O44:H18 y O?:H10)	Se adhiere formando agregados bacterianos por medio de fimbrias AAF/I y AAF/II	Toxina codificada en plásmido (Pet) Proteína involucrada en colonización intestinal (Pic) Enterotoxina termoestable (EAST 1)	Plásmido 60-65 Mda

75

TRISIS CON
FALLA DE ORIGEN

CUADRO 2.- RENDIMIENTO DEL PROCESO DE PURIFICACION DE LA PROTEINA Pet DE EAggEC.

FRACCION PROTEICA	VOLUMEN (ml)	CONCENTRACION N (mg/ml)	TOTAL (mg)	RENDIMIENTO (%)
SIN CULTIVO	1000	0.015	105	100
PP (NH ₄) ₂ SO ₄	216	0.480	103.68	98.74
PP 1.15	8	0.720	5.76	5.48
SN 1.15	94	0.96	90.24	85.94
PP 1.75	100	0.710	71	67.61
SN 1.75	135	0.085	11.475	10.92
PICO I Q-SEPHAROSE	15	2	30	28.57
PICO II MONO S	10	0.33	3.3	3.14

PP = precipitado; SN = sobrenadante

PICO I Q-SEPHAROSE = fracciones 9-13 (pico I) en Q-Sepharose

PICO II MONO S = fracciones 60 - 67 (pico II) en Mono S (FPLC).

CUADRO 3.- VIABILIDAD DE CELULAS HEP-2 TRATADAS
CON TOXINA Pet DE EAggEC.

CONCENTRACION DE Pet ($\mu\text{g/ml}$)	TIEMPO (HRS)				
	0	12	18	24	36
0	100	85.35	64.3	65.0	56.0
10	100	80.0	65.78	60.0	60.0
50	100	82.26	69.8	62.5	48.0
100	100	67.8	60.89	63.0	32.0

Los valores están dados en porcentaje de viabilidad (%), por exclusión de la tinción con azul tripano

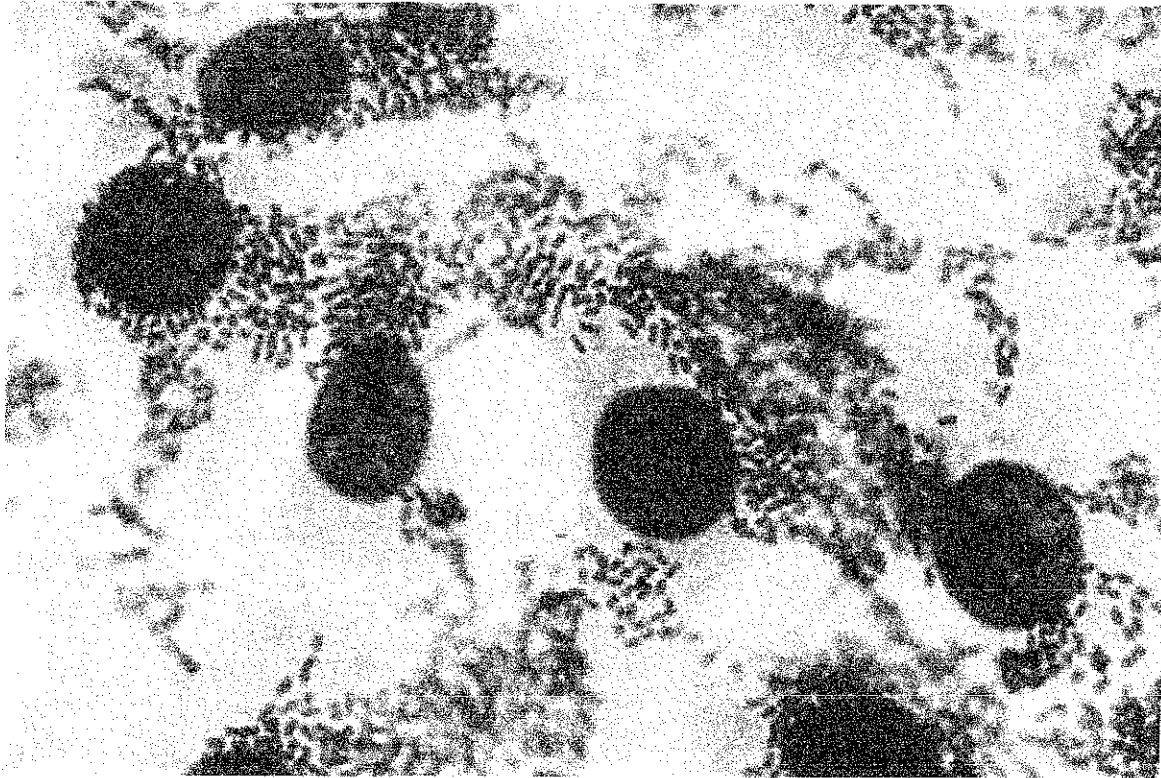


Figura 1.- Patrón de adherencia agregativa a células en cultivo HEp-2. Las bacterias se adhieren tanto a la superficie del citoplasma de la célula como al vidrio de la preparación formando empalizadas (X 100).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

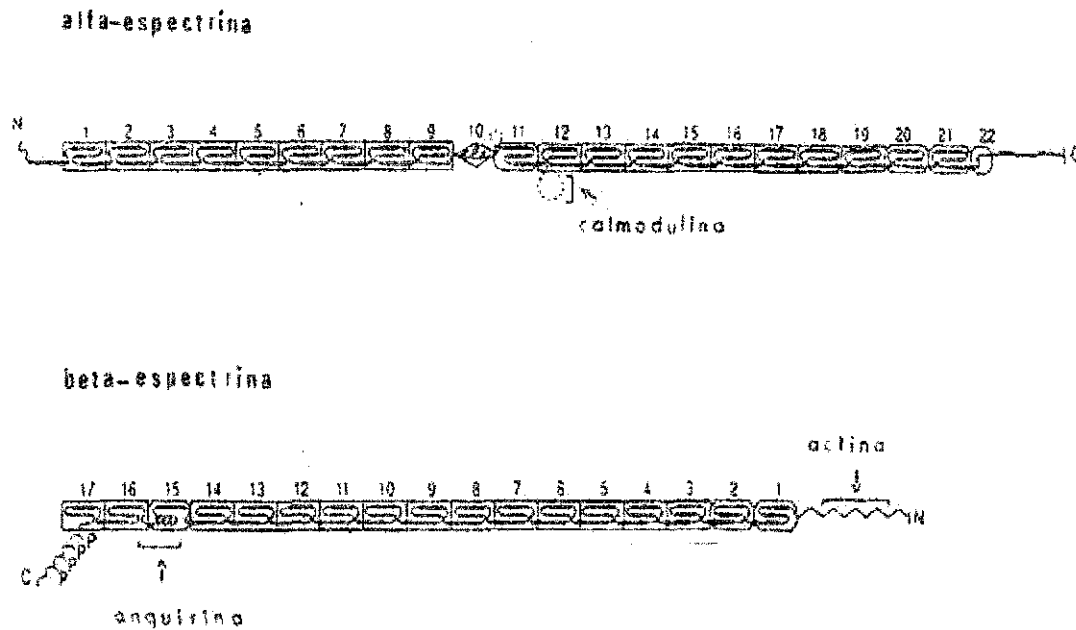


Figura 2.- Composición molecular de la espectrina. La espectrina está formada por el dímero de cadenas α - y β -espectrina, de 240 y 220 kDa respectivamente. Ordenadas de forma antiparalela ambas cadenas poseen dominios de 116 aminoácidos, la cadena α - con 22 dominios y la β - con 17. La α -fodrina (análogo de espectrina presente en la mayoría de las células) tiene la propiedad de combinarse a calmodulina y la β -espectrina y a su análogo β -fodrina tienen la capacidad de combinarse a la anquirina y a la actina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

CROMATOGRAFIA DE INTERCAMBIO ANIONICO EN Q-SEPHAROSE DE LA PROTEINA Pet

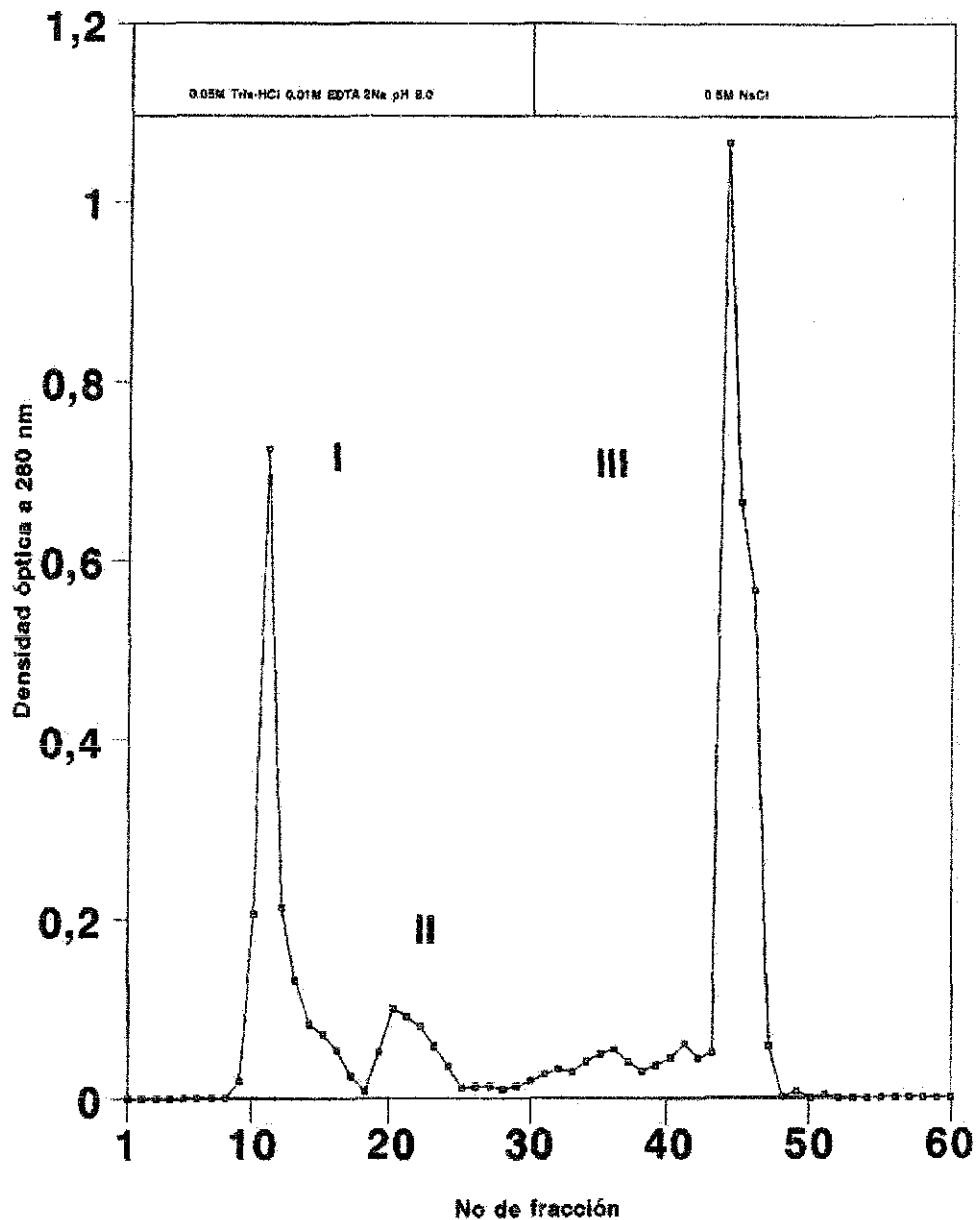


Figura 3.- Cromatografía en Q-Shepharose del PP 1.75 M con K1/K2.
El pico I (fracciones 9-16) del perfil de elución contiene la proteína Pet.

CROMATOGRAFIA EN COLUMNA DE INTERCAMBIO CATIONICO EN MONO S HR 5/5 (FPLC) DE LA PROTEINA Pet

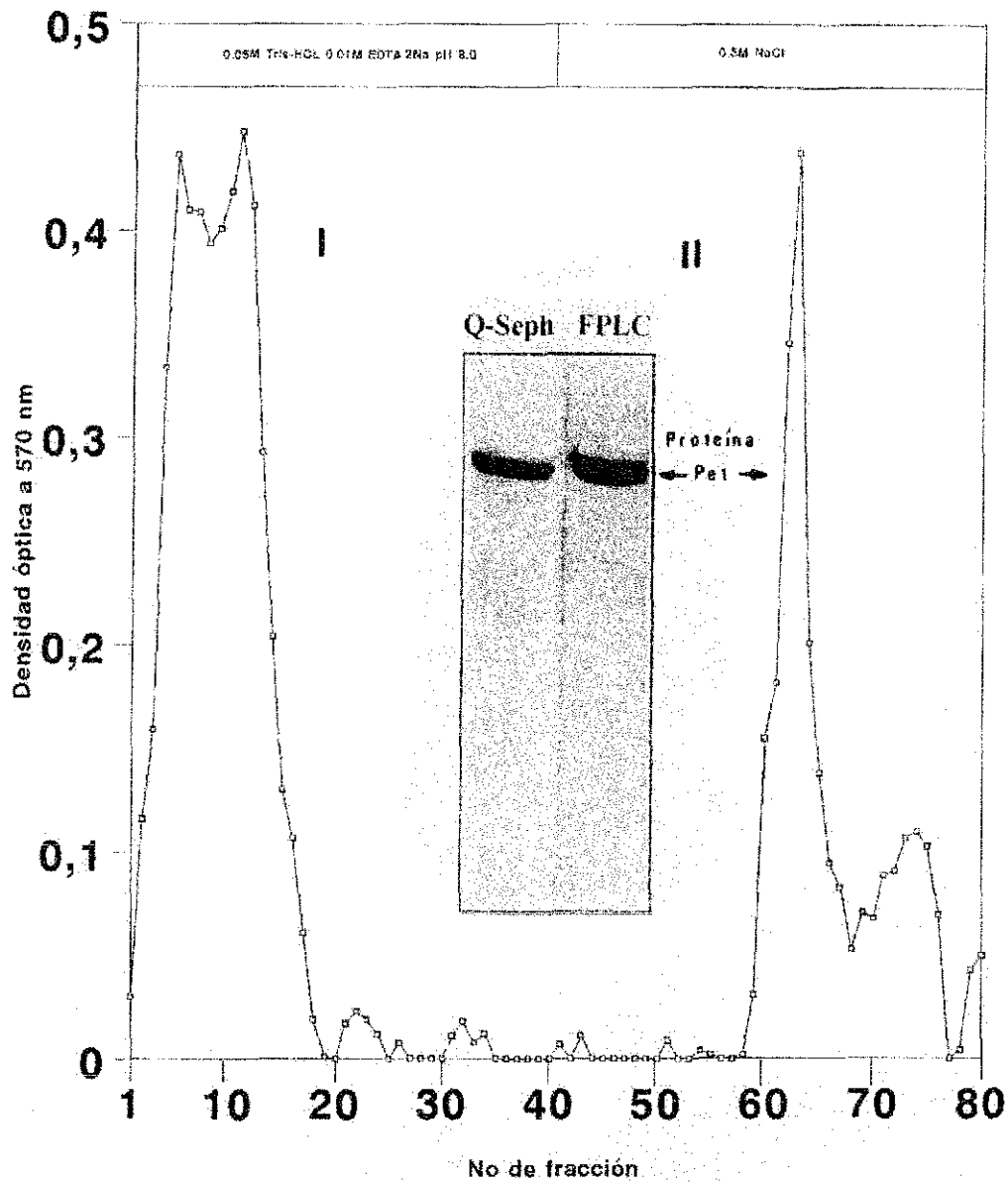


Figura 4.- Cromatografía en FPLC de intercambio catiónico en Mono S.
El pico II (fracciones 60-67) del perfil de elución contiene
la proteína Pet.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

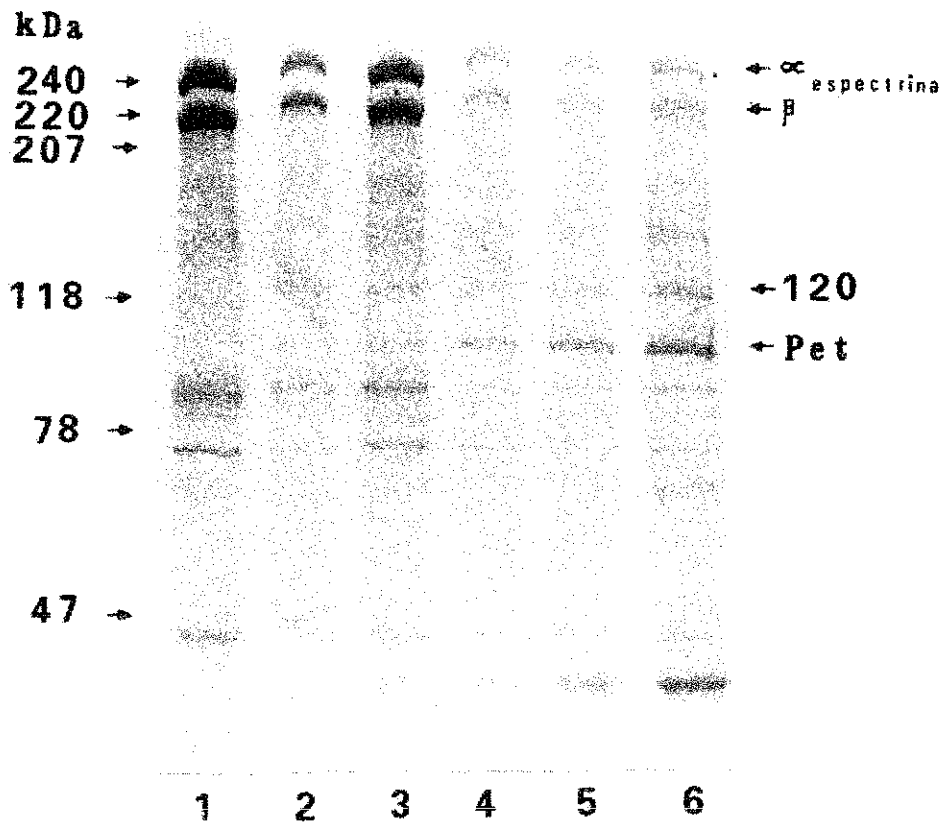


Figura 5.- SDS-PAGE de membranas de eritrocitos de carnero tratadas con Pet. Membranas purificadas de eritrocitos tratadas con diferentes concentraciones de Pet e incubadas por 6 h: carril 1, membranas sin tratar; carril 2, 0.312 μg ; carril 3, 0.625 μg ; carril 4, 1.25 μg ; carril 5, 2.5 μg ; carril 6, 5 μg . En los carriles 3 a 6 se observa la formación de una fracción de 120 kDa que se incrementa en relación directa a la disminución de las fracciones de 240 y 220 kDa.

TESIS CON
VALIA DE ORIGEN

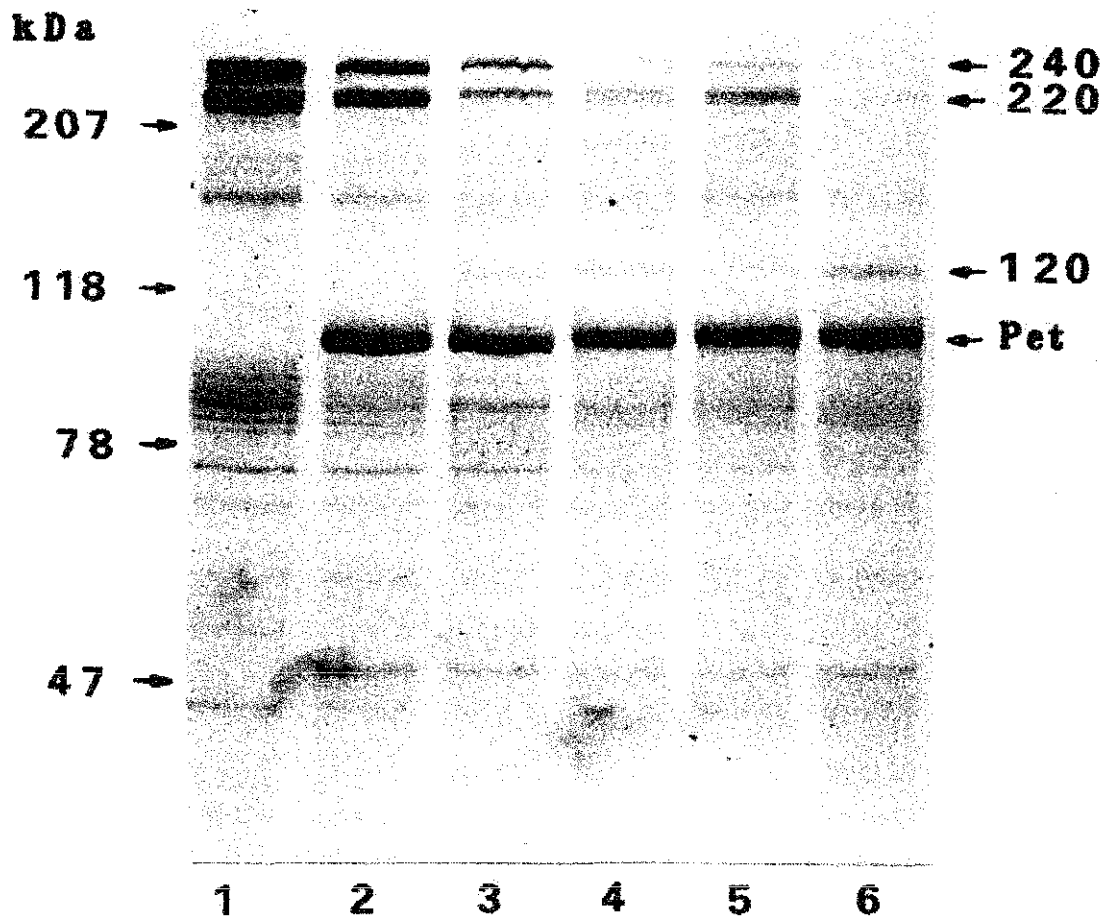


Figura 6.- SDS-PAGE de membranas de eritrocitos tratadas con Pet. Membranas de eritrocitos de carnero purificadas (10 µg) se trataron con 5 µg de Pet a diferentes tiempos: carril 1, membranas sin tratar; carril 2, 0 h; carril 3, 6 h; carril 4, 12 h; carril 5, 18 h; carril 6, 24 h. La degradación de las fracciones de 240 y 220 kDa se incrementa con respecto al tiempo, incrementándose la formación del subproducto de 120 kDa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

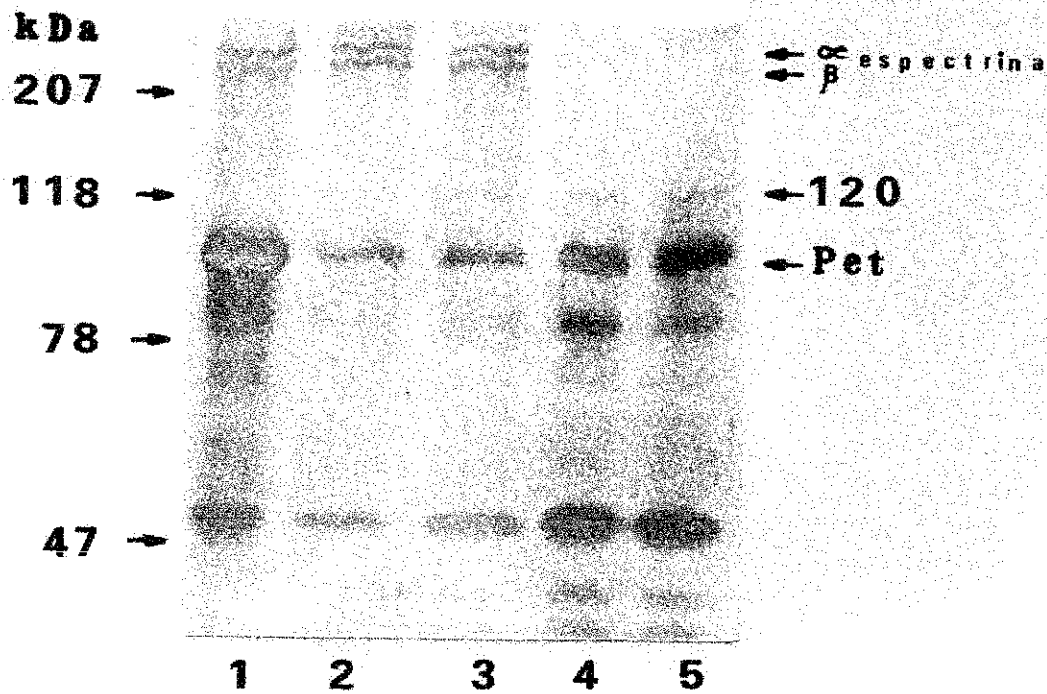


Figura 7.- SDS-PAGE de espectrina tratada con Pet a diferentes tiempos. Espectrina comercial (Sigma) purificada (5 μg) se incubó con 2.5 μg de Pet a diferentes tiempos: carril 1, 0 h; carril 2, 6 h; carril 3, 12 h; carril 4, 18 h; carril 5, 24 h. Pet degrada las cadenas α - y β - de la espectrina, observándose la formación de un subproducto de 120 kDa que se incrementa con el tiempo de tratamiento.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

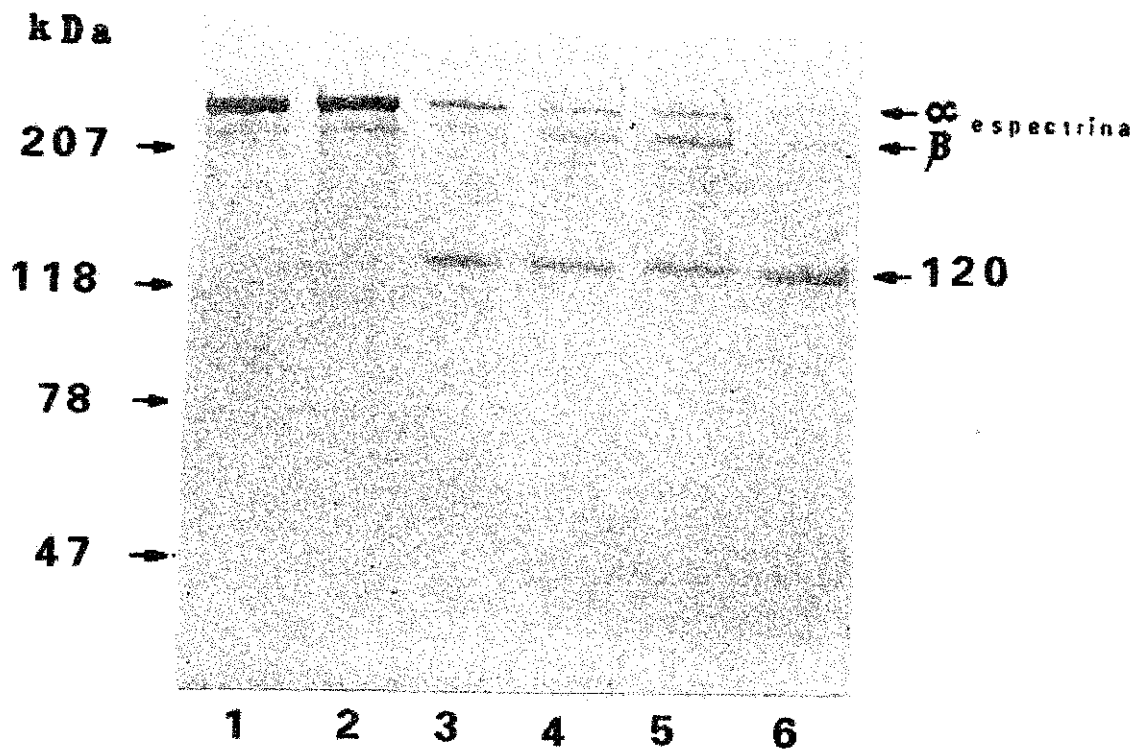


Figura 8.- Inmunotransferencia de membranas de eritrocitos tratadas con Pet a diferentes tiempos. Membranas de eritrocitos de carnero (5 μ g) se incubaron con 2.5 μ g de Pet a diferentes tiempos, la reacción se reveló con anticuerpos anti-espectrina: carril 1, membranas sin tratar; carril 2, 0 h; carril 3, 6 h; carril 4, 12 h; carril 5, 18 h; carril 6, 24 h. El efecto de Pet es dirigido a las cadenas α - y β - de la espectrina, la fracción de 120 kDa corresponde a un subproducto del rompimiento de las cadenas de la espectrina.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

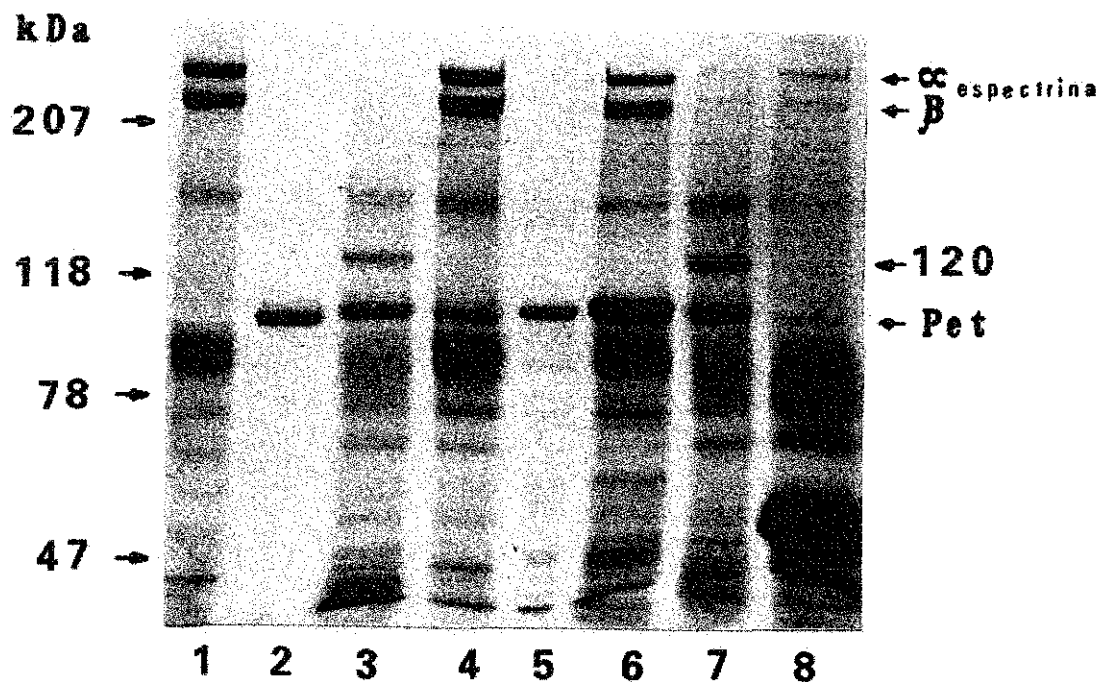


Figura 9.- SDS-PAGE para evaluar la participación del motivo de serina proteasa en la actividad proteolítica de Pet sobre la espectrina y de la actividad neutralizante de anticuerpos anti-Pet. Membranas de eritrocitos de carnero purificadas (10 μ g) se incubaron con 5 μ g de Pet en presencia de PMSF y con la proteína mutante (S260I) por 24 h: carriles 1, membranas sin tratar; carril 2, toxina Pet purificada; carril 3 y 7, membranas incubadas con Pet por 24 h; carril 4, membranas incubadas con 2 mM de PMSF; carril 5, proteína mutante (S260I); carril 6, membranas incubadas con 5 μ g de S260I; carril 8, membranas incubadas con Pet previamente neutralizada con anticuerpos anti-Pet por 3 h. El motivo de serina proteasa participa en la degradación de la fodrina, la neutralización de los anticuerpos anti-Pet es parcial.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

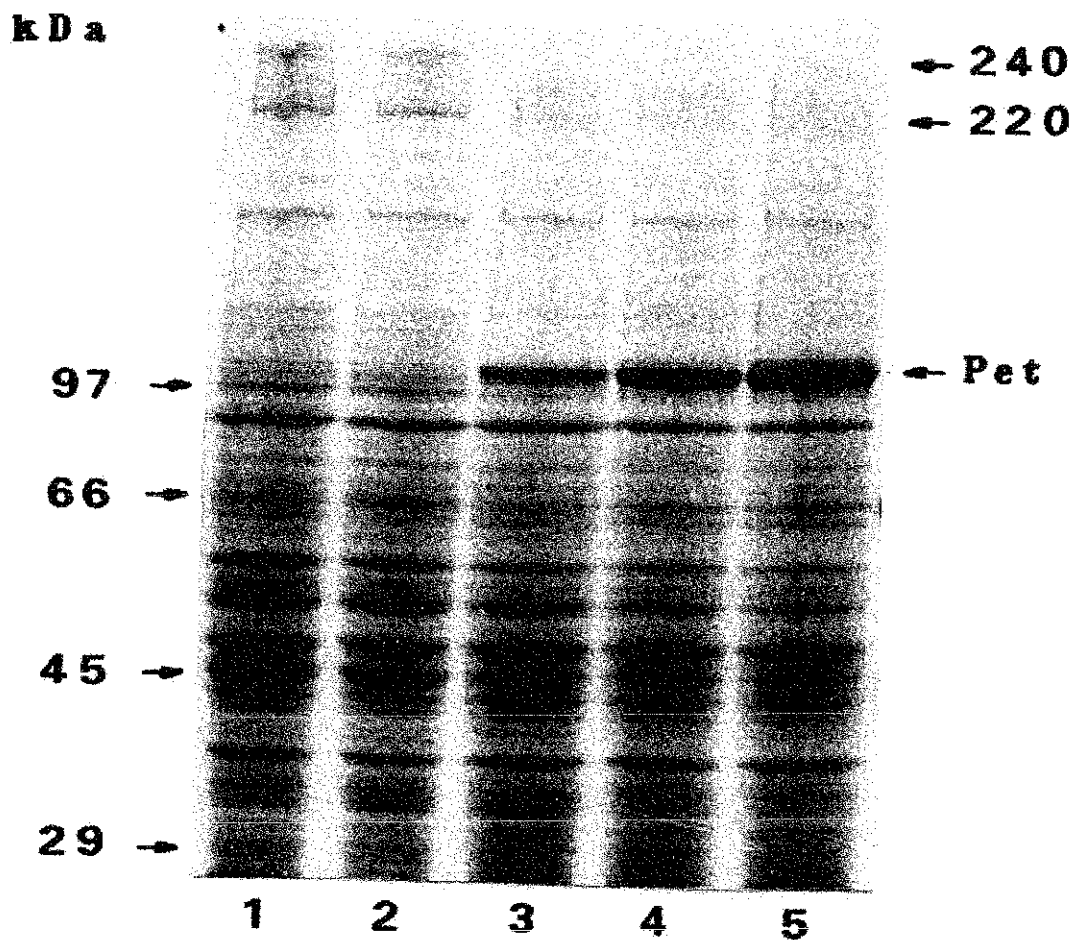


Figura 10.- SDS-PAGE de membranas purificadas de células HEp-2 tratadas con Pet. Membranas purificadas de células HEp-2 (100 µg) se trataron con diferentes concentraciones de Pet o con el sobrenadante de cultivo de la cepa HB101 e incubadas por 3 h: carril 1, membranas sin tratar; carril 2, 10 µg del sobrenadante de HB101; carril 3, 2.5 µg de Pet; carril 4, 5 µg de Pet; carril 5, 10 µg de Pet. Las membranas tratadas con Pet muestran degradación de fracciones de 240 y 220 kDa.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

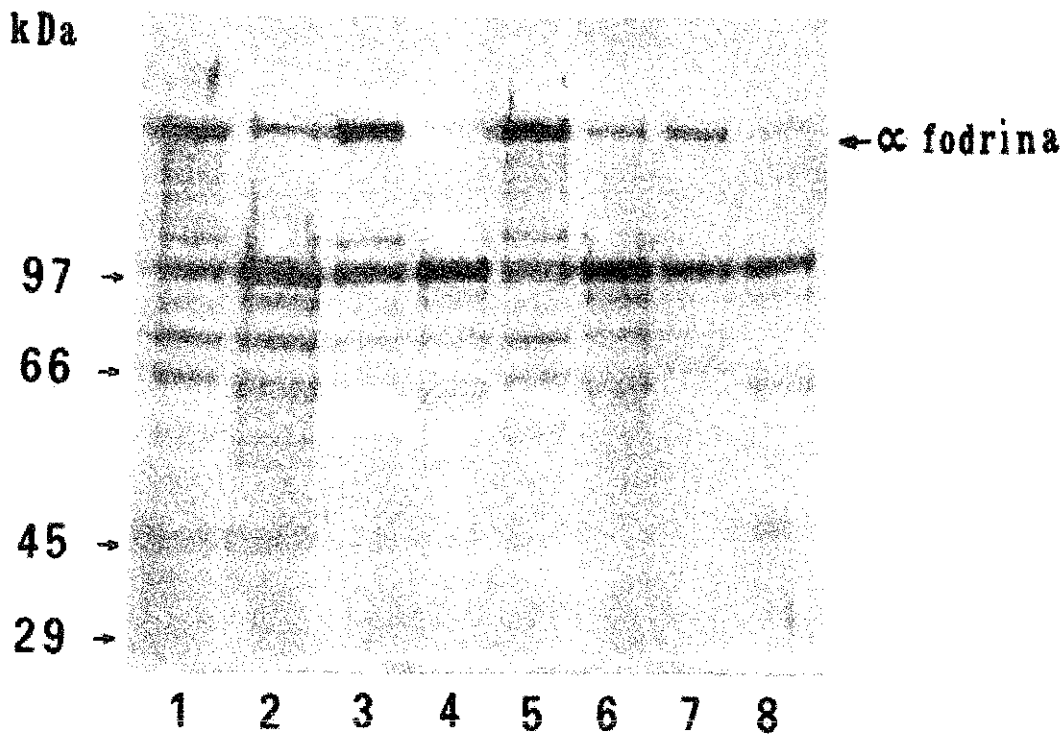


Figura 11.- Inmunotransferencia de membranas purificadas de diferentes líneas celulares tratadas con Pet. Membranas purificadas de diferentes líneas celulares tratadas con 5 μ g Pet se incubaron por 3 h. Para visualizar la reacción se utilizaron anticuerpos anti-fodrina (10 ng/ml). La reacción fue visualizada utilizando anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa y revelando con un Kit para quimioluminiscencia. Membranas de células tratadas: carril 2, HEp-2; carril 4, HeLa; carril 6, CaCo; carril 8, Vero. Membranas de células control: carril 1, HEp-2; carril 3, HeLa; carril 5, CaCo; carril 7, Vero. El efecto sobre la fodrina es universal, ya que todas las membranas celulares utilizadas fueron sensibles.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

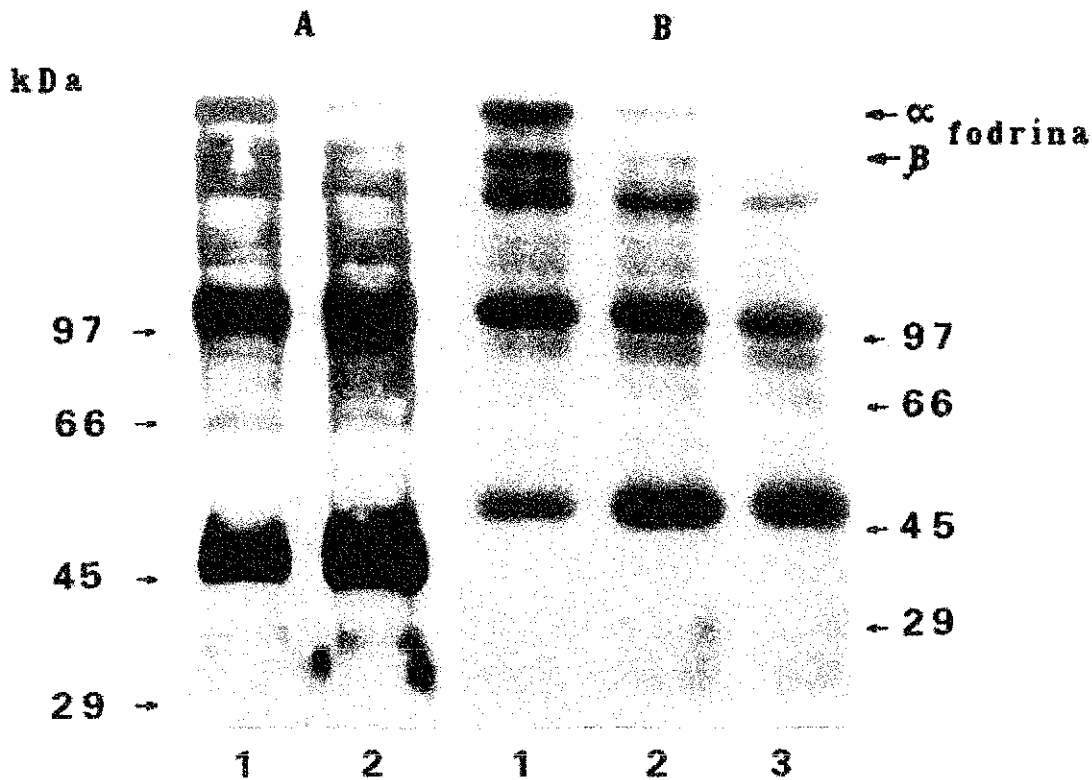


Figura 12.- Inmunotransferencia del efecto de degradación de fodrina, inducido por Pet, en células epiteliales HEP-2 mantenidas en suspensión. Para identificar las cadenas de α - y β -fodrina se emplearon anticuerpos anti-fodrina (10 ng/ml). La reacción fue visualizada con anti-IgG de conejo marcada con peroxidasa y revelando con un Kit para quimioluminiscencia: (A) Células epiteliales incubadas con Pet por 18 h. Carril 1, células HEP-2 no tratadas; carril 2, células tratadas con Pet (100 μ g/ml). (B) Células HEP-2 incubadas por 36 h con Pet. Carril 1, células no tratadas; carriles 2, células tratadas con 50 μ g/ml de Pet; carril 3, células tratadas con 100 μ g/ml de Pet. El efecto de degradación se presenta a partir de las 18 h.

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

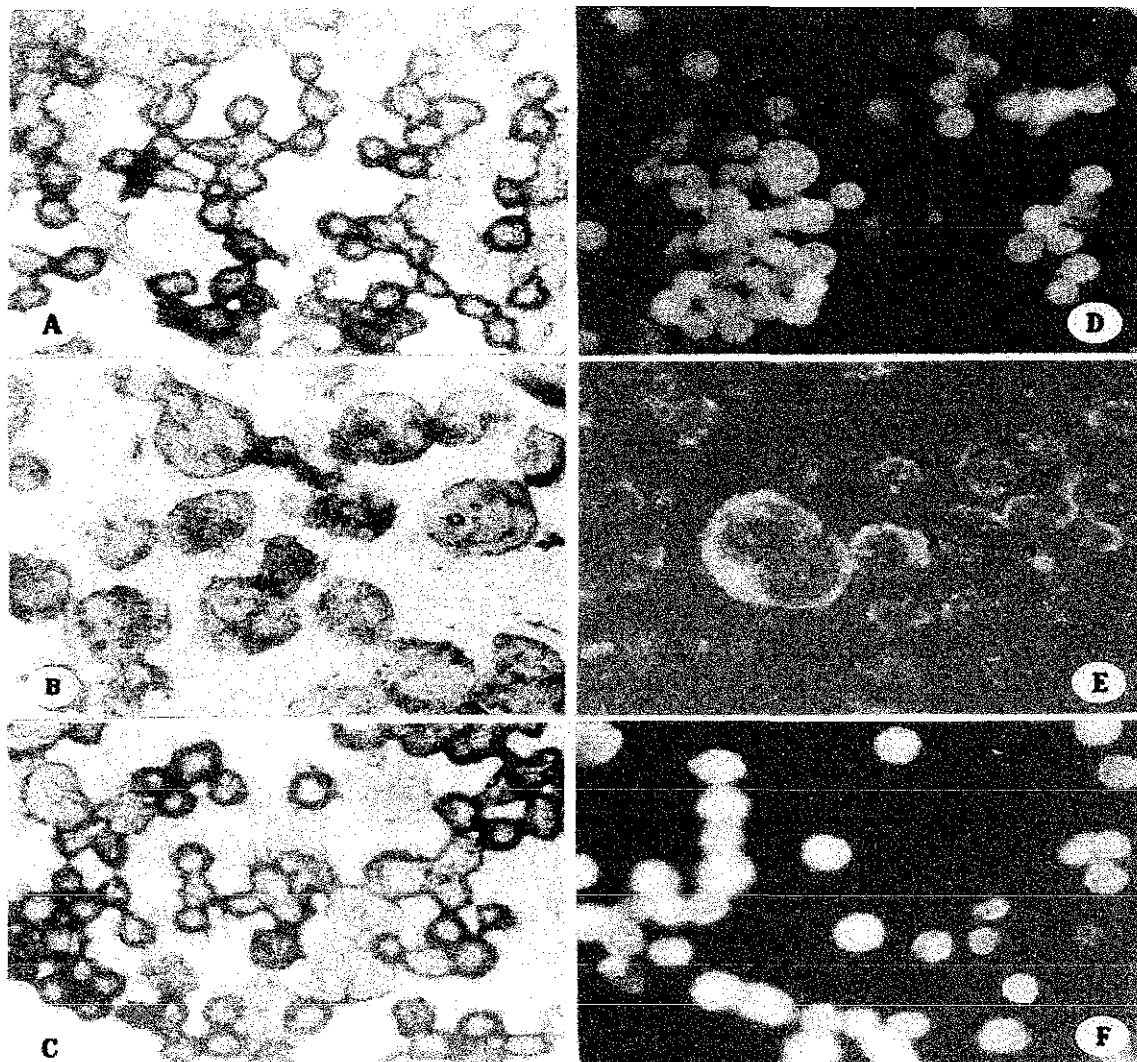


Figura 13.- Microscopia de luz y fluorescencia de células HEP-2 tratadas con Pet. A y D, células HEP-2 no tratadas; B y E células HEP-2 tratadas con 5 µg/ml de Pet por 3 h; C y F, células HEP-2 tratadas con 5 µg/ml de la proteína mutante (S260I) por 3 h. A, B y C, preparaciones teñidas con azul de Coomassie. D, E y F, preparaciones incubadas con anticuerpos anti- α - y β -espectrina y visualizadas con anticuerpos marcados con fluoresceína. Las células tratadas con Pet muestran aumento de tamaño y una distribución irregular de la fluorescencia (B y E). Con respecto a las células no tratadas y las desafiadas con la proteína mutante (S260I) no presentaron alteraciones (A, C, D y F) (X 40).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

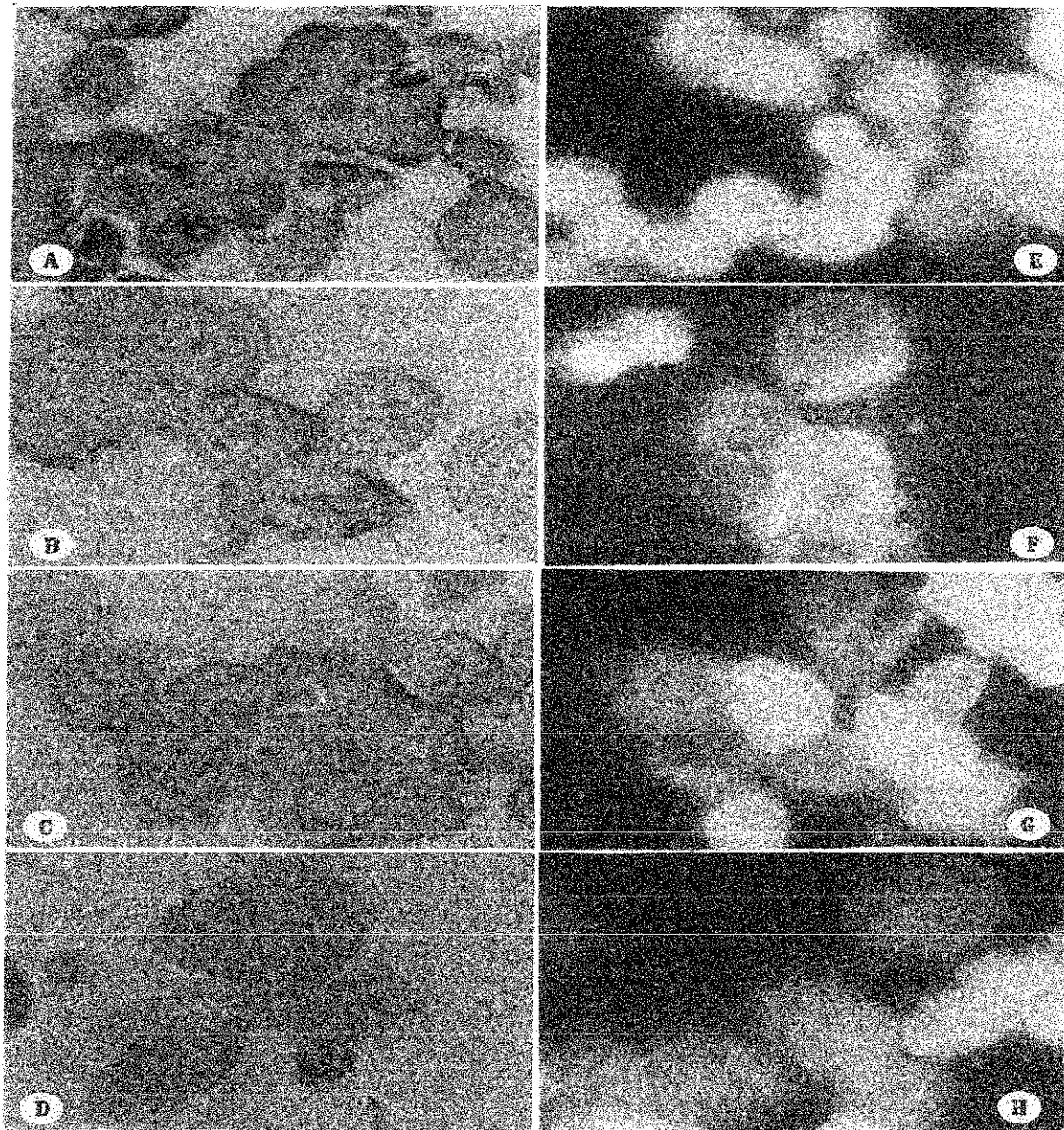


Figura 14.- Microscopia de luz y fluorescencia de células HEp-2 tratadas con Pet por periodos prolongados. A y E, células no tratadas; B y F, células tratadas con 10 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Pet; C y G, células tratadas con 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Pet; D y H, células tratadas con 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ de Pet. El tiempo de incubación en todos los casos fue de 36 h. Las preparaciones para inmunofluorescencia, se incubaron con anticuerpos anti- α - y β -fodrina preparados en conejo marcados con fluoresceina (E, F, G y H). Las preparaciones para microscopio de luz fueron teñidas con azul de Coomassie (A, B, C y D). Las células tratadas con Pet presentan aumento de tamaño y distribución irregular de fluorescencia, efecto que se acentuó con relación a la concentración de toxinas (X 100).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

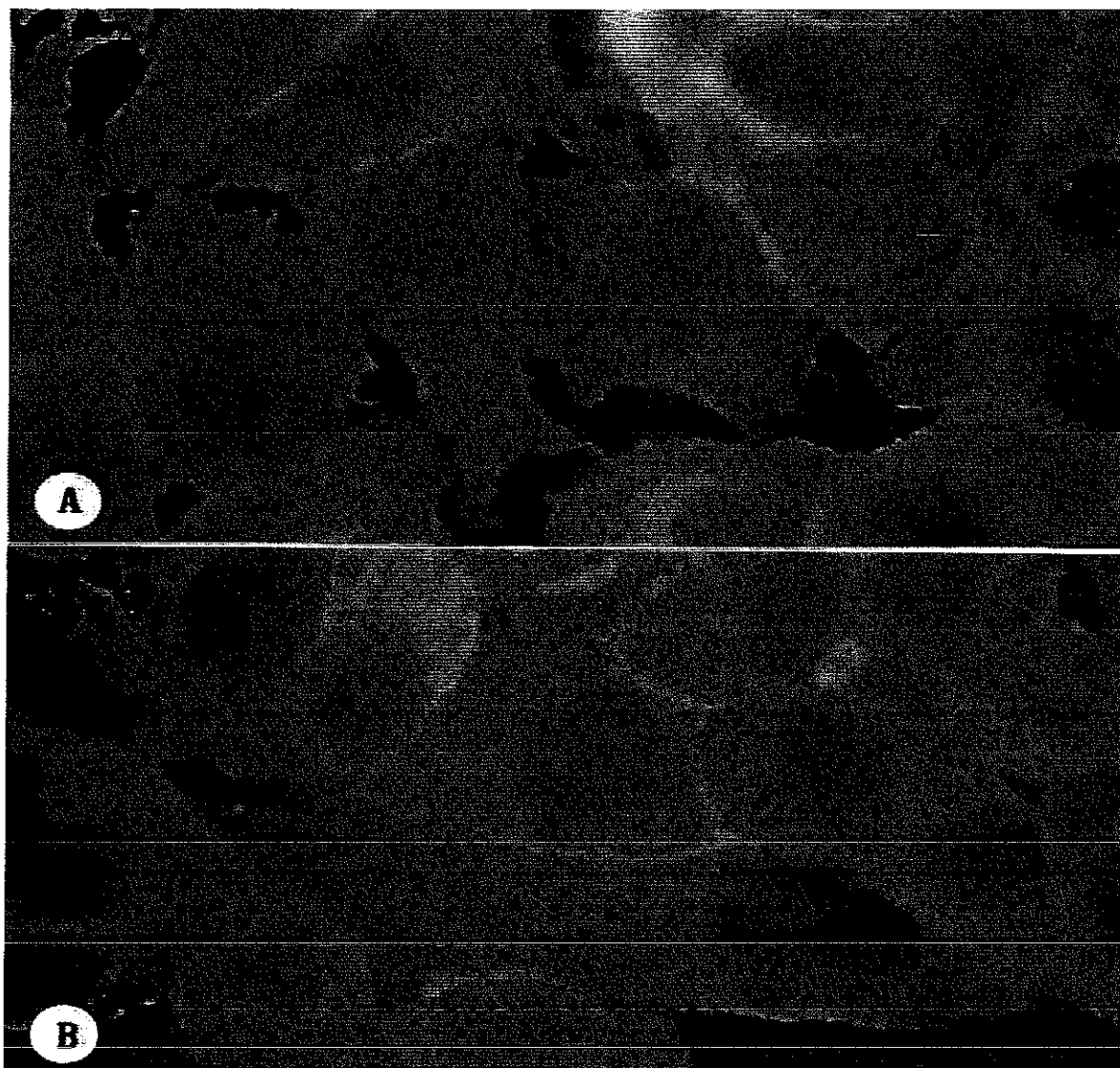


Figura 15.- Microscopia de fluorescencia de monocapas de células HEp-2 tratadas con Pet. Las células se incubaron con 10 µg/ml de Pet a diferentes tiempos. Para visualizar el efecto las preparaciones se incubaron con anticuerpos anti- α - y β -fodrina y con anticuerpos de conejo marcados con fluoresceína. (A) Células tratadas con Pet por 18 h. En esta se observa alteración en las uniones intercelulares, liberación de los contactos celulares focales del substrato de vidrio de la preparación, alargamiento y desprendimiento celular, así como discontinuidad en la red de fodrina membranal. (B) Células no tratadas, se aprecia la integridad de la monocapa y la red de fodrina con mayor continuidad (X 100).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

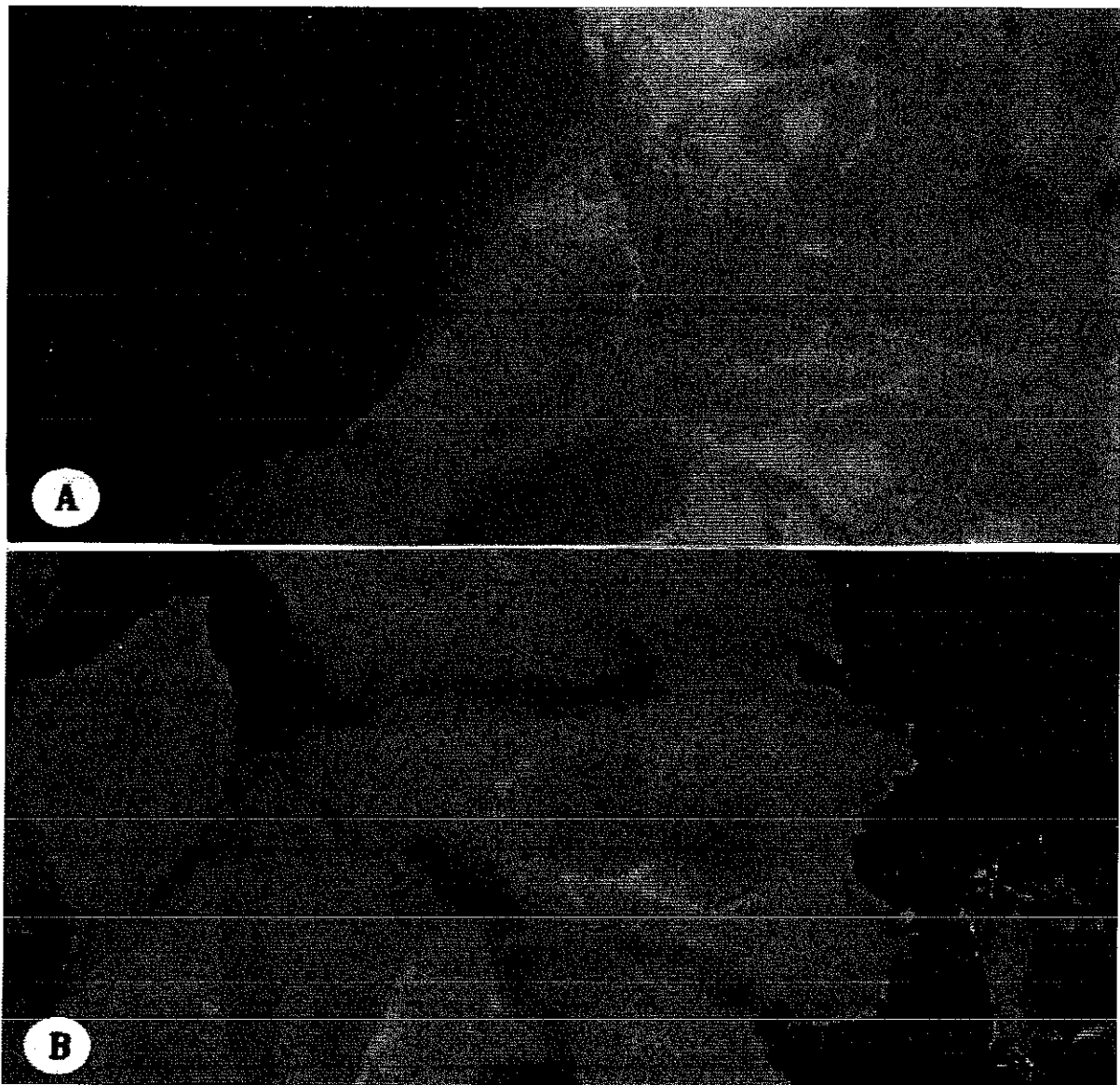


Figura 16.- Microscopia de fluorescencia de células HEp-2 (trata igual que la figura 15), incubadas por 24 h. (A) Las células tratadas con Pet muestran alargamiento y desprendimiento, y el citoplasma se observa colapsado, además, la red de foderina se observa menos conservada; disminuida y discontinua. (B) Las células no tratadas muestran conservada gran parte de la monocapa y el citoplasma se muestra conservado, así como una continuidad en la red de foderina (X 100).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN

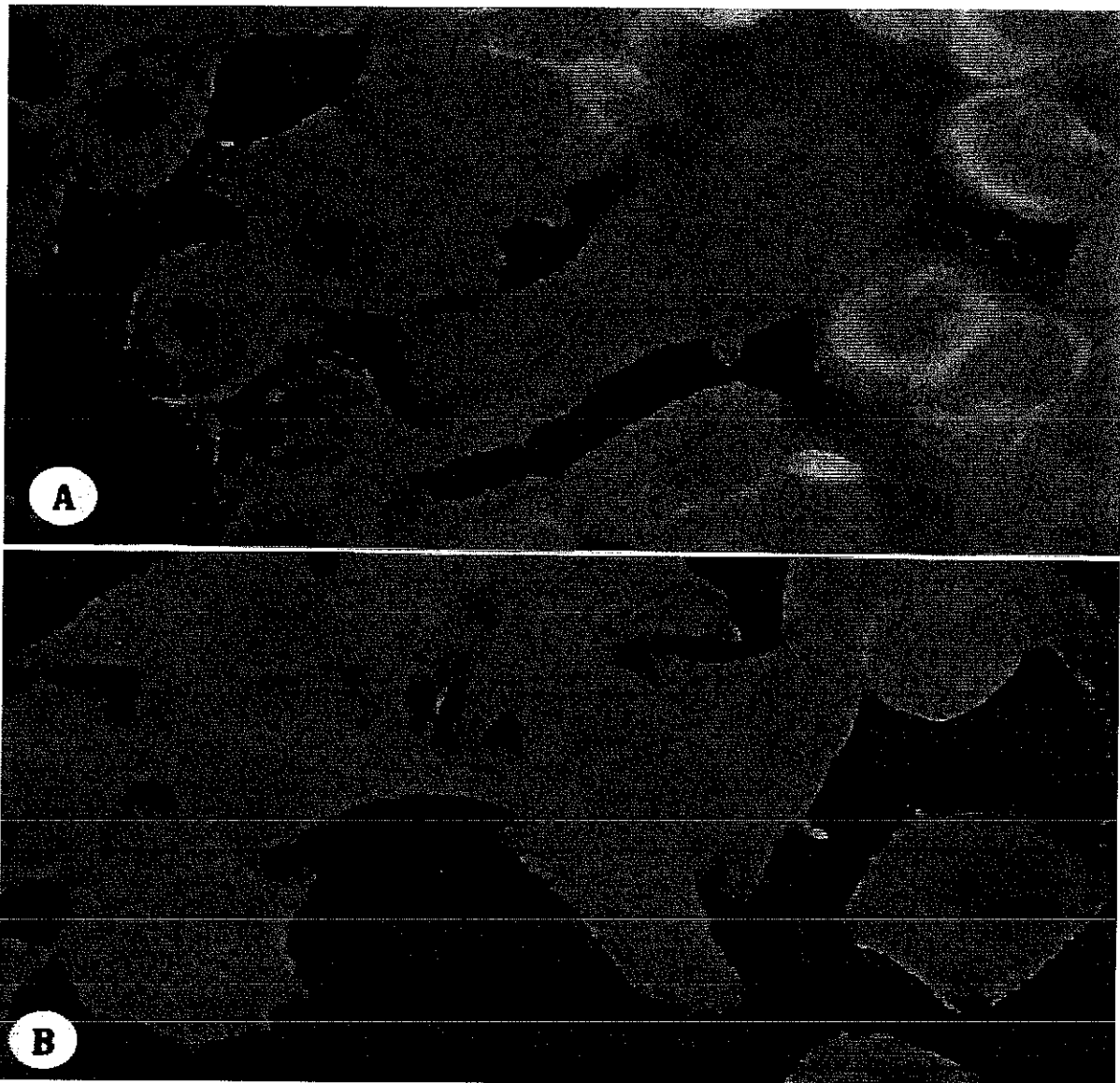


Figura 17.- Microscopia de fluorescencia de células HEP-2 (tratadas igual que en la figura 15), incubadas por 36 h. (A) Las células tratadas con Pet muestran aumento de tamaño y redondeamiento, el citoplasma tiende a ser más laxo y la red de foderina pierde su continuidad. (B) Las células no tratadas siguen conservando gran parte de la monocapa y el citoplasma conservado, y muestran una continuidad en la red de foderina (X 100).

TESIS CON
FALLA DE ORIGEN