

SUBSECRETARÍA DE EDUCACIÓN SUPERIOR
DIRECCIÓN GENERAL DE EDUCACIÓN SUPERIOR
TECNOLÓGICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ



SECRETARÍA DE
EDUCACIÓN PÚBLICA



**TRABAJO PROFESIONAL
COMO REQUISITO PARA OBTENER EL TÍTULO DE:**

INGENIERA BIOQUÍMICA

QUE PRESENTA:

BLANCA NELLY SÁNCHEZ PÉREZ

CON EL TEMA:

**“PRODUCCIÓN DE LOTES CONFIABLES DE TOXINAS
BACTERIANAS PARA ESTUDIOS DE MICROBIOLOGÍA
CELULAR”**

MEDIANTE

OPCIÓN I

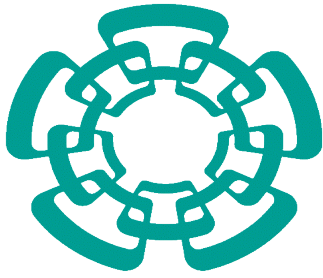
TESIS PROFESIONAL

ASESOR:

DRA. PATRICIA SÁNCHEZ ITURBE

TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS

NOVIEMBRE. 2014



Cinvestav

El presente trabajo se realizó en el laboratorio 17 del departamento de Biología Celular en el Centro de Investigación y Estudios Avanzados del IPN (CINVESTAV), bajo la dirección del Dr. Fernando Navarro García

DEDICATORIAS

Dedico este trabajo primeramente al creador de todas las cosas por haberme dado vida y salud durante todos estos años de mi carrera profesional, por manifestarse en aquellas personas que con una palabra de aliento o una muestra de cariño me ayudaron a superar los obstáculos del camino, porque si bien es cierto que a él no lo podemos ver podemos sentirlo en aquellas muestras de amor de nuestro prójimo.

A mi padre porque con su tenacidad inquebrantable ha sido mi mayor ejemplo, porque no solo en las caricaturas existen los súper héroes él para mi es ese personaje que ha sido mi inspiración en todo momento y a quien le debo gran parte de mis logros.

A mi madre que con su carácter ha forjado fortaleza y empeño en mi trabajo, y a mi hermano que es parte de mi vida y que ha sido mi compañero todos estos años.

A mis amigos que forman parte del tesoro de mi vida y que estuvieron conmigo en las buenas y en las malas.

Y de una manera muy especial a mis profesores, quienes son el alma de la carrera que sin ellos los conocimientos bien cimentados no hubieran sido posibles, a mis asesores por tomarse parte de su tiempo tan valioso para la elaboración de este trabajo

AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres el esfuerzo hecho por mí para que lograra cada una de mis metas, por haberme creído y estar conmigo en todo momento.

Agradezco también a la familia Salas Pimentel quienes han sido mi segunda familia, por haber abierto las puertas de su corazón y su casa durante mi instancia de residencia y tesis.

A mis amigos muy cercanos quienes conocen parte de mi vida y mis sueños, aquellas personas que compartieron conmigo parte de su vida y que no están más.

De una manera muy especial al Dr. Fernando Navarro García quien sin conocerme creyó en mí, me aceptó y compartió sus conocimientos y su proyecto, gracias a él fue posible mi instancia en el CINVESTAV

A mi directora de tesis Dra. Patricia Guadalupe Sánchez Iturbe por su paciencia, dedicación y tiempo invertidos en mi trabajo, quien con su conocimiento y experiencia ha sido parte medular de este trabajo.

A mis revisores Dr. Reiner Rincon Rosales y Q.B.P. Aura Flores Pérez por el tiempo y apoyo en la realización de mi trabajo.

A todos mis maestros que con tanto esmero sembraron en mí el amor al conocimiento e inculcaron valores inquebrantables en mi persona.

A todas y cada una de las personas que forman parte de mi vida y que han estado conmigo durante todos estos años importantes de mi carrera profesional

¡GRACIAS!

CONTENIDO

Lista de figuras.....	III
Lista de cuadros.....	V
Resumen.....	VI
1.- Introducción.....	1
2.- Marco teórico.....	3
2.1.- Patogénesis molecular de EPEC.....	4
2.1.1.- Adherencia inicial.....	4
2.1.2.- Inyección de factores y transducción de señales.....	6
2.1.3.- Contacto íntimo y formación de pedestales.....	9
2.1.4.- Papel de las toxinas en la infección.....	9
2.1.5.- Transmisión y reservorio.....	11
2.2 Fundamentos de las técnicas para el análisis de las proteínas.....	14
3.- Justificación.....	18
4.- Objetivos.....	20
5.- Metodología.....	21
5.1.-Obtención de la Proteína Pic de <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa.....	21
5.1.2.- Análisis de plásmidos.....	21
5.1.3.- Preparación del gel de agarosa.....	22
5.1.4.- Preparación del DNA Plasmídico.....	22
5.1.5.- Electroforesis en gel de Agarosa.....	22
5.2.-Transformación de bacterias HB101 de E. coli.....	23
5.2.1.- (PCR) y electroforesis en geles de agarosa para comprobar la expresión del plásmido de pACYC 184 Pic	24
5.2.2 .-precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA)	27
5.2.3.- Electroforesis en gel de poliacrilamida.....	28
5.3 .-Obtención de la toxina EspC de <i>Escherichia coli</i> Entero patógena	30
5.3.1 .-Reactivación de la cepa HB101 +ESPC WT (FN12) para obtención de la toxina EspC.....	30
5.4.- Obtención de la Proteína Pet de <i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa	31
5.5.- Liofilización.....	31

5.6 .-Cultivo de célula.....	32
5.7.- Ensayos de actividad biológica.....	32
5.8 .-Congelamiento de cepas.....	33
6.- Resultados.....	34
6.1.- Obtención de la proteína Pic de Escherichia coli Enteroagregativa.....	34
6.1.1.- Amplificación del plásmido de Pic mediante PCR.....	35
6.1.2.- Análisis de bacterias transformadas con el plásmido de Pic mediante la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA).....	36
6.2.- Obtención de la Proteína EspC.....	37
6.2.1.- Concentración de las toxinas liofilizadas y concentradas de EspC.....	37
6.2.2.- Análisis de Electroforesis SDS-PAGE para la toxina EspC.....	38
6.2.3.- Ensayos de actividad biológica de EspC.....	42
6.3.- Obtención de la Proteína Pet de Escherichia coli Enteroagregativa.....	47
6.3.1.- Concentración de las toxinas liofilizadas y concentradas de Pet.....	48
6.3.2.- Análisis de Electroforesis SDS-PAGE para la toxina EspC.....	48
6.3.3.- Ensayos de actividad biológica de Pet.....	51
7.- Discusión.....	54
8.- conclusiones.....	56
9.- Bibliografía.....	57
10.- Anexos.....	63

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Modelo esquemático de las etapas de la infección por EPEC	4
Figura 2. Genes de Virulencia en el plásmido EAF y el Locus de la eliminación del enterocito (LEE)	5
Figura 3. Detección de EPEC mediante el ensayo de adherencia y la prueba de FAS	6
Figura 4. Estructura hipotética del complejo de aguja de EPEC	7
Figura 5. Patrón de adherencia localizada de EPEC sobre cultivo de células epiteliales HEP-2 (in vitro)	11
Figura 6. Proceso de transformación de bacterias	24
Figura 7. Reacción de los componentes de la mezcla para PCR	25
Figura 8. Amplificación de secuencias específicas de DNA en PCR	26
Figura 9. Proceso de Precipitación de proteínas con Ácido tricloro-acético.	28
Figura 10. Esquema de la cámara de electroforesis	30
Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa para el análisis de plásmido de la proteína Pic. Gel de Agarosa 0.8 %	35
Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR del plásmido de Pic. 1 Marcador, (2-10) colonias con el plásmido de Pic.	35
Figura 13. Análisis de Pic por TCA 108 KDa crecida por 16 h 150 rpm 37°C SDS-PAGE 10%	36
Figura 14. Lote A de la toxina EspC 110 KDa crecida por 16 h 150 rpm 37° C SDS-PAGE 10%	38
Figura 15. lote B de la toxina EspC crecida por 18 h 150 rpm 37° C SDS-PAGE 10%	39
Figura 16. Lote C de la toxina EspC crecida por 12 h Y 20 h 150 rpm 37° C SDS-PAGE 10%	40

- Figura 17. Cepa HB 101 que contiene el plásmido de EspC crecida por 20 h 41
150 rpm 37° C SDS-PAGE 10%
- Figura 18. Lote D de la toxina EspC 110 KDa crecida por 20 h 150 rpm 37° C 42
SDS-PAGE 10%
- Figura 19. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y 43
teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 8 h de infección. Lote A de
EspC.
- Figura 20. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y 44
teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 8 h de infección. Lote B de
EspC.
- Figura 21. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y 45
teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 8 h de infección. Lote C de
EspC.
- Figura 22. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y 46
teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 8 h de infección. Lote D de
EspC.
- Figura 23. Lote 1 de la proteína Pet crecida en medio LB más Ampicilina [100 49
µg/ml] crecida por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10%.
- Figura 24 . Lote 2 de la proteína Pet crecida en medio LB más Ampicilina [100 49
µg/ml] crecida por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10%.
- Figura 25. Lote 3 de la proteína Pet crecida en medio LB más Ampicilina [100 50
µg/ml] crecida por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10%
- Figura 26. Lote 4 de la proteína Pet crecida en medio LB más Ampicilina [100 49
µg/ml] crecida por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10%.
- Figura 27. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y 51
teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 4 h de infección. Lote 1 de
Pet.

Figura 28. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y 52 teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 4 h de infección. Lote 2 de Pet.

Figura 29. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y 53 teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 4 h de infección. Lote 3 y 4 de Pet.

Lista de cuadros

Cuadro 1. Mezcla para PCR.....	25
Cuadro 2. Programación del termociclador.....	26
Cuadro 3. Porcentaje y componentes de Gel separador.....	29
Cuadro 4. Porcentaje y componentes de Gel concentrador.....	29
Cuadro 5. Concentración de los lotes de la toxina EspC en mg/ml.....	38
Cuadro 6. Concentración de los lotes de la toxina Pet en mg/ml.....	48

.RESUMEN

En el presente trabajo de investigación se estudiaron las concentraciones y el tiempo en que las toxinas Pet, Pic y EspC logran provocar daños al citoesqueleto de las células epiteliales, dichas toxinas son secretadas por *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC) causante de diarrea persistente en niños y adultos en países en desarrollo y desarrollados, y *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) que infecta principalmente a niños menores de 2 años provocando diarrea de diversos grados.

Para determinar el grado de infección conforme a la concentración y el tiempo se planteó el siguiente objetivo: producir lotes de las toxinas Pet, Pic y EspC con pureza y calidad confiable y demostrar su actividad biológica sobre cultivos de células epiteliales. Se hicieron cultivos de colonias de bacterias que contenían los plásmidos de la toxina Pic, se extrajo el DNA y este fue introducido a bacterias transformadas, posteriormente, se cultivaron y se analizaron por PCR para comprobar su expresión. Las clonas más eficientes fueron crecidas en medio Luria Bertani más Tetraciclina en una concentración de 10 µg/ml en condiciones aerobias por 16 h a 150 rpm y 37 ° C.

EspC fue crecida en medio Luria Bertani Ampicilina (100 µg/ml) y arabinosa 2% de una solución al 20%. Se incubó a 150 rpm y 37 ° C. Pet se creció en medio Luria Bertani con Ampicilina 10 µg/ml, 150 rpm y 37 ° C. El tiempo de crecimiento fue variable de 16h a 18 h para ambas toxinas; se llevó a cabo por lotes de bacterias sembradas en 1 litro de medio respectivamente las cuales fueron concentradas y purificadas posteriormente liofilizadas para su conservación. Para comprobar su concentración y pureza se hicieron ensayos de Bradford y Electroforesis SDS-PAGE antes y después de ser liofilizadas.

La concentración de Pet en células epiteliales para la infección fue de 60 µg/ml por 4 horas de incubación en una atmósfera humidificada de 10% de CO₂ -90% de aire a 37 ° C. Y para Espc 180 µg/ml en las mismas condiciones a 8 horas de infección.

Se obtuvieron 4 lotes de la toxina de EspC teniendo como concentración para lote A, B, C y D (1.137 ,0.610, 0.518 y 0.558) mg/ml respectivamente para la toxina Pet los lotes 1,2,3 y 4 (0.466, 0.669 ,0.660, 0.525) mg/ ml respectivamente. El plásmido de Pic no pudo ser expresado en las bacterias transformadas.

EspC fue capaz de internalizarse de manera eficiente en las células epiteliales (después de 8 horas de infección) a una concentración de 180 µg/µl. La toxina Pet secretada por EAEC demostró daño celular irreversible a las 4 horas de infección con 60 µg/µl para la infección. Además en este trabajo se demostró que el tiempo óptimo de incubación de la cepa productora de la toxina EspC debe ser de 18 -20 horas.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades gastrointestinales así como las infecciones entéricas son las enfermedades más comunes en el ser humano. La organización mundial de la salud (OMS) ha estimado que alrededor de dos millones de niños mueren anualmente de enfermedades diarreicas en países en vías de desarrollo y además causan la muerte de un menor cada 15 segundos alrededor del mundo. Entre los agentes etiológicos clásicos que producen cuadros diarreicos importantes en los niños se encuentra *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC) (Vidal, 2003).

Escherichia coli es el anaerobio facultativo predominante de la flora intestinal humana. Este microorganismo coloniza el tracto intestinal pocas horas después del nacimiento, posteriormente *E. coli* y su hospedero desarrollan una relación de simbiosis. Las cepas comensales de *E. coli* raramente causan enfermedad, excepto en individuos inmunodeficientes o cuando la integridad de las barreras gastrointestinales se ven afectadas (Kaper y Nataro, 1998).

Existen diversas clonas de *E. coli* que han adquirido atributos específicos de virulencia lo cual les confiere la habilidad de adaptarse a nuevos nichos y causar un amplio espectro de enfermedades (Kaper et al., 2004). Las cepas patógenas de *E. coli* han sido divididas dentro de diferentes categorías basadas en la enfermedad que causan, los factores de virulencia que poseen y el sitio del hospedero donde fueron aisladas (Johnson y Nolan, 2009). Infecciones por patógenos de *E. coli* pueden limitarse a las superficies mucosas o pueden difundirse por todo el cuerpo (Kaper y Nataro, 1998).

Tres síndromes clínicos generales resultan de la infección con los patotipos: Enfermedades entérico/diarreicas, infecciones del tracto urinario, sepsis y meningitis. Dentro de los patógenos intestinales existen 6 categorías descritas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli*

enterotoxigenica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) (Kaper et al., 2004).

Una de las necesidades más puntuales que deben atenderse en el campo de la salud es el estudio de las infecciones que causa esta bacteria debido a que su hospedero es el sector más vulnerable de la población; niños en el caso del ser humano y recién nacidos en el caso de los animales.

La *Escherichia coli* EPEC y EAEC han sido de los más estudiados, por los numerosos casos de diarrea que se han reportado como consecuencia de la infección por estos dos grupos.

A pesar de que se conoce de modo detallado el proceso de formación de los pedestales de actina, aún no se ha esclarecido el mecanismo global de la diarrea que induce EPEC. La diarrea se ha vinculado con: a) la destrucción de las microvellosidades del enterocito, b) la salida masiva de iones hacia la luz intestinal y c) la secreción de alguna enterotoxina (Vidal, 2007).

La detección específica de los genes que codifican a las proteínas incluidas en la infección, además de su daño al hospedero son de vital importancia para actualizar los avances observados en la patogénesis molecular de la infección por EPEC y EAEC, por ello la importancia de producir las principales toxinas secretadas por estas bacterias para contribuir en el conocimiento de las concentraciones en las que estas causan un efecto irreversible en el daño celular, además de conocer el tiempo de incubación necesario para dicho daño.

Es por estas razones que se han producido en este trabajo de investigación lotes de las toxinas EspC proteína secretada por EPEC y las proteínas Pet y Pic secretadas por EAEC; que son las principales involucradas en la patogénesis molecular, para conocer el tiempo de infección así como la concentración en la cual causan un daño irreversible en células epiteliales.

2. MARCO TEÓRICO

Durante la década de 1940 se comenzó a esclarecer la participación de *Escherichia coli* como factor de una enfermedad humana. Investigadores del Reino Unido y Estados Unidos descubrieron que ciertos serotipos somáticoflagelares (O: H) de *E. coli* estaban asociados con casos esporádicos de diarrea infantil de verano en niños y además en algunos brotes epidémicos de gastroenteritis en guarderías, por lo que se denominó a este grupo como *E. coli* enteropatógena (EPEC) para diferenciar a este tipo virulento de las bacterias de la flora normal.

E. coli enteropatógena (EPEC) es una bacteria que infecta principalmente a niños menores de 2 años provocando diarrea de diversos grados. EPEC utiliza una variedad de factores de virulencia para causar el daño mediante un mecanismo complejo. En EPEC, se han involucrado al pilus BFP (pelos formadores de penachos) como un factor de virulencia característico que participa en el proceso infeccioso (Girón et al., 1991) al promover la adherencia íntima a enterocitos; posteriormente se produce la polimerización de la actina del citoesqueleto, seguida de la destrucción de las microvellosidades. Los cambios bioquímicos relacionados con este proceso son los que inducen probablemente la secreción de agua y electrolitos al espacio intraluminal, produciendo diarrea aguda (Giron,1993; Levine,1984).

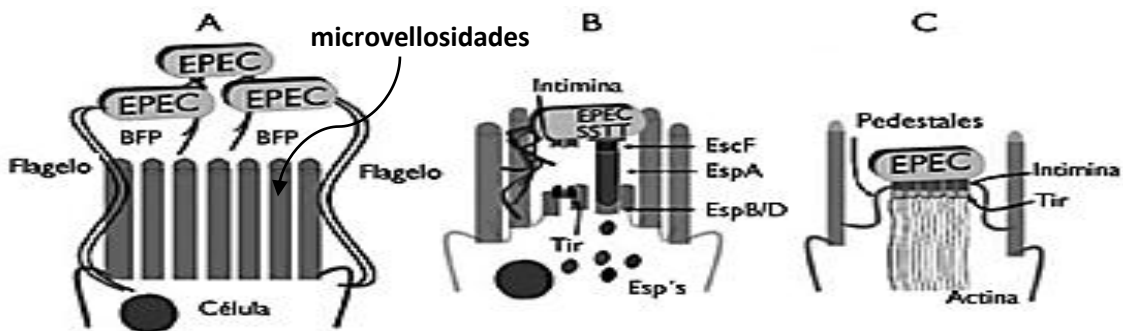
A nivel intestinal induce una alteración histopatológica conocida como la lesión A/E (Adherencia y enfacelamiento) que se caracteriza por la degeneración de las microvellosidades del enterocito. La lesión se induce principalmente por la acumulación de la actina intracelular en la región apical de la célula, justo por debajo de la bacteria adherida, este desarreglo que sufre el citoesqueleto parece formar una estructura tipo pedestal. La diarrea secretoria causada por EPEC está relacionada con la salida masiva de iones, lo cual parece ser una consecuencia del desarreglo del citoesqueleto la destrucción de las microvellosidades y la secreción de alguna enterotoxina (Vidal, 2003).

2.1 Patogénesis molecular de EPEC

EPEC induce una alteración histopatológica en el intestino conocida como lesión A/E (adherencia y eliminación). La lesión se lleva a cabo mediante un mecanismo de virulencia complejo, que induce la degeneración de las microvellosidades y altera la morfología normal de la región apical del enterocito (Celli y Goosney, 2000). Para fines prácticos, el modelo de patogénesis de EPEC se divide en tres fases: a) adherencia inicial, b) inyección de factores y transducción de señales y c) contacto íntimo.

2.1.1 Adherencia inicial

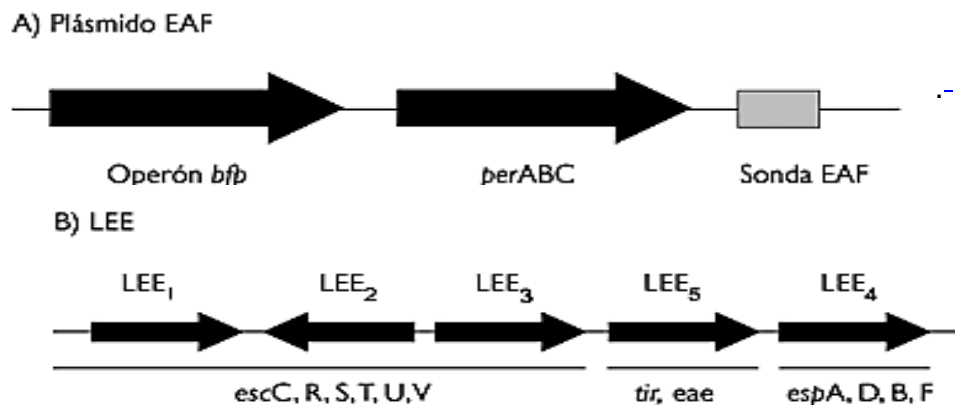
La adherencia es un proceso fundamental en la patogénesis y de ella pueden distinguirse dos fases; la primera implica la adherencia inicial entre las mismas bacterias, mientras que la segunda supone la adherencia de las bacterias a la célula del huésped. Estos fenotipos están directamente relacionados con dos factores de virulencia importantes de EPEC: los pelos formadores de penachos (BFP, por sus siglas en inglés) y el flagelo (figura 1A) (Giron, 1991; Tórrres 2005).



A) Los pelos formadores de penachos (BFP) permiten que las bacterias interactúen entre ellas para formar una microcolonia y el flagelo establece el contacto inicial de la microcolonia con la célula epitelial. **B)** una vez adherida a la célula EPEC inyecta factores de virulencia (Esp) mediante el Sistema de Secreción Tipo III (SSTT) que promueve la translocación al interior de la célula, entre ellos a Tir (receptor de la adhesina bacteriana intimina) que se inserta en la membrana de la célula y expone una región en el espacio extracelular. **C)** La intimina (una proteína de membrana externa) se une con firmeza a Tir y se induce el reacomodo del citoesqueleto, lo cual favorece la formación de los pedestales de actina y la desaparición de las microvellosidades absorptivas; ello da lugar a la lesión conocida como adherencia y eliminación.

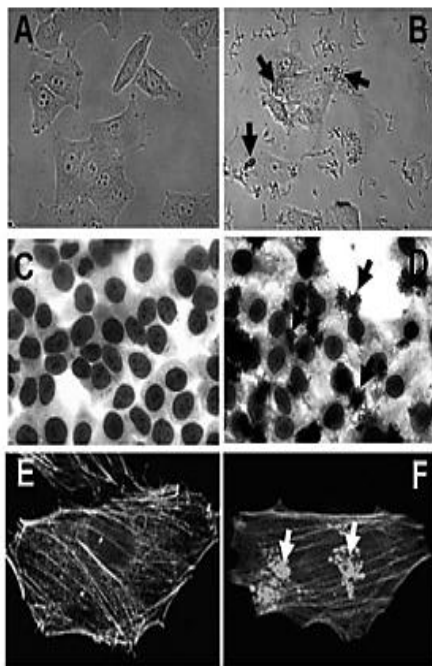
Figura 1. Modelo esquemático de las etapas de la infección por EPEC (Vidal, 2007).

Los BFP son pelos o fimbrias de 7 nm de diámetro y 14 a 20 µm de largo, cuya biogénesis requiere 14 genes codificados en el plásmido de virulencia denominado factor de adherencia de EPEC o EAF (figura 2A y 3B). En este plásmido también están codificados los genes del operón *per* (regulador codificado en el plásmido) que regula la síntesis del BFP y las proteínas que secreta EPEC (Donnenberg, 1992., Ibarra, 2003). La expresión del BFP se induce in vitro en la fase de crecimiento logarítmico y lo regulan factores fisicoquímicos como la temperatura, el calcio y los iones amonio. Resulta interesante que todos éstos son factores que EPEC encuentra en el intestino delgado del huésped (Puente, 1996). Los BFP permiten que las bacterias se agrupen entre ellas y formen microcolonias (un fenotipo conocido como autoagregación) (figuras 1A); estos sucesos promueven la adherencia localizada típica de EPEC en cultivo de células in Vitro (figura 3D) y en el intestino delgado (Bieber, 1998., Donnenberg, 1992).



A) El plásmido EAF contiene todos los genes necesarios para la biogénesis de los pelos (BFP) y los genes del regulador *perA*, *B* y *C*. Una secuencia conservada dentro del plásmido EAF se ha utilizado como sonda para detectar cepas virulentas de EPEC tipo I (véase apartado Diagnóstico de EPEC). B) El LEE se divide en cinco operones policistrónicos que codifican en particular a tres dominios de virulencia. El primer dominio lo constituyen los operones LEE₁, LEE₂ y LEE₃, los cuales codifican los genes de las proteínas del sistema de secreción tipo tres (SSTT). En el segundo dominio (LEE₄) están codificados los genes de las proteínas translocadoras y efectoras. El LEE₅ (tercer dominio) contiene los genes que codifican a la adhesina intimina (*eae*) y el receptor de intimina Tir (*tir*)

Figura 2. Genes de virulencia en el plásmido EAF y el Locus de la Eliminación del Enterocito (Vidal, 2007)



Células HEP-2 en cultivo in vitro observadas con microscopía de contraste de fases. A) Morfología característica del cultivo de células epiteliales HEP-2 no infectadas. B) Células HEP-2 infectadas durante dos horas con la cepa tipo EPEC (E2348/69); se observan las bacterias agrupadas entre ellas y la formación de la microcolonia (flechas negras), la cual se halla adherida a las células HEP-2. Ensayo de adherencia, células HEP-2 fijadas con metanol al 70% y teñidas con el colorante de Giemsa, microscopía de luz convencional). C) Morfología característica de cultivos de células HEP-2 no infectados. D) Adherencia localizada de EPEC a células HEP-2 después de tres horas de infección (flechas negras). Prueba de FAS [tinción fluorescente para actina], células fijadas con paraformaldehído al 2% y teñidas con faloidina rodamina; microscopía de fluorescencia). E) Citoesqueleto de actina de células HEP-2 sin infectar (control) que muestra las fibras de estrés. F) Pedestales formados por la acumulación de la actina del citoesqueleto (flechas blancas) inducido por la infección con la cepa tipo EPEC durante tres horas

Figura 3. Detección de EPEC mediante el ensayo de adherencia y prueba de FAS (Vidal, 2007)

El contacto entre las bacterias y la célula del huésped se relaciona directamente con el flagelo de EPEC (figura 1A). Sin embargo, también se han referido otros factores como la adhesina intimina o los filamentos cortos de EspA.

2.1.2 Inyección de factores y transducción de señales

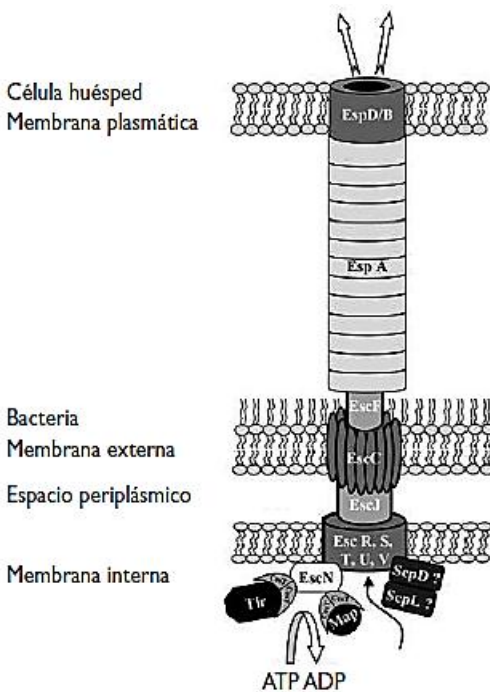
Una vez que la bacteria está adherida, inyecta a la célula una serie de proteínas mediante el sistema de secreción tipo III (SSTT) (figura 1B). La mayor parte de estas proteínas está codificada en el cromosoma de EPEC, dentro de una isla de patogenicidad de 35 kb conocida como el locus de la eliminación del enterocito o LEE (figura 2B).

La isla de patogenicidad LEE está organizada en cinco operones policistrónicos (LEE₁ a LEE₅); estos operones forman tres dominios de virulencia que codifican a los siguientes genes: a) los operones LEE₁, LEE₂ y LEE₃ codifican los genes de las proteínas del SSTT, las cuales forman un complejo de aguja (CA); b) en el LEE₄ los genes de las proteínas que se secretan a través del SSTT las cuales se conocen de forma colectiva con el nombre de Esp (proteínas secretadas por EPEC); y c) en LEE₅

están codificadas la adhesina bacteriana intimina y su receptor, llamado Tir porque se transloca por la misma bacteria a través del SSTT hacia el interior de la célula.

Las proteínas del SSTT forman el CA; este complejo atraviesa la membrana interna, el espacio periplásmico y la membrana externa de la bacteria y permite la secreción de proteínas (figura 4). El CA es una compleja maquinaria macromolecular cuya estructura y función están conservadas dentro de un gran número de patógenos gram negativos, como *Yersinia*, *Shigella*, *Salmonella* y EPEC. El SSTT de EPEC se ensambla de manera coordinada por al menos 19 proteínas; la plataforma del CA inicia con la localización de la proteína EscV en la membrana interna y EscC en la membrana externa (figura 4).

A continuación se agregan otros componentes de membrana interna (EscR, EscS, EscT y EscU) que completan la plataforma del CA. La proteína EscN se agrega como el componente citosólico del SSTT; ésta funciona como una ATP-asa citoplásmica para proveer la energía necesaria al sistema. La lipoproteína EscJ conecta la plataforma en la membrana interna (EscR, EscS, EscT, EscU y EscV) con la proteína EscC en la membrana externa y forma un conducto cilíndrico que atraviesa el espacio periplásmico a través del cual pasa la proteína EscF para



Las proteínas EscR, EscS, EscT, EscU y EscV del SSTT se insertan en la membrana interna de la bacteria para formar la plataforma del complejo de aguja (CA) y, de manera simultánea, la proteína EscC se coloca en la membrana externa. Mediante un mecanismo dependiente de Sec, la lipoproteína EscJ se sitúa en el espacio periplásmico y conecta a la plataforma en la membrana interna, así como a la EscC en la membrana externa. La proteína EscN está ligada de modo estrecho a la cara citosólica de la membrana interna; esta proteína es una ATP-asa que provee la energía necesaria para el transporte de proteínas; de esta manera pasa por el sistema la EscF, que se localiza en la punta del CA. Mediante este conducto pasa EspA hasta la punta, en donde interactúa con EscF y comienza a polimerizarse. La polimerización permite que el CA se alargue. La EspA forma un tubo cilíndrico que sirve para enviar a las proteínas EspB y EspD a la membrana de la célula en donde se colocan y terminan de formar el translocón-SSTT (complejo de aguja) por donde EPEC inyecta directamente proteínas de virulencia al citosol de la célula

Figura 4. Estructura Hipotética del complejo de aguja de EPEC (Vidal, 2007)

establecerse finalmente como la punta del complejo de aguja. Este complejo de aguja le permite a EPEC secretar proteínas hacia el medio extracelular.

A través del CA pasan tres proteínas codificadas en el LEE (Locus de Eliminación del Enterocito) conocidas como proteínas translocadoras. La primera de ellas, EspA, se ensambla directamente con EscF y se polimeriza en la punta o región distal del CA. La polimerización permite que la aguja molecular se extienda y forme un puente físico que posibilita el contacto entre la bacteria y la membrana de la célula (figura 4). Evidencias ultraestructurales han demostrado que EspA forma un conducto cilíndrico en cuyo interior pasan las proteínas EspB y EspD. Estas proteínas se hallan en la membrana de la célula eucariótica y completan el conducto llamado SSTT-translocón, que conecta y permite la comunicación molecular entre la bacteria y la célula y por el cual EPEC inyecta directamente a las proteínas efectoras de la virulencia.

Las proteínas efectoras se han clasificado en proteínas codificadas en el LEE (EspF, EspG, EspH, EspZ, Map y Tir) y no codificadas en el LEE (Cif, EspG2, NleC, y NleD). EspF redistribuye proteínas importantes de las uniones estrechas intercelulares, con lo que se atenúa la resistencia transepitelial. EspG y EspG2 degradan la red de microtúbulos por debajo de donde se encuentra la bacteria adherida a la célula. Por su parte, EspH modula la estructura del citoesqueleto de actina, así como la formación de filopodios durante la lesión A/E. La proteína EspZ se acumula en zonas donde crecen los pedestales de actina; empero, no se ha demostrado un papel específico dentro de la patogénesis de EPEC. Map se ubica con proteínas de la mitocondria, en donde altera el potencial de membrana y propicia la liberación del citocromo C e inducción de apoptosis.

Entre estos factores, la inyección de Tir en el citosol es un paso crucial durante la lesión A/E y la formación de los pedestales. El transporte de Tir a través del SSTT-translocón se lleva a cabo mediante una chaperona específica llamada CesT. Una vez en el citosol, un fragmento central de Tir (dominio hidrofóbico) se inserta dentro de la membrana plasmática de la célula, con lo que expone hacia el espacio

extracelular un fragmento de 107 aminoácidos conocido como TIBA (área de unión a intimina), con el que se une a la proteína de membrana externa de EPEC llamada intimina.

2.1.3 Contacto íntimo y formación de pedestales

La última etapa de la infección por EPEC se caracteriza por la unión estrecha entre la bacteria y la célula del huésped, así como la formación de los pedestales de actina (figura 1C). Tras la unión de Tir con intimina, aquél se fosforila en el residuo 474 por una proteína de la familia Src-cinasa conocida como c-Fyn. La forma fosforilada de Tir recluta a la proteína adaptadora Nck, la cual atrae, interacciona y activa al final a otras proteínas reguladoras del citoesqueleto, como WASP (proteína del síndrome de Wiskott-Aldrich) y el complejo Arp2/3. Todas estas proteínas activadas atraen la polimerización de actina hacia la zona donde está Tir fosforilada, lo que inicia la reorganización del citoesqueleto.

Los pedestales se forman por debajo de donde la bacteria está adherida y se componen sobre todo de actina polimerizada y otras proteínas relacionadas con actina, como actinina, fimbrina, miosina, talina y ezrina. La reorganización del citoesqueleto altera la morfología y fisiología normal de la región apical de las células, lo que lleva al final a la pérdida de las microvellosidades intestinales y su función (Vidal et al., 2007).

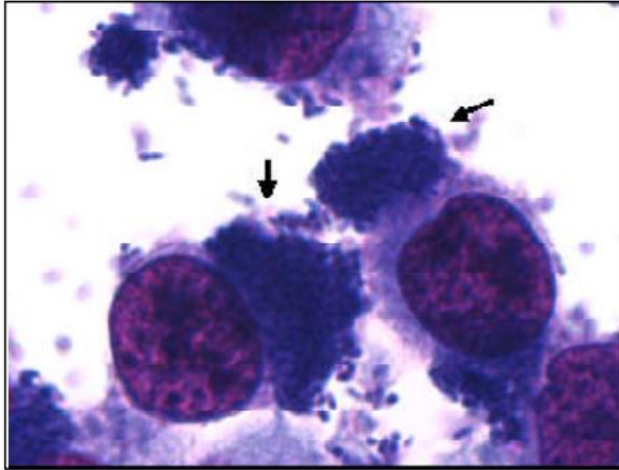
2.1.4 Papel de las toxinas en la infección

En modelos in vitro en donde se reproduce la lesión A/E causada por EPEC se ha observado una disminución de la resistencia transepitelial (TEER, por sus siglas en Inglés) de células polarizadas en cultivo; además mediante estos modelos se han podido registrar aumentos en la corriente de corto circuito (Isc) y diferencia de potencial (PD) en cámaras de Ussing, lo que sugiere la secreción activa de iones (Donnenberg et al., 1998).

Utilizando biopsias intestinales de niños infectados por EPEC se ha observado una ligera inflamación de la mucosa intestinal por lo que se ha sugerido la presencia de alguna enterotoxina producida y secretada por la bacteria participando en la patogénesis. Algunos grupos han encontrado en cepas de EPEC una variedad de productos tóxicos que podrían estar mediando la enterotoxicidad, aunque la participación de estos productos no está claro ya que no están distribuidos ampliamente en las cepas (Frankel et al., 1998).

Sin embargo, recientemente se ha descrito a una proteína involucrada de manera directa en la enterotoxigenicidad provocada por la EPEC, la proteína fue denominada EspC (proteína C secretada por EPEC, por sus siglas en inglés). EspC pertenece a la familia de proteínas autotransportadoras al igual que algunas toxinas de importancia médica como Pet de EAEC, Sat de *E. coli* uropatogénica, IgA proteasa de *N. gonorrhoeae* entre otras (Enderson et al., Stein, et al., 1998). La proteína indujo en experimentos de electrofisiología realizados con tejido yeyunal de rata y montados en cámaras de Ussing, un incremento en la corriente de corto circuito y diferencia de potencial, indicando per se la salida masiva de iones al espacio extracelular, que correlaciona con la diarrea acuosa que se observa (Law 1994., Mellies et al., 2001).

Para la identificación de EPEC se han utilizado diversos esquemas, entre los que se incluyen la serotipificación, el ensayo de adherencia en células HEp-2, la prueba de FAS y técnicas de biología molecular. La serotipificación permite diferenciar a los serotipos de EPEC involucrados históricamente en la diarrea o como los han referidos algunos autores, serotipos clásicos (Giammanco, 1996., Nataro et al., 1998). El ensayo fenotípico considerado como el estándar de oro para la identificación de EPEC es el ensayo de adherencia sobre células HEp-2 descrito por Cravioto et al., (1979), este método permite identificar a la bacteria gracias a que se dispone en cúmulos sobre las células epiteliales en cultivo (Fig.4), esta forma de adherirse a la célula se conoce como patrón de adherencia localizada (LA). Con esta técnica también se pueden identificar a otras categorías diarreogénicas de *E. coli* como enteroagregativa (EAEC) y enteroadherente difusa (DAEC) (Cravioto et al., 1979; Scaletsky et al., 19984; Scaletsky et al., 1998).



Se muestra la típica microcolonia (flechas) que forman las bacterias sobre la superficie de las células. El patrón de adherencia de EPEC ha servido como herramienta en el diagnóstico y es conocido como adherencia localizada (LA, por sus siglas en Inglés).

Figura 5. Patrón de adherencia localizada de EPEC sobre cultivo de células epiteliales HEp-2 (in vitro).(Vidal, 2003).

2.1.5 Transmisión y reservorio

Al igual que sucede con otros microorganismos importantes, la transmisión se lleva a cabo por la vía fecal-oral; en países en vías de desarrollo la principal vía de transmisión es el agua contaminada. Se ha demostrado que en los países industrializados la transmisión por alimentos es la principal causa de la enfermedad, aunque la transmisión no parece estar involucrada con algún tipo específico de alimento. Se piensa además que el aire (formación de aerosoles) podría ser una forma de diseminación de la bacteria sobre todo en lugares donde niños que han sido infectados conviven con niños asintomáticos (Nataro et al., 1998)

Los reservorios incluyen principalmente a niños con sintomatología y asintomáticos, adultos que en ocasiones son portadores asintomáticos y personas que manejan infantes. En algunos pacientes con infección por EPEC se ha logrado aislar de las heces a la bacteria hasta dos semanas después de clarificada la enfermedad, por lo que es necesario el control de las excretas de estos pacientes por un tiempo.

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) secreta al menos cinco proteínas. Dos de estas proteínas, EspA y EspB (anteriormente llamado EaeB), activan vías de transducción de señales en las células epiteliales del huésped. Mientras que el papel de las otras tres proteínas (39, 40 y 110 kDa) sigue siendo indeterminado. Sobre la

base de datos de la secuencia de la proteína amino terminal, se ha clonado y secuenciado el gen que codifica la proteína secretada de 110 kDa y se ha examinado su posible papel en la señalización de EPEC y la interacción con las células epiteliales. Según la terminología utilizada para espA y espB, se llamó a este gen espC, proteína secretada EPEC (Stein, 1996). EspC, se sabe que se secreta de forma independiente del aparato de secreción tipo III (Jarvis, 1995; Stein 1996).

Es una proteína autotransportadora de 110 kDa codificada por EPEC que causa un efecto citopático en las células epiteliales incluyendo daños al citoesqueleto, su citotoxicidad depende de su internalización y de su motivo funcional de serina proteasa (Navarro et al., 2004). Genes de virulencia de las bacterias patógenas se encuentran a menudo en elementos genéticos transmisibles como bacteriófagos, plásmidos o transposones, y muchas de estas proteínas se codifican dentro de una región específica del cromosoma denominado Islas de patogenicidad (Groisman, 1996; Hacker, 1997). En estudios realizados por Jay y colaboradores (2001) determinaron que espC está codificada dentro de una isla de patogenicidad ubicada a 60 min en el cromosoma de EPEC y que la proteína EspC tiene actividad enterotóxica.

Los autotransportadores, son una familia de proteínas secretadas por bacterias Gram-negativas, poseen una estructura global unificadora que comprende tres dominios funcionales: el amino-terminal de la secuencia líder, la proteína secretada madura (dominio de pasajeros) y un dominio carboxi-terminal (β -) que forma un poro β -barril para permitir la secreción de la proteína de pasajeros. Los miembros de esta familia han sido implicados como factores de virulencia importantes o putativos en muchos patógenos Gram-negativos.

Durante la infección por EPEC, EspC es secretada de las bacterias por el sistema de secreción tipo V (T5SS) y luego es eficientemente trasladada en las células epiteliales a través del sistema de secreción de tipo III (T3SS) translocon. La secreción EspC está mediada por el sistema de secreción de

tipo V (T5SS). Las proteínas secretadas por este sistema reciben también el nombre de proteínas autotransportadoras porque las proteínas promueven su propia secreción a través de las membranas interna y externa mediante el uso de dos dominios de procesamiento, la secuencia de señal (SS) y la unidad de translocación (TU) (Stein et al., 1996; Mellies et al., 2001; Henderson, et al., 2004). Se ha explorado el mecanismo de internalización EspC en las células epiteliales, ya que este es un evento clave en la inducción del daño del citoesqueleto que podrían explicar el efecto citopático causado por EPEC. Se ha demostrado que EspC, en condiciones no fisiológicas (es decir, como una proteína purificada), no es eficientemente internalizado, porque el receptor no está implicado en su captación y su tráfico intracelular no es necesario. EspC fisiológicamente secretada por EPEC, se acentúa en los medios de cultivo de tejidos y por contacto celular, es eficientemente internalizado durante la infección por EPEC y la interacción de células epiteliales (Navarro y Vidal, 2006).

En experimentos realizados por Navarro y colaboradores (2004) se demostró que EspC induce daño al citoesqueleto de células HEp-2. El efecto citotóxico de EspC es muy parecido al que induce la toxina Pet (toxina codificada en un plásmido) de EAEC y otras toxinas autotransportadoras de enterobacterias (Navarro, et al, 2003).

Las Cepas EAEC actualmente se definen como cepas de *E. coli* que no secretan enterotoxinas LT o ST y se adhieren a las células HEp-2 en un patrón de AA. Es probable que esta definición abarque tanto patógenas y no patógenas que comparten un factor que confieren un fenotipo común.

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) es causante de diarrea persistente en niños y adultos en países en desarrollo y desarrollados, y ha sido identificado como el causante de múltiples brotes a nivel mundial. Actualmente EAEC es definida como la *E. coli* que no secreta LT o ST y que tiene un patrón de adherencia en células HEp-2 conocido como autoagregativo en la cual la bacteria se adhiere a otras en una configuración de ladrillos apilados (Kaper et al., 2004). Como enterotoxina *Shigella*

1(ShET1) que contienen muchas cepas de *Shigella flexnerii* 2a (Henderson et al., 1999). Dos de las cuales son codificadas por el mismo locus cromosomal sobre cadenas opuestas. El gen más grande codifica una proteasa autotransportadora con actividad de mucinasa llamada Pic, y la cadena opuesta codifica la enterotoxina oligomérica conocida ETEC STa.

Kaper et al., (2004) propuso un modelo de patogenicidad para la EAEC que consta de tres etapas. El primero consiste en la adherencia de los microorganismos a la mucosa intestinal a través de la adhesión, por fimbrias de adherencia agregativa. Durante la segunda etapa hay hipersecreción mucosa intestinal, los microorganismos se mantienen inmersos en una matriz de gel favoreciendo la colonización persistente y la desnutrición. Finalmente, la tercera fase consiste en la secreción de proteínas con actividades enterotóxicas y citotóxicas que provocan alteraciones histopatológicas. CEEA es capaz de secretar proteínas dos autotransportadoras. Una citotoxina de 104-kDa que causa daño a las células epiteliales (Navarro et al., 1999), también se ha encontrado otra proteína de 116 kDa en sobrenadantes EACE (Navarro et al., 1998). Esta proteína fue nombrada Pic, está implicada en la colonización intestinal, debido a su actividad biológica (Henderson, 1999).

Muchas cepas de EAEC secretan una proteína autotransportadora llamada Pet. Esta tiene una actividad enterotóxica y potencialmente conduce a cambios en el citoesqueleto, redondeamiento de la célula epitelial debido al corte de la proteína espectrina del citoesqueleto (Navarro et al., 1998).

Los plásmidos son moléculas circulares de DNA extracromosómico que se replican de forma autónoma, a partir de su propio origen de replicación. Hay distintos procedimientos para la purificación de DNA plasmídico, aunque todos incluyen los tres pasos siguientes:

- a) Crecimiento de las bacterias en un medio selectivo de aquellas que llevan el plásmido.

- b) Lisis de las bacterias para la liberación del plásmido.
- c) Purificación del DNA plasmídico. Método para la separación de plásmidos del ADN genómico en extractos celulares bacterianos por lisis alcalina

La técnica se basa en la fragmentación lineal que ocurre durante la lisis celular del ADN genómico. Al incrementar su pH cerca de 12 pueden eliminarse los puentes de hidrogeno y separarse cada una de las cadenas del ADN. Los plásmidos (especialmente aquellos de bajo PM empleados para clonación génica) son resistentes y no se alteran por lisis celular, permaneciendo como ADN bacteriano circular superenrollado. Cuando el pH es reducido, las uniones entre las cadenas en el plásmido se remueven y entran en un estado más relajado. Sin embargo, los fragmentos lineales de ADN genómico no tienden a re-naturalizarse, por lo que pueden agregarse en una malla insoluble que se remueve por centrifugación, mientras que los plásmidos permanecen en solución. Otros componentes celulares que incluyen restos de pared celular y proteínas, se remueven por este procedimiento, así que la extracción por fenol no es necesaria. La preparación del plásmido obtenido con esta metodología es puro por lo que es útil aun en casos de digestión con enzimas de restricción

2.2 Fundamentos de las técnicas para el análisis de las proteínas

El término electroforesis se usa para describir la migración de una partícula cargada bajo la influencia de un campo eléctrico. Muchas moléculas importantes biológicamente (aminoácidos, péptidos, proteínas, nucleótidos, ácidos nucleicos...) poseen grupos ionizables y existen en solución como especies cargadas, bien como cationes, o bien como aniones. Estas especies cargadas se van a separar en función de su carga cuando se aplica un voltaje a través de los electrodos. Existen muchos tipos de electroforesis, que se engloban en dos categorías fundamentales:

- Electroforesis de frente móvil.
- Electroforesis de zona.

En esta investigación se utilizó la electroforesis de zona donde los componentes de la muestra migran en forma de pequeñas bandas, también llamadas zonas.

La electroforesis en gel es una técnica muy utilizada para separar moléculas o fragmentos de moléculas de ácidos nucleicos. Los materiales más comunes para separar moléculas de ácidos nucleicos son polímeros como la poliacrilamida o la agarosa. Estos geles se colocan en la cubeta de electroforesis, sumergidos en un tampón de pH alrededor de 8. De esta forma, las moléculas de DNA o RNA sometidas a electroforesis se desplazarán al polo positivo ya que a pH superiores a 5 poseen carga negativa. Los geles se comportan como un tamiz molecular y permiten separar moléculas cargadas en función de su tamaño y forma. Así, moléculas de DNA de diferente tamaño, van a emigrar de forma distinta en un gel de electroforesis. La distancia recorrida por cada fragmento de DNA va a ser inversamente proporcional al logaritmo de su peso molecular. Es importante la utilización de marcadores de tamaño conocido porque nos permitirán calcular los pesos moleculares de las muestras de DNA problema.

También se utilizó gel de agarosa para el análisis del plásmido de la toxina Pic. Los plásmidos son moléculas de DNA extracromosómico, circular y de pequeño tamaño (entre dos y varios cientos de kilobases) que se encuentran en muchas especies bacterianas. Se caracterizan porque se replican de manera independiente del DNA cromosómico bacteriano, tienen su propio origen de replicación, y no son necesarios para la viabilidad general de la célula, pero pueden contener genes que contribuyan a la supervivencia en condiciones especiales, como los que confieren resistencia a antibióticos. Una determinada célula bacteriana puede no tener ningún plásmido o puede albergar un número variable de los mismos. Algunas clases de plásmidos poseen la propiedad conocida como “replicación relajada”, esto es, están presentes en forma de muchas copias por célula, lo que facilita enormemente su aislamiento y purificación (Nelson y Cox 2001; Roux, 2003).

Para la detección de la concentración de cada una de las toxinas antes descritas (EspC, Pet Y Pic) se hará por el método de Bradford es una técnica sensible que consiste en la medición de la extinción provocada por el cambio en el espectro visible de un colorante (Coomasie Blue G-250) cuando éste se une a las proteínas

(absorbiendo así a 595 nm). Esta unión se realiza a través de grupos ionizados y se comprueba proporcionalidad con la concentración de las proteínas contenidas en la muestra.

La determinación del contenido proteico de una muestra requiere la comparación del valor de absorbancia de la muestra con los obtenidos a partir de cantidades conocidas de proteínas, con los que se construye una curva de calibración: a mayor cantidad de proteínas, mayor color desarrollado y por lo tanto, mayor absorbancia (Bradford, 1976).

Después se determina el peso molecular de la proteína mediante el método de electroforesis desnaturizante (SDS-PAGE). Esta es la electroforesis de proteínas más ampliamente usada; se realiza en presencia de SDS ('SDS-polyacrilamide gel electrophoresis'). Fue descrito por Laemmli (Laemmli, 1970). Se trata de un tipo de electroforesis donde las muestras se desnaturalizan por calor en presencia de agentes desnaturizantes (beta-mercaptoetanol, que destruye los puentes disulfuro, SDS que desnaturaliza y recubre a la proteína con cargas netas negativas), y se separan como cadenas polipeptídicas aisladas.

Con estas técnicas se puede conseguir la identificación de las toxinas buscadas además de su pureza y concentración para continuar con todo el proceso de su producción por lotes.

3. JUSTIFICACIÓN

Escherichia coli puede estar involucrada en problemas gastrointestinales, así como en infecciones urémicas y neonatales. Dentro de las infecciones intestinales, las *E. coli* se han clasificado en seis grupos: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC). *Escherichia coli* enterotoxigénica se adquiere, al igual que los otros grupos patógenos de *E. coli*, por la ingestión de agua y alimentos contaminados (Cortés et al., 2002). Para conocer la patogénesis molecular de la infección por estos patógenos y con la intención del estudio detallado de los grupos EPEC que son bacterias que infectan principalmente a niños menores de 2 años provocando diarrea de diversos grados (Vidal, 2003), y EAEC que es causante de diarrea persistente en niños y adultos en países en desarrollo y desarrollados, y ha sido identificado como el causante de múltiples brotes a nivel mundial (Kaper et al., 2004).

Se ha propuesto en esta investigación la producción de las toxinas que son secretadas por estas dos cepas, la toxina EspC secretada por EPEC y las toxinas secretadas por cepas de EAEC proteasas autotransportadoras llamadas Pet y Pic .

A pesar de que se conoce de manera general el daño característico de la infección por estas bacterias, aun no se han esclarecido el modelo patogénico de las toxinas que destruyen las microvellosidades de las células epiteliales y que alteran la estructura original del citoesqueleto provocando la muerte celular. La diarrea se ha vinculado con: a) la destrucción de las microvellosidades del enterocito, b) la salida masiva de iones hacia la luz intestinal y c) la secreción de alguna enterotoxina. En el ámbito local se desconocen muchos aspectos relevantes acerca de la virulencia y el diagnóstico eficaz, lo que repercute en el control adecuado de la enfermedad diarreica en los niños (Vidal, 2003).

De manera alarmante, las cifras de letalidad en países en desarrollo son elevadas (20 a 50%), lo que convierte a la infección por EPEC en una anomalía clínica de inmediata respuesta. Además, se ha notificado en algunos países latinoamericanos que la infección por EPEC supera a la provocada por *Campylobacter spp.* y rotavirus en la población infantil (Cravioto et al., 1988).

Para *E. coli* enteroagregativa en el mecanismo de patogenicidad están implicadas la bacteria y diversas moléculas que ella produce; también se sabe que las cepas EAEC tienen la capacidad de incrementar en la mucosa la producción y secreción de moco que atrapa a las bacterias que se autoaglutinan en una fina película en el epitelio intestinal. La producción de moco puede estar relacionada con la capacidad de EAEC para colonizar persistentemente el intestino y causar diarrea (Savarino et al., 1991; Savarino et al., 1996).

Eslava y colaboradores (1998), identificaron dos proteínas de alto peso molecular de cepas EAEC, aisladas de niños que murieron de diarrea persistente. Estas proteínas fueron probadas en asa ligada de rata observándose vellosidades cortas, hemorragia y necrosis. El gen de una de estas proteínas se encontró en un plásmido de 65 MDa y se le dio el nombre de Pet (plasmid-encoded toxin) la cual tiene la capacidad de producir efecto citopático en células Hep-2, caracterizado por redondamiento y desprendimiento de las células así como contracción del citoesqueleto y pérdida de fibras de actina. En EAEC se ha descrito también otra proteína llamada Pic que está codificada en el genoma y que tiene actividad de proteasa (Eslava et al., 1998; Henderson et al., 1999).

Con el fin de evaluar detalladamente el mecanismo de infección de estas cepas se propuso la producción de lotes confiables de estas toxinas bacterianas para estudios de microbiología celular. Teniendo en cuenta que el avance de la ciencia en las investigaciones de este campo contribuyen a la mejora de la calidad de vida de la población infantil con mayor susceptibilidad a la infección.

4. OBJETIVOS

Objetivo General

Producir lotes de las toxinas Pet y Pic secretadas por bacterias de *E. coli* Enteroagregativa y EspC de *E. coli* enteropatogena con pureza y calidad confiable y demostrar su actividad biológica sobre cultivos de células epiteliales.

Objetivos específicos

- a) Obtener y analizar los genes que codifican la síntesis de las toxinas Pet, Pic y EspC
- b) Determinar la concentración y pureza de las toxinas Pet, Pic y EspC mediante ensayos de Bradford y Electroforesis SDS-PAGE
- c) Evaluar su actividad biológica de las toxinas Pet, Pic y EspC sobre cultivos de células epiteliales
- d) Seleccionar las clonas bacterianas más eficientes para producirlas por lotes.

5. METODOLOGÍA

Los procedimientos experimentales se llevaron a cabo en el laboratorio 17 del departamento de Biología Celular, del Centro de Investigación y Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional ubicado en Av. Instituto Politécnico Nacional 2508 San Pedro Zacatenco, Gustavo A. Madero 07360 Ciudad de México, D.F.

5.1 Obtención de la Proteína Pic de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) (Navarro et al., 2010)

Reactivación de la cepa HB101/ pACYC 184 Pic para la obtención de la toxina Pic

Se tomó una azada de una clona de *E. coli* denominada HB101/ pACYC 184 Pic contenida en un microtubo con glicerol almacenado a -20 ° C y se sembró por estría cruzada en una caja Petri con LB-agar más tetraciclina 10 µg/ml se incubó durante 15 horas a 37 ° C.

5.1.2 Análisis de plásmidos (Promega, 2005).

Pasadas las 15 horas de incubación se tomó una colonia individual característica y se sembró en 1 tubo con 5 ml de medio Luria Bertani (ver la composición del medio en Anexo A) más Tetraciclina en una concentración de 10 µg/ml en condiciones aerobias por 16 h a 150 rpm y 37 ° C. Después de este tiempo se centrifugó durante 5 min a 10 000 rpm (en centrifuga universal y rotor de columpio, marca 320 R Hettich). Se descartó el sobrenadante y se agregaron 50 µl de solución de resuspensión celular, se resuspendió por completo el pellet mediante pipeteo y se pasó a un tubo eppendorf de 1.5 estéril. Posteriormente se agregaron 250 µl de solución de lisis celular (NaOH/SDS) se mezcló el contenido del tubo por inversión suave 5 veces hasta que se observó la solución viscosa y ligeramente clara por la lisis celular, pasado el tiempo se agregaron 10 µl de la solución de proteasa alcalina, se homogenizó de la misma manera y se dejó en incubación por 5 min más.

A continuación se añadieron 350 µl de solución de neutralización (acetato potásico), y se mezcló el contenido del tubo por inversión suave por 5 veces, hasta que se observó un precipitado blanco que contiene el DNA cromosómico junto con las proteínas, se centrifugó el lisado a 14 000 rpm durante 10 min, posteriormente se transfirió el clarificado a una columna y un tubo nuevo y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. El filtrado se descartó se agregaron 750 µl de solución de lavado y nuevamente se centrifugó a 14 000 rpm durante 1 min; se descartó el filtrado y la columna se pasó a un tubo nuevo, se repitió el mismo paso pero ahora con 250 µl de la solución de lavado (etanol al 80 %) durante 2 min, se transfirió la columna a un nuevo tubo estéril 1.5 ml teniendo cuidado de no transferir de la solución de lavado a la columna, y se centrifugó a 14000 rpm durante 1 min. En la solución recolectada al final se obtuvo el DNA plasmídico.

5.1.3 Preparación del gel de agarosa (Padilla, 2001)

Se vertieron en un matraz 30 ml del tampón de electroforesis TBE y 0.24 g de agarosa (0.8 %). la solución se fundió en microondas y se dejó enfriar hasta que alcanzó 50 ° C aproximadamente. Se vertió el gel y se colocó el peine que para formar los pocillos. Se dejó polimerizar durante unos 30 minutos.

5.1.4 Preparación del DNA Plasmídico (Promega, 2005).

Se tomaron 20 µl del DNA plasmídico aislado y se le añadieron 5 µl de tampón de carga.

5.1.5 Electroforesis en gel de Agarosa (Padilla, 2001)

Se añadió al gel tampón de electroforesis TBE hasta cubrirlo perfectamente y se depositaron 10 µl de la muestra preparada en tres pocillos. Se aplican 10 µl de marcadores de peso molecular en dos de los pocillos. Se tapó la cubeta de electroforesis y se conectan los electrodos a la fuente de alimentación. Se corrió a 100 Voltios durante 40 minutos. Una vez acabada la electroforesis se desmontó el gel y se le añadió Bromuro de Etidio para visualizar los fragmentos de DNA mediante luz UV y se tomó una fotografía de la imagen.

5.2 Transformación de bacterias HB101 de *E. coli* (Navarro et al., 2010)

En una transformación bacteriana las células introducen y expresan la información de un ADN exógeno. Este ADN puede provenir de un ADN recombinante construido in vitro o bien de moléculas de ADN naturales. En la transformación bacteriana se requiere que las bacterias se encuentren en un determinado estado fisiológico, denominado competencia. En este estado competente, las paredes bacterianas se hacen permeables a macromoléculas como el ADN o en concreto a los plásmidos. En ciertas especies, la competencia puede producirse de forma natural cuando las condiciones son adversas, con bajos niveles de nutrientes y de oxígeno. *Escherichia coli* es una especie que en su forma natural no tiene un estado de competencia, se requiere una manipulación para hacerla competente.

La competencia se induce gracias a choques térmicos, transiciones súbitas entre calor y frío, que afectan la estructura y permeabilidad de la pared celular y de la membrana. En estado de competencia las paredes celulares son inestables y las células se vuelven frágiles por lo que deben tratarse con cuidado. El número de células transformadas por 1 microgramo de ADN se conoce como la eficiencia de transformación. Se requieren cantidades muy pequeñas de ADN en las transformaciones, alrededor de 5 a 100 nanogramos. Cantidades excesivas de ADN, >100 nanogramos, inhiben el proceso de transformación (Sanz, 2012).

Para la transformación de bacterias con el plásmido de Pic se adicionaron 50 μ l de bacterias competentes HB101 de *E. coli* y 3 μ l y 1.5 μ l del plásmido de pACYC 184 Pic (obtenido en el paso 5.1.2) en 2 tubos fríos eppendorf de 1.5 ml estéril . Se mezclaron con golpes suaves para evitar dañar las estructuras celulares y se incubaron en hielo durante 30 min. Después de este tiempo se dio un choque térmico a 42 °C durante 1 min y se pasó a hielo por 5 min. Se adicionaron 750 μ l de medio Luria Bertani, se incubaron en termociclador durante 1 h a 37 °C y 150 rpm y se sembraron 100 μ l de la suspensión de cada tubo en cajas Petri estériles con medio LB-agar (Luria Bertani sólido) más tetraciclina 10 μ g/ml.

De las colonias crecidas se sembraron 8 características de cada caja y se inocularon en tubos con 5 ml de medio Luria Bertani (ver la composición del medio en Anexo A) más Tetraciclina en una concentración de 10 µg/ml, (se usaron tubos cónicos de 50 ml y con tapa floja) se incubaron durante 16 h a 37 ° C 150 rpm. Se hicieron análisis por precipitación de proteínas con TCA (Ácido tricloro-acético) que se detalla en el paso 5.2.2 para observar la expresión de los plásmidos en las bacterias ya transformadas.

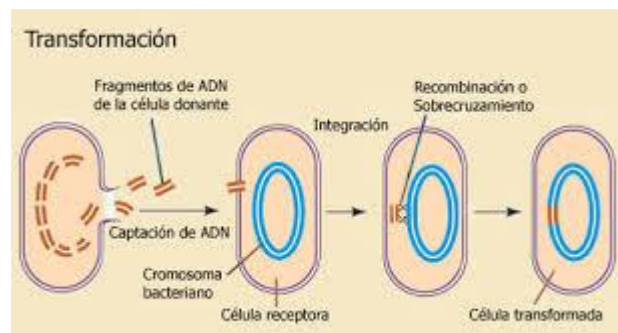


Figura 6. Proceso de transformación de bacterias

Simultáneamente se utilizó la técnica de PCR para comprobar la expresión del plásmido en las bacterias transformadas como se detallate en el paso 5.2.1.

5.2.1 Reacción de la cadena de la polimerasa (PCR) y electroforesis en geles de agarosa para comprobar la expresión del plásmido de pACYC 184 pic en las bacterias transformadas HB101 de *E. coli* (Roux H. 2003).

Se utilizó la técnica de PCR para amplificar el gen plasmídico que codifica la proteína Pic en las bacterias transformadas HB101 de *E. coli*. De las colonias crecidas en medio Luria Bertani más Tetraciclina (10 µg/ml) se tomó con la punta de un palillo una colonia característica y se resuspendió con 20 µl de agua esteril, se hirvió (98 ° C) durante 10 min y se centrifugó a 14 000 rpm por 5 minutos ,se utilizaron 3 µl del sobrenadante para la PCR.

Para la reacción de amplificación (PCR) se preparó la mezcla como se muestra en el cuadro 1 (ver componentes de la mezcla en anexo C), se adicionaron todos los componentes y por último el DNA

Cuadro 1. Mezcla para PCR

Componente	µl utilizados para 1 reacción
Agua inyectable	14.05
Buffer Para PCR 10 x	2.5
MgCl ₂ (50 mM)	0.75
4 dNTPs (2 mM)	2.5
Tq Polimerasa (5U/ µl)	0.2
Primer 1 forw (10µl)	1.0
Primer 2 rev (10µl)	1.0
DNA muestra templado	3
Volumen total	25 µl/tubo

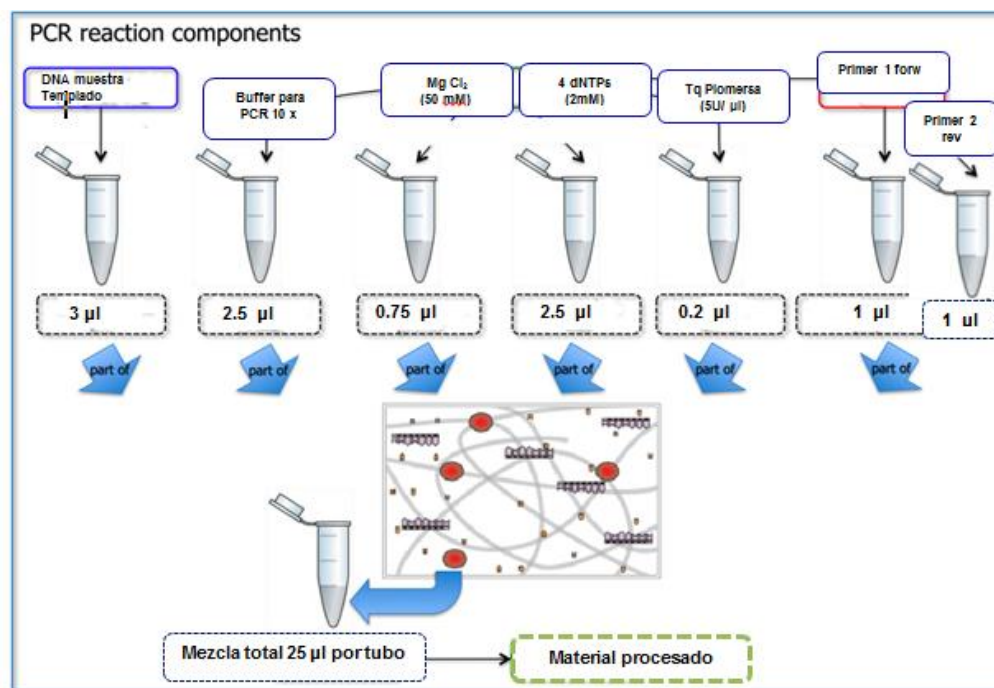


Figura 7. Reacción de los componentes de la mezcla para PCR

Al final de la mezcla se agregan los 3 µl del DNA de la muestra y se preparó respectivamente un blanco negativo, se pusieron en el termociclador programado previamente como se muestra en el cuadro 2.

Cuadro 2. Programación del termociclador para amplificación del gen

Ciclos	Temperatura	Tiempo
1	95°C (desnaturalización inicial)	5 min
30	95°C (desnaturalización)	45 seg
	58°C (hibridación oligo)	30 seg
	72°C (extensión)	1 min
1	72°C (extensión final)	10 min
1	4°C	∞

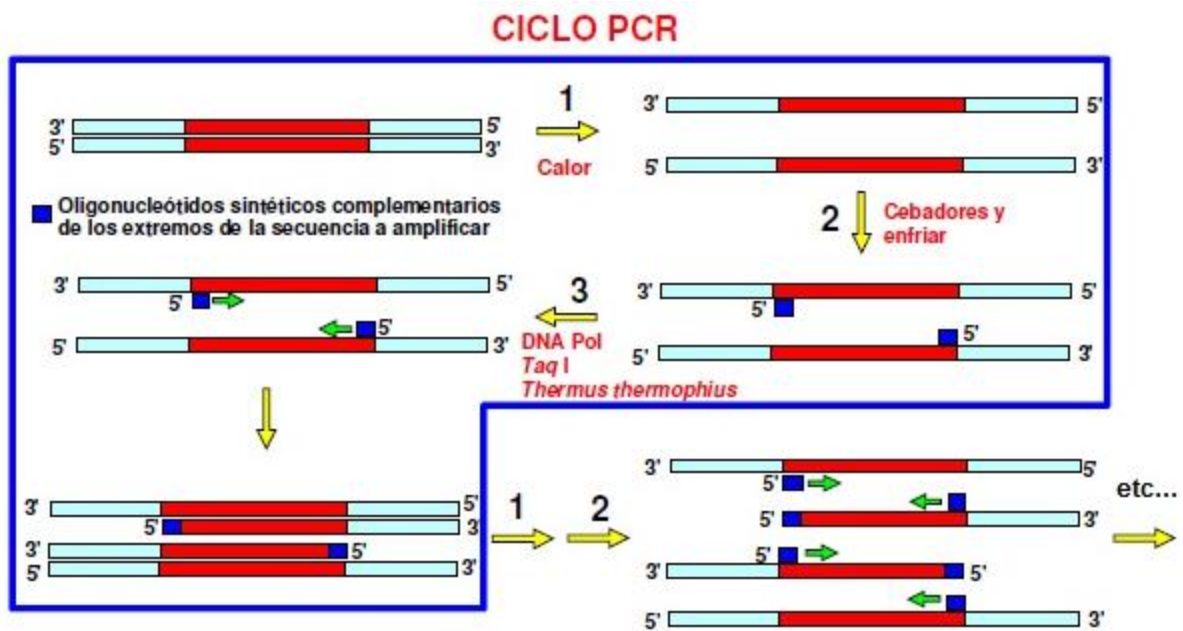


Figura 8. Amplificación de secuencias específicas de DNA en PCR

Los productos de amplificación se analizaron en geles de agarosa al 1.5 % siguiendo el mismo proceso del paso 5.1.3.

5.2.2 precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) (Navarro et al., 2010)

De las colonias transformadas HB101 de *E. coli* (paso 5.2) se crecieron 8 de las más características en 5 ml de medio LB más Tetraciclina 10 µg/ml. Posteriormente se centrifugaron a 4000 rpm (en centrifuga universal y rotor de columpio marca 320 R Hettich) por 15 minutos a 4°C y se rescató el sobrenadante, se hicieron alícuotas de 1200 µl en tubos Eppendorf de 1.5 ml estériles (todo el manejo se hizo en hielo). Se adicionaron 20% de TCA (200 µl de una solución madre al 50% de una solución 6 g de TCA en 6 ml de H₂O de sol1:1). Con agitación suave se homogenizó y se incubó en hielo durante 1h. Pasado el tiempo se centrifugó a 14 000 rpm (en centrifuga universal y rotor Eppendorf 1462 R Hettich) 25 minutos a 4 ° C y el sobrenadante se descartó hasta escurrir lo más posible.

La pastilla fue lavada con 500 µl de acetona pura (pre-enfriada a -20° C), y se centrifugó 10 minutos a 14 000 rpm posteriormente se descartó el sobrenadante este proceso fue repetido 2 veces y se dejó evaporar por 10 minutos. Posteriormente se resuspendió la pastilla en 15 µl de tris-HCl 1 Molar a pH 8.8 y 20° C.

Las alícuotas de las muestras iguales se unieron mediante el lavado por las paredes primero con 15 µl y se traspasó al siguiente tubo hasta obtener una sola muestra de la misma proteína. Se agregaron 15 µl más a cada tubo repitiendo el paso anterior para lavar perfectamente las paredes y se obtuvo un volumen final de 30 µl. A este volumen se agregaron 5 µl de β-Mercaptaetanol y se hirvieron (98°C) durante 5 minutos. Finalmente se almacenaron a -20° C para correr un gel SDS- PAGE (Electroforesis en gel de poliacrilamida).

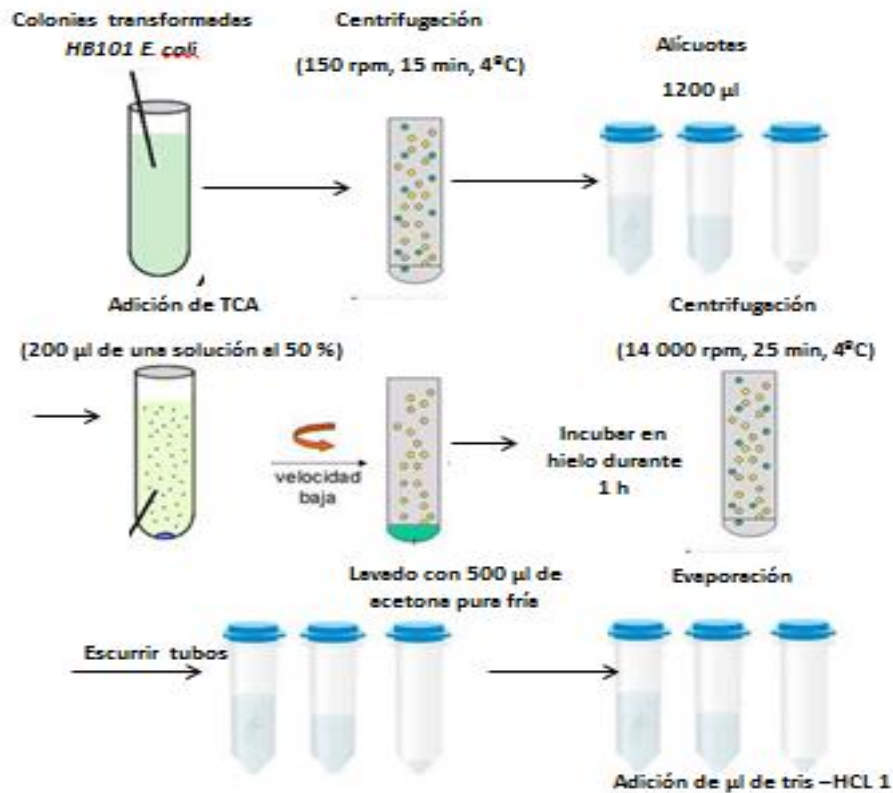


Figura 9. Proceso de Precipitación de proteínas con Ácido tricloro-acético.

5.2.3 Electroforesis en gel de poliacrilamida (Fanglian, H. 2011)

Con las muestras obtenidas del paso 5.2.2 se realizó el gel para la detección de la proteína.

Montaje de la cámara y polimerización

Todo el material a utilizar se limpió con SDS 1 % utilizando guantes. Se hizo la mezcla del gel separador (ver cuadro 3) homogenizando por inversión, se cargó dejando 1cm de espacio hasta la superficie para el gel concentrador y se selló agregándole agua para evitar el contacto con el oxígeno, se dejó polimerizar por 30 minutos.

Cuadro 3. Porcentaje y componentes de Gel separador

Geles mm	0.75	1.5
10 %		
Buffer 8.8 (ml)	1.20	2.25
Acrilamida-Bisacrilamida (ml)	1.58	2.97
H₂O Desio. (ml)	2.03	3.81
TEMED (µl)	24	45
PSA 12.5 % (µl)	48	90

Cuadro 4. Porcentaje y componentes de Gel concentrador

Geles mm	0.75	1.5
Buffer 6.8 (ml)	0.38	0.75
Acrilamida-Bisacrilamida (ml)	0.56	1.125
H₂O Desionizada. (ml)	1.31	2.625
TEMED (µl)	15	30
PSA 12.5 % (µl)	30	60

Se hizo la mezcla del gel concentrador (GC) homogenizando por inversión, se cargó de igual manera que el paso anterior y se colocó el peine para pozos de 1.5 mm Se desmontó el gel, y se montó en la cámara la cual se llenó con buffer de corrida 1 x nuevo y la externa con buffer de corrida 1 x usado (ver concentraciones de buffer en el anexo B). Las muestras se cargaron y en el último carril se pusieron 9 µl de marcador de peso molecular como estándar. Se encendió la fuente a 60 voltios hasta que el colorante llegó al gel separador, alcanzado el gel separador, se aumentó en voltaje a 120 voltios.

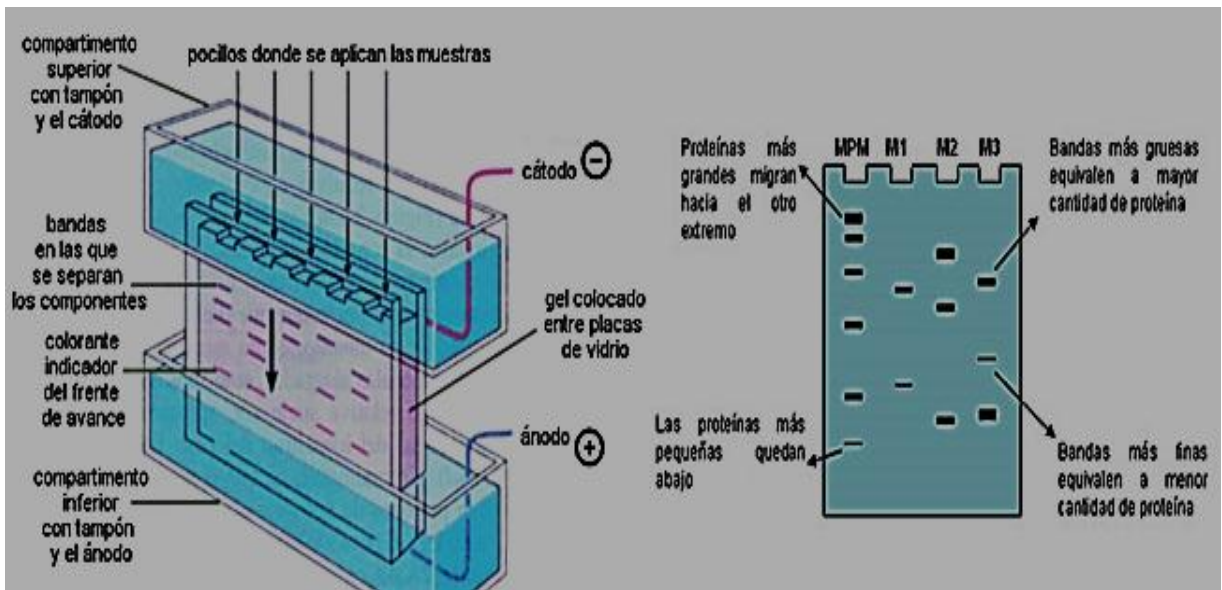


Figura 10. Esquema de la cámara de electroforesis

Cuando el frente alcanzó el fondo del gel se retiró y se apagó la fuente. El gel se tiñó con colorante de Fairbanks hasta que las bandas fueron visibles (20 min aproximadamente). Se agregó a la charola solución desteñidora con agitación lenta el tiempo necesario para ver las bandas claras y se escaneó para la interpretación de resultados.

5.3 Obtención de la toxina EspC de *Escherichia coli* Entero patógena (Navarro et al., 2010)

5.3.1 Reactivación de la cepa HB101 +ESPC WT (FN12) para obtención de la toxina EspC

Se Inoculó con la cepa HB101 +EspC Wt (FN12) una caja Petri con medio Luria Bertani-Agar más Ampicilina (100 µg/ml) en estría cruzada. Se incubó a 37 ° C durante 16 horas. Pasado el tiempo, se sembró una asada de las colonias más características en 2 matraces de 1000 ml con 500 ml de medio Luria Bertani Ampicilina (100 µg/ml) y arabinosa 2% de una solución al 20%. Se incubó a por 16 h a 150 rpm y 37 ° C (Miller, 1992).

A partir de este paso se trabajó en hielo:

El contenido de los matraces se colocó en las botellas Sorvall, se centrifugaron a 4° C (6700 rpm en rotor GSA, marca Sorvall Rc3c) durante 20 minutos el sobrenadante se filtró en condiciones asépticas con filtro 0.22 µ estériles recibiendo el filtrado en una botella estéril, se colocaron 15 ml del mismo en un filtro Ultra free-15 biomax 100kDa y se centrifugaron a 4000 rpm (en centrifuga universal y rotor de columpio marca 320 R Hettich) durante 20 minutos hasta que el volumen retenido en los filtros fue de 15 µl. El concentrado se recolectó de los filtros, y se colocó en un tubo Eppendorf de 1.5 ml estéril (se mantuvo en hielo) y se desechó el sobrenadante del tubo cónico, se pusieron otros 15 ml del medio con la cepa y se procesaron de la misma manera, hasta que este se terminó.

Finalmente se hicieron alícuotas del contenido homogéneo en tubos Eppendorf estériles de 500 µl, y se guardaron a -70 °C para su liofilización, se dejó una muestra a -20° C para determinar concentración de proteína por la técnica de Micro Bradford y realizar SDS-PAGE.

5.4 Obtención de la Proteína Pet de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC) (Navarro et al., 2010)

Para la obtención de esta proteína se procedió de igual manera que el paso 5.31, con la excepción del medio para esta toxina se requiere medio Luria Bertani con Ampicilina 10 µg/ml (LB-A). La Cepa que se sembró corresponde a HB101 (pCEF1) (plásmido que codifica para la proteína Pet).

5.5 Liofilización (Navarro et al., 2010)

Cada una de las alícuotas de las toxinas EspC Y Pet obtenidas en los pasos 5.3 y 5.4 respectivamente se etiquetaron y se guardaron a -70°C durante toda la noche, para continuar con su liofilización.

Las muestras se liofilizaron durante 10 horas, en algunos casos el tiempo aumentó hasta que las muestras estuvieran completamente secas; se monitorearon

constantemente para evitar la licuefacción. Una vez liofilizadas completamente, fueron guardadas a temperatura ambiente para hacer ensayos biológicos.

Simultáneamente se corrió un gel SD-PAGE de la proteína concentrada y liofilizada a la par, para comparar las bandas y comprobar que estas no se hubieran degradado en los pasos anteriores.

5.6 Cultivo de células (Navarro et al., 2010)

Para determinar la concentración a la que la sustancia produce un efecto dado (daño celular) y con esto evaluar su pureza durante la infección por *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) y *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), las células HEp-2 (Heteroploide continua, proveniente de un carcinoma de laringe humano) (Win, 2006), fueron infectadas con las toxinas producidas.

Células HEp-2 fueron propagadas en 5% de CO₂ -95% de aire a 37 ° C en medio de Eagle modificado de Dulbecco suplementado con 5% de suero fetal bovino (Hyclone, Logan, UT), con 1% de aminoácidos no esenciales, 5 mM de L - glutamina, penicilina (100 U/ml) y estreptomycin (100 mg/ml). Los cultivos fueron reproducidos en serie con 10 mM de EDTA y 0,25% de tripsina, en solución tamponada con fosfato salino (PBS) a pH 7.4 para uso experimental, las células HEp-2 se resuspendieron con EDTA-tripsina, se sembraron en pocillos LabTek y se dejaron crecer durante 1 día.

5.7 Ensayos de actividad biológica (Navarro et al., 2010)

Para todas las muestras, del concentrado y del liofilizado se diluyeron directamente en medio de cultivo tisular (sin suero ni antibióticos) y se añadieron a las células diana en un volumen final de 500 µl por pocillo. Para la proteína Pet la concentración es de 60 µg/ml y se dejó por 4 horas de incubación en una atmósfera humidificada de 10% de CO₂ -90% de aire a 37 ° C. Después de este tiempo el medio se aspiró y las células se lavaron dos veces con 200 µl de PBS. Posteriormente se tiñeron con Giemsa al 10% durante 1 hora y media y los

portaobjetos se leyeron a un aumento de 40 x con luz de campo brillante en microscopía estándar.

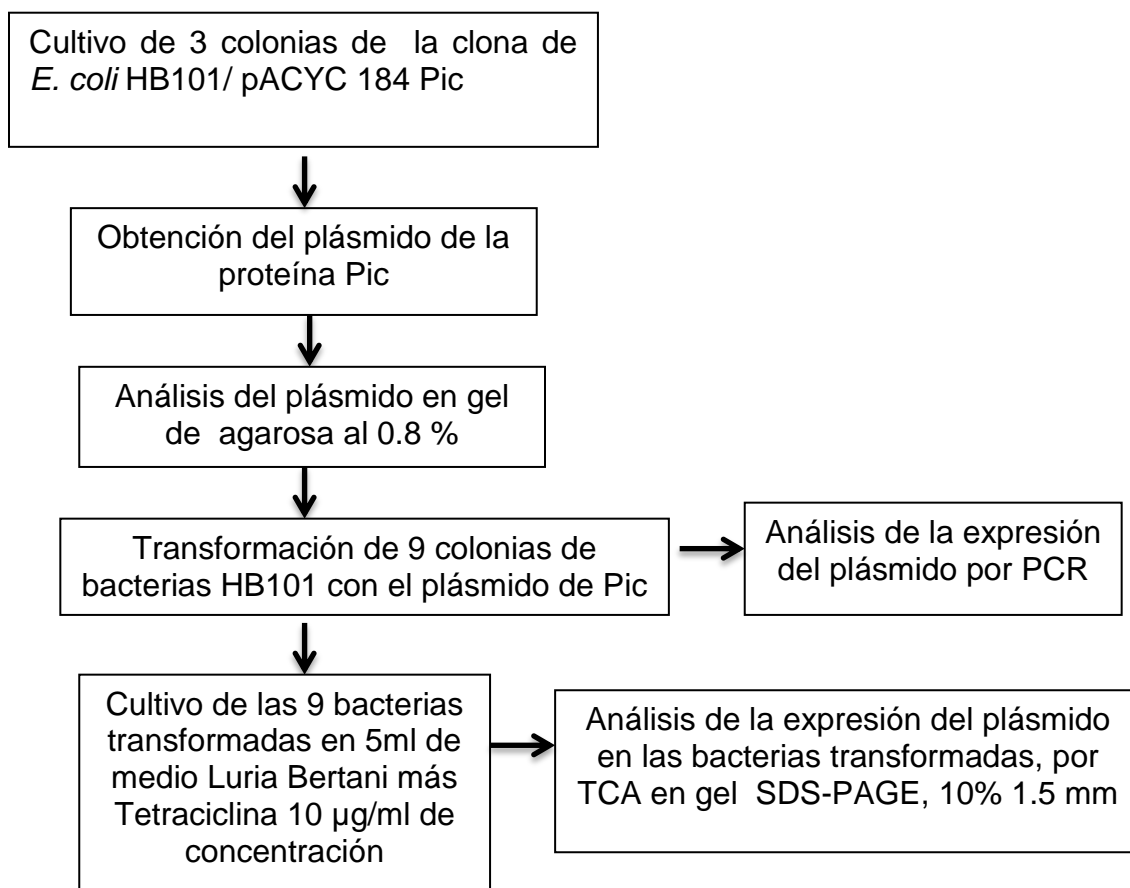
5.8 Congelamiento de cepas (Navarro et al., 2010)

Las cepas productoras de las toxinas de Pet y EspC analizadas mediante Bradford y Electroforesis SDS- PAGE, se sembraron en cajas Petri en estría masiva en medio LB-Agar más Ampicilina 10 µg/ml y se crecieron durante 16 h, pasado este tiempo se agregaron 1.5 ml de medio Luria Bertani y 15% Glicerol en crioviales estériles de tapa con rosca externa ya etiquetados.

Todo el manejo en campana de flujo laminar, se levantaron suavemente todas las bacterias de las cajas y se pasaron a los crioviales, resuspendiendo las bacterias hasta levantar todas las de la caja, se pasaron por 15 a 20 segundos en el vórtex para disgregar bien las células y luego se guardaron ya etiquetadas a -20°C en congelador marca REVCO.

6. RESULTADOS

El proceso para la obtención del plásmido que codifica para la toxina Pic está descrito en el siguiente esquema, dicho plásmido fue tomado de la clona de *E. coli* denominada HB101/ pACYC 184 Pic conservada en glicerol y almacenado a -20 ° C, obtenido en el laboratorio 17 del departamento de Biología Celular, del CIVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.



6.1 Obtención de la proteína Pic de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

La obtención del plásmido de la cepa HB101/pACYC 184 Pic, se analizó en un gel de agarosa al 8 % se hizo una siembra por triplicado del mismo plásmido denominándolas A, B, C, respectivamente; en la figura 11 se puede observar que en las tres colonias diferentes que fueron sembradas, se obtuvo eficientemente el

material plasmidico de Pic, el cual tiene un plásmido mayor a 10 Kb y que codifica para una proteína 109.8 kDa como lo afirma Henderson y colaboradores (1999).

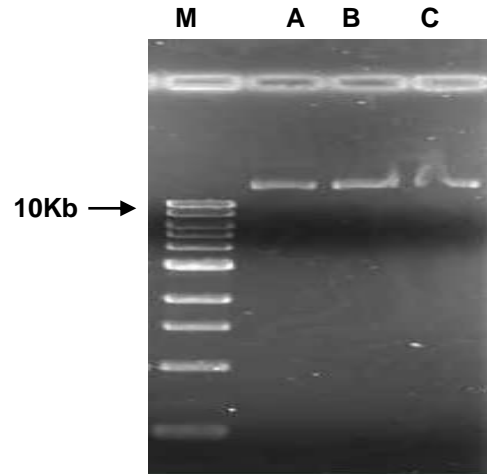


Figura 11. Electroforesis en gel de agarosa para el análisis de plásmido de la proteína Pic. Gel de Agarosa 0.8 %. M Marcador, A, B, C plásmido de Pic

6.1.1 Amplificación del plásmido de Pic mediante PCR

Una vez obtenido el plásmido de la cepa HB101/pACYC 184, se sembraron las 9 colonias de HB101 de *E. coli* competentes para su transformación, y conjuntamente se hizo la amplificación por PCR, en la figura 12 se observa que el producto de la amplificación de las 9 colonias a las que se les introdujo el gen de Pic, este fue expresado eficientemente. Este gen está compuesto por 572 pares de bases como se observa en la figura 7 su expresión en las bacterias transformadas fue clara.

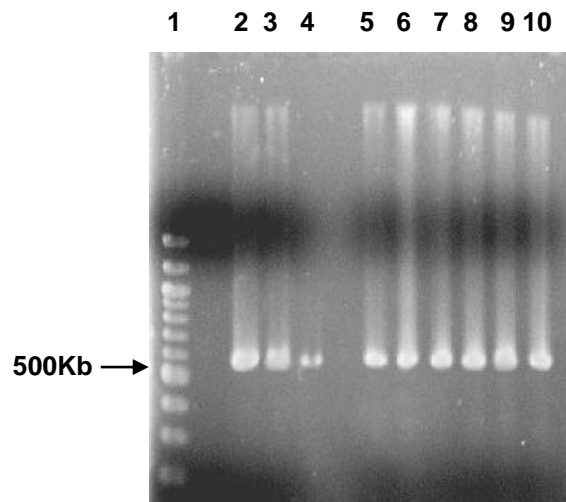


Figura 12. Electroforesis en gel de agarosa de los productos de amplificación de PCR del plásmido de Pic. 1 Marcador, (2-10) colonias con el plásmido de Pic

6.1.2 Análisis de bacterias transformadas con el plásmido de Pic mediante la precipitación de proteínas con ácido tricloro-acético (TCA)

El cultivo de las bacterias transformadas se analizó por precipitación con ácido tricloroacético en SDS-PAGE en la figura 13 solo se observan las bandas del marcador de peso molecular se comprueba que no fueron expresadas. Las colonias no se caracterizaron de la manera esperada, pues el peso molecular de Pic es de 109.8 KDa, la cual no pudo expresarse una vez que las bacterias HB101 de *E. coli* fueron transformadas con este plásmido, esto podría deberse a que para tener una transformación eficiente la bacteria debe estar en un estado de competencia, lo que puede ocurrir como una respuesta limitada en el tiempo a las condiciones ambientales, tales como la falta de nutrientes y una densidad celular elevada por la cual estas no fueron capaces de introducir el plásmido de Pic.

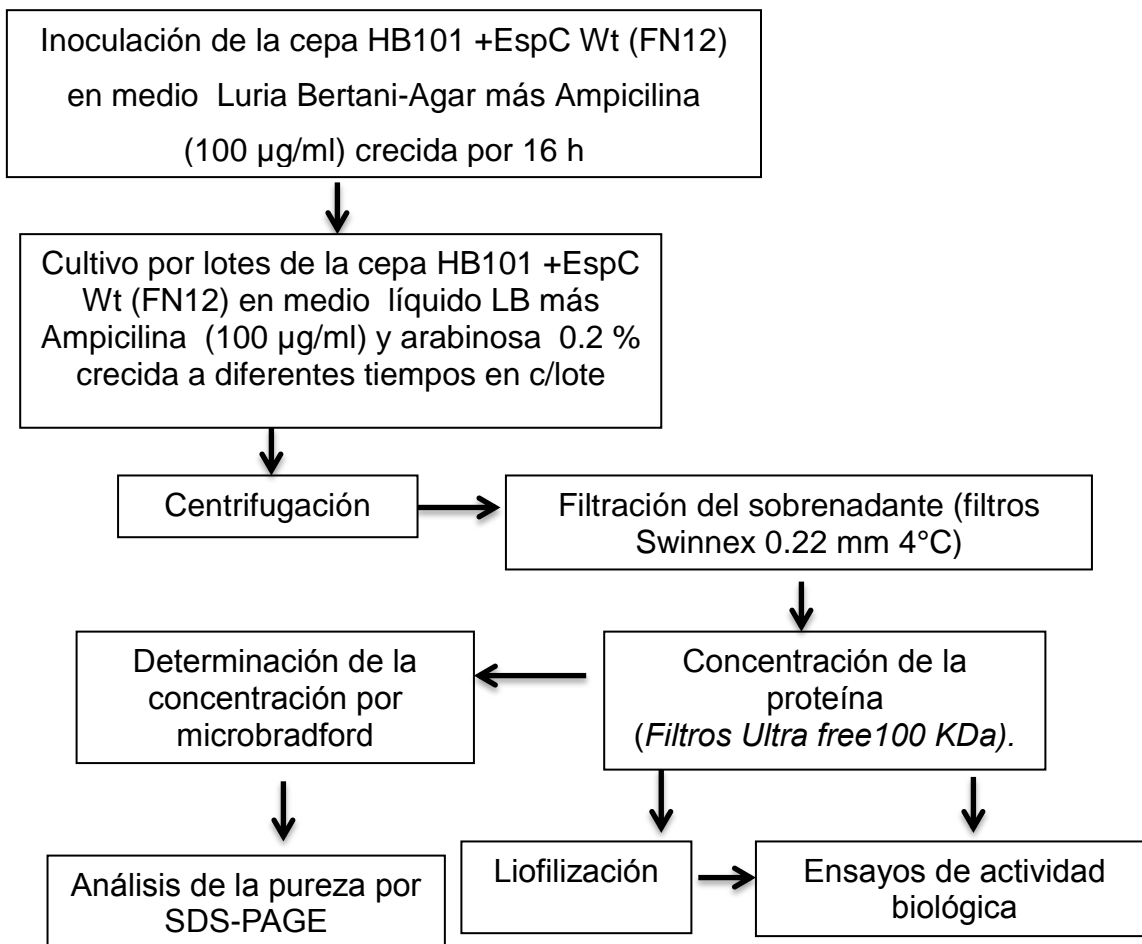


Figura 13. Análisis por TCA de la proteína **Pic** 108 KDa, crecida en bacterias transformadas HB101, en medio Luria Bertani más tetraciclina 10µg/ml por 16 h, a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10% 1.5 mm.

1. Marcador de pm 2. Clona De Pic A 3. Clona de Pic B 4. Clona de Pic C 5. Clona de Pic D 6. Clona de Pic E 7. Clona de Pic F 8. Clona de Pic G 9. Clona de Pic H

6.2 Obtención de la Proteína EspC

El siguiente esquema describe el proceso para la obtención de la toxina EspC secretada por *Escherichia coli* enteropatógena, tomada de la clona de *E. coli* denominada HB101 +EspC Wt (FN12) conservada en glicerol y almacenado a -20 ° C, conservada en el laboratorio 17 del departamento de Biología Celular, del CIVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.



6.2.1 Concentración de las toxinas liofilizadas y concentradas de EspC

En total se produjeron 4 lotes de EspC, todos fueron homogenizados y se hicieron alícuotas de 500 µl para liofilizar la toxina obtenida. Las concentraciones de las toxinas purificadas fueron determinadas antes y después de su liofilización por la

técnica de microbradford y simultáneamente se hicieron geles SDS-PAGE los resultados de las concentraciones se muestran en el cuadro 5.

Cuadro 5. Concentración de los lotes de la toxina EspC en mg/ml

Lote	Concentración mg/ml	
	Concentrado	Liofilizado
A	1.084	1.137
B	0.619	0.610
C	0.524	0.518
D	0.615	0.558

6.2.2 Análisis de Electroforesis SDS-PAGE para la toxina EspC

Para la proteína del lote A liofilizada carril 2, 3 y 4 se observa una banda más ancha, que la concentrada del carril 5, 6 y 7 (figura 14), sin embargo las bandas degradadas son más en las muestras liofilizadas, esto puede deberse a que en el proceso de la congelación y manipulación para su análisis las proteínas se desnaturalizan por la acción del calor, sin embargo estos resultados no son definitivos para evaluar la infección de la toxina lo cual se observa mediante los ensayos con las células epiteliales. Para el lote A si se observa la expresión del plásmido.

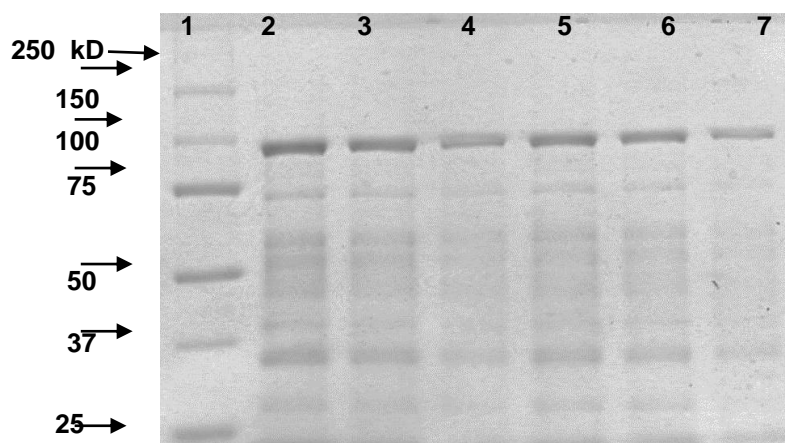


Figura 14. Lote A de la toxina **EspC** 110 KDa crecida en medio LB más ampicilina [100µg/ml] y arabinosa 0.2 %, por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10% 1.5 mm 1. Marcador de pm, 2.liofilizado [3µg], 3.Liofilizado [2µg],4. Liofilizado [1µg], 5. Concentrado [3 µg], 6. Concentrado [2 µg], 7. Concentrado [1 µg].

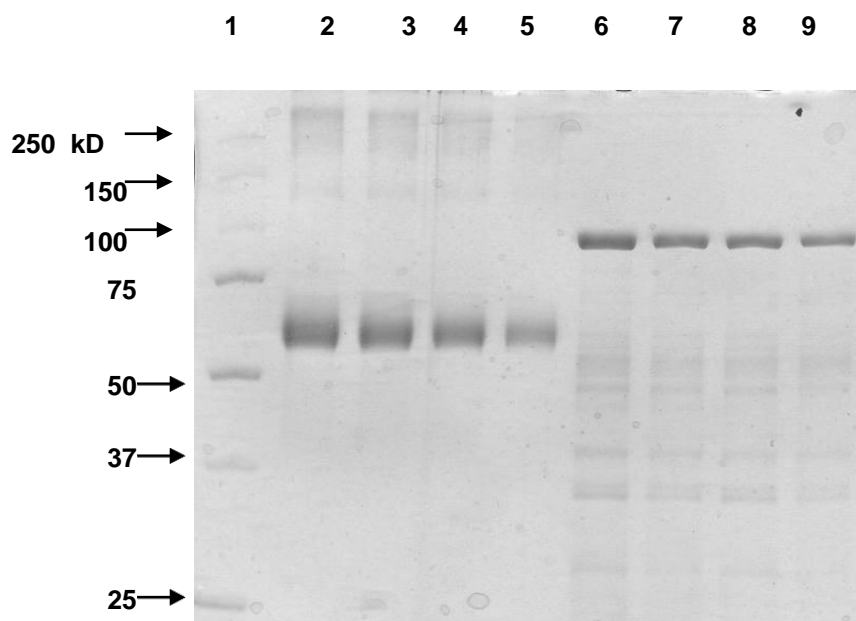


Figura 15. Lote B de la toxina **EspC 110 KDa** crecida en medio LB más ampicilina [100µg/ml] y arabinosa 0.2 % por 18 h a 150 rpm y 37° C SDS-PAGE 10% 1.5 mm y BSA 60 KDa utilizada como marcador de referencia 1.Marcador de pm 2. BSA [5µg], 3. BSA [4µg], 4.BSA [3µg], 5. BSA [2µg], 6. EspC [5µg], 7. EspC [4µg] 8. EspC [3µg], 9. EspC [2µg].

En la figura 15, se puede observar que la proteína es mejor secretada al medio en un mayor tiempo de incubación, obsérvese que en esta figura la cepa con el plásmido de EspC fue crecida durante 18 h. Las bandas son más definidas y menos degradadas en un mayor tiempo de producción. Aunque se observa una disminución en la concentración comparada con el lote A (cuadro 5). Esta determinación se hizo con el fin de comprobar que la cepa estuviera secretando la proteína eficientemente además de tener un control para descartar cualquier alteración en el crecimiento de la cepa o la carga del gel.

Una de las causas de la desnaturalización de las proteínas es el calor en este caso la degradación de la toxina observada en la degradación de las bandas puede ser resultado del descuido de la temperatura durante la manipulación para su análisis ya que las proteínas fueron descongeladas en dos ocasiones seguidas, una para su

homogenización a la hora de hacer las alícuotas y la siguiente para la determinación de la concentración.

Como se observa el lote B comparado con el A (figura 14 y 15), el tiempo de incubación también fue un factor importante para que la proteína se secretara en mayor cantidad. Con el fin de comprobar si está variable también presenta cambios en cuanto al efecto de la infección característico de esta toxina. Se hizo una comparación variando los tiempos de incubación como se muestra en la figura 15.

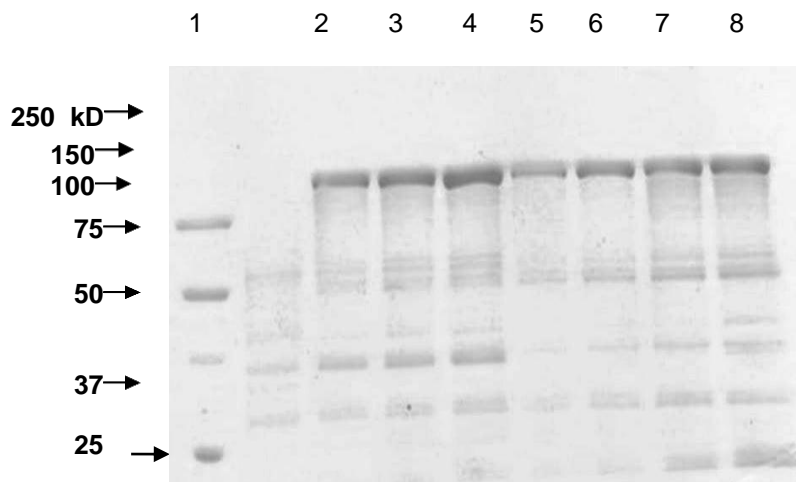


Figura 16. Lote C de la toxina **EspC 110 KDa** crecida en medio LB más ampicilina [100µg/ml] y arabinosa 0.2 %. Crecida por 12 h y 20 h a 150 rpm y 37° C SDS-PAGE 10% 1.5 mm 1.Marcor de pm, 2. 20h [2 µg] 3.- 20h [3µg] 4.- 20h [4 µg] 5.- 12 h [1µg] 6.- 12 h [2µg] 7.- 12 h [3µg] 8.- 12 h [4µg].

Las concentraciones para las proteínas crecidas a 12 h y 20 h fueron 0.424 mg/ml y 0.567 mg/ml respectivamente, se observa una variable notoria en cuanto a su concentración y la identificación en las bandas de los geles. En los carriles 2 y 6 no se observan diferencias notorias, el ancho de las bandas es el mismo si se compara que en ambas se cargaron 2 µg, sin embargo este resultado solo se obtuvo en bajas concentraciones si se observan los carriles 3 y 4 comparados con los carriles 7 y 8 (figura 15) las diferencias en cuanto al ancho y la degradación de las bandas es más notoria, para las cepas que se crecieron por 12 horas se observan más bandas debajo de las que son características de la toxina de 110 KDa.

Con este resultado se comprobó que el tiempo de incubación si repercutió en la secreción de la toxina al medio como se observa en la figura 16.

Por otro lado, el descongelamiento de los viales para la reactivación de la cepa puede ser un factor que afecta la producción de la toxina al cultivarla en medio líquido por lo que se hizo un control más para descartar la posibilidad de que la cepa que contiene el plásmido se encontraba dañado y se sembró una colonia fresca de HB101 que contiene EspC del cepario y se incubó durante 20 horas.

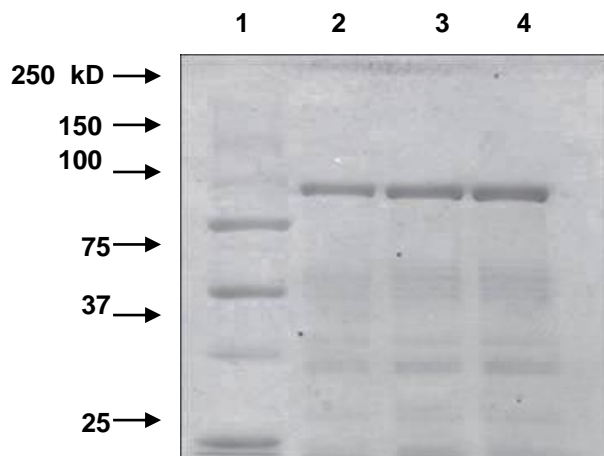


Figura 17. Cepa **HB 101** que contiene el plásmido de **EspC 110 KDa** crecida en medio Luria Bertani mas Ampicilina [100µg/ml] y arabinosa al 0.2 % crecida por 20 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10% 1.5 mm 1.Marcador de pm 2.- [1µg], 3.- [3 µg], 4.- [4µg]

En la figura 17 las bandas de la proteína de 110 KDa se observan perfectamente bien expresadas, la concentración fue de 0.45 mg/ml si se compara con los lotes A, B y C (figuras14, 15 y 16) se observa una concentración menor que a las anteriores, sin embargo también es notorio que está menos degradada y el grosor de la banda obtenida es únicamente de la toxina en cuestión. Con este resultado se produjo un cuarto lote (lote D) bajo las mismas condiciones utilizando esta cepa que es la misma que contiene el plásmido de EspC pero que a diferencia de la que se utilizó para los lotes anteriores únicamente se ha descongelado una vez.

En el lote D de EspC se obtuvo una concentración de 0.615 mg/ml mayor que la obtenida en la cepa crecida anteriormente (figura 18) las bandas son más anchas

pero se observa una mayor degradación, con esto se comprueba que el descongelamiento de la cepa que implica una variable de su temperatura es un factor sensible que causa efectos en la expresión de la proteína.

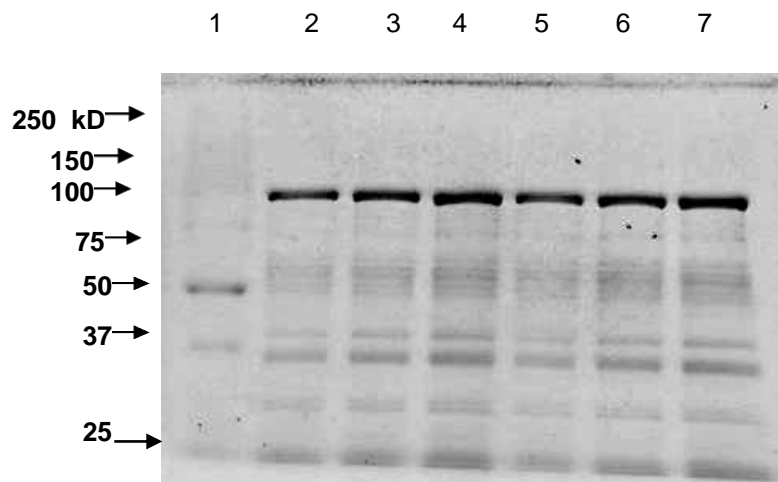


Figura 18. Lote D de la toxina **EspC 110 KDa** crecida en medio LB más Ampicilina [100 µg/ml] y arabinosa al 0.2 %. Crecida por 20 h, a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10% 1.5 mm. 1. MG, 2.concentrado [2µg], 3. Concentrado [3µg], 4.concentrado [4µg], 5. liofilizado [2 µg], 6. Liofilizado [3 µg], 7. Liofilizado [4 µg].

Sin embargo los resultados de los geles SDS-PAGE no son definitivos para determinar la pureza y la concentración a la que estas toxinas causan un efecto citopatico en las células epiteliales, con este fin los ensayos de actividad biológica sirven para determinar la concentración de la proteína y su pureza para el daño de infección.

6.2.3 Ensayos de actividad biológica de EspC

Las células HEp-2 (Heteroploide continua, proveniente de un carcinoma de laringe humano) se sembraron en pocillos LabTek (VWR, Bridgeport, NJ) a una densidad de 3×10^4 células por pocillo para evaluar el efecto de las toxinas por cada lote. Se comprueba que las toxinas eficientemente causan el daño esperado, un efecto citopático en las células epiteliales, incluyendo daños al citoesqueleto, hasta provocar muerte celular.

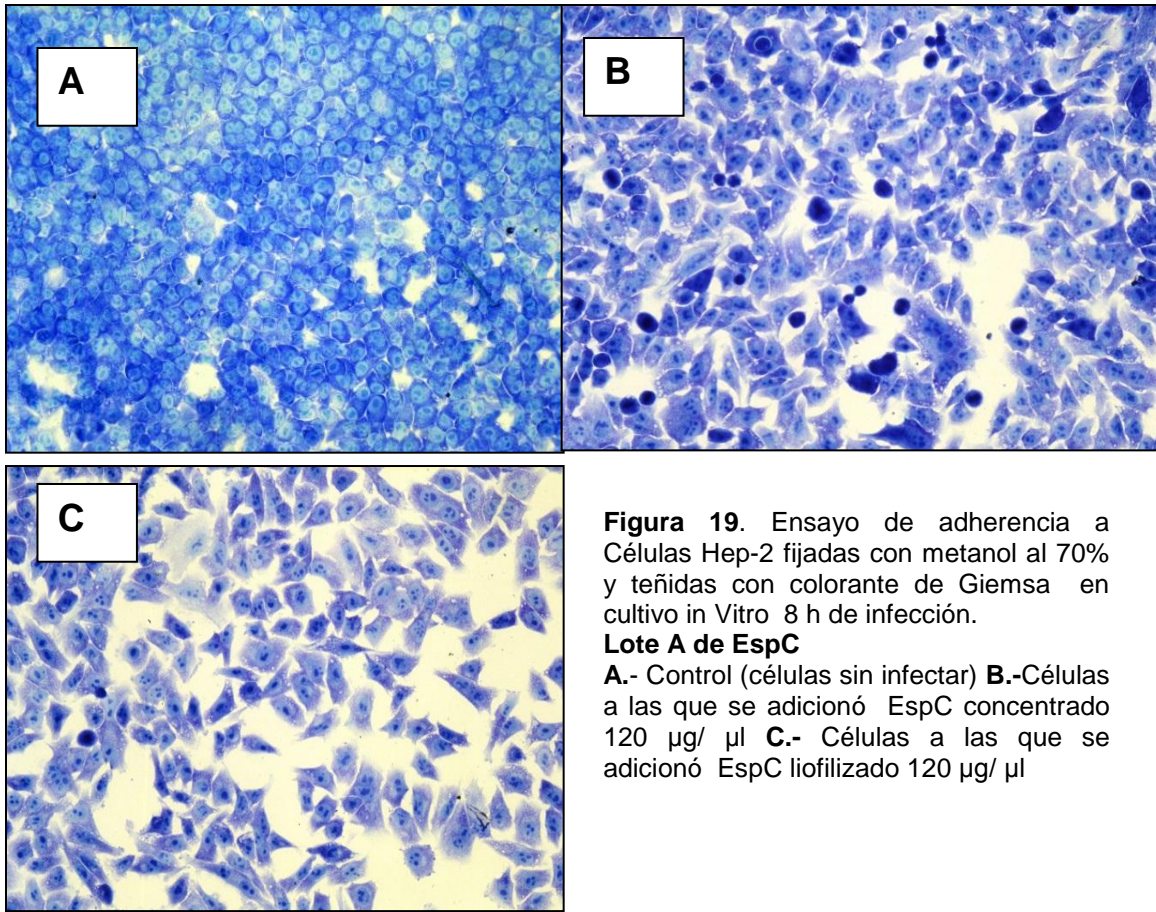


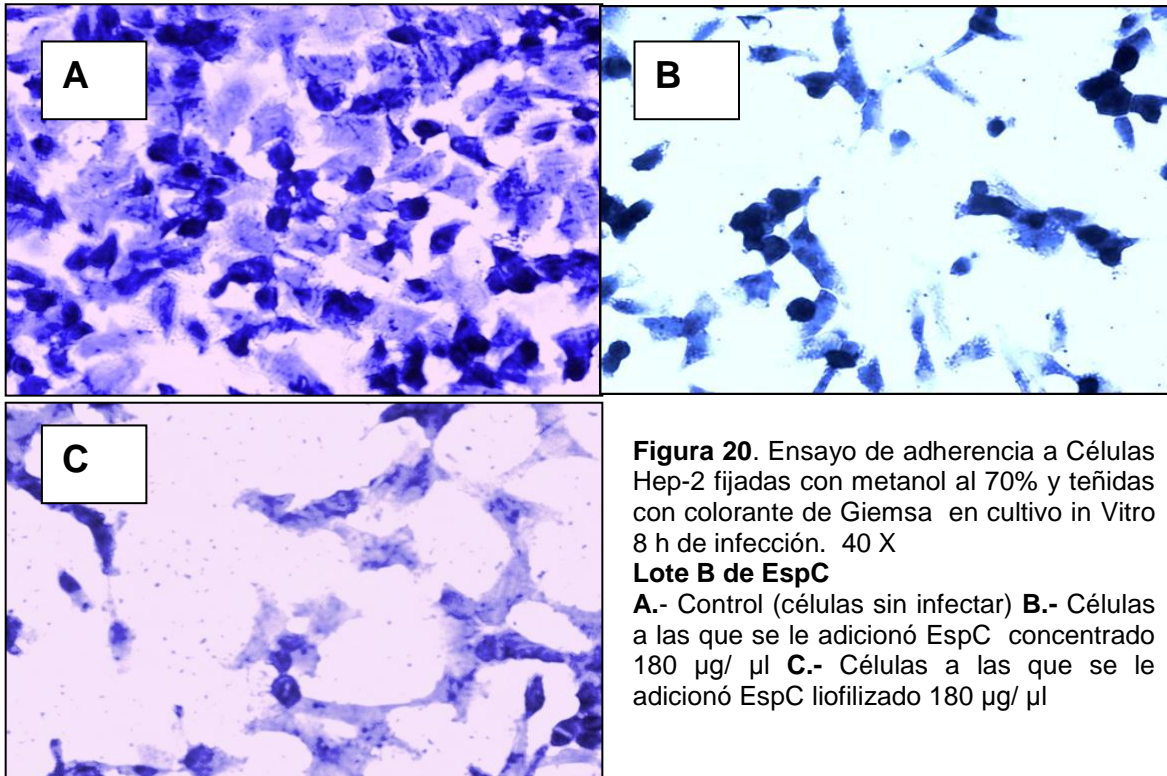
Figura 19. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 8 h de infección.

Lote A de EspC

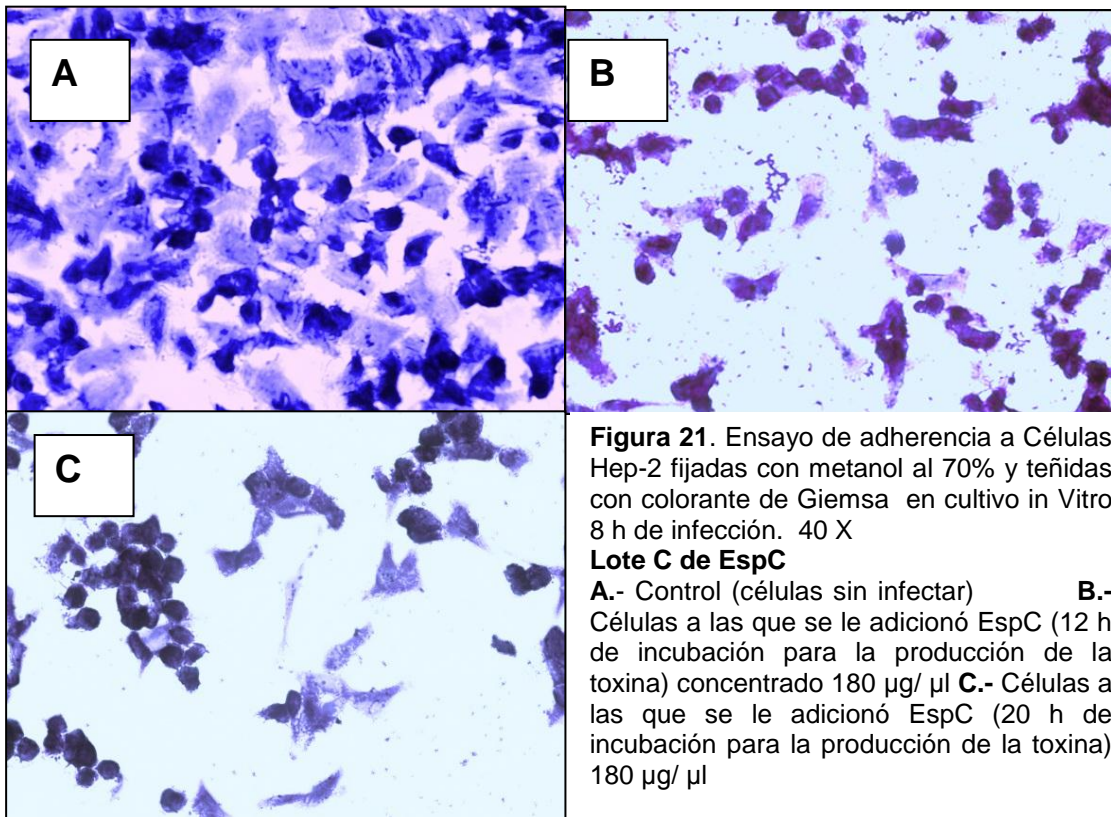
A.- Control (células sin infectar) **B.-**Células a las que se adicionó EspC concentrado 120 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ **C.-** Células a las que se adicionó EspC liofilizado 120 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

El efecto citopático causado por EspC del lote A a las 8 horas de infección a células epiteliales Hep-2, fue poco como se muestra en la figura 19 B. Para la proteína liofilizada del lote A de EspC se observa un mayor desprendimiento de las células (figura 15 C) comparado con la del concentrado. El daño se caracterizó por la pérdida de la estructura original del citoesqueleto, alargamiento y desprendimiento celular. Si se compara el control (figura 19 A) el efecto que tiene a una concentración de 120 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ es insuficiente para el daño irreversible de las células epiteliales tanto para la proteína concentrada como la liofilizada. Las bacterias de este tipo diarreogénico se agrupan y forman empalizadas que se adhieren a las células y al cristal en los ensayos de adherencia. En experimentos realizados por Navarro y colaboradores (2001) se demostró que EspC induce daño al citoesqueleto de células HEP-2 El efecto citotóxico de EspC es muy parecido al que induce la toxina Pet

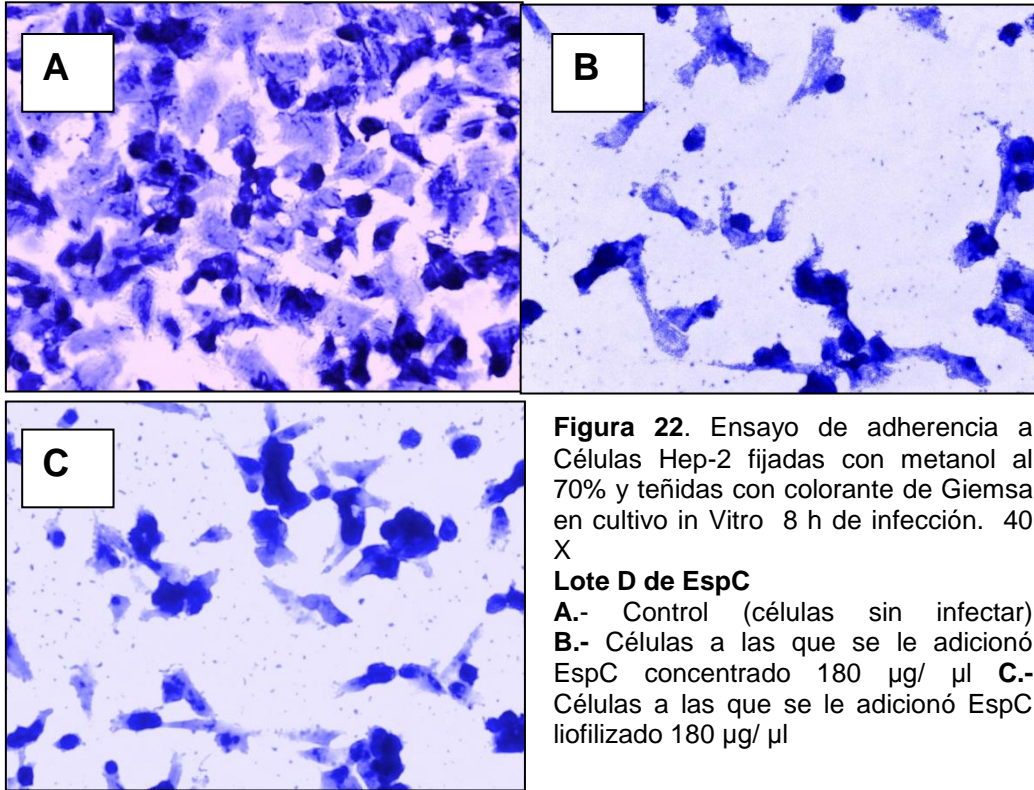
(toxina codificada en un plásmido) de EAEC y otras toxinas autotransportadoras de enterobacterias.



El efecto citopático causado por EspC del lote B fue mayor que el daño causado por el lote A (figura 19 y 20) se observa mayor alargamiento y desprendimiento celular. Nótese que el tiempo de incubación de este lote para la producción de la toxina (lote B) fue de 18 horas (Figura 17) y que la concentración para la infección también aumentó de 120 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentración del ensayo del lote A de EspC) a 180 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ (concentración del ensayo del lote B de EspC) Esta variación implicó mayor daño celular.



En el lote C de EspC (figura 21) el daño celular causado por la toxina se caracterizó por alargamiento y desprendimiento celular en la infección con la proteína crecida durante 12 horas (figura 21 B) en comparación con la proteína crecida durante 20 horas (figura 21 C) se observó mayor redondeamiento y desprendimiento celular. La variable del tiempo de producción de la toxina si presenta cambios en la caracterización del daño celular, este es mayor cuanto mayor sea el tiempo que tarda en incubación la cepa para la producción de la toxina al medio.

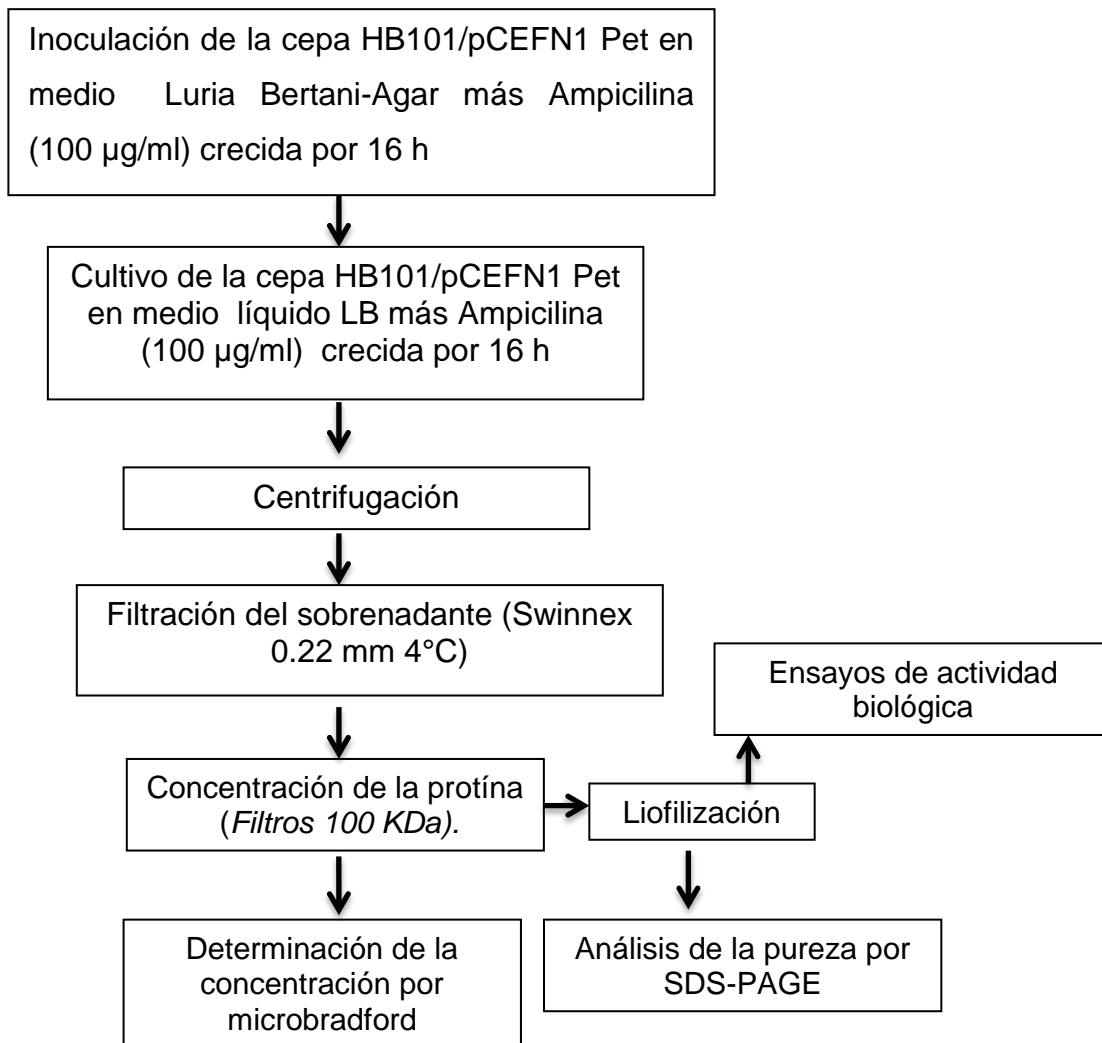


En el lote D de EspC (figura 22) el daño celular causado por la toxina se caracterizó por alargamiento y desprendimiento celular en tanto en la toxina concentrada como en la liofilizada simultáneamente (figura 22 B y C) si se compara con el control (figura 22 A) se observa una disminución muy notoria en las células, causada por la destrucción del citoesqueleto hasta perder su estructura original lo que da paso a la muerte y al daño irreversible.

En los 4 lotes de EspC se observa el daño característico causado por EPEC la cual destruye las microvellosidades del enterocito, que da lugar a la mala absorción de nutrientes (función de las microvellosidades) la formación de los pedestales de actina y por último el reacomodo del citoqueleto hasta la muerte celular, en los ensayos de la infección con EspC a células Hep -2 este daño se observa en el redondeamiento o alargamiento y por último el desprendimiento.

6.3 Obtención de la Proteína Pet de *Escherichia coli* Enteroagregativa (EAEC)

El siguiente esquema describe el proceso para la obtención de la toxina Pet secretada por *Escherichia coli* enteroagregativa, tomada de la clona de *E. coli* denominada HB101/pCEF1 conservada en glicerol y almacenado a -20°C , conservada en el laboratorio 17 del departamento de Biología Celular, del CIVESTAV del Instituto Politécnico Nacional.



6.3.1 Concentración de las toxinas liofilizadas y concentradas de Pet

De la Cepa HB101 (pCEF1) se obtuvieron 4 lotes de la toxina Pet (104 KDa) crecidos bajo las mismas condiciones. Se determinaron las concentraciones para cada una por método de micro Bradford obteniendo las concentraciones del cuadro 6.

Cuadro 6. Concentración de los lotes de la toxina Pet en mg/ml

Lote	Concentración mg/ml	
	Concentrado	Liofilizado
1	0.582	0.466
2	0.710	0.669
3	0.712	0.660
4	0.618	0.525

6.3.2 Análisis de Electroforesis SDS-PAGE para la toxina EspC

En el lote 1 de Pet (figura23) se observó una variación en las bandas de la proteína concentrada con respecto a la liofilizada, en los carriles 2, 3 y 4 correspondientes a la toxina liofilizada las bandas se observan más angostas con respecto a los carriles 5, 6 y 7 que corresponden a la toxina concentrada, sin embargo la degradación observada en ambas es poca lo que indica que el grosor de las bandas son de la proteína Pet de 104 KDa.

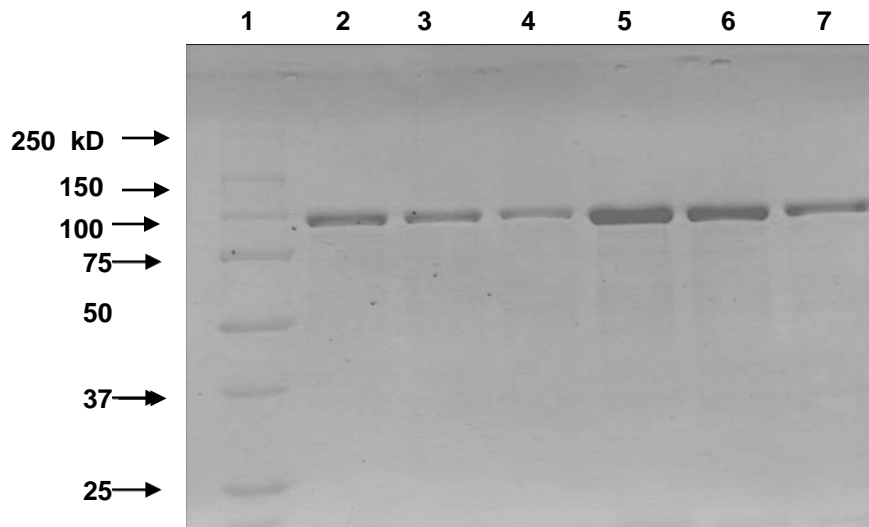


Figura 23. Lote 1 de la proteína **Pet** crecida en medio LB más Ampicilina [100 µg/ml] crecida por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10% 1.5 mm. 1. Marcador de pm 2.liofilizado [4µg], 3. Liofilizado [2µg], 4. Liofilizado [1µg], 5. Concentrado [4 µg], 6. Concentrado [2 µg], 7. Concentrado [1 µg],

En el Lote 2 de Pet (figura 24) hay una variación muy notable en cuanto la concentración, es más alta con respecto al Lote 1. Las bandas tanto del liofilizado como del concentrado se observan más definidas y anchas, La expresión del plásmido de Pet en el lote 2 fue muy evidente.

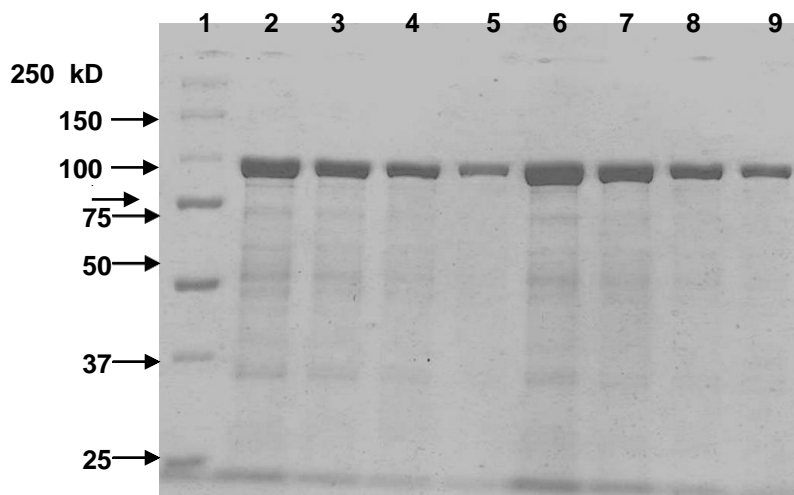


Figura 24 . Lote 2 de la proteína **Pet** crecida en medio LB más Ampicilina [100 µg/ml] crecida por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10% 1.5 mm
1. MG, 2.liofilizado [5µg], 3. Liofilizado [3µg], 4. Liofilizado [2µg], 5. Liofilizado [1µg], 6. concentrado [5 µg], 7. Concentrado [3 µg], 8. Concentrado [2 µg], 9. Concentrado [1 µg],

En la figura 25 del Lote 3 de Pet se observa la proteína en muy buenas condiciones debido al grosor de las bandas además la concentración es ligeramente más alta que el lote anterior, el cuidado en el manejo y el monitoreo de la temperatura para la eficiente producción de lotes es un factor determinante para lograr los resultados esperados en la pureza de la toxina. Las condiciones en las que fueron producidos todos los lotes son similares por lo cual se puede hacer una comparación adecuada de sus variaciones.

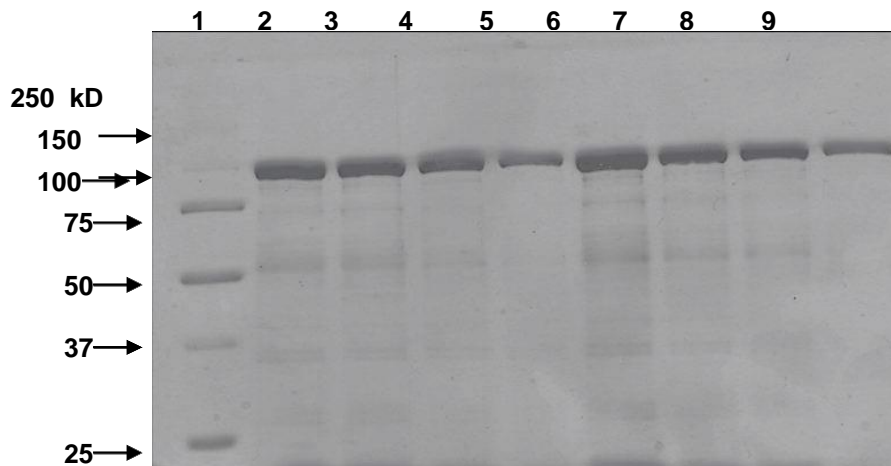


Figura 25. Lote 3 de la proteína **Pet** crecida en medio LB más Ampicilina [100 µg/ml] crecida por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10% 1.5 mm

1. MG, 2. liofilizado [5µg], 3. Liofilizado [3µg], 4. Liofilizado [2µg], 5. Liofilizado [1 µg], 6. Concentrado [1 µg], 7. Concentrado [2 µg], 8. Concentrado [3µg], 9 Concentrado [5µg],

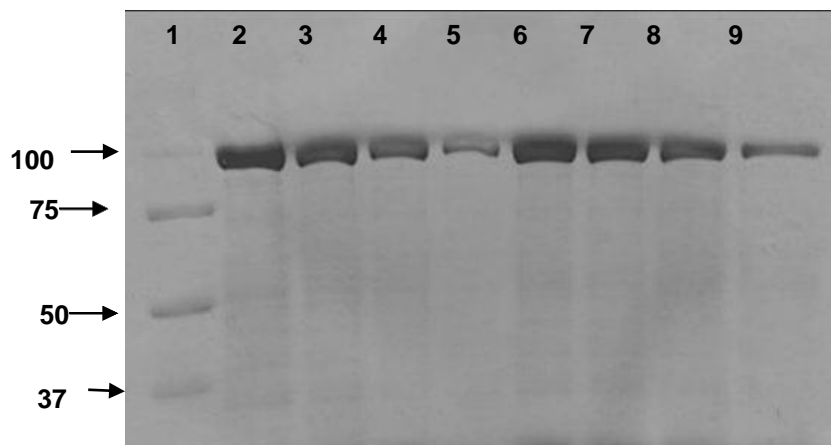


Figura 26. Lote 4 de la proteína **Pet** crecida en medio LB más Ampicilina [100 µg/ml] crecida por 16 h a 150 rpm y 37° C. SDS-PAGE 10% 1.5 mm

1. MG, 2. liofilizado [5µg], 3. Liofilizado [3µg], 4. Liofilizado [2µg], 5. Liofilizado [1 µg], 6. Concentrado [1 µg], 7. Concentrado [2 µg], 8. Concentrado [3µg], 9 Concentrado [5µg],

La concentración en el lote 4 de Pet (figura 26) disminuyó con respecto a las anteriores sin embargo como se observa en la cuadro 6 es ligeramente menor que el lote 2 y 3 pero las bandas no están degradadas. Estas bandas corrieron de manera irregular esto puede deberse a que algunos de los componentes implicados en la polimerización del gel no estén en las condiciones óptimas. Una polimerización muy rápida puede deformar las bandas, porque ocurre una contracción no uniforme del gel, en este caso debe reducirse el TEMED y el persulfato de amonio o adicionar ferricianuro de potasio, con el objetivo de hacer más lenta esta, sin embargo como el gel es tan fino es más propenso a perturbaciones y problemas en la polimerización. Se ha planteado que la resolución de las moléculas generalmente aumenta con la disminución del grosor del gel (García, 2000).

Para comprobar que estos lotes tuvieran el efecto citopático esperado se realizó un ensayo con células epiteliales Hep-2 a 4 horas de infección con una concentración 60 $\mu\text{g/ml}$.

6.3.3 Ensayos de actividad biológica de Pet

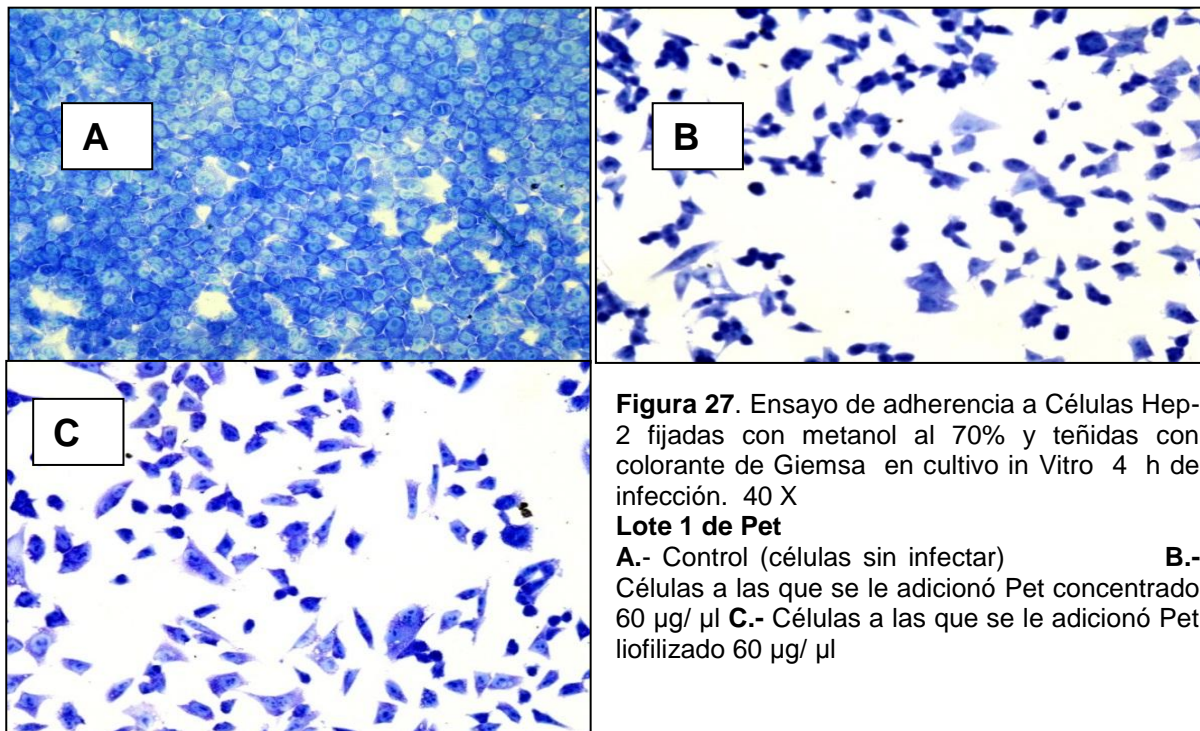


Figura 27. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 4 h de infección. 40 X

Lote 1 de Pet

A.- Control (células sin infectar)

B.-

Células a las que se le adicionó Pet concentrado 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

C.- Células a las que se le adicionó Pet liofilizado 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

El efecto citopático que causó el lote 1 de Pet (figura 27) en las células Hep-2 es mucho mayor comparado con el de EspC, el tiempo de la infección se reduce a la mitad, el redondeamiento de las células es característico en la infección por esta toxina y finalmente su desprendimiento. Si se observa el control (figura 27 A) comparado con las células infectadas (figura 27 B y C) puede comprobarse que el daño causado con 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ de concentración es irreversible en las células Hep-2 infectadas con esta toxina.

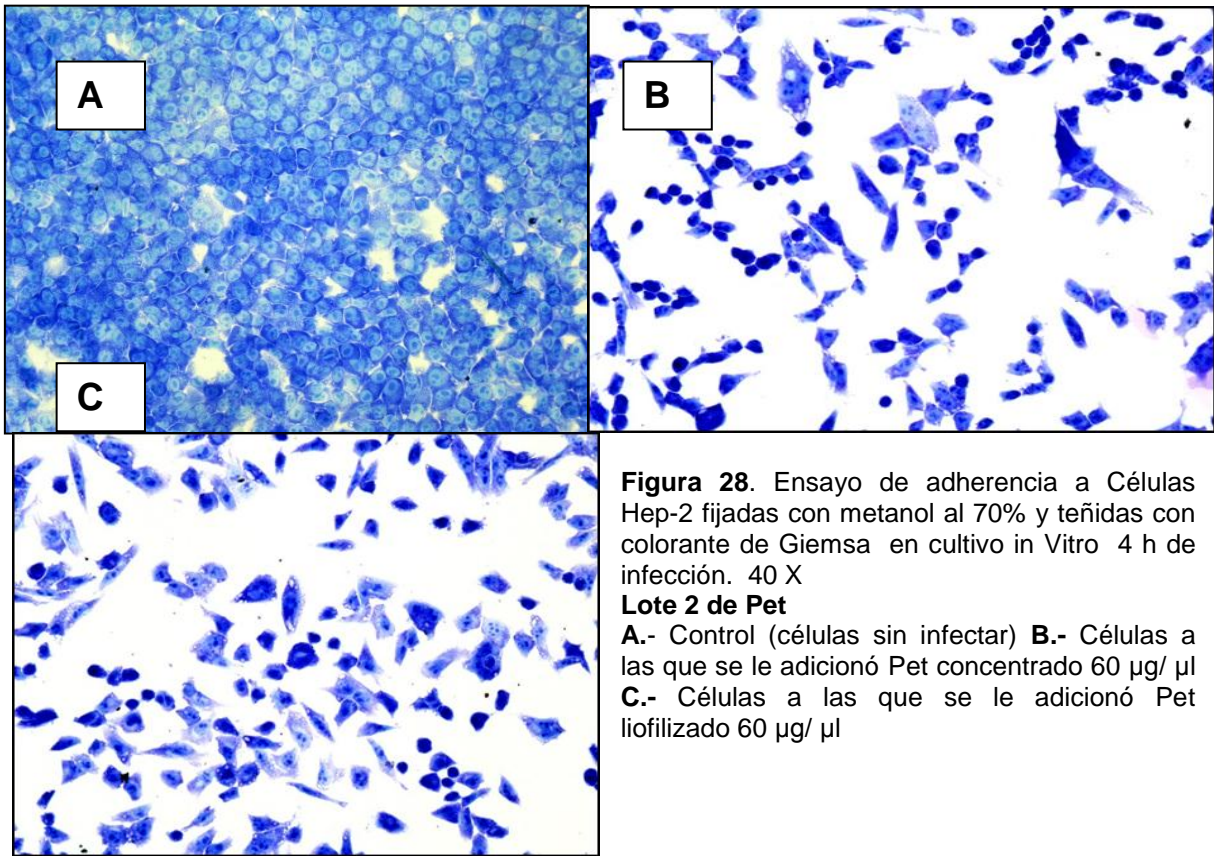
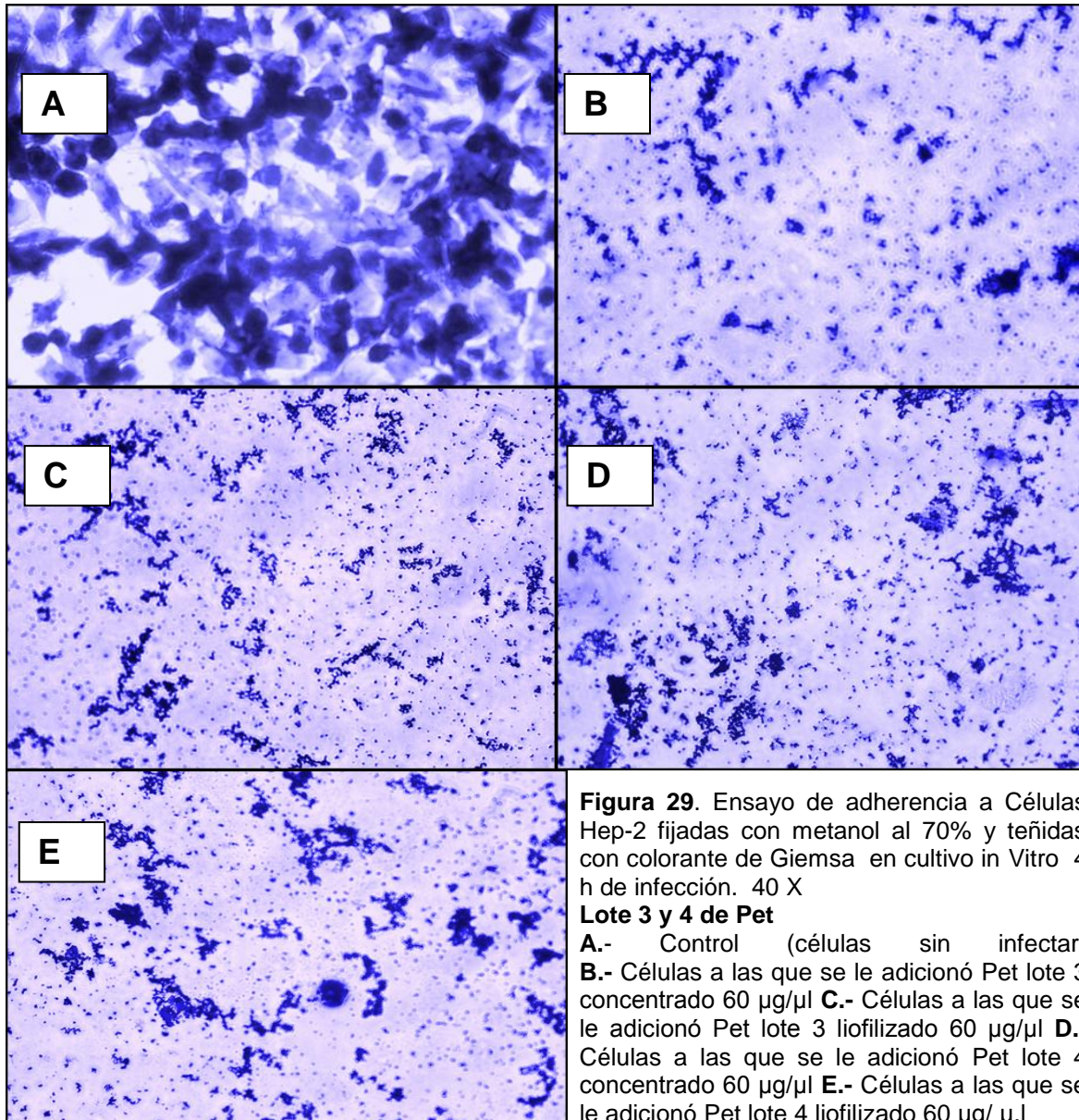


Figura 28. Ensayo de adherencia a Células Hep-2 fijadas con metanol al 70% y teñidas con colorante de Giemsa en cultivo in Vitro 4 h de infección. 40 X

Lote 2 de Pet

A.- Control (células sin infectar) **B.-** Células a las que se le adicionó Pet concentrado 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$
C.- Células a las que se le adicionó Pet liofilizado 60 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$

El daño citopático del lote 2 de Pet (figura 28) es similar comparado con el del lote 1 (figura 26) como se observa en la figura 28 B y C pocas células epiteliales quedaron adheridas al vidrio luego de la infección con Pet, además el efecto fue similar en ambas proteínas tanto del liofilizado como del concentrado.



El lote 3 y 4 de Pet se hicieron en el mismo ensayo de infección ambos demostraron tener similar efecto de citotoxicidad, tanto en los concentrados como en los liofilizados de ambos lotes, su efecto fue caracterizado por el agrupamiento y desprendimiento de las células epiteliales.

La inducción de daño a la célula epitelial causada en células HEp-2 por Pet produce reorganización del citoesqueleto, perdidas de las fibras de actina y por último el desprendimiento y la muerte celular.

7. DISCUSIÓN

En estudios anteriores se ha demostrado que la toxina EspC se internaliza eficientemente en células epiteliales después de las 8 horas de infección a una concentración de 180 $\mu\text{g/ml}$, demostrando alargamiento y desprendimiento celular (Vidal, 2006). En este trabajo los lotes B, C y D (figuras 19, 20 y 21) de la toxina EspC fueron similares con los estudios anteriores, estos fueron probados a los mismos tiempos y bajo las mismas concentraciones que las pruebas realizadas por Vidal (2006), manifestando el mismo efecto citopático en las células Hep- 2, característico por el alargamiento y desprendimiento celular. Sin embargo el lote A de EspC (figura 14) demostró tener poco daño celular, debido a que la concentración a la que se probó el daño celular fue de 120 $\mu\text{g/ml}$ esta variación demostró que a menor concentración la toxina no es capaz de causar daño celular irreversible, con estos resultados se comprueban que los lotes de las toxinas de EspC y Pet fueron producidos de manera eficiente a concentraciones de pureza y calidad confiable para los estudios de los mecanismos de reacción en células epiteliales.

En experimentos realizados por Navarro y colaboradores (2001) se demostró que EspC induce daño al citoesqueleto de células HEp-2 y que su efecto es muy parecido al que induce la toxina Pet (toxina codificada en un plásmido) de EAEC. Pet tiene una actividad enterotóxica y potencialmente conduce a cambios en el citoesqueleto, redondeamiento de la célula epitelial debido al corte de la proteína espectrina del citoesqueleto (Navarro et al., 1998).

En esta investigación la proteína Pet muestra un daño celular similar a los señalados por Navarro (1998) característico por el redondeamiento y pérdida total de la estructura de su citoesqueleto hasta la liberación de la célula a las 4 horas de infección y a una concentración de 60 $\mu\text{g/ml}$. Los cuatro lotes de Pet mostraron un daño celular mayor en menor tiempo comparados con los de la toxina EspC, este efecto interviene en la infección que tiene en su hospedero si se toma en cuenta

que una de las características de EAEC es que tiene alta capacidad para sobrevivir largo tiempo en el intestino humano.

Para la toxina Pic fue necesario hacer la extracción del plásmido, para introducirlo en bacterias transformadas HB101 de *E. coli*. En trabajos realizados por Gutiérrez (2008) las cepas mutantes con el plásmido de Pic fueron incapaces de secretar la toxina, lo que se atribuyó a la manipulación genética en la construcción de los mutantes y que además su sitio catalítico estaba inactivo. En este trabajo las bacterias transformadas con el plásmido de Pic tampoco fueron capaces de expresarlo en los análisis de SDS-PAGE. Una de las contratiempos de la manipulación de material genético extracromosómico como lo son los plásmidos es que son altamente sensibles a la contaminación es posible que la muestra final contenga trazas de ADNAsas bacterianas que se acarrean durante el proceso de extracción y que provienen de las manos, saliva, lágrimas etc., una vez que son purificados e introducidos en las bacterias, este resultado también puede deberse a que el estado de competencia de la bacterias HB 101 de *E. coli* pudo haber tenido una respuesta limitada debido a las condiciones ambientales, tales como la falta de nutrientes y una densidad celular elevada.

Los estudios de los mecanismos de virulencia que provocan estas cepas que tantos estragos hacen a la población infantil son decisivos para contrarrestar sus daños; además de prevenir su infección y evitar el desarrollo de la cepa dentro del huésped. Estos estudios han sido de antaño uno de los más investigados debido a que la diarrea infantil es causa principal de muerte en los niños en países en vías de desarrollo como el nuestro.

8. CONCLUSIONES

En conclusión los 4 lotes que se obtuvieron de ambas toxinas de EspC y Pet respectivamente, expresaron los resultados esperados tanto de su concentración como del análisis de la pureza al realizar electroforesis SDS-PAGE. Al término del lote completo para cada una, se realizaron nuevamente los análisis mencionados anteriormente como control de calidad, para verificar que las toxinas que son altamente sensibles a los cambios de temperaturas no se hubieran degradado, los resultados fueron similares a los del inicio con una variación mínima como consecuencia de la manipulación para su análisis. Finalmente los ensayos de actividad biológica que se realizaron para comprobar su acción citopática en células epiteliales Hep-2 fue el característico para cada lote.

La clona HB101 más EspC Wt (FN12) secretada por el sistema de secreción de tipo V durante la infección por EPEC fue capaz de internalizar EspC de manera eficiente en las células epiteliales (después de 8 horas de infección) a una concentración de 180 µg/µl. Y la clona HB101/pCEF1 más Pet secretada por EAEC demostró daño celular irreversible a las 4 horas de infección con 60 µg/µl para la infección. Además en este trabajo se concluyó que el tiempo de incubación de la cepa productora de la toxina EspC debe ser de 18 -20 horas, este periodo se encuentra dentro de la fase logarítmica de crecimiento lo que influye en la cantidad de secreción de la toxina al medio además también influye en el daño citopático que esta causa a las células epiteliales, lo que se comprobó mediante los ensayos de actividad biológica por la infección de la toxina a células Hep-2.

Se ha demostrado que tanto las toxinas Pet de EAEC y EspC de EPEC causan daños directamente al citoesqueleto provocando el redondeamiento o alargamiento celular, despredimiento y por último la muerte celular.

9. BIBLIOGRAFÍA

Bieber, D., Ramer, S.W., Wu, C.Y. (1998). Type IV pili, transient bacterial aggregates, and virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal Science*. pp. 2114-2118. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9641917>

Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*. Vol. (72), pp. 248-254.

Celli, J., Deng, W., Finlay, B.B. (2000). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. *Cell Microbiology*. Vol. 2(1), pp. 1-9. Doi. 10.1046/j.1462-5822.2000.00033.x

Cortés, O. (2002). Brote causado por *Escherichia coli* en Chalco, México. *Salud Pública de México*. Vol. 44(4), pp. 297-302. Recuperado de <http://bvs.insp.mx/rsp/articulos/articulo.php?id=000246#autores>

Cravioto, A., Gross, R.J., Scotland, S.M., Rowe (1979). An adhesive factor found in strains of *Escherichia coli* belonging to the traditional infantile enteropathogenic serotypes. *Journal Current. Microbiology* .Vol (3),pp. 95-99. Recuperado de <http://link.springer.com/article/10.1007%2F02602439#page-1>

Donnenberg, M.S., Giron, J.A., Nataro, J.P., Kaper, J.B. (1992). A plasmid-encoded type IV fimbrial gene of enteropathogenic *Escherichia coli* associated with localized adherence. *Journal Molecular Microbiology*. Vol6(22), pp. 3427-3437. doi. 10.1111/j.1365-2958.1992.tb02210.x

Donnenberg, M.S., Kaper, J.B., Finlay, B.B. (1997). Interactions between enteropathogenic *Escherichia coli* and host epithelial cells. *Journal Trends Microbiology*. Vol (5), pp. 109-114. doi:10.1016/S0966-842X(97)01000-7.

Eslava, C., Navarro, G., Czeczulin, J., Henderson, I., Cravioto, A., Nataro, J. (1998). Pet an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal Infection and Immunity*. Vol 66 (7), pp. 3155-3163. Recuperado de <http://iai.asm.org/content/66/7/3155.full>

Flanglian, H. (2011). Laemmli-SDS-PAGE. *Biology protocol*. Vol. (4), pp 6921.

Frankel, G., Phillips, A.D., Rosenshine, I., Dougan, G., Kaper, J.B., Knutton, S. (1998). Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Journal Molecular Microbiol*. Vol. (30), pp 911-921.

García, H. (2000). Adaptación de geles de poliacrilamida a sistema PhastSystem. Tesis de Maestría. UNAM, Facultad de Biología, México. D.F.

Giammanco, A., Maggio, M., Giammanco, G., Morelli, R., Minelli, F., Scheutz. F., Caprioli, A. (1996). Characteristics of *Escherichia coli* strains belonging to enteropathogenic *E. coli* serogroups isolated in Italy from children with diarrhea. *Journal Clinical Microbiology*. Vol. (34), pp. 689-94. Recuperado de <http://jcm.asm.org/content/34/3/689.full.pdf+html>

Giron, J.H and Schoolnik, G.K. (1991) An inducible bundle-forming pilus of enteropathogenic *Escherichia coli*. pp. 710-713.

Girón, J.A., Sonnenberg, M.S., Martin, W.C., Jarvis, K.G., Kaper, J.B. (1993) Distribution of the bundle-forming pilus structural gene (*bfpA*) among enteropathogenic *Escherichia coli*. pp. 1037-1041.

Goosney, D.L., Gruenheid, S., Finlay, B.B. (2000). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) interactions with the host. *Annual Review of Cell and Developmental Biology*. Vol.(16),pp 173-189.

Groisman, E. A. (1996). Pathogenicity H. Ochman islas: evolución bacteriana en saltos cualitativos. *Celular*.Vol(87), pp. 791–794.

Gutiérrez, J., Arciniega, I., Navarro, G., (2008). The serine protease motif of Pic mediates a dose-dependent mucolytic activity after binding to sugar constituents of the mucin substrate.*Microbioly* ;45(2),pp 115-23.

Henderson, I., Navarro, F., Nataro, J. (1998).The great escape: structure and function of the autotransporter proteins. *Trends Microbiology*.vol(6),pp. 370-380. doi:10.1016/S0966-842X(98)01318-3.

Henderson, I., Czeczulin, J., Eslava, C., Noriega, F., Nataro, J. (1999). Characterization of pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infection Immunity*. Vol 67 (11), pp. 5587-5596.

Ibarra, J.A., Villalba, M.I., Puente, J.L. (2003). Identification of the DNA binding sites of PerA, the transcriptional activator of the bfp and per operons in enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriology*.Vol.185(9), pp. 2835-2847.

Jarvis, K.G., Giron, J.A., Jerse, A.E., McDaniel, T.K., Donnerberg, M.S., Kaper, J.B. (1995) Enteropathogenic *Escherichia coli* contains a putative type III secretion system necessary for the export of proteins involved in attaching and effacing lesion formation. pp.7996-8000

Johnson, T. and Nolan, K. (2009). Pathogenomics of the virulence plasmids of *Escherichia coli*. *Microbiology and Molecular , Biology Review*. vol. 73 (4), pp. 750-774.

Kaper, J., Nataro, J., Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Microbiology. Vol (2), 123-40. doi:10.1038/nrmicro818

Law, D. (1994). Adhesion and its role in the virulence of enteropathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology reviews. Vol. 7(2),152-73. Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC358315/?page=1>.

Levine, M.M. and Edelman, R. (1984). Enteropathogenic *Escherichia coli* of classic serotypes associated with infant diarrhea: Epidemiology and pathogenesis. Epidemiol. Vol. (6) pp. 31-51.

Mellies, J.L., Navarro, G.F., Okeke, I., Frederickson, J., Nataro, J.P., Kaper, J.B. (2001). EspC pathogenicity island of enteropathogenic *Escherichia coli* encodes an enterotoxin. Journal Infection Immunity. Vol, 69(1), pp. 315-24. doi: 10.1128/IAI.69.1.315-324.2001

Nataro, J. and Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Review. 11(1), pp. 142-201. Recuperado de <http://cmr.asm.org/content/11/1/142.long>

Navarro, G. F., Eslava, C., Villaseca, J. M., Lopez, R., Czeczulin, J. R., Srinivas, S., Nataro, J. P., Cravioto, A. (1998). In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Journal Infection and Immunity. Vol (66), pp. 3149-3154.

Navarro, G. F., Sears, C., Eslava, C., Cravioto, A., Nataro, J.P. (1999). Cytoskeletal effects induced by pet, the serine protease enterotoxin of enteroaggregative *Escherichia coli*. Journal Infection Immunity. Vol.67(5). pp. 2184-2192. doi. 10.1128/mBio.00838-13

Navarro, G., Canizalez, R., José, L., Nataro, J. (2001). Plasmid-Encoded Toxin of Enteroaggregative *Escherichia coli* is Internalized by Epithelial Cells. Infection and Immunity. Journal Infection Immunity. Vol 69(2), pp. 1053-1060. doi: 10.1128/IAI.69.2.1053-1060.2001

Navarro, G., Canizalez, R., Bao, Quan., Nataro, J., Azamar, Y. (2004). The serine protease motif of EspC from enteropathogenic *Escherichia coli* produces epithelial damage by a different mechanism than Pet toxin from enteroaggregative *E. coli*. Journal Infection and Immunity. Vol. 72 (6), pp. 3609-3621. doi.10.1128/IAI.72.6.3609-3621.2004

Nelson, D.L and Cox, M.M. (2001).Bio-Rad: Protocolo que acompaña al “Quantum Prep Miniprep Kit”. Principios de Bioquímica, 3ª ed. Barcelona, España. Editorial Omega, pp. 1119-1128.

Puente, J.L., Bieber, D., Ramer, S.W., Murray, W., Schoolnick, G.K. (1996). The bundle forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional replication by environmental signals. Molecular Microbiology. Vol. 20 (1), pp. 87-100.

Roux, H. (2003). Optimization and Troubleshooting in PCR. Cold Spring Harbor. Vol (10), pp.1101

Savarino, S.J., Fasano, A., Robertson, D., Levine, M. (1991). Enteroaggregative *Escherichia coli* elaborate a heat-stable enterotoxin demonstrable in an in vitro intestinal model. Vol. (87), pp. 1450-1455.

Savarino, S., McVeigh., Watson, J., Molina, J., Cravioto, A., Echeverria P. (1996). Enteroaggregative *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin is not restricted to enteroaggregative *E. coli*. Vol. 173 (4), pp.1019-1022.

Scaletsky, I.C., Milani, S.R., Trabulsi, L.R., Travassos, L.R.(1998). Isolation and characterization of the localized adherence factor of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal Infection and Immunity* .Vol,(56),pp. 2979-83.Recuperado de <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC259680/?page=1>

Scaletsky, I.C., Silva, M.L., Trabulsi, L.R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Journal Infection and Immunity*.Vol. 45(2):, pp. 534-536. Recuperado de <http://iai.asm.org/content/45/2/534.full.pdf+html>

Stein, M., Kenny. B., Stei, M. A., Finlay, B. B. (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.*Journal of Bacteriology*. Vol. 178(22), pp. 6546–6554.

Torres, A.G., Zhou, X., Kaper, J.B. (2005).Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infection Immunity*. Vol 73(1), pp.18-29.

Vidal, E.(2003). *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC) Una Causa Frecuente de Diarrea Infantil. *Revista Salud en Tabasco*.Vol 9 (1), pp. 188-193. Recuperado <http://www.redalyc.org/pdf/487/48709108.pdf>

Vidal, E. and Navarro, G. (2006). Efficient Translocation of EspC into Epithelial Cells Depends on Enteropathogenic *Escherichia coli* and Host Cell Contact. *Infection Immunity*. Vol. 74 (4), pp. 2293-2303.

Vidal, E., Canizález, R., Gutiérrez, J., Navarro, G. (2007). Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli*. [versión electrónica]. *Salud Pública de México Review*. Vol. 49 (5), pp. 376-386.

ANEXOS

Anexo A. Componentes del medio Luria Bertani

Componentes	Líquido 100 ml	Sólido 100 ml
Bacto Triptona	1 g	1 g
Extracto de Levadura	0.5 g	0.5 g
Na Cl	1 g	1 g
Agar bacteriológico		1.5 g

Anexo B. Buffer de Corrida 1 X para cargar cubeta de SDS-PAGE

Se prepara a partir de un bufer concentrado (10 X)

$$C_1 V_1 = C_2 V_2$$

$$V_1 = \frac{(1X)(1000 \text{ ml})}{10 X}$$

V1= 100 ml del
concentrado de 10 X
en 900 ml de agua
desionizada

Anexo C. Componentes de la mezcla para PCR

- 1) Oligos o Primer para PCR
- 2) Desoxinucleotidos trifosfato (dNTPs). Mezcla 4 dNTPs (0.2uM cada uno)
- 3) Taq DNA polimerasa.5U/ul
- 4) Iones Magnesio (Mg^{2+}) agregado como cloruro de Magnesio ($MgCl_2$)
- 5) Amortiguador para PCR 10 X
- 6) DNA templado
- 7) Marcado de peso molecular de 100 pb
- 8) TBE 10 X

Anexo D. Componentes del medio Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) para cultivo de células.

COMPONENTE	Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)		
SALES INORGÁNICAS		L-Lysine-HCl	0.146
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.265	L-Methionine	0.03
CuSO ₄ ·5H ₂ O	—	L-Phenylalanine	0.066
Fe(NO ₃) ₃ ·9H ₂ O	0.0001	L-Proline	—
FeSO ₄ ·7H ₂ O	—	L-Serine	0.042
KCl	0.4	L-Threonine	0.095
MgCl ₂ ·6H ₂ O	—	L-Tryptophan	0.016
MgSO ₄	0.09767	L-Tyrosine-2Na·2H ₂ O	0.10379
Na ₂ HPO ₄	—	L-Valine	0.094
NaCl	6.4	VITAMINAS	
NaH ₂ PO ₄	0.109	Choline Chloride	0.004
NaHCO ₃	3.7	D-Pantothenic Acid·1/2Ca	0.004
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	—	Folic Acid	0.004
AMINOACIDOS		Hypoxanthine	—
Glycine	0.03	Linoleic Acid	—
L-Alanine	—	myo-Inositol	0.0072
L-Arginine·HCl	0.084	Niacinamide	0.004
L-Asparagine·H ₂ O	—	Pyridoxine·HCl	0.004
L-Aspartic Acid	—	Riboflavin	0.0004
L-Cystine·2HCl	0.0626	Thiamine·HCl	0.004
L-Glutamic Acid	—	Thiolic Acid	—
L-Glutamine	0.584	Thymidine	—
L-Histidine·HCl·H ₂ O	0.042	Vitamin B-12	—
L-Isoleucine	0.105	OTROS	
L-Leucine	0.105	D-Glucose	4.5
		Phenol Red·Na	0.0159
		Pyruvic Acid·Na	—
		Putrescine·HCl	—