



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"*

**FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN  
DEL FLAGELO DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA  
Y SU IMPLICACIÓN EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS  
EN MATERIALES INERTES**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**FABIOLA AVELINO FLORES**

Asesora de tesis:

Dra. María Lilia Cedillo Ramírez

Coasesor de tesis:

Dr. Jorge Alberto Girón Ortiz

Septiembre 2014



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**

**INSTITUTO DE CIENCIAS**

**POSGRADO EN CIENCIAS AMBIENTALES**



*"La tierra no es de nosotros, nosotros somos de la tierra"*

**FACTORES AMBIENTALES QUE AFECTAN LA EXPRESIÓN  
DEL FLAGELO DE ESCHERICHIA COLI ENTEROPATÓGENA  
Y SU IMPLICACIÓN EN LA FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS  
EN MATERIALES INERTES**

**TESIS**

Que para obtener el grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS AMBIENTALES**

Presenta

**FABIOLA AVELINO FLORES**

Comité tutorial:

Asesora y Tutora	Dra. María Lilia Cedillo Ramírez
Coasesor de Tesis	Dr. Jorge Alberto Girón Ortiz
Integrante de Comité Tutorial	Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos

Septiembre 2014





**BUAP**

**M.C. FABIOLA AVELINO FLORES**

Por este conducto me permito comunicarle que los miembros del jurado integrado por:

<i>Dr. Jorge Antonio Yáñez Santos</i>	<i>Presidente</i>
<i>Dra. Elsa Iracena Castañeda Roldán</i>	<i>Secretario</i>
<i>Dr. Elias Pezzat Said</i>	<i>1er. Vocal</i>
<i>Dra. Sonia Emilia Silva Gómez</i>	<i>2do. Vocal</i>
<i>Dr. Ricardo Munguía Pérez</i>	<i>3er. Vocal</i>
<i>Dra. Edith Chávez Bravo</i>	<i>1er. Suplente</i>
<i>Dra. Gladys Linares Fleites</i>	<i>2do. Suplente</i>

designado para la defensa de su tesis “Factores Ambientales que afectan la expresión del flagelo de *Escherichia coli* enteropatógena y su implicación en la formación de biopelículas en materiales inertes”, han manifestado mediante su voto que ésta cumple con los méritos suficientes para ser defendida como tesis de grado de Doctorado en Ciencias Ambientales, por lo que este Posgrado le autoriza la impresión de la misma.

Sin otro asunto en lo particular, quedo de usted.

**ATENTAMENTE**  
**“Pensar Bien, Para Vivir Mejor”**  
H. Puebla de Z., Septiembre 17 de 2014

*J. Santos Hernández Zepeda*  
**Dr. J Santos Hernández Zepeda**  
Coordinador

JSHZ/anma  
c.c.p. Archivo  
c.c.p. Minutario



Instituto  
de Ciencias

Edif. 103 E, Ciudad Unversitaria,  
Col. San Manuel, Puebla, Pue.  
C.P. 72570  
01 (222) 229 55 00 Ext. 7050 y 7051

## *AGRADECIMIENTOS*

*A LA BENEMÉRITA UNIVERSIDAD  
AUTÓNOMA DE PUEBLA, POR SER MI  
ALMA MATER*

*AL POSGRADO EN CIENCIAS  
AMBIENTALES, POR DARME LA  
OPORTUNIDAD DE CONOCER UN NUEVO  
MUNDO MARAVILLOSO, EN EL CUAL  
TODO SE OBSERVA DE UNA FORMA  
GLOBAL*

## ÍNDICE

<b>I. RESUMEN.</b>	1
<b>II. INTRODUCCIÓN.</b>	2
<b>III. ANTECEDENTES GENERALES.</b>	
III.1. Infecciones diarreicas, un problema de salud ambiental global importante.	4
III.2. <i>Escherichia coli</i> como indicador de contaminación ambiental.	8
<b>IV. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS.</b>	
IV.1. Patogrupos de <i>E. coli</i> causantes de diarrea.	10
IV.2. <i>Escherichia coli</i> Enteropatógena (EPEC).	13
IV.3. Flagelo: Estructura y funciones.	16
IV.4. Flagelo de <i>Escherichia coli</i> y su implicación en la Adherencia o formación de biopelículas a superficies bióticas o abióticas.	21
<b>V. JUSTIFICACIÓN.</b>	24
<b>VI. OBJETIVOS.</b>	
V.1. Objetivo general.	25
V.2. Objetivos específicos.	25
<b>VII. HIPÓTESIS.</b>	26
<b>VIII. METODOLOGÍA.</b>	
VIII.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.	27
VIII.1.1. Cepas utilizadas.	27
VIII.1.2. Medios de cultivo.	28
VIII.1.3. Condiciones de cultivo.	28
VIII.2. Crecimiento bacteriano.	29
VIII.3. Transcripción flagelar.	29
VIII.3.1. Construcción de la fusión transcripcional del promotor del gen de <i>fliC</i> y del operón de <i>lacZ</i> ( <i>fliC::lacZ</i> ) para monitorear la transcripción flagelar.	29
VIII.3.2. Transformación de las cepas.	31
VIII.3.3. Ensayos de $\beta$ -galactosidasa.	32
VIII. 4. Inmunolectrotransferencia.	33

VIII.5. Pruebas de movilidad.	34
VIII.6. Adherencia a células epiteliales.	34
VIII.7. Formación de biopelículas	35
VIII.8. Determinación de las propiedades adhesivas del flagelo H6 de EPEC.	35
VIII.8.1. Determinación de la unión de flagelo H6 a proteínas de matriz extracelular (PMEC)	35
VIII.8.2. Unión de bacterias a las proteínas de Matriz extracelular.	35
VIII.8.3. Prueba de unión del flagelo a las proteínas de matriz extracelular mediante ensayo de ELISA.	36
VIII.9. Análisis Estadístico.	36
<b>IX. RESULTADOS</b>	<b>38</b>
IX.1. Cinética de transcripción y de expresión de la flagelina de EPEC.	38
IX.2. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC bajo diferentes condiciones nutricionales.	40
IX.2.1. La presencia de glucosa y sacarosa favorecen la transcripción y expresión flagelar de EPEC.	40
IX.2.2. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC y <i>E. coli</i> K-12 en presencia de iones divalentes.	42
IX.2.3. Influencia de las sales de amonio en la expresión flagelar.	45
IX.2.4. Influencia de las sales de sodio en la expresión flagelar.	47
IX.3. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC bajo diferentes condiciones ambientales intestinales y extraintestinales.	51
IX.3.1. Las sales biliares favorece la expresión del flagelo de EPEC.	51
IX.3.2. La transcripción y expresión del flagelo de EPEC es favorecida en cultivos celulares.	52
IX.3.3. La transcripción y expresión de flagelo se favorece en medio D-MEM precondicionado (PD-MEM).	53
IX.3.4. Las catecolaminas estimulan la expresión del flagelo de EPEC.	55
IX.3.5. Comportamiento del flagelo de EPEC y <i>E. coli</i> K-12 a temperatura ambiente y corporal.	56
IX.3.6. Comportamiento del flagelo de EPEC y <i>E. coli</i> K-12 bajo diferentes valores de pH.	57
IX.3.7. Comportamiento del flagelo de EPEC y <i>E. coli</i> K-12 en presencia de oxígeno o dióxido de carbono.	58
IX.3.8. Incremento de la transcripción y expresión flagelar de EPEC crecida en un medio de cultivo que	60

	simula el ambiente intestinal.	
	IX.3.9. Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de metales pesados que se pueden encontrar como contaminantes ambientales.	61
	IX.3.10. Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de desinfectantes a base de metales pesados, de uso cotidiano.	68
	IX.3.11. Movilidad de EPEC bajo las diferentes condiciones que afectaron la transcripción y expresión flagelar.	73
IX.4.	Relación del flagelo de EPEC en la adhesión y/o formación de biopelículas a superficies bióticas y/o abióticas.	74
	IX.4.1. Unión de flagelo H6 a proteínas de matriz extracelular (Colágena, laminina y fibronectina).	74
	IX.4.2. Formación de biopelículas sobre superficies abióticas en presencia de metales pesados.	77
<b>X.</b>	<b>DISCUSIÓN.</b>	79
X.1.	Cinética de transcripción y de expresión de la flagelina de EPEC.	79
X.2.	Transcripción y expresión de flagelo de EPEC bajo diferentes condiciones nutricionales.	80
	X.2.1. La presencia de glucosa y sacarosa favorecen la transcripción y expresión flagelar de EPEC.	80
	X.2.2. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC y <i>E. coli</i> K-12 en presencia de iones divalentes.	81
	X.2.3. Influencia de las sales de amonio en la expresión flagelar.	81
	X.2.4. Influencia de las sales de sodio en la expresión flagelar.	82
X.3.	Transcripción y expresión de flagelo de EPEC bajo diferentes condiciones ambientales intestinales y extraintestinales.	82
	X.3.1. Las sales biliares favorece la expresión del flagelo de EPEC.	82
	X.3.2. La transcripción y expresión del flagelo de EPEC es favorecida en cultivos celulares.	83
	X.3.3. La transcripción y expresión de flagelo se favorece en medio D-MEM precondicionado (PD-MEM).	84
	X.3.4. Las catecolaminas estimulan la expresión del flagelo de EPEC.	84
	X.3.5. Comportamiento del flagelo de EPEC y <i>E. coli</i> K-12 a temperatura ambiente y corporal.	84
	X.3.6. Comportamiento del flagelo de EPEC y <i>E. coli</i>	85

K-12 bajo diferentes valores de pH.	
X.3.7. Comportamiento del flagelo de EPEC y E. coli K-12 en presencia de oxígeno o dióxido de carbono.	86
X.3.8. Incremento de la transcripción y expresión flagelar de EPEC crecida en un medio de cultivo que simula el ambiente intestinal.	86
X.3.9. Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de metales pesados que se pueden encontrar como contaminantes ambientales.	87
X.3.10. Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de desinfectantes a base de metales pesados, de uso cotidiano.	90
X.4. Relación del flagelo de EPEC en la adhesión y/o formación de biopelículas a superficies bióticas y/o abióticas.	93
X.4.1. Unión de flagelo H6 a proteínas de matriz extracelular (Colágena, laminina y fibronectina).	93
X.4.2. Formación de biopelículas sobre superficies abióticas en presencia de metales pesados.	94
<b>XI. CONCLUSIONES.</b>	96
<b>XII. BIBLIOGRAFÍA.</b>	98



## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b>	Fracción ambiental relacionada a enfermedades.	5
<b>Figura 2.</b>	Estructura del flagelo de bacterias Gramnegativas.	18
<b>Figura 3.</b>	Biosíntesis del flagelo.	19
<b>Figura 4.</b>	Cinética de transcripción y expresión flagelar.	39
<b>Figura 5.</b>	Transcripción y expresión del flagelo de EPEC a diferentes concentraciones de fuentes de carbono.	41
<b>Figura 6.</b>	Comportamiento del flagelo en presencia de iones divalentes.	44
<b>Figura 7.</b>	Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de sales de amonio.	46
<b>Figura 8.</b>	Efectos de las sales de sodio sobre la transcripción y expresión flagelar.	49
<b>Figura 9.</b>	Crecimiento de EPEC en presencia de bisulfito de sodio.	50
<b>Figura 10.</b>	Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de sales biliares.	52
<b>Figura 11.</b>	Efecto de los cultivos celulares en el comportamiento flagelar de EPEC.	53
<b>Figura 12.</b>	Efecto del medio D-MEM precondicionado en el flagelo de EPEC.	54
<b>Figura 13.</b>	Comportamiento flagelar de EPEC en presencia de catecolaminas.	55
<b>Figura 14.</b>	Efecto de la temperatura sobre el flagelo de EPEC y de <i>E. coli</i> K-12.	57
<b>Figura 15.</b>	Efecto de diferentes valores de pH en la expresión flagelar de EPEC.	58

<b>Figura 16.</b>	Comportamiento del flagelo en cultivos incubados en tensión de dióxido de carbono.	59
<b>Figura 17.</b>	Comportamiento flagelar de EPEC crecido en medio diseñado.	61
<b>Figura 18.</b>	Comportamiento del flagelo de EPEC y su sobrevivencia en presencia de mercurio.	63
<b>Figura 19.</b>	Comportamiento del flagelo de EPEC y <i>E. coli</i> K-1 2 en presencia de $\text{Cu}^{+2}$ .	64
<b>Figura 20.</b>	Efecto de cadmio en el flagelo de EPEC.	65
<b>Figura 21.</b>	Efecto del cromo en el flagelo de EPEC.	65
<b>Figura 22.</b>	Hierro y su efecto sobre el flagelo de EPEC.	66
<b>Figura 23.</b>	Relación del flagelo de EPEC y el zinc.	67
<b>Figura 24.</b>	Efecto del plomo sobre la sobrevivencia de EPEC y su expresión flagelar.	69
<b>Figura 25.</b>	Comportamiento de EPEC y de <i>E. coli</i> K-12 en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de cobalto.	71
<b>Figura 26.</b>	Comportamiento del flagelo en presencia de $\text{AgNO}_3$ .	72
<b>Figura 27.</b>	Afinidad del flagelo H6 y H7 por las proteínas de membrana externa.	75
<b>Figura 28.</b>	Adherencia de EPEC, su mutante y su complementada en flagelo y EHEC a proteínas de matriz extracelular.	76
<b>Figura 29.</b>	Formación de agregados bacterianos de EPEC en presencia de cobalto.	77

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b>	Factores ambientales que influyen en las infecciones diarreicas.	7
<b>Tabla 2.</b>	Características generales de los patogrupos tradicionales de <i>E. coli</i> diarrogénicas.	11
<b>Tabla 3.</b>	Sustancias y concentraciones empleadas para los ensayos de expresión flagelar.	30
<b>Tabla 4.</b>	Cepas transformadas y transformantes obtenidas.	32
<b>Tabla 5.</b>	Movilidad de EPEC bajo las diferentes condiciones que afectaron la transcripción flagelar.	73
<b>Tabla 6.</b>	Formación de biopelículas en presencia de diversos metales pesados a diferentes concentraciones a 24, 48 y 72 horas de incubación a 25°C.	78

## I. RESUMEN

Se sabe que las condiciones microambientales en el hospedero son un factor determinante para los microorganismos oportunistas en las primeras fases de la infección, tal es el caso de las bacterias que generan enfermedades diarreicas, las que siguen siendo un problema de salud pública en los países en desarrollo. México ocupa uno de los primeros lugares en este tipo de enfermedades principalmente producidas por *E. coli* enteropatógena. Se ha asociado al flagelo de EPEC como un mediador de adherencia a células epiteliales, lo que le permite sobrevivir en el medio intestinal y ser causante de infección. En esta investigación se trabajó la interacción de EPEC en condiciones “microambientales”, encontrándose que la transcripción como la expresión del flagelo de *E. coli* enteropatógena se favoreció en a) cultivos celulares, b) en presencia de desoxicolato de sodio, c) en medio D-MEM precondicionado, en presencia de algunos nutrientes y en presencia de algunos metales pesados. Se diseñó un medio de cultivo óptimo para la expresión flagelar, formulado con desoxicolato de sodio al 0.1%, pH=8.2 y el medio D-MEM precondicionado y adicionado con 5 mM de  $MgCl_2$ , 5 mM de  $(NH_4)_2SO_4$ , 150 mM de NaCl y fue incubado en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%. Los resultados sugieren fuertemente que el flagelo de EPEC está involucrado tanto en la movilidad como en la colonización intestinal, confiriéndole características de factor de virulencia. Se determinó a la colágena como la principal proteína de matriz extracelular que se une al flagelo H6 de EPEC. También se observó que EPEC sobrevive en presencia de metales pesados, aun los que son utilizados como agentes desinfectantes (nitrato de plata y cloruro de cobalto) a las concentraciones establecidas por la normatividad, y el flagelo parece estar implicado en esta sobrevivencia. EPEC no formó biopelículas en presencia de metales pesados.

## II. INTRODUCCIÓN

A pesar de los esfuerzos que se hacen, no se han podido controlar las infecciones diarreicas, ya que son enfermedades ligadas a la pobreza y a las condiciones de vida. El incremento de las inequidades y los niveles de exclusión social han aumentado en muchos países de América Latina, los índices de desempleo aumentan con el consecuente deterioro de la calidad de vida. Más de un 42% del total de la población vive en condiciones de marginalidad. Actualmente seis de cada diez niños viven en condiciones de exclusión y presentan una elevada mortandad por enfermedades diarreicas, infecciones respiratorias que en algunos de los casos son enfermedades prevenibles. Otros factores que influyen a la exclusión y a las enfermedades diarreicas son la desnutrición y las dificultades de acceso a la salud para un control de crecimiento y desarrollo, aunado a la falta de servicios de alcantarillado adecuados, el fecalismo al ras del suelo, el riego de hortalizas con aguas negras, que sirven como fuente de agentes patógenos, el deterioro ambiental y la falta de educación (Guillén A, 2011; Monteverde 2010; OPS, 2011).

En México, al igual que en otros países en desarrollo, las infecciones gastrointestinales en niños menores de 5 años presentan un alto índice de prevalencia y, específicamente *E. coli* enteropatógena (EPEC) ha sido implicada en un gran porcentaje de casos de diarrea en niños menores de dos años, las cifras de letalidad en países subdesarrollados son elevadas (20 a 50%), lo que convierte a la infección por EPEC en una anomalía clínica de inmediata respuesta (Vidal *et al*, 2007).

EPEC posee diversos factores de virulencia que actúan conjuntamente para facilitar la colonización del intestino delgado y causan la lesión de unión y esfacelamiento (AE) al enterocito. La adherencia de EPEC al intestino delgado y a las células de cultivo celular es muy característica y se conoce como patrón de

adherencia localizada, la bacteria se asocia a su célula blanco a través de apéndices de superficie como son los pili, las fibras de Esp A e intimina ((Vila-Estapé y Zboromyrska, 2012; Kaper *et al*, 2004). Se ha demostrado en EPEC que el flagelo está directamente involucrado con la adherencia a células a través de mucina principalmente, que es el paso inicial para la colonización y la posterior infección al organismo (Erdem *et al*, 2007; Girón *et al*, 2002).

El estudio de los microambientes es importante, ya que nos brinda información acerca de las condiciones que requiere un microorganismo para su desarrollo y de forma indirecta la forma en la que se puede controlar. Esto cobra mayor importancia si el microorganismo en estudio es un patógeno que causa un número elevado de casos de diarrea en niños menores a 5 años. A pesar de que se conocen muchos de los factores de virulencia de EPEC, no se ha podido controlar la prevalencia de infecciones gastrointestinales causadas por esta bacteria, por lo que se hace necesario dilucidar otros mecanismos de patogenicidad que estén involucrados en la enfermedad y en los ambientes extraintestinales, este es el caso de las condiciones microambientales que favorecen los procesos de expresión del flagelo de EPEC y su relación en la formación de biopelículas a superficies bióticas y abióticas.



### III. ANTECEDENTES GENERALES

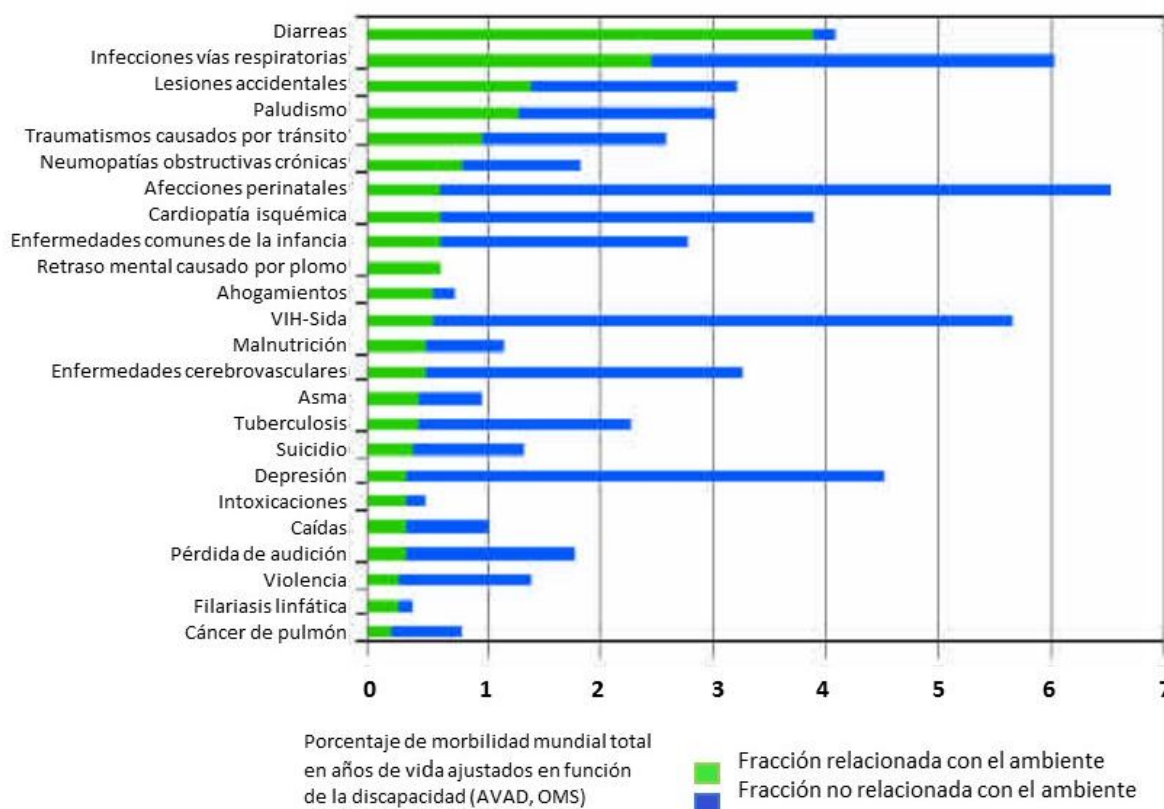
#### III.1. Infecciones diarreicas, un problema de salud ambiental global importante.

Los impactos más relevantes observados debidos al cambio climático se dan en la agricultura, la salud humana, los ecosistemas terrestres y acuáticos, el abastecimiento de agua potable y el estilo de vida de las personas (IPCC, 2014). La falta de agua potable y saneamiento básico tienen impactos negativos en los procesos de desarrollo humano constituyen la segunda causa de morbi-mortalidad para menores de cinco años en la Región de América Latina (AL), y es el mayor componente de la carga de enfermedades asociadas con el ambiente, sobre todo las consideradas de origen hídrico como las diarreas (OPS, 2011) (Figura 1). Los niños mueren porque sus organismos están a menudo debilitados por la rápida pérdida de líquidos y desnutridos por la falta de alimentos (Gullian-Klanian *et al*, 2011) la carga alcanza su nivel máximo en las zonas pobres, en donde el saneamiento es escaso, la higiene es insuficiente y el agua de beber no es potable (UN Task Team on Social Dimensions of Climate Change, 2011, Monteverde *et al*, 2010).

En los países pobres los niños tienen una carga de enfermedad 140 veces mayor para diarreas que sus pares de naciones desarrolladas, estos grupos vulnerables no solo requieren de atención primaria en las propias comunidades, sino que deben atenderse en las regiones marginadas como problemas integrales que requieren de la multidisciplinariedad, incluyendo la atención a aspectos ambientales, sociales, económicos, políticos y de recursos naturales. (Cosio *et al*, 2011) (Tabla 1).

En México al igual que en otros países en vías de desarrollo las enfermedades gastrointestinales son una de las primeras causas de consulta médica y también una de las primeras causas de muerte por infecciones, se las considera un problema de salud pública que afecta a personas de cualquier edad y condición social, aunque los

grupos más vulnerables son los niños y los ancianos, debido a la excesiva pérdida de electrolitos durante la enfermedad y que puede causar una deshidratación grave, el riesgo de sufrir estas enfermedades se incrementa en la temporada de calor (Hernández *et al*, 2011).



**Figura 1.** Fracción ambiental relacionada a enfermedades. Diversas enfermedades tienen una fracción relacionada con el ambiente determinante como es el caso de la diarrea y las enfermedades respiratorias. Se observa en verde la fracción que aporta el ambiente. Fuente: OPS, 2011.

La Secretaría de Salud reportó para 2008, que las infecciones intestinales ocuparon el quinto lugar como causa de mortalidad en niños menores de cuatro años (SINAIS, 2008) y en 2012 ocupó el segundo lugar como causa de enfermedad a nivel general y reportó 1.5 millones de casos nuevos en niños menores de 4 años, siendo el grupo etario de mayor riesgo el de 1 a 4 años (DGE, 2012).

Las infecciones intestinales presentan diversos agentes etiológicos que pueden ser virus como rotavirus, Norwalk y calicivirus, bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* spp, *Shigella* spp, *Campylobacter jejuni* y protozoarios como *Giardia lamblia* y *Criptosporidium parvum*.

La Organización Mundial de la Salud (OMS) ha reportado que la mayoría de las defunciones por enfermedades infecciosas - casi el 90% - están provocadas solo por seis enfermedades: neumonía, tuberculosis, enfermedades diarreicas, paludismo, sarampión y VIH/SIDA, causando más de la mitad de todas las defunciones prematuras. En 2011 la OMS a través del Observatorio de Salud Global mencionó que las cuatro causas principales de mortalidad infantil en niños menores de 5 años fueron neumonía (17.5% durante la etapa neonatal y 12.8% de 1-59 meses), nacimiento prematuro (16.9% durante la etapa neonatal y 2.4% de 1-59 meses), asfixia del nacimiento (11.3% durante la etapa neonatal y 1.1% de 1-59 meses), y enfermedades diarreicas (9.3% durante la etapa neonatal y 8.5% de 1-59 meses), siendo las diarreas la segunda causa de mortalidad infantil como enfermedad infecciosa. Las enfermedades diarreicas provocan la muerte de casi un millón de niños menores de cinco años al año. Cada tres segundos muere un niño, en la mayoría de los casos por una enfermedad infecciosa. En algunos países, uno de cada cinco niños fallece antes de cumplir cinco años (Global Health Observatory Data Repository, 2011).

En la edad de las vacunas, los antibióticos y los progresos científicos, esas enfermedades deberían estar controladas. Sin embargo, siguen causando muertes a un ritmo alarmante, como fue reportado en Antofagasta, Chile donde se registraron 26,000 casos de diarrea aguda en 2010 (Cabello, 2010).

En Costa Rica en el primer trimestre de 2014 se reportaron 75,029 casos de diarrea, esa cifra es la más alta desde el año 2008; de acuerdo con datos de la Subárea de Vigilancia Epidemiológica de la Caja Costarricense, el incremento de los casos ha sido más notorio en las últimas dos semanas. La causa de las diarreas se atribuye a *E. coli*, *Shigella flexneri*, norovirus y rotavirus, en ese orden (Díaz, 2014).

**Tabla 1.** Factores ambientales que influyen en las infecciones diarreicas.

	Paludismo	TB	VHI e ITS	Esquistos*	Gripe	IRA	Diarreas	Sarampión	Cólera
Deforestación	Factor importante								
Cambio climático	Factor muy importante			Factor importante	Factor importante	Factor importante			
Proyectos de regadíos y embalses	Factor importante			Factor muy importante					
Insuficiencia del saneamiento y la higiene				Factor muy importante			Factor muy importante		Factor muy importante
Hambre y malnutrición		Factor importante			Factor importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	
Analfabetismo	Factor importante		Factor importante	Factor importante			Factor importante	Factor importante	
Baja situación de las mujeres	Factor importante	Factor importante	Factor muy importante			Factor importante	Factor importante	Factor importante	
Falta de vivienda apropiada	Factor muy importante	Factor muy importante			Factor importante	Factor importante	Factor importante	Factor muy importante	Factor muy importante
Aumento de viajes y migración	Factor importante	Factor importante	Factor importante	Factor importante	Factor muy importante		Factor importante	Factor muy importante	Factor muy importante
Falta de coordinación multifactorial	Factor muy importante	Factor importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor importante	Factor importante	Factor importante		Factor muy importante
Falta de sistema de vigilancia	Factor muy importante		Factor importante		Factor muy importante			Factor muy importante	Factor muy importante
Inexistencia de servicios de salud	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante
Ausencia de instrumentos o estrategias preventivas			Factor importante		Factor importante	Factor importante			Factor muy importante
Fallo en el uso de las estrategias de prevención	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante
Falta de tratamiento eficaz			Factor muy importante			Factor importante			
Fallo en el uso de estrategias de tratamiento	Factor muy importante	Factor muy importante		Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante		Factor muy importante
Falta de vacuna eficaz	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante	Factor muy importante		Factor importante	Factor importante		Factor importante
Fallo en el uso de vacunas					Factor muy importante				
Otros factores		Mal uso antibióticos	Factores religiosos			Contaminación aire de locales			Guerras trastornos civiles

\* Esquistosomiasis

Factor muy importante
  Factor importante
  Factor menor, indirecto o inexistente

Fuente: UN Task Team on Social Dimensions of Climate Change, 2011

### **III.2. *Escherichia coli* como indicador de contaminación ambiental.**

El agua puede contaminarse cuando entra al sistema de distribución, a través de conexiones cruzadas, rotura de tuberías, cisternas y/o reservorios defectuosos, grifos dañados y/o reparaciones realizadas sin medidas de seguridad (Arcos-Pulido *et al*, 2005). Se ha observado que la construcción defectuosa de pozos o depósitos y la ausencia de mantenimiento predisponen el ingreso y multiplicación de microorganismos a partir de distintas fuentes (Cho *et al*, 2000). La contaminación de los cuerpos naturales de agua es un problema actual, principalmente en países en vías de desarrollo, ya que los desechos domésticos e industriales se vierten a estos ecosistemas sin tratamiento o pobremente tratados constituyendo una fuente constante de deterioro del medio ambiente (Shaheed *et al*, 2014).

Los factores que permiten el desarrollo de microorganismos en los cuerpos de agua son la cantidad y el tipo de nutrientes, la presencia o ausencia de oxígeno, los cambios de temperatura, los diferentes valores de pH, la presencia y concentración de desinfectantes y el material de las tuberías (Hill *et al*, 1996).

Los agentes patógenos de transmisión hídrica pueden causar enfermedades con diferentes niveles de gravedad, desde una gastroenteritis simple hasta cuadros graves de diarrea, disentería, hepatitis o fiebre tifoidea (OMS, 2003). La presencia de estos microorganismos representa una amenaza mundial, que exige una respuesta coordinada de los servicios de salud de todos los países. Asimismo constituyen una carga financiera que obliga a gastos enormes para el control de brotes epidémicos, en atención médica y salud pública (Harwood *et al*, 2005). El diagnóstico de estos microorganismos, requiere laboratorios especializados que llevan varios días de análisis y costos elevados, por lo que se prefiere usar los indicadores microbianos que se pueden identificar mediante el uso de métodos sencillos, rápidos y económicos, y así tomar decisiones en relación al control de vertidos, tratamiento de aguas y conservación de ecosistemas, evitando así el riesgo de contaminación de las personas y en el ambiente (Arcos-Pulido *et al*, 2005).

Un microorganismo indicador debe reunir ciertas características: Ser constituyente normal de la flora intestinal de individuos sanos, estar presente en las heces de animales homeotermos, estar presente cuando los microorganismos patógenos intestinales lo están, presentarse en número elevado para facilitar su aislamiento e identificación, ser incapaz de reproducirse fuera del intestino de los animales homeotermos, su tiempo de supervivencia debe ser igual o un poco superior al de las bacterias patógenas, su resistencia a los factores ambientales debe ser igual o superior al de los patógenos de origen fecal, debe ser fácil de aislar y cuantificar, no debe ser patógeno (Harwood *et al*, 2005).

La búsqueda de coliformes como indicadores de contaminación de origen fecal del agua es una práctica establecida desde hace muchos años, desde 1895 se propuso a *E. coli* como indicador para determinar la potabilidad del agua de bebida, marcando así el inicio del uso de los coliformes como indicadores de patógenos (Gesche *et al*, 2003). En la actualidad se trabaja con diferentes microorganismos representantes de los patógenos de origen fecal: coliformes fecales, *E.coli*, enterococos fecales y esporas de anaerobios sulfito-reductores. El comportamiento de estos indicadores frente a barreras naturales como artificiales puede variar (Herrera y Suárez, 2005). La relación que se establece entre los organismos coliformes fecales y los enterococos fecales (CF/EF) determina el origen de la contaminación, si el cociente es  $> 4$  el origen es humano, si el cociente es  $< 0.7$  el origen es animal, con un cociente entre 0.7-4 no se puede interpretar el origen de la contaminación, generalmente se considera de origen mixto.

*E. coli* puede adaptarse y sobrevivir en heces de animales, en donde permanece viable por periodos que ocupan de semanas a meses, por lo que funciona como un microorganismo indicador de contaminación fecal para aguas de recreación en cuerpos de agua dulce (Agencia de Protección al Ambiente). El crecimiento de esos microorganismos en aguas naturales puede comprometer su uso como indicadores de contaminación fecal, existen numerosas evidencias de que *E. coli* se multiplican en aguas templadas, subtropicales y persiste en sedimentos de aguas ambientales (SSA, 2004).



## IV. ANTECEDENTES ESPECÍFICOS

### IV.1. Patogrupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea.

*E. coli* es una bacteria ubicua en una gran variedad de ecosistemas, incluido el tracto gastrointestinal del ser humano y de los animales de sangre caliente. Puede actuar como patógeno primario en el tracto intestinal, y también como bacteria oportunista causando una gran variedad de procesos infecciosos como sepsis, infecciones en vías urinarias, meningitis, infecciones de heridas entre otras. Existen diversos tipos de *E. coli* causantes de enteritis, de algunos de estos patotipos de *E. coli* se han descrito casos esporádicos, así como brotes epidémicos (Vila-Estapé y Zboromyrska, 2012). Dichos patogrupos de *E. coli* poseen mecanismos de patogenicidad que pueden causar enfermedad. Los diferentes patogrupos de *E. coli* causan alta morbilidad y mortalidad en todo el mundo. Aunque hay muchos rasgos comunes en los patogrupos para colonizar mucosa intestinal y causar la enfermedad, el curso, el inicio, y complicaciones varían considerablemente dependiendo de cada uno de ellos (Croxen *et al*, 2013).

Las cepas de *E. coli* diarrogénicas se dividen tradicionalmente en seis patogrupos, de acuerdo a su patogenicidad (factores de virulencia, entidad clínica y sus características filogenéticas): *E. coli* Enteropatógena (EPEC), *E. coli* Enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* Enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* Enteroagregativa (EAEC), *E. coli* Enterotoxigena (ETEC) y *E. coli* de Adherencia Difusa (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998; Kaper *et al*, 2004). En 2012 se propone la introducción de dos patogrupos emergentes: *E. coli* Adherente Invasiva (AIEC), asociada con la enfermedad de Crohn y *E. coli* Enteroagregativa productora de la toxina Shiga (Stx) (STEAEAC) responsable del brote ocurrido en Alemania en 2011 (Clements *et al*, 2012). Las características generales de estos patogrupos de *E. coli* se muestran en la tabla 2.

**Tabla 2.** Características generales de los patogrupos tradicionales de *E. coli* diarrogénicas.

Grupo	Síntomas clínicos	Epidemiología	Factores de patogenicidad
ETEC	Diarrea aguda acuosa	Niños menores de 2 años y diarrea del viajero	Enterotoxina termoestable (STa, STb), enterotoxina termolábil (LT), Adhesinas (>20 CFA, CS o PFC), enterotoxina 2 de Shigella (ShET2), autotransportador de ETEC (Eat A), Adhesina asociada a adherencia porcina (Paa), citolisina A (ClyA)
EHEC	Síndrome Urémico Hemolítico (SUH), diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre, vómito. Intoxicación alimentaria	Niños y adultos que adquieren por comer carne cruda o mal cocida	Toxina Shiga (STx), Lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E), Intimina, pO157, Adhesinas (ToxB, Efa-1, LifA, Saa, OmpA, LPF, Paa, Iha), Ureasa, Autotransportador (EspP), Efector tipo II (StcE), toxinas RTX (Ehx), proteína de unión a inmunoglobulinas (EibG), autotransportador codificado en el gen A (EhaA), Sistema de secreción tipo III (SSTIII).
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal,	Niños menores de seis meses, vómito, fiebre baja hasta dos años	<b>A/E, Pilus formador de bucles (BFP), Plásmido EAF de 50-70MDa, Flagelo, Adhesinas (Intimina, Paa, Iha), Tir, Autotransportador (Esp C), Efectores tipo III (EspF, EspH, Map), Adherencia, EhaA, SSTIII.</b>
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa, puede presentar disentería.	Niños menores de seis meses	Invasividad, Plásmido de 140MDa, Efectores tipo III (IpaA, IpaB, IpaC, IpaH, IpgD, VirA), ShET1, SSTIII, Autotransportadores (Pic, SepA, SigA), Aerobactina, Chu e IcsA,

EAEC	Diarrea líquida, verde con moco, sin sangre, diarrea persistente hasta por 20 días. Diarrea del viajero	Recién nacidos y niños menores de dos años	Fimbria de adherencia agregativa AAFI, II y III, Hda (Adhesinas), ShET1, Autotransportadores (Pet y Pic), Dispersina, Plásmido de 60 Mda, Citotoxina, locus A de invasión toxigénica (Tia), Enterotoxina 1 termoestable (EAST1), ShET1, Hemolisina E (HlyE), toxina secretada autotransportadora (Sat), SigA, EspP
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	Adhesinas Fimbriales F1845 y Dr o afimbrial (Afa), Sat
STEAEC	Intoxicación alimentaria, SUH		AAF, IrgA, STx, Pic, Pet
AIEC	Enfermedad de Crohn		Pilus Tipo 1, Fimbria Polar Larga (LPF)

Fuente: Elaboración propia con base en Clements et al, 2014.

Las infecciones humanas ocasionadas por *E. coli* pueden asociarse al consumo de agua y productos alimenticios contaminados, a la transmisión directa de persona a persona, a malas prácticas higiénicas y a la transmisión por diversos fomites (Batabyal *et al*, 2013; Berger *et al*, 2010; López *et al*, 2013; Luna-Gierke *et al*, 2014a; Shaheed *et al*, 2014). En los países en vías de desarrollo ETEC, EPEC y EAEC son los patogrupos considerados de mayor importancia como agentes causales de diarrea infantil con consecuencias fatales sino son tratadas (Batabyal *et al*, 2013; Gonzalez *et al*, 2013; Roy *et al*, 2013); en los países desarrollados estas infecciones son moderadas o muy limitadas, aunque en los últimos años los patogrupos EHEC, EAEC y STEAEC se han involucrado con brotes de Enfermedades Transmitidas por alimentos (ETA) (Luna-Gierke *et al*, 2014a; Luna-Gierke *et al*, 2014b; Smith *et al*, 2013).

De los patogrupos que más afectan a los países en vías de desarrollo se encuentran ETEC que está relacionada a diarreas en niños menores de 5 años, se considera la causa más común de la diarrea del viajero generando del 10 al 60% de los casos dependiendo de la región visitada, puede afectar al humano y a los animales, se considera relacionada a las ETA (Avelino-Flores *et al*, 2012; Greenwood *et al*, 2008); EAEC es el segundo agente causal de la diarrea del viajero, causa diarrea persistente en niños y se le implica como un patógeno entérico importante que afecta a pacientes con SIDA (González *et al*, 2013; Salmanzadeh-Ahrab *et al*, 2005; Sarantuya *et al*, 2004;); EPEC desde su primera descripción como patógeno intestinal sigue siendo una causa importante de diarrea infantil en diversos países de América Latina, Asia y África, relacionado del 6–54% como el agente causal de diarreas, dependiendo de la zona involucrada (Hao *et al*, 2012; Lääveri *et al*, 2014; Ochoa *et al*, 2011; Vilchez *et al*, 2009).

#### **IV.2. *Escherichia coli* Enteropatógena (EPEC).**

EPEC es un patogrupo importante de *E. coli* diarrogénica que afecta principalmente a niños menores de dos años, originando cuadros agudos o persistentes, principalmente en países en vías de desarrollo. Causa lesiones intestinales histopatológicas características denominadas de adherencia y esfacelamiento (A/E) y no produce toxinas tipo Shiga (Zavaleta *et al*, 2007). Las cepas típicas de EPEC de origen humano presentan un plásmido de virulencia denominado factor de adherencia al enterocito de *E. coli* (EAF *E. coli* adherence factor), mientras que las cepas EPEC atípicas no poseen este plásmido (Brinkley *et al*, 2006; Trabulsi *et al*, 2002). En EPEC los determinantes genéticos para la producción de las lesiones de tipo A/E se encuentran en el locus de esfacelamiento al enterocito (LEE locus of enterocyte effacement). LEE es una isla de patogenicidad (IP) de 35 kb ubicada en el cromosoma bacteriano que contiene los genes que codifican para una proteína de membrana externa denominada intimina (*eae*), genes reguladores, genes que codifican para chaperonas, genes de las proteínas

secretadas (*esp*), el gen que codifica para el receptor translocado de intimina (Tir Translocated intimin receptor) y los genes estructurales para la síntesis del sistema de secreción tipo III (SSTIII) (Elliott *et al*, 1998).

Intimina tiene una masa de 94 kDa, es esencial para la unión íntima de la bacteria con la célula epitelial (Jerse *et al*, 1990), se reconocen más de veinte tipos de intimina (Lacher *et al*, 2006), debido a la alta variabilidad que presenta en la región carboxilo-terminal, responsable de la interacción con Tir (Frankel *et al*, 1996).

Tir es translocado vía el SSTIII (Kenny *et al*, 1997) y se alberga en la membrana plasmática de la célula del hospedero para ello interactúa mediante la región amino terminal. Tir actúa recíprocamente con intimina y permite la unión íntima de la bacteria con la célula hospedera, es importante hacer notar que para que Tir permanezca estable en el citoplasma de EPEC requiere de la chaperona CstT (Crawford and Kaper, 2002).

Otra estructura de la superficie bacteriana presente en las cepas EPEC típicas asociada con la virulencia, es el pilus formador de bucles (Bfp bundle-forming pilus). Se trata de un pilus de adherencia tipo IV, que forma microcolonias a través de interacciones bacteria-bacteria (Girón *et al*, 1993), dando origen al patrón de unión conocido como de adherencia localizada (Santona *et al*, 2013; Scaletsky *et al*, 1984). El conjunto de genes *bfp* está localizado en el plásmido EAF (Tobe *et al*, 1999). En las cepas típicas de EPEC se han descrito dos variantes genéticas mayores del gen *bfpA* que codifica para la proteína “bundlina”. La región variable de esta proteína se ubica en la mitad carboxilo-terminal, que está expuesta al exterior bacteriano y que actúa como dominio de unión a los distintos receptores ubicados sobre la célula eucariota (Contreras *et al*, 2010).

Existen cepas de EPEC denominadas atípicas debido a que aunque poseen la región LEE carecen del plásmido EAF y, por lo tanto, de Bfp, las cuales se han asociado a brotes y casos esporádicos de diarrea en seres humanos (Ochoa, 2009; Wedley, 2013). Las cepas atípicas pueden expresar, además de los factores de virulencia codificados en LEE (intimina, Esp, Tir, SSTIII), otros factores accesorios

como EAST1 (enteroaggregative heat-stable-1-toxin) una toxina estructuralmente relacionada con la enterotoxina termoestable ST1 de ETEC (Wedley, 2013), la enterohemolisina E-hly (EHEC-enterohemolysin) (Al-Hilali y Almohana, 2011 y Afa (afimbrial adhesin).

El SSTIII es necesario para que se lleve a cabo la unión íntima entre la bacteria y el enterocito y para que se presente la lesión A/E, ya que libera varios efectores entre ellos a espA que se polimeriza para dar origen a un filamento y junto con EspB y EspD formar el translocón en la membrana de la célula hospedadora. Una vez formado este filamento EPEC inyecta docenas de proteínas efectoras en el citoplasma de la célula eucariótica que afectan diversas vías de señalización y procesos fisiológicos (Ghosh, 2004; Knutton *et al*, 1998). La colonización por EPEC causa la formación de lesiones A/E sobre la superficie apical de los enterocitos, generando el acortamiento de las microvellosidades y promoviendo la unión íntima, con una subsecuente acumulación de actina en el interior de la célula del anfitrión; in vitro la polimerización de actina causa la formación de estructuras elevadas parecidas a un pedestal debajo de la bacteria unida (Frankel, 1998)

EPEC induce cuadros de diarrea por una variedad de mecanismos, el más conocido es por el esfacelamiento de las microvellosidades del enterocito que causa una superficie reducida para los procesos normales de absorción. Los efectos inmediatos que se inducen durante la transducción de señales durante la patogénesis de EPEC incluyen cambios a nivel intracelular que repercuten con la actividad fisiológica normal de la célula intestinal, tal es el caso del aumento en la secreción de electrólitos al espacio extracelular, permeabilidad de las uniones estrechas intracelulares y remodelación de la región apical del enterocito, estos cambios son los responsables de la diarrea acuosa (Celli *et al*, 2000; Dean *et al*, 2006). EspF and EspG alteran la localización de acuaporinas en las membranas apicales y laterales de los enterocitos afectando el transporte de agua (Guttman *et al*, 2007).



Otro de los factores de virulencia de gran interés para EPEC es el flagelo, ya que además de participar en el desplazamiento de los microorganismos y en las taxias (movimiento en respuesta a atracción o repulsión respecto a factores ambientales) (Shapiro, 1995), se relaciona con la colonización de células epiteliales mediante su adherencia bajo determinadas condiciones microambientales (Girón *et al*, 2002) y en algunos microorganismos también se relaciona con la formación de biopelículas (Colon-Gonzalez *et al*, 2004).

### **IV.3. Flagelo: Estructura y funciones.**

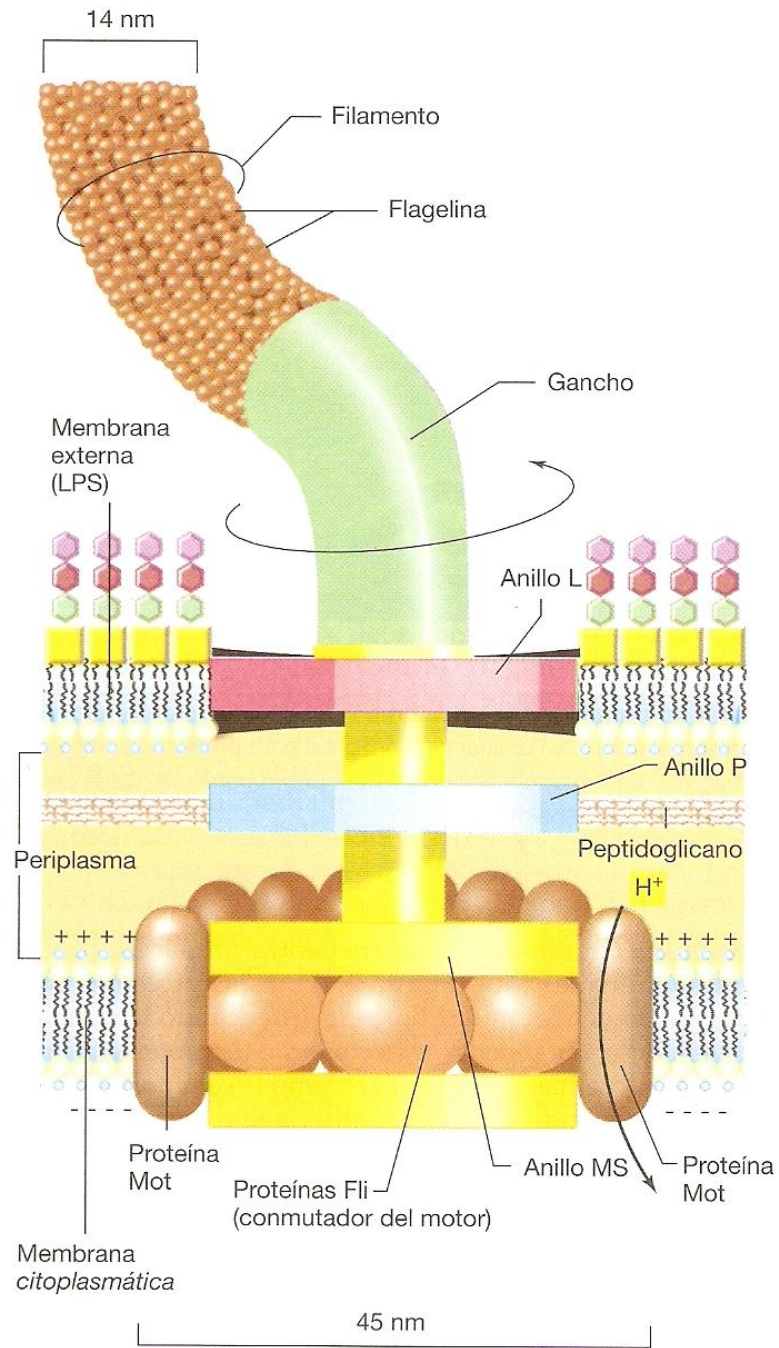
El flagelo es un organelo de la superficie bacteriana con forma de filamento helicoidal, su longitud varía de 5 a 10  $\mu\text{m}$  y su diámetro es de 20 nm, muestra una distancia constante entre cada dos vueltas o curvaturas adyacentes que se denomina longitud de onda que es constante para cada organismo. El flagelo se conforma por cuerpo basal, codo o gancho y filamento, en el cuerpo basal se encuentra el motor flagelar que cuenta con dos regiones principales: el estator, que se encarga de disminuir el movimiento y el rotor, que permite el desplazamiento. El cuerpo basal posee una simetría cilíndrica, está formado por tres anillos (M, S y C) y un eje, los anillos interactúan con varias de las capas de la envoltura celular y permanecen anclados al flagelo; el anillo externo L forma parte integral de la capa de lipopolisacáridos (Madigan *et al*, 2009).

El gancho se une a la célula a través del cuerpo basal por el eje, tiene una longitud fija de entre 50 y 150 nm, en el centro del gancho se encuentra un canal que sirve como vía de exportación de subunidades, permitiendo el intercambio de flagelina entre el gancho y el filamento durante el ensamblaje flagelar. La proteína asociada al gancho permite la asociación adecuada entre los monómeros de flagelina que constituyen el filamento. El filamento se compone de polímeros de la proteína flagelina que es globular, elongada, con peso molecular de 62 kDa y se compone químicamente por aminoácidos ácidos y neutros en abundancia, escasez de aminoácidos básicos y ausencia de triptófano y cisteína. Dicho filamento se

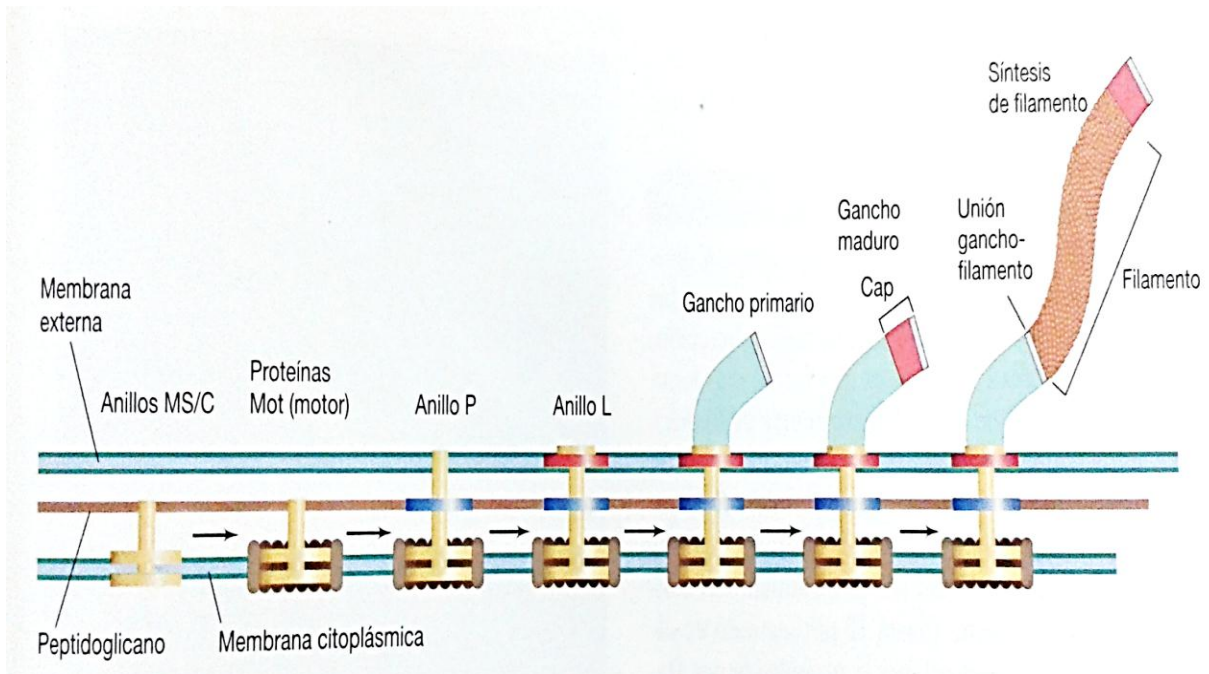
conecta a la célula a través del gancho debido a que este último cuenta con las proteínas asociadas al gancho, que presentan regiones idénticas a la flagelina tanto en el extremo amino como carboxilo terminal, el filamento rota de derecha a izquierda ejerciendo una fuerza sobre el medio gracias a que su forma helicoidal permite traducir la fuerza rotacional de la estructura motora. La propulsión de la célula está dada por el giro en sentido contrario a las agujas del reloj de los anillos del motor, lo que causa la rotación del filamento (Prescott *et al*, 2008) (Figura. 2).

Similitudes morfológicas y bioquímicas se han observado entre los componentes del cuerpo basal y el SSTIII, por lo que el sistema exportador del flagelo es también considerado un mecanismo secretor tipo III (Kubori *et al*, 1998; La Ragione *et al*, 2000). La síntesis, ensamble y función del sistema flagelar de *E. coli* están bajo el control de un regulón flagelar que comprende más de 50 genes distribuidos en 17 operones que codifican tanto para las proteínas del aparato flagelar como para la salida de los componentes del flagelo a través de la membrana (Chilcott and Hughes, 2000) y están implicados en la regulación de muchos procesos bioquímicos que tienen lugar durante la síntesis de nuevos flagelos.

El ensamblaje flagelar es un proceso lineal, que procede desde la región proximal de la célula hasta llegar a la distal, es secuencial, es decir la construcción de una nueva estructura requiere la existencia previa de otra y por lo tanto es ordenado, se sintetiza inicialmente el anillo y se inserta en la membrana, luego se sintetizan otras proteínas de anclaje junto con el gancho antes de que inicie la formación del filamento flagelar. Las moléculas de flagelina se sintetizan en el citoplasma y pasan a través de un canal de 3 nm situado en el interior del filamento hasta situarse por aposición en su extremo. En el extremo en crecimiento de un flagelo existe una proteína terminal denominada CAP, que ayuda a que las moléculas de proteínas que difunden por el canal interior se distribuyan de forma organizada en el extremo terminal para formar la nueva porción de filamento (Figura 3).



**Figura 2.** Estructura del flagelo de bacterias Gramnegativas. El anillo L se inserta en la capa de LPS y el anillo P en el peptidoglicano, el anillo MS se ancla en la membrana citoplasmática y el anillo C en el citoplasma. En el filamento existe un estrecho canal a través del cual la flagelina alcanza su destino durante la síntesis del flagelo. Las proteínas Mot funcionan como motor flagelar y las proteínas Fli constituyen el conmutador del motor. Fuente: Madigan *et al*, 2009.



**Figura 3.** Biosíntesis del flagelo. La síntesis del flagelo se inicia con el ensamblaje de los anillos MS y C en la membrana citoplásmica, seguida de la formación de los otros anillos, el gancho y la proteína terminal, después las moléculas de flagelina conforman el filamento con ayuda de las proteínas Cap que aseguran el desarrollo uniforme del filamento que está en crecimiento. Fuente Madigan *et al*, 2009.

Un filamento requiere aproximadamente 20,000 moléculas de flagelina, este crecimiento se detiene hasta que se alcanza la longitud final. Los flagelos rotos son capaces de rotar y pueden repararse por la nueva llegada de moléculas de flagelina a través (del canal interior que reemplazan a las proteínas que se han perdido (Madigan *et al*, 2009).

El movimiento de rotación del flagelo parte del cuerpo basal que funciona como un motor. La en Las flagelinas muestran una alta homología en los extremos amino y carboxilo terminal y una alta divergencia en la región media de las proteínas, lo que constituye las bases para la serotipificación del antígeno H de las cepas de *E. coli* (MacNab, 2000).

La energía que se necesita para la rotación del flagelo proviene de la fuerza motriz generada por el gradiente de protones. El movimiento transmembranal de

protones a través del complejo Mot estimula la rotación del flagelo, habiéndose calculado que por cada rotación del flagelo se translocan aproximadamente 1.000 protones. Los flagelos no rotan a velocidad constante sino que la velocidad de rotación aumenta o disminuye en relación con la intensidad de la fuerza motriz de protones. La rotación flagelar puede mover a las bacterias a través de un medio líquido a velocidades de hasta 60 longitudes celulares por segundo (0,00017 km/h). Los movimientos de los organismos con flagelos polares y lofotricos son distintos del de los que poseen flagelos peritricos. Los organismos con flagelos peritricos se mueven generalmente en línea recta de una manera lenta y majestuosa. Los organismos con flagelos polares se mueven dando giros periódicos, de una manera más rápida e impetuosa (Stanier *et al*, 2010).

Los flagelos son considerados estructuras complejas asociadas a la virulencia en una amplia gama de bacterias patógenas. Además de la movilidad, está implicado en conducir a la bacteria hacia microentornos benéficos o bien la aleja de lugares adversos (Josenhans y Suerbaum, 2002). Otras de sus funciones son la adhesión a las células del hospedero, la colonización, la hemaglutinación, la formación de biopelículas (Gavin *et al*, 2003; Girón *et al*, 2002; Richardson, 1991).

Se ha observado que la expresión de flagelos y la movilidad en *E. coli* K 12 (no patógena) y algunas otras bacterias es afectada por condiciones de crecimiento tales como variaciones de los valores de pH, temperatura, osmolaridad, sustancias nutritivas orgánicas, y sales (Adler and Templeton, 1967; Kapatral and Minnich, 1995, Kiyukia *et al*, 1993, Walker *et al*, 1999)..

Estudios epidemiológicos de las infecciones causadas por EPEC muestran que las cepas aisladas se restringen a un pequeño número de serogrupos en base al antígeno O, tales como O26, O55, O86, O111, O114, O119, O126, O127, O128 y O142 (Kozub-Witkowski *et al*, 2008), y aún más limitado el tipo de antígenos flagelares (H) (Nataro y Kaper, 1998). En EPEC varios genes asociados a la virulencia son requeridos para la síntesis y función adecuadas del flagelo, se observa que la mutación en algunos genes localizados en el plásmido EAF y en LEE afectan

de forma importante la expresión flagelar y la movilidad de EPEC cuando se crece en medio D-MEM (Girón *et al*, 2002). A pesar de la función importante que desempeña el flagelo de EPĒC en la movilidad y su patogénesis no ha sido estudiado detalladamente en su microambiente y menos aún en el medio ambiente.

#### **IV.4. Flagelo de *Escherichia coli* y su implicación en la adherencia o formación de biopelículas a superficies bióticas o abióticas.**

Las biopelículas son comunes en la naturaleza, se estima que el 80% de la biomasa microbiana terrestre reside en el interior de ellas, y pueden formarse en diversos nichos, incluyendo superficies abióticas, células vivas y en las interfaces aire-líquido de medios líquidos, su resistencia es debida a la compleja matriz extracelular que forman las comunidades bacterianas (Hung *et al*, 2013) como respuesta a las condiciones ambientales (Reisner *et al*, 2006), esta estrategia permite a las bacterias persistir en diversos ambientes, lo que contribuye a la patogenicidad de diversas especies (Mah yO'Toole, 2001). Se ha observado formación de biopelículas en el interior de catéteres (Nicolle, 2005), en suelos, en equipos de explotación de recursos naturales, rastros o plantas de procesamiento de alimentos, en los que incrementa la corrosión, pero principalmente en el área de alimentos constituye un incremento en el riesgo de contaminación del producto por microflora patógena y también en el deterioro del alimento (Donlan, 2002)

Las biopelículas bacterianas son agregados multicelulares unidos a una superficie, embebidos en una matriz extracelular. En *E. coli* esta matriz extracelular está constituida por proteínas, incluyendo varias adhesinas como fibras amiloides y curli; exopolisacáridos como celulosa, poli- $\beta$ -1,6-D-N-acetilglucosamina (PGA) y ácido colánico; y ácidos nucleicos (Flemming y Wingender, 2010; Karatan y Watnick, 2009), que se conforman en una estructura tridimensional, rodeando a la bacteria y protegiéndola contra los daños ambientales, como la desecación, los antibióticos y el sistema inmune del hospedero (Anderson y O'Toole, 2008; Branda *et al*, 2005). En *E.*



*E. coli* K-12 se ha observado que bajo condiciones estáticas de crecimiento los componentes que contribuyen a la formación de biopelículas son flagelo, pili tipo I, proteínas de membrana externa, ácido colánico, y poli- $\beta$ -1,6-D-N-acetilglucosamina (Reisner *et al*, 2006).

Existen diferentes etapas para que se forme una biopelícula estable o madura: a) Inicialmente hay una adherencia reversible de bacterias planctónicas, b) transición entre la adherencia reversible a irreversible por la producción de polímeros extracelulares y/o adhesinas específicas por parte de la bacteria, c) desarrollo temprano de la arquitectura de la biopelícula, d) desarrollo de microcolonias dentro de la biopelícula madura, con la formación de una estructura similar a un pedestal con canales de agua y poros, y e) dispersión de las células desde la biopelícula hacia el ambiente que la rodea con el retorno de las bacterias a células planctónicas (Donlan, 2002; Dunne, 2002; Stoodley *et al*, 2002).

En *E. coli* patogénicas el pilus tipo I o la adhesina AG43 están involucradas en la adherencia inicial y el PGA y las fibras curli estabilizan la unión permanentemente ya sea dentro del hospedero o en superficies abióticas (37°C) ((Agladze *et al*, 2005; Danese *et al*, 2000). Las bacterias que crecen en el ambiente o en superficies abióticas a bajas temperaturas (<30°C) forman biopelículas con diferente composición, ya que usan al flagelo y a curli para la adhesión inicial, y a la celulosa y al ácido colánico como la matriz de maduración de la biopelícula (Beloin *et al*, 2008; Pratt y Kolter, 1998; Wood *et al*, 2006). Sin embargo *E. coli* K-12 no produce celulosa, como algunas cepas ambientales (Da Re y Ghigo, 2006).

En *E. coli* K-12 la transición entre la movilidad flagelar y la vida sedentaria en la biopelícula está inversamente regulada por dos cascadas transcripcionales, la cascada flagelar FlhDC + $\sigma^{70}/\sigma^F$  y la cascada CsgD/MlrA/ $\sigma^S$ , las cuales son activas en la fase post-exponencial de crecimiento y en la fase celular estacionaria, respectivamente. La producción de flagelo y la síntesis de los componentes de la matriz de la biopelícula son mutuamente excluyentes (Pesavento *et al*, 2008; Pesavento y Hengge, 2012). Las señales que modulan esta transición son la

limitación de nutrientes, la baja temperatura y las alteraciones en la envoltura celular, es importante hacer notar que la estructura de las biopelículas no son siempre iguales sino que van a depender incluso de cada cepa que la esté formando y que son diferentes en cepas de *E. coli* diarrogénicas y cepas de *E. coli* ambientales (Reisner *et al*, 2006). Todo esto sienta las bases para estudiar específicamente a EPEC bajo ciertas condiciones para conocer si las biopelículas son una estrategia para su sobrevivencia en medios extraintestinales.

## V. JUSTIFICACIÓN.

En la edad de las vacunas, los antibióticos y los progresos científicos, las enfermedades infecciosas deberían estar controladas. En México, EPEC ha sido implicada en un importante porcentaje de casos de diarrea en niños menores de dos años, las cifras de letalidad de este microorganismo en países subdesarrollados son del 20 al 50%, lo que convierte a la infección por EPEC en un problema de salud que requiere una respuesta inmediata. Las infecciones diarreicas son un problema ambiental que debe ser atendido y solucionado con presteza, para ello es fundamental conocer cómo los microorganismos a pesar de las estrategias sanitarias, de los tratamientos con antibióticos y de los avances en el diagnóstico, siguen siendo un problema de salud pública; ¿Cuáles son las estrategias que los microorganismos desarrollan para sobrevivir y persistir en el ambiente? El estudio de los microambientes brinda información acerca de las condiciones que requiere un microorganismo para su desarrollo y de forma indirecta para su control. Estudios previos han demostrado la importancia del flagelo para que la bacteria se desplace y se adhiera a las células del hospedero pero falta dilucidar como el flagelo esta involucrado en la persistencia ambiental de EPEC, aún en condiciones adversas como es la presencia de metales pesados, lo que contribuirá a conocer mejor sus estrategias de sobrevivencia, cómo contribuye en la formación de biopelículas cuyo impacto en la salud, el ambiente, la agricultura y la industria en general, es muy importante. Además existen pocos estudios que traten del comportamiento del flagelo de *E. coli* diarrogénicas y en especial de EPEC, ya que la mayoría se han hecho con el flagelo de *E. coli* K-12 que no es patógena, y tal como se mostró en este estudio no presentan el mismo comportamiento en todos los casos.

## **VI. OBJETIVOS**

### **VI.1. Objetivo general.**

Determinar las condiciones nutricionales y microambientales que favorecen la expresión flagelar de EPEC, su sobrevivencia y la adherencia y/o formación de biopelículas a superficies bióticas y/o abióticas.

### **VI.2. Objetivos específicos.**

- Determinar las condiciones nutricionales y microambientales que favorecen la transcripción y expresión flagelar de EPEC.
- Simular el ambiente intestinal para la mejor expresión flagelar de EPEC a partir de los componentes y de las condiciones que influyeron en la transcripción y la expresión de flagelo.
- Determinar como la presencia de metales pesados afecta la transcripción y la expresión flagelar, y la sobrevivencia de EPEC, a partir de las concentraciones pre-establecidas por la normatividad que afectan la viabilidad de los microorganismos.
- Estudiar la formación de biopelículas de EPEC en presencia de metales pesados, como mecanismo de resistencia ambiental; y el receptor específico del flagelo de EPEC para la adherencia a células epiteliales.

## **VII. HIPÓTESIS**

La transcripción y la expresión del flagelo de EPEC se ven influenciadas por las condiciones nutricionales y microambientales al igual que la adherencia y/o formación de biopelículas.

## VIII. METODOLOGÍA.

Los parámetros que se evaluaron de forma general para observar el comportamiento del flagelo ante diferentes condiciones ambientales y nutricionales fueron: crecimiento bacteriano; transcripción flagelar, que fue medida mediante los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa; expresión de flagelina, que se determinó mediante inmunoelectrotransferencia; y funcionalidad flagelar que se evaluó mediante pruebas de movilidad. Todos los ensayos fueron realizados al menos en tres ocasiones diferentes y por triplicado, por lo que los resultados se consideran reproducibles y confiables. Además se evaluó su capacidad para formar biopelículas y/o agregados a vidrio y la forma en que el flagelo H6 de EPEC se une a células epiteliales.

### VIII.1. Cepas utilizadas y condiciones de cultivo.

#### VIII.1.1. Cepas utilizadas.

Las cepas empleadas en este estudio fueron *E. coli* E2348/69 (O127:H6), que es una cepa patógena de EPEC, la cepa AGT01 que es la *E. coli* E2348/69 mutada en el gen de la flagelina (*fliC*) y la cepa *E. coli* DH5 $\alpha$  (no patógena), las cuales se utilizaron para monitorear el crecimiento bacteriano, la expresión de flagelina y la funcionalidad flagelar. Para medir la transcripción flagelar se emplearon las cepas antes mencionadas pero transformadas con la fusión transcripcional *fliC::lacZ*, las cepas originales y las cepas resultantes de la transformación se pueden consultar en la tabla 4. Las cepas se activaron en agar Luria Broth (LB), incubándose por 24 h a 37°C y de ahí se tomaron para realizar los ensayos correspondientes.

### **VIII.1.2. Medios de cultivo.**

Las cepas se crecieron en medios diferentes, dependiendo de los requerimientos del ensayo. Los medios que se emplearon durante los ensayos fueron LB, Medio Eagle modificado por Dulbecco's (D-MEM), M9 que es un medio especial para los ensayos de carbohidratos y D-MEM precondicionado (PD-MEM).

El medio PD-MEM fue preparado por incubación del D-MEM con monocapas de células HeLa durante 24-48 h sin adición de suero fetal bovino ni antibióticos. El sobrenadante después de la incubación es el denominado PD-MEM, el cual fue recolectado y se le ajustó el valor de pH a 7.4, fue esterilizado mediante filtración (filtros de 0.22 micras) (Girón *et al*, 2002) y suplementado con ampicilina para crecer las cepas que contenían a los plásmidos pRS551 o pFAV36; o usado sin adición de antibióticos para los ensayos de crecimiento bacteriano, expresión de flagelina y movilidad, excepto para AGT01 a la que se le adicionó kanamicina.

Al terminar de determinar las diferentes condiciones que favorecen la expresión flagelar de EPEC E2348/69, se formuló un medio de cultivo especial al que denominamos medio suplementado, con las sustancias que por separado favorecieron la transcripción de *fliC*, este medio se describe en el apartado de resultados.

### **VIII.1.3. Condiciones de cultivo.**

Las cepas se inocularon en los medios y condiciones especiales y se incubaron a 37° C con agitación a 200 rpm. Los ensayos con metales pesados se llevaron a cabo a temperatura ambiente. Para determinar la influencia de la fuente de carbono en el comportamiento del flagelo, se utilizó el medio M9 y se adicionó con alguna de las cuatro fuentes de carbono utilizadas: glucosa, sacarosa, citrato y acetato, a las concentraciones de 20, 40,80 y 160 mM. Las sales, nutrientes y compuestos orgánicos empleados, al igual que las concentraciones probadas se

detallan en la tabla 3. Cuando las cepas requirieron ser crecidas a diferentes valores de pH el medio se ajustó, usando un buffer 0.1M de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-Na<sub>2</sub>H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> combinado con 1% de glicerol para obtener valores de pH de 6.2, 7.2 y 8.2 (Schwan *et al*, 2002). Las cepas se incubaron en presencia de oxígeno o dióxido de carbono al 5%, cuando así lo requirió el ensayo. Otra de las condiciones que se evaluó fue la expresión flagelar en presencia de células.

## **VIII.2. Crecimiento bacteriano.**

Un inóculo de 200 µL de cada cepa de *E. coli* (EPEC E2348/69, AGT01 y *E. coli* DH5α, proveniente de un cultivo de 21 h (DO<sub>600</sub> =1) fue adicionado a 5 mL de caldo LB y/o D-MEM conteniendo diferentes concentraciones de los sustratos que fueron ensayados (Schwan *et al*, 2002). A la cepa AGT01 se le agregó kanamicina, el crecimiento se midió después de 4 h de incubación a una DO<sub>600</sub>. En el experimento se empleó como condición basal el medio sin adición de sustrato extra.

## **VIII.3. Transcripción flagelar.**

Se monitoreo la transcripción flagelar por medio de la producción de β-galactosidasa, para lo cual se llevó a cabo previamente la construcción de la fusión transcripcional y la transformación de las cepas en estudio.

### ***VIII.3.1. Construcción de la fusión transcripcional del promotor del gen *fliC* y del operón *lacZ* (*fliC::lacZ*) para monitorear la transcripción flagelar.***

Se construyó una fusión transcripcional del promotor de *fliC* de EPEC con el gen reportero *lacZ* (sin promotor) y se utilizó para monitorear la expresión de *fliC* en EPEC E2348/69 o en *E. coli* K-12 DH5α en varias condiciones de crecimiento.



**Tabla 3.** Sustancias y concentraciones empleadas para los ensayos de transcripción y expresión flagelar, y de movilidad de EPEC.

<b>I. Nutriente/sal/meta l/neurotransmisor</b>	<b>Concentraciones en mM, excepto cuando se especifique</b>							
<b>Glucosa</b>	20	40	80	160				
<b>Sacarosa</b>	20	40	80	160				
<b>Citrato</b>	20	40	80	160				
<b>Acetato</b>	20	40	80	160				
<b>Sulfato de magnesio</b>	5	20	100					
<b>Cloruro de magnesio</b>	5	20	100					
<b>Cloruro de manganeso</b>	5	20	100					
<b>Cloruro de calcio</b>	1.8	5	7					
<b>Oxalato de amonio</b>	5	20	100					
<b>Cloruro de amonio</b>	5	20	100					
<b>Sulfato de amonio</b>	5	20	100					
<b>Cloruro de sodio</b>	50	100	150	200	250	300		
<b>Bisulfito de sodio</b>	5	20	100					
<b>Bicarbonato de sodio</b>	22	44						
<b>Desoxicolato de sodio</b>	0.05%	0.10%	0.20 %					
<b>Adrenalina</b>	0.3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	3000 $\mu$ M					
<b>Noradrenalina</b>	0.3 $\mu$ M	30 $\mu$ M	3000 $\mu$ M					
<b>II. Metales pesados</b>	<b>Concentraciones en mg/L</b>							
<b>Sulfato de zinc</b>	1	3	9	18	27			
<b>Cloruro de cobre II</b>	1	2	4	8	15			
<b>Cloruro de mercurio II</b>	0.0005	0.001	0.002	0.004	0.008	0.016		
<b>Acetato de plomo II</b>	0.01	0.1	1	10	100			
<b>Cloruro de cadmio</b>	0.001	0.003	0.009	0.027	0.1	0.25	0.5	0.75
<b>Cloruro de cromo III</b>	0.002	0.01	0.05	0.25	0.5	0.75		
<b>Cloruro de hierro III</b>	0.1	0.3	0.9	2.7				
<b>III. Desinfectantes a base de metales pesados</b>	<b>Concentraciones en mg/L</b>							
<b>Nitrato de plata</b>	0.001	0.01	0.1	0.3				
<b>Cloruro de cobalto II</b>	0.01	0.05	0.1	0.15	0.2	0.25		

Para construir la fusión del promotor de *fliC* fueron usados los iniciadores FAV3 (5'-CGCGGATCCAAACGGTTAGCAATCGCCTG-3'), esta secuencia está localizada en la región que codifica para el gen *fliC* de EPEC ([www.sangerinstitute.org](http://www.sangerinstitute.org)) y FAV5 (5'-TCAAGCTTGGAAGCTTAAATCCAG-3') que se localiza en la región que codifica para el gen *fliD* basado en la secuencia de *E. coli* K-12 MG1655. El producto fue amplificado por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con la polimerasa *Pwo* usando como DNA molde el de la cepa E2348/69, el producto fue ligado dentro de pCR-Blunt II-TOPO y se denominó pFAV35. Un fragmento proveniente de pFAV35 digerido con *EcoRI* que contenía al promotor de *fliC* fue ligado dentro del vector pRS551 en el sitio de *EcoRI* (Mellies *et al*, 1999), y se denominó como pFAV36. Este plásmido fue transformado dentro de la cepa E2348/69 (FAV28), dentro de la mutante de *fliC* (FAV29) y en *E. coli* K-12 DH5 $\alpha$  (FAV30) (tabla 4), la expresión de la fusión *fliC::lacZ* fue monitoreada mediante la medición de la actividad de  $\beta$ -galactosidasa como ya se ha descrito por el método de Miller (Mellies *et al*, 1999; Sperandio *et al*, 2001). Como controles negativos fueron utilizadas las cepas E2348/69 y DH5 $\alpha$  transformadas sólo con el plásmido pR551.

### **VIII.3.2. Transformación de las cepas.**

La transformación de las cepas fue por electroporación modificando el método propuesto por Dower (Dower *et al*, 1988). A partir de un inóculo bacteriano crecido durante toda la noche a 37°C y en agitación (200 rpm), se realizó una dilución 1:50 en medio fresco y se incubó el cultivo hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.3 (aproximadamente 3 h), se tomó una alícuota de 1 mL de este cultivo y se inocularon 25 mL de medio fresco (4 tubos) y se incubaron a 37°C con agitación (200 rpm) hasta alcanzar una DO<sub>600</sub> de 0.48. Los cultivos se centrifugaron a 4100 rpm durante 10 minutos en tubos de 50 mL, el sobrenadante se descartó completamente y a continuación las células fueron lavadas 3 veces con agua bidestilada por centrifugación (2,000 rpm, 10 minutos, 4°C) y resuspendidas en 1 mL de agua bidestilada estéril (4 mL de volumen final total), las células electrocompetentes

obtenidas se colocaron en alícuotas de 200 mL en tubos Eppendorf (estériles y preenfriados a -20°C) y se congelaron rápidamente a -70°C. Se prepararon células electrocompetentes de las cepas E2348/69, AGT01 y DH5 $\alpha$ .

**Tabla 4.** Cepas transformadas y transformantes obtenidas.

CEPA ORIGINAL	PLÁSMIDO	CEPA TRANSFORMANTE
EPEC E2348/69	pRS551* pFAV36***	Control 1 FAV28
AGT01 (E2348/69 mutante en flagelo)	pFAV36	FAV29
<i>E. coli</i> K-12 DH5 $\alpha$	pRS551 pFAV36	Control 2 FAV30

\* pRS551 – plásmido sin fusión transcripcional

\*\*pFAV36– plásmido pRS551 con la fusión transcripcional *fliC::lacZ*

Para la electrotransformación, se transfirieron 50  $\mu$ L de células electrocompetentes a cubetas de electroporación de 1 mm de separación y se mantuvieron en hielo durante 5 minutos, se mezclaron con 1  $\mu$ L del plásmido (pRS551 o pFAV36) y se realizó la electroporación a 1800 V en un equipo EC100 (Apparatus Corporation). Una vez realizada la descarga, las células se resuspendieron inmediatamente en 1 mL de medio SOC sin antibióticos (Hanahan, 1983), y se incubaron durante 1 h a 37°C y 200 rpm para permitir la expresión de los marcadores fenotípicos (resistencia a antibióticos). Las células transformantes fueron seleccionadas en placas de agar LB suplementadas con ampicilina y se incubaron durante 18-24 h a 37°C.

### **VIII.3.3. Ensayos de $\beta$ -galactosidasa.**

La transcripción flagelar se midió a través del ensayo de  $\beta$ -galactosidasa, para el cual 100  $\mu$ L de un cultivo de 21 h, se inocularon a 5 mL de caldo LB o D-MEM (dilución 1:50) reconstituidos con las diferentes sustancias a ensayar, los cultivos se

incubaron 4 h a 37°C y a 200 rpm ( $DO_{600}$  entre 0.65-0.70), cuando se requirió los cultivos se incubaron en presencia de oxígeno o de dióxido de carbono al 5%. Al finalizar la incubación los tubos se colocaron en hielo por 20 min. Después se tomaron 500  $\mu$ L de cada cultivo y se agregaron a 500  $\mu$ L de Buffer Z ( $Na_2HPO_4$  0.06M,  $NaH_2PO_4$  0.04 M, KCl 0.01 M,  $MgSO_4$  0.001 M,  $\beta$ -mercaptoetanol 0.05 M), se agregó cloroformo y SDS al 0.1 % y se mezcló, se incubó a temperatura ambiente, a esta mezcla se le adicionaron 200  $\mu$ L de ONPG (orto-nitro-fenil- $\beta$ -galactósido) y se mezcló nuevamente, se incubó la reacción a temperatura ambiente hasta la aparición de un color amarillo. Se detuvo la reacción con 500  $\mu$ L de  $Na_2CO_3$  1M. Se tomaron las lecturas espectrofotométricas para aplicar la ecuación de Miller (Miller, 1972; Sperandio *et al*, 2001). La actividad basal de la  $\beta$ -galactosidasa en los medios sin adición de sustancias, se usaron como referencia para el análisis por Kruskall-Wallis.

#### **VIII. 4. Inmunoelectrotransferencia.**

Para determinar la producción de flagelina, se prepararon extractos de bacteria completa con las cepas E2348/69, AGT01 y DH5 $\alpha$ , estas fueron crecidas bajo las diversas condiciones ensayadas, los cultivos se ajustaron a una  $DO_{600}$  entre 0.65-0.70 e igual cantidad de bacterias fueron usadas para preparar los extractos mediante desnaturalización por calor, en buffer de muestra SDS-PAGE, las proteínas se separaron por electroforesis en geles de acrilamida al 14% (SDS-PAGE), las proteínas fueron transferidas a una membrana de nitrocelulosa en un equipo Bio-Rad semi-dry (Trans-blot SD). Las proteínas transferidas se retaron con anticuerpos policlonales anti-flagelo H6 de conejo, se utilizó como anticuerpo secundario anti-IgG de conejo marcado con peroxidasa (Sigma-Aldrich Corporation St. Louis, USA) y se reveló con DAB (diamonibencidina). Se usó como control de la concentración de proteínas cargada en los geles la proteína DnaK (Girón *et al*, 2002).

### **VIII.5. Pruebas de movilidad.**

Este parámetro da información acerca de la funcionalidad del flagelo, una vez concluidos los procesos de transcripción y traducción flagelar. Para evaluar este parámetro se prepararon placas con agar al 0.25 % de los diferentes medios ensayados adicionados con los sustratos probados en cada caso, cada placa se sembró por picadura en el centro sin tocar el fondo de la placa y se incubó 12 h a 37° C, después de la incubación se midieron los halos de movilidad., realizando esto por triplicado. Cuando fue necesario los cultivos fueron crecidos en presencia de dióxido de carbono al 5%. Una vez obtenidos los resultados, se compararon para verificar diferencias significativas entre el basal y cada una de las diferentes concentraciones ensayadas (Sperandio *et al*, 2001).

### **VIII.6. Adherencia a células epiteliales.**

Células HeLa fueron cultivadas a 37°C en tensión de dióxido de carbono en placas de poliestireno de 24 pozos (Corning) que contenían cubreobjetos circulares de vidrio, cuando alcanzaron el 80% de confluencia fueron lavadas y posteriormente infectadas con 10<sup>7</sup> bacterias, provenientes de un cultivo de 18-24 h, después de la infección se incubaron durante 3 h a 37°C y en tensión de dióxido de carbono al 5% sin agitación. Cuando terminó el tiempo de infección, se recuperaron los sobrenadantes y fueron utilizados para llevar a cabo las determinaciones de transcripción mediante ensayos de actividad de β-galactosidasa y de expresión de flagelo por inmunoelectrotransferencia. Cabe destacar que al ser los cultivos celulares incubados sin agitación el crecimiento bacteriano es más lento y la DO que se alcanzó fue menor, por lo que a primera vista los incrementos en las determinaciones podrían parecer no significativos por lo que se corrió a la par un ensayo control.

## **VIII.7. Formación de Biopelículas**

Para la formación de biopelículas se utilizaron placas de 24 pozos, cada pozo contenía un cubreobjetos circular con 2 mL de caldo LB y la concentración correspondiente de cada sustancia, se inocularon con 100  $\mu$ L de un cultivo de 24 h de las cepas en estudio; incubando a 28° C por 24, 48 y 72 h respectivamente y por triplicado, posteriormente se fijaron con formalina al 2%, para después teñirlas con una dilución 1:20 de Giemsa, y fueron observadas en el microscopio a 100x para localizar a las biopelículas y/o agregados bacterianos (Bowden y Li, 1997).

## **VIII.8. Determinación de las propiedades adhesivas del flagelo H6 de EPEC.**

### ***VIII.8.1. Determinación de la unión de flagelo H6 a proteínas de matriz extracelular (PMEC).***

La electroforesis de proteínas se llevó a cabo como se describe en el apartado VI.4., pero la transferencia se llevó a cabo en membranas de difluoruro de polivinilo (PVDF) y ya inmovilizada la flagelina fue incubada con cada una de las proteínas de ECM a una concentración de 5 $\mu$ g/mL (Colágena, laminina, fibronectina y vitronectina) después se hicieron reaccionar con anticuerpos primarios, dirigidos individualmente a las PMEC, posteriormente a un anticuerpo secundario anti-IgG de conejo o ratón acoplado a peroxidasa y se reveló con el kit ECL Plus Western blotting detection reagents (GE Biosciences).

### ***VIII.8.2. Unión de bacterias a las Proteínas de Matriz Extracelular (PMEC).***

Se colocaron 100  $\mu$ L de cada una de las proteínas PMEC: colágena, fibronectina, laminina y vitronectina (Sigma) a una concentración de 1  $\mu$ g/mL sobre un cubreobjetos circular de vidrio y se fijaron con formalina al 2%, después se lavaron con PBST (PBS con tween), y se le agregaron 50  $\mu$ L de cultivo bacteriano

ajustado a una  $DO_{600}$  de 1.1 en 1 mL de PBS para cubrir completamente el cubreobjetos y se incubó durante 3 h. Posteriormente los cubreobjetos fueron lavados tres veces con PBST, se fijaron con metanol, se tiñeron con Giemsa (Sigma) y después se observaron al microscopio óptico (Erdem *et al*, 2007).

### ***VIII.8.3. Prueba de unión del flagelo a las Proteínas de Matriz Extracelular mediante ensayo de ELISA.***

En este ensayo se ocuparon placas para ELISA (enzyme-linked immunosorbent assay), las cuales se sensibilizaron con flagelo H6 purificado (aproximadamente 1 ng/pozo) diluido en búfer de carbonatos (pH 9.8) a 4°C durante 18 h. Después de este tiempo las placas se lavaron y se bloquearon con BSA (Albúmina sérica bovina) al 3% en PBST durante 1 h y se lavaron. Se les adicionaron diluciones seriadas de las proteínas de matriz extracelular (0.01 a 100  $\mu\text{g/mL}$ ) y se incubaron a 37°C durante una h y se lavaron con PBST (ensayos por cuadruplicado), después se incubaron a 37°C durante una h con los anticuerpos correspondientes dirigidos contra cada una de las proteínas de matriz, al término de la incubación se lavaron. Posteriormente se incubaron las placas a 37°C durante 1 h con el anticuerpo anti-IgG de conejo o de ratón acoplado a fosfatasa alcalina, a los controles negativos no se les adicionó flagelo. Después de revelar las placas se leyeron a una  $DO_{405}$  en un lector de ELISA (Multiskan EX de Labsystems) (Erdem *et al*, 2007).

### **VIII.9 Análisis Estadístico.**

Los valores obtenidos en cada ensayo se graficaron, obteniendo la media y la desviación estándar para cada uno de ellos.

El análisis estadístico se realizó usando la prueba de Kruskal Wallis para verificar si existe diferencia significativa entre el basal y cada una de las diferentes condiciones ensayadas.



## IX. RESULTADOS

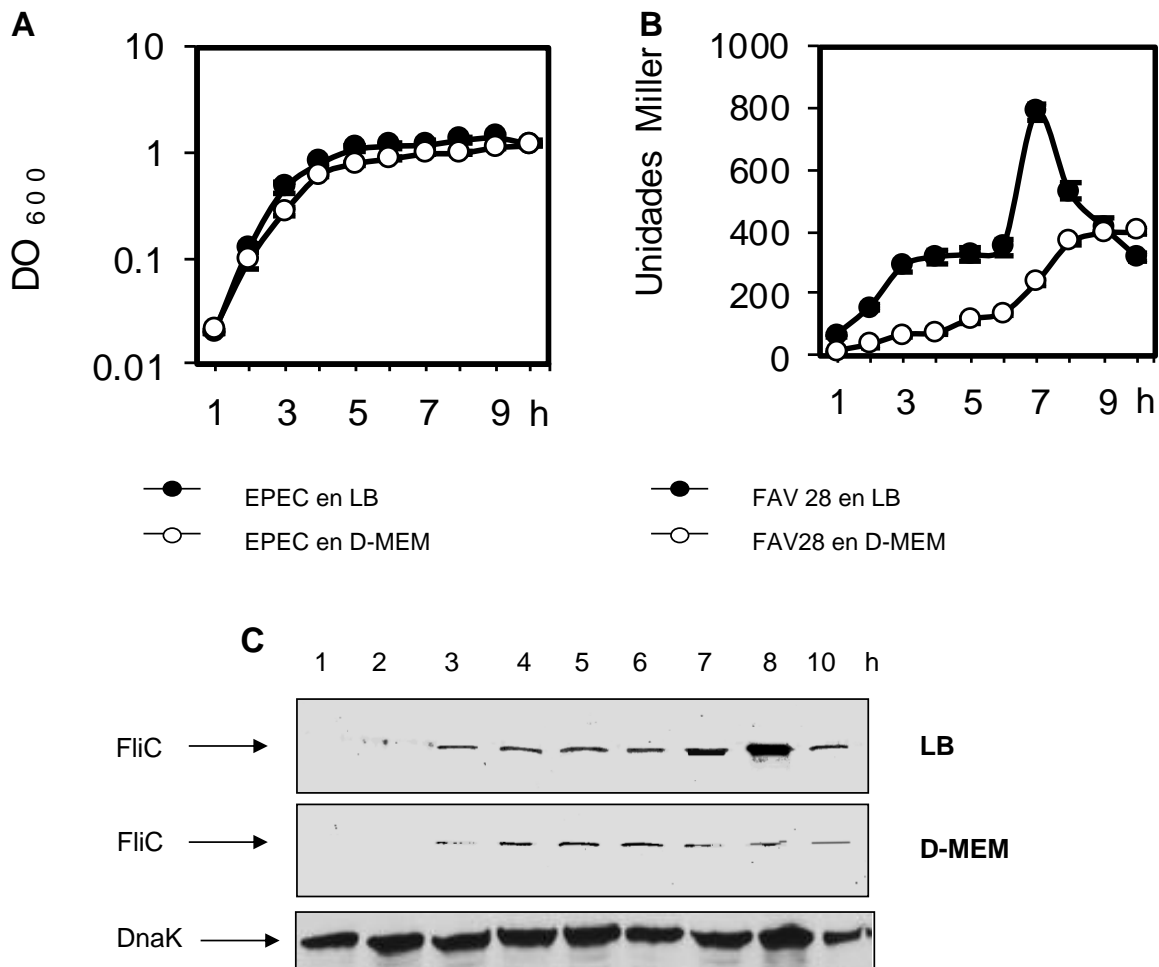
Durante el desarrollo de la tesis se trabajó con varias cepas: EPEC E2348/69 (O127:H6), *E. coli* K-12 (DH5 $\alpha$ ), AGT01 que es la mutante de flagelo de EPEC, las cepas transformadas con la fusión transcripcional *fliC::lacZ* que se emplearon para los ensayos de transcripción flagelar y las cepas control para los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa, en las Figura de los resultados solo se presentan los datos obtenidos para la cepa de EPEC y de *E. coli* K-12, los datos para AGT01 y los controles no se presentan. Para correlacionar los datos de transcripción con la producción o expresión de flagelina, se llevaron a cabo en paralelo los ensayos de  $\beta$ -galactosidasa y la síntesis de *FliC* que fue determinada por inmunoelectrotransferencia bajo las mismas condiciones de crecimiento, empleando concentraciones estandarizadas de cultivos bacterianos. Para visualizar que las proteínas fueran equivalentes se utilizó al anticuerpo anti-DnaK. Para todos los casos estudiados se observó una fuerte correlación entre la transcripción y la traducción (expresión de *FliC*).

La movilidad de EPEC bajo las diferentes condiciones nutricionales y ambientales que presentaron un mayor impacto en la transcripción y expresión flagelar se muestra en la tabla 5, al final de la sección IX.4.1.

### IX.1. Cinética de transcripción y de expresión de la flagelina de EPEC.

Aunque el crecimiento para EPEC fue muy parecido tanto en LB como en D-MEM (Figura 4A), se observó que la transcripción flagelar presentó diferentes patrones de comportamiento en ambos medios de cultivo, observándose que en LB la transcripción se incrementó gradualmente a las 7 h y empezó a disminuir a las 8 h, en D-MEM la transcripción flagelar no se reprime totalmente pero fue notablemente

más baja que para LB (Figura 4B). Con esto se confirmó que D-MEM reprime o no dispara la expresión de flagelo en comparación con LB ( $p=0.0046$ ) (Girón *et al*, 2002).



**Figura 4.** Cinética de transcripción y expresión flagelar. El crecimiento microbiano fue seguido espectrofotométricamente a una  $DO_{600}$  y se observó que no existió diferencia significativa entre las dos cepas (A). Se muestra la cinética de transcripción flagelar de EPEC que fue mayor en LB que en D-MEM, la transcripción flagelar de EPEC se observó incrementada gradualmente hacia las 7 y 8 h (B). La síntesis de flagelina fue monitoreada por inmunoelectrotransferencia usando anticuerpos de conejo anti-flagelo H6 conejo y correlacionó con la transcripción flagelar, también se incluye los anticuerpos anti-DnaK para mostrar la igualdad en las concentraciones de las proteínas usadas para este ensayo (C). Los datos son el resultado de tres experimentos por triplicado. Fuente: Elaboración propia, 2014.

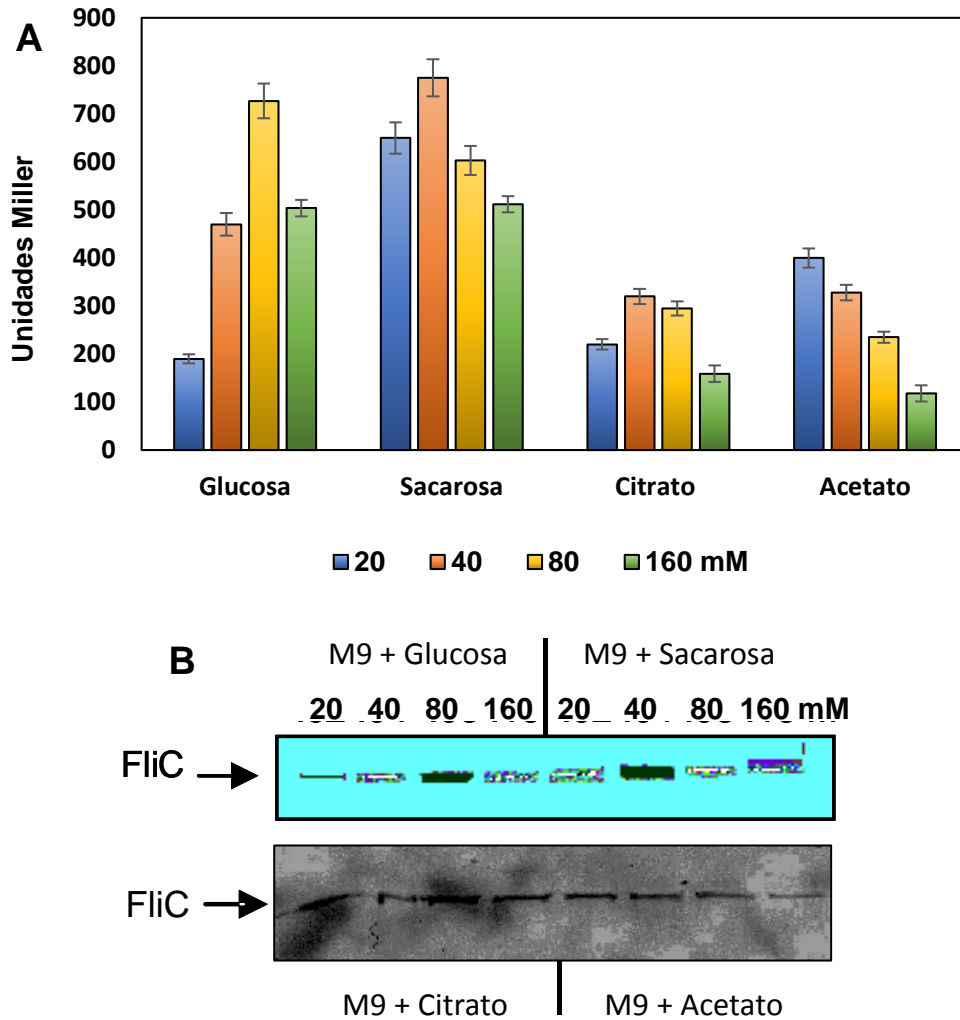
Se observó que la síntesis de flagelina presentó el mismo patrón dependiente de la fase de crecimiento (Figura 4C) que se reportó previamente para *E. coli* K-12, que mostró que la bacteria en fase exponencial se mueve más que la bacteria en fase estacionaria (Adler y Templeton, 1967), para EPEC no existen reportes previos.

## **IX.2. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC bajo diferentes condiciones nutricionales.**

### ***IX.2.1. La presencia de glucosa y sacarosa favorecen la transcripción y expresión flagelar de EPEC.***

Para determinar el efecto de diferentes fuentes de carbono sobre la expresión de *fliC* de EPEC se utilizó el medio mínimo M9 y se adicionó con la fuente de carbono a probar (glucosa, sacarosa, acetato y citrato) en las concentraciones de 20, 40, 80 y 160 mM. De las fuentes de carbono que se utilizaron, la glucosa y la sacarosa fueron las dos que favorecieron la transcripción y la expresión de flagelo, para la glucosa la transcripción máxima se observó a una concentración de 80 mM ( $p=0.002$ ) y para la sacarosa a la concentración de 40 mM ( $p=0.001$ ) (Figura 5A). Se observó que a una concentración baja de sacarosa como lo es 40 mM se induce ligeramente el nivel de expresión de *FliC*, comparado con la glucosa. En contraste a lo observado para *E. coli* K-12 en presencia de glucosa para la cual se reporta un efecto negativo en la movilidad, para EPEC se observó que a la concentración de 80 mM se incrementó la expresión flagelar indicando que la glucosa está regulándolo positivamente. Se observó que tanto la transcripción como la expresión flagelar se comportaron de forma similar (Figura 5B).

La adición de citrato y acetato como fuentes alternativas de carbohidratos no incrementaron la transcripción y la expresión flagelar más que la glucosa, y en el caso del acetato se observó un efecto de decremento dosis dependiente en la transcripción flagelar hasta de un 70.5% menos a la concentración de 160 mM ( $p=0.002$ ) (Figura 5).



**Figura 5.** Transcripción (A) y expresión (B) del flagelo de EPEC a diferentes concentraciones de fuentes de carbono, glucosa, sacarosa, citrato y acetato en medio M9. Fuente: Elaboración propia, 2014.

Estas pruebas no se llevaron a cabo en *E. coli* K-12 porque ya se ha reportado que la presencia de glucosa y de otros carbohidratos ejercen una represión catabólica sobre su flagelación y movilidad (Adhler y Templeton, 1967). No existió diferencia significativa para el crecimiento bacteriano en presencia de las diferentes fuentes de carbono utilizadas (datos no mostrados).

### **IX.2.2. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC y *E. coli* K-12 en presencia de iones divalentes.**

Se ha reportado que diferentes moléculas químicas disparan la expresión de factores de virulencia de algunos patógenos intestinales cuando son adicionados a LB o D-MEM. Comúnmente son cationes divalentes, los cuales son elementos clave tanto para la integridad de la membrana celular como para muchas otras funciones celulares. En EPEC, la expresión del pilus formador de bucles (BFP) y de las proteínas efectoras del Sistema de Secreción tipo III, son influenciados por la presencia de cationes divalentes como el  $\text{Ca}^{+2}$  y el  $\text{Mg}^{+2}$  cuando se adicionan a los medios de cultivo (Kenny *et al*, 1997; Puente *et al*, 1996).

En este estudio se emplearon sales catiónicas divalentes como son  $\text{MgSO}_4$ ,  $\text{MgCl}_2$ ,  $\text{CaCl}_2$ ,  $\text{MnCl}_2$  a varias concentraciones (5, 20, and 100 mM) para conocer su papel en la transcripción y expresión flagelar, así como el crecimiento y la movilidad de EPEC, tanto en LB como en D-MEM. La adición de 5 mM de sulfato de magnesio a LB incrementó significativamente la transcripción flagelar de EPEC tanto en LB (2.7 veces,  $p=0.0116$ ) como en D-MEM (2.6 veces,  $p=0.029$ ), éste fue el incremento mayor observado, ya que a las tres concentraciones empleadas se observó una mayor transcripción (Figura 6A). *E. coli* K-12 presentó un comportamiento muy diferente ya que al adicionar  $\text{Mg}^{+2}$ , la transcripción disminuye gradualmente hasta un 37.5% a la concentración de 100 mM en LB, este comportamiento también se presentó en D-MEM pero los efectos fueron más notorios (78.1%) (Figura 6A). La expresión flagelar mostró un patrón muy similar para EPEC y para *E. coli* K-12, respectivamente (Figura 6B).

Cuando se adicionó a LB una concentración de 5 mM de cloruro de magnesio, la transcripción de *fliC* de EPEC se incrementó cuatro veces comparado con el LB sólo ( $p=0.0221$ ) y a la concentración de 20 mM fue de casi el doble ( $p=0.0321$ ), sin embargo en D-MEM el incremento fue muy ligero aunque significativo a la concentración de 5 mM únicamente ( $p=0.0433$ ). Resultados similares fueron obtenidos cuando se adicionó el sulfato de magnesio, aunque con menores

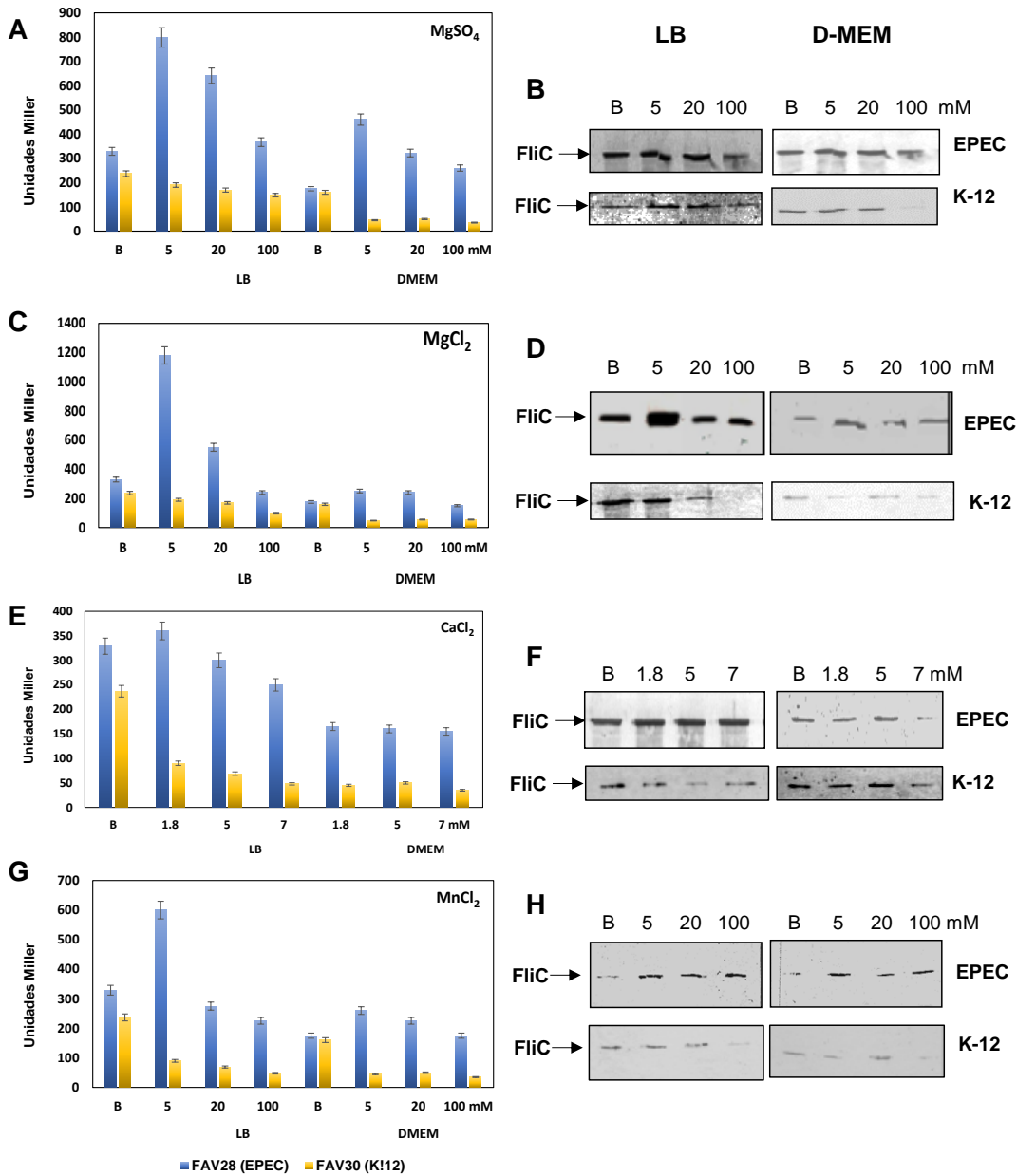
incrementos, sugiriendo que el catión magnesio es el que está disparando la expresión de FliC. Para *E. coli* K-12 se observó una disminución tanto en la transcripción como en la expresión flagelar desde la primera concentración de 5 mM (Figura 6C y 6D).

La adición de cloruro de manganeso a LB en una concentración de 5 mM duplicó la transcripción flagelar de EPEC ( $p=0.0311$ ), en D-MEM hubo un ligero incremento en la transcripción flagelar pero no fue significativo; en contraste para *E. coli* K-12 se observó una reducción significativa en la transcripción flagelar desde la adición de 5 mM de cloruro de manganeso tanto en LB (62%) como en D-MEM (72%) (Figura 6E). Este comportamiento también se observó para la expresión flagelar (Figura 6F).

La presencia de cloruro de calcio no afectó la transcripción ni la expresión flagelar de EPEC de forma significativa a las concentraciones empleadas, pero para *E. coli* K-12 en LB se observó una disminución significativa del 62% en la transcripción flagelar desde la concentración de 1.8 mM y a concentraciones superiores se mantiene sin disminuir más, en D-MEM no se observaron cambios significativos para la transcripción flagelar (Figura 6G y 6H).

De los cationes divalentes probados, el  $Mg^{+2}$  fue el más importante en el aumento de la transcripción y la expresión flagelar de EPEC, para corroborar que los cationes si desempeñaban una función en la activación de la transcripción flagelar se llevó a cabo un ensayo con un agente quelante de cationes divalentes que fue el EDTA (ácido etilendiaminotetracético) a una concentración de 5 mM, tanto en LB como en D-MEM.

Como se esperaba se observó una reducción significativa del 69.8% en la transcripción flagelar cuando se agregó en LB ( $p=0.0321$ ) y del 62% cuando se agregó en D-MEM ( $p=0.0379$ ), también se observó una disminución considerable en la expresión de la flagelina, indicando la necesidad de los cationes divalentes para la expresión del flagelo. Estos resultados concuerdan con estudios previos que mostraron que 0.05 M de EDTA inhibe la movilidad de *E. coli* K-12.



**Figura 6.** Comportamiento del flagelo en presencia de iones divalentes. (A) El  $MgSO_4$  al 5 mM en LB incrementó 2.7 veces y en D-MEM 2.6 veces la transcripción flagelar de EPEC, en *E. coli* K-12 disminuyó la transcripción hasta un 37.5% a la concentración de 100 mM en LB y en D-MEM 78.1%. (B) La expresión flagelar de EPEC y *E. coli* K-12 mostró un patrón muy similar a la transcripción. (C) La adición de 5 mM de  $MgCl_2$ , incrementó cuatro veces la transcripción de *fliC* de EPEC en LB, para *E. coli* K-12 se observó una disminución tanto en la transcripción como (D) en la expresión flagelar. (E) La adición de 5 mM de  $MnCl_2$  a LB duplicó la transcripción flagelar de EPEC, en *E. coli* K-12 se observó una reducción desde 5 mM tanto en LB (62%) como en D-MEM (72%). (F) Esto se observó también para la expresión flagelar. (G) El  $CaCl_2$  no afectó la transcripción de EPEC, en *E. coli* K-12 se observó una disminución del 62% en la transcripción desde 1.8 mM. (H) El patrón de expresión fue similar al de la transcripción flagelar observado en presencia de  $CaCl_2$ . Fuente: Elaboración propia, 2014.

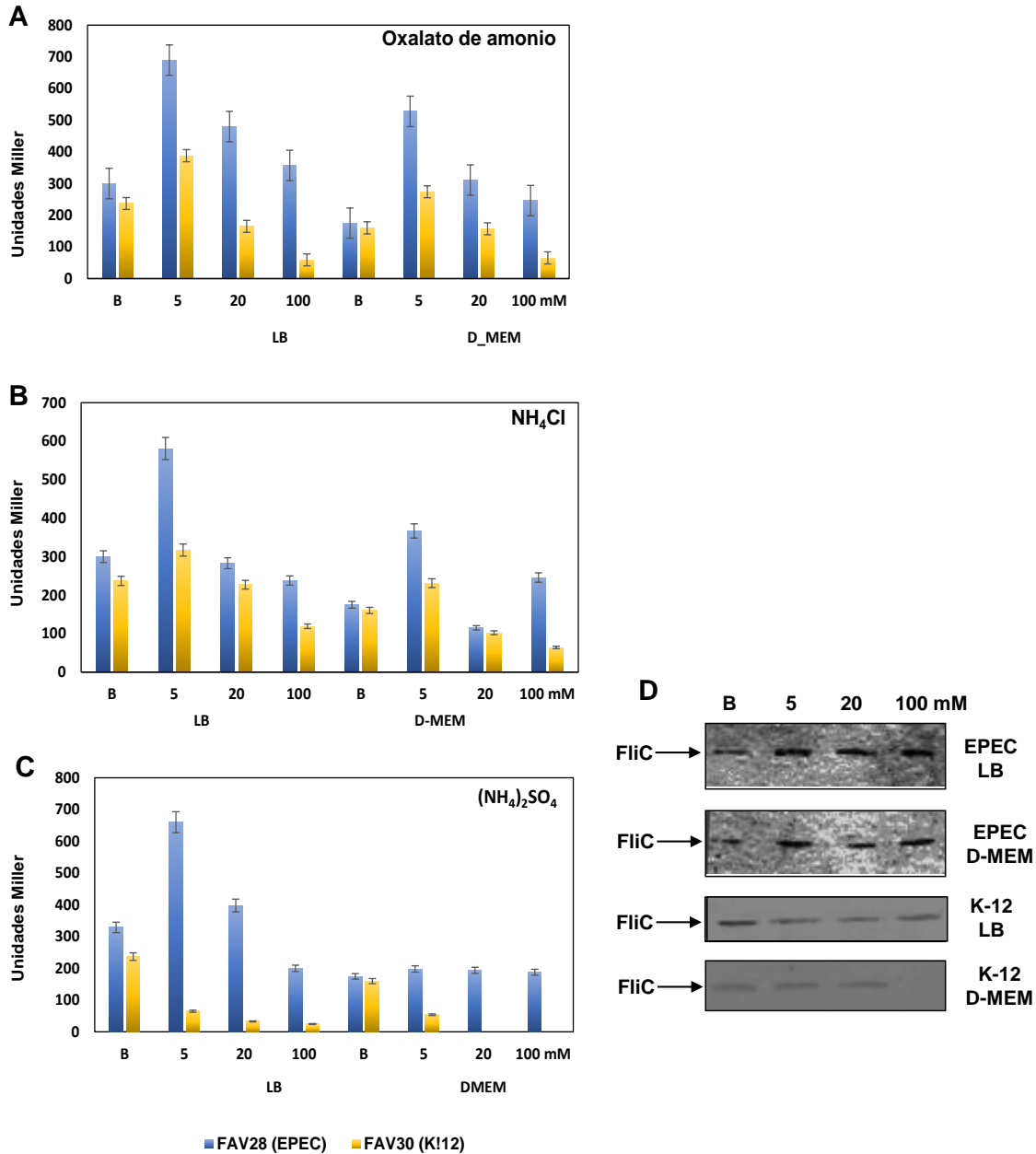
Los resultados aquí obtenidos concuerdan con lo reportado anteriormente para *E. coli* K-12, en los cuales se observó que la movilidad fue inhibida por la presencia de cloruro de magnesio y cloruro de manganeso (Adhler y Templeton, 1967), a diferencia de EPEC para la cual no se vió afectada, pero en el caso de la presencia de 5 mM de calcio se observó que la movilidad se incrementó moderadamente a pesar de que no se incrementaron la transcripción y expresión flagelar (Tabla 5). El crecimiento microbiano no fue afectado por la adición de los cationes divalentes ensayados, ni para EPEC ni para *E. coli* K-12, en los medios de cultivo empleados (LB o D-MEM) (datos no mostrados).

### **IX.2.3. Influencia de las sales de amonio en la expresión flagelar.**

Se emplearon tres sales de amonio para estudiar el efecto del ión amonio en la expresión flagelar (oxalato, sulfato y cloruro), éstas fueron adicionadas a los medios de cultivo (LB o D-MEM) a las concentraciones de 5, 20 y 100 mM, de las tres sales probadas, el oxalato de amonio fue el que mostró los niveles más altos de transcripción de *fliC*, pero al hacer el comparativo de las tres sales en LB, se observó que la transcripción de *fliC* fue similar a la concentración 5 mM, para los estudios posteriores se seleccionó el sulfato de amonio, dado que al mezclar el oxalato con otros componentes, el medio se tornaba opalescente y precipitaba.

El incremento de la transcripción flagelar en presencia de 5 mM de oxalato de amonio fue de 2.3 veces (Figura 7A) con respecto al LB solo ( $p=0.0152$ ), en presencia de cloruro de amonio el incremento fue de 1.7 veces (Figura 7B) y para el sulfato de amonio fue de 2.1 veces (Figura 7C) con respecto al LB sin adicionar ( $p=0.0152$ ). La transcripción flagelar en D-MEM presentó un comportamiento similar pero con menores incrementos (Figura 7).





**Figura 7.** Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de sales de amonio. El incremento de la transcripción flagelar de EPEC al (A) 5 mM de oxalato de amonio fue de 2.3 veces, (B) en presencia de cloruro de amonio fue de 1.7 veces y para el (C) sulfato de amonio fue de 2.1 veces con respecto al LB sin adicionar. La transcripción flagelar en D-MEM presentó un comportamiento similar pero con menores incrementos. Para *E. coli* K-12 se observó una disminución de la transcripción a 20 mM de oxalato de amonio y de cloruro de amonio, en presencia de sulfato de amonio la transcripción flagelar empieza a disminuir desde 5 mM, (D) La expresión flagelar en presencia de sulfato de amonio, para EPEC en LB se incrementó con la adición de la sal y en D-MEM se observaron cambios ligeros de aumento y disminución. Para *E. coli* K-12 se observó que después de la adición del sulfato de amonio se disminuyó la expresión flagelar tanto en LB como en D-MEM. Fuente: Elaboración propia, 2014.

Para *E. coli* K-12 se observó un ligero incremento no significativo a la concentración de 5 mM de oxalato de amonio y de cloruro de amonio, pero a 20 mM empieza a disminuir la transcripción flagelar, en presencia de sulfato de amonio la transcripción flagelar de *E. coli* K-12 empieza a disminuir desde la concentración de 5 mM, estos datos concuerdan con lo reportado en un estudio previo donde se observó que a una concentración de 10 mM de cloruro de amonio la movilidad era inhibida parcialmente (Adhler y Templeton, 1967).

La expresión flagelar solo se monitoreo en presencia de sulfato de amonio, observándose que EPEC incrementó la expresión flagelar en LB a todas las concentraciones de la sal empleadas, y en D-MEM se observó incremento a la concentración de 5 mM y luego se observan cambios muy tenues. Para *E. coli* K-12 se observó que después de la adición del sulfato de amonio se disminuyó la expresión flagelar tanto en LB como en D-MEM (Figura 7D). La movilidad de EPEC se observó incrementada moderadamente a la concentración de 5 mM de sulfato de amonio (Tabla 5).

Con respecto al crecimiento no se observó ninguna diferencia significativa con la adición de las sales de amonio a los medios de cultivo (datos no mostrados).

#### **IX.2.4. Influencia de las sales de sodio en la expresión flagelar.**

En el presente estudio se emplearon tres sales de sodio (cloruro de sodio, bisulfito de sodio y bicarbonato de sodio), las concentraciones usadas para el cloruro de sodio fueron 0, 50, 100, 150, 200, 250 y 300 mM en LB y 150, 200, 250 y 300 mM en D-MEM; el bisulfito de sodio a las concentraciones de 5, 20 y 100 mM; y el bicarbonato de sodio a las concentraciones de 22 y 44 mM.

En EPEC se observó que el cloruro de sodio incrementó la transcripción flagelar en un efecto dosis dependiente cuando se usaron concentraciones de 50 a 200 mM, observándose el pico máximo a 200 mM, esto representó un incremento de

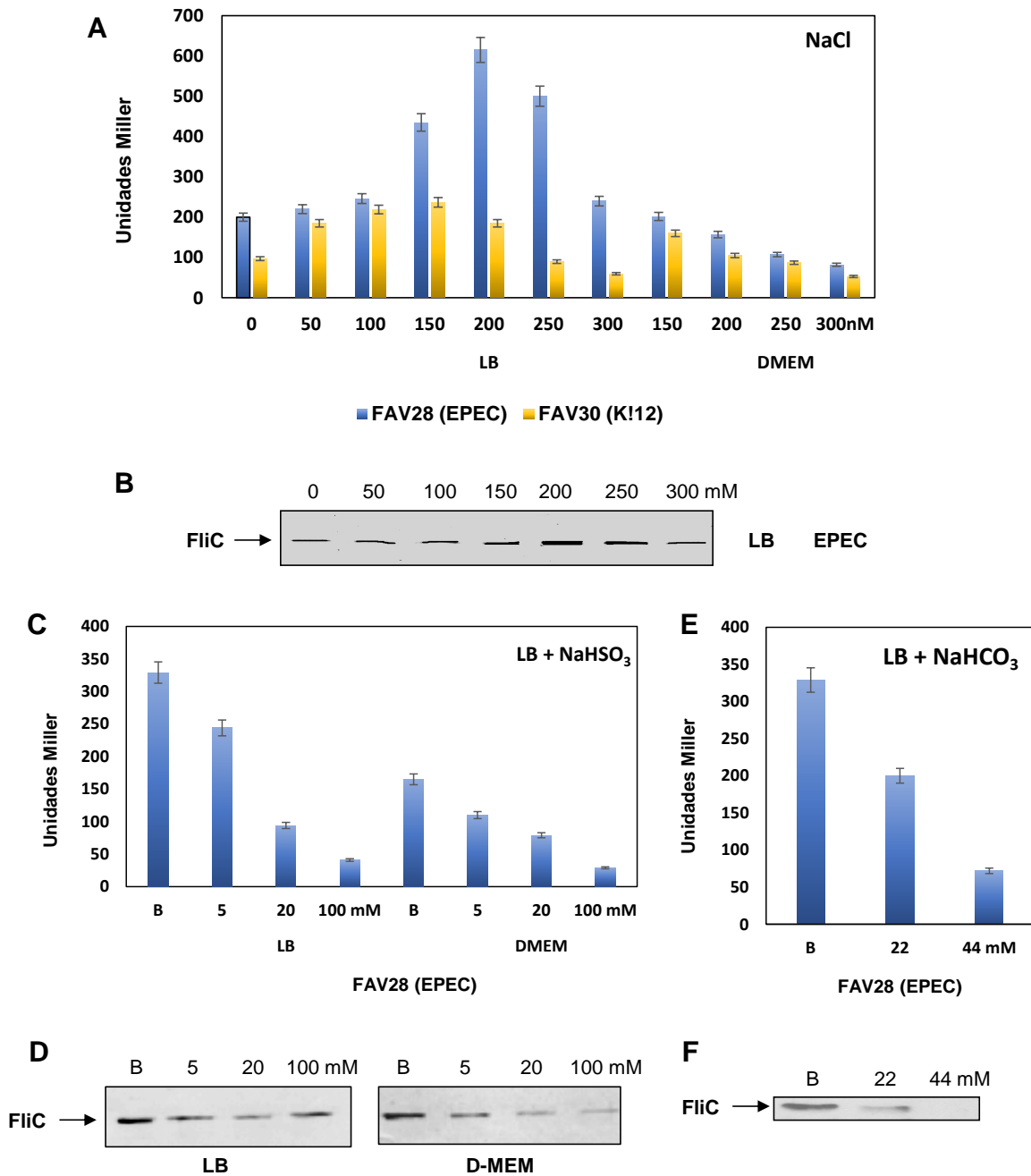
3 veces comparado con el medio LB sin cloruro de sodio ( $p=0.003$ ) (Figura 8A); la expresión flagelar presenta un patrón similar a la transcripción ya que se observó la mayor expresión a 200 mM de cloruro de sodio en LB (Figura 8B).

En D-MEM no se determinó la transcripción flagelar a concentraciones menores a 150 mM, porque el medio tiene en su constitución una concentración de 0.109 mM, no hubo incremento significativo en la transcripción flagelar a la concentración de 150 mM, y se observó la disminución con la adición de cloruro de sodio a partir de 200 mM (Figura 8A).

Para *E. coli* K-12 la transcripción flagelar se incrementó ligeramente a la concentración de 150 mM de cloruro de sodio con respecto al LB solo y empezó a disminuir a partir de 200 mM, en D-MEM se observó la disminución de la transcripción flagelar a partir de concentración de 150 mM con respecto al D-MEM no adicionado (Figura 8A). La expresión flagelar en EPEC mostró un patrón similar a la transcripción (Figura 8B), para *E. coli* K-12 no se logró observar algún cambio notorio con respecto al basal en la adición de cloruro de sodio (datos no mostrados).

En estudios previos se mostró que el bisulfito de sodio induce la síntesis de BFP en EPEC (Gismero-Ordoñez *et al*, 2002), pero para el flagelo de EPEC se demostró en este estudio que tiene un efecto inhibitorio en la transcripción y en la expresión flagelar (Figuras 8C y 8D)), al igual que en la movilidad (Tabla 5).

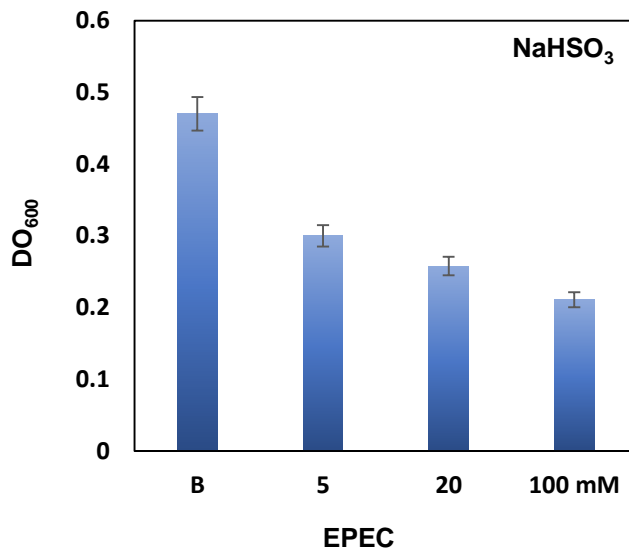
Se ha reportado que el bicarbonato de sodio estimula la expresión de los genes de la región LEE de *E. coli* enterohemorrágica O157:H7 (Abe *et al*, 2002), es por ello que se decidió determinar si el bicarbonato de sodio podría afectar la expresión de *fliC* en EPEC. Lo que se observó fue que la presencia de este compuesto en LB, redujo de manera dosis dependiente la transcripción y la expresión flagelar de EPEC (Figuras 8E y 8F)), lo que se ve reflejado en la movilidad bacteriana (Tabla 5).



**Figura 8.** Efectos de las sales de sodio sobre la transcripción y expresión flagelar. (A) En EPEC se observó que el NaCl incrementó la transcripción flagelar en un efecto dosis dependiente en las concentraciones de 50 a 200 mM, observándose un incremento de 3 veces a 200 mM, En D-MEM disminuyó la transcripción con la adición de cloruro de sodio a partir de 200 mM. Para *E. coli* K-12 la transcripción flagelar disminuyó a partir de 200 mM, en D-MEM se observó la disminución de la transcripción flagelar a partir de 150 mM. (B) la expresión flagelar presentó un patrón similar a la transcripción, para *E. coli* K-12 no se logró observar algún cambio notorio con respecto al basal en la adición de NaCl. (C) El bisulfito de sodio mostró un efecto inhibitorio tanto en la transcripción como en la (D) expresión flagelar de EPEC. (E) En presencia de bicarbonato de sodio se redujo de manera dosis dependiente la transcripción y la (F) expresión flagelar de EPEC. Fuente: Elaboración propia, 2014.

No se utilizó D-MEM en esta prueba ya que la composición de este medio reporta una concentración de 44 mM de bicarbonato de sodio, concentración a la cual se observó la reducción de la transcripción y expresión flagelar de EPEC. Este hallazgo podría ser el motivo de la regulación negativa del D-MEM sobre la transcripción y expresión flagelar que se presenta en EPEC y que se presenta en la Figura 4 de esta tesis.

El crecimiento bacteriano no se afectó por la adición de cloruro de sodio ni del bicarbonato de sodio (datos no mostrados), pero si se afectó por la adición del bisulfito de sodio (Figura 9), observándose un decremento significativo ( $p=0.0098$ ) a partir de la concentración de 20 mM (76%).



**Figura 9.** Crecimiento de EPEC en presencia de bisulfito de sodio. El crecimiento de EPEC se inhibió por la adición de bisulfito de sodio a LB desde la concentración de 5 mM, observándose una disminución dosis dependiente. Fuente: Elaboración propia, 2014.

### **IX.3. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC bajo diferentes condiciones microambientales (intestinales y extraintestinales).**

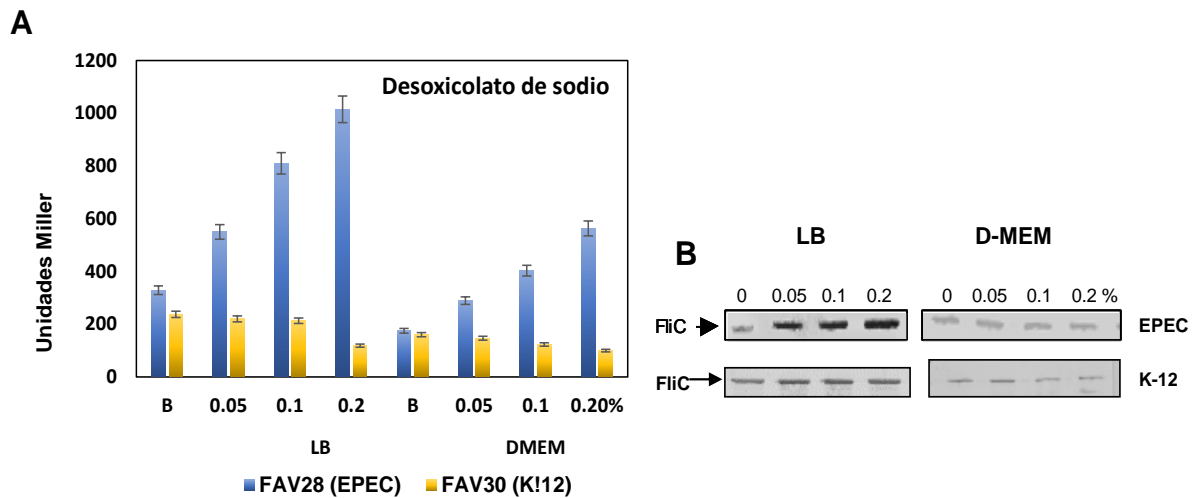
En este apartado se engloban las condiciones de dos microambientes importantes para EPEC, el medio intestinal que es importante para su reproducción y que tiene gran importancia para la salud humana, y algunas condiciones del medio extraintestinal, que son necesarias analizar, para conocer un poco más acerca de cómo EPEC usa su flagelo para poder sobrevivir y persistir en el medio ambiente para luego volver a entrar a su hospedero natural.

#### **IX.3.1. La sales biliares favorece la expresión del flagelo de EPEC.**

El desoxicolato de sodio es una sal biliar que forma parte del microambiente intestinal al que deben enfrentarse los microorganismos que habitan normalmente en él o llegan como hospederos, tal es el caso de las bacterias patógenas como EPEC. La presencia de desoxicolato de sodio incrementó la transcripción y la expresión de flagelo, mostrando un efecto dosis dependiente, ya que al incrementar la dosis de desoxicolato de sodio también se incrementaron la transcripción y la expresión flagelar de EPEC. Los cambios son significativos a partir de la adición de 0.05% de desoxicolato de sodio, pero se obtuvo la mayor transcripción flagelar a la concentración del 0.20%, siendo 3.4 veces incrementada en LB ( $p=0.017$ ) y 3 veces incrementada en D-MEM ( $p=0.0008$ ), comparadas con el medio sin adición de desoxicolato (Figura 10A). Para *E. coli* K-12 el comportamiento en la transcripción flagelar es similar al del medio sin adición de la sal, excepto porque a la concentración de 0.2% disminuyó tanto en LB como en D-MEM (Figura 10A).

La inducción de la expresión flagelar por las sales biliares en este caso el desoxicolato de sodio fue dosis dependiente para EPEC como se observó mediante inmunoelectrotransferencia, pero no se observó algún cambio para *E. coli* K-12 (Figura 10B). Esto sugiere que las sales biliares pueden estar actuando como una señal positiva para la síntesis de flagelo en el intestino principalmente a la

concentración del 0.1% que es la concentración fisiológica. También se observó que a la concentración de 0.1% de desoxicolato de sodio se incrementó moderadamente la movilidad de EPEC (Tabla 5).

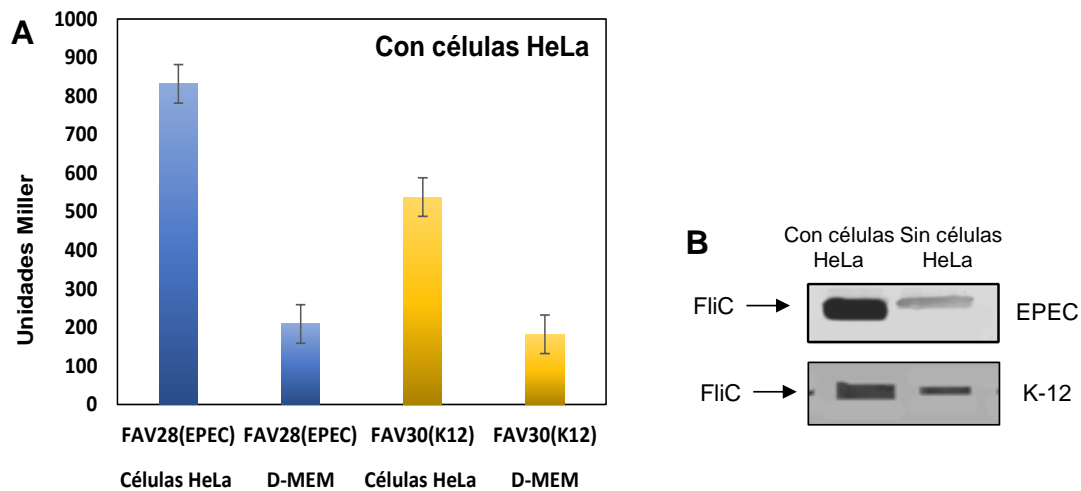


**Figura 10.** Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de sales biliares. Un efecto dosis dependiente se presenta al adicionar desoxicolato de sodio a los medios LB y D-MEM, tanto a nivel transcripcional (A) como de expresión (B) para EPEC como para *E.coli* K-12, aunque en este caso un poco menor. Fuente: Elaboración propia, 2014.

### IX.3.2. La transcripción y expresión del flagelo de EPEC es favorecida en cultivos celulares.

EPEC en su microambiente habitual crece normalmente en presencia de células intestinales que son las que le proveen de alimento, hábitat y ambiente, para conocer el comportamiento de EPEC en las condiciones más cercanas a la realidad se llevó a cabo un monitoreo en presencia de células, para ello cultivos celulares de células HeLa fueron infectados con las cepas bacterianas en estudio, durante tres h e incubadas en tensión de dióxido de carbono al 5%, a 37°C y sin agitación, posteriormente se determinó la transcripción y la expresión del flagelo. Cabe destacar que al ser los cultivos celulares incubados sin agitación el crecimiento

bacteriano es más lento, por lo que a primera vista los incrementos en las determinaciones podrían parecer no significativos por lo que se corrió a la par un ensayo control. La  $DO_{600}$  que se alcanzó durante el periodo de incubación fue de 0.300, pero aún a esta DO el incremento en la transcripción del flagelo se incrementó 3.5 veces con respecto al D-MEM solo ( $p=0.0003$ ) (Figura 11A). La expresión de flagelo bacteriano en presencia de células HeLa también se observó aumentada en EPEC y *E. coli* K-12 (Figura 11B), esto apoya la idea de que las células eucarióticas o algún producto celular secretado puede activar la expresión flagelar de EPEC (Girón *et al*, 2002).



**Figura 11.** Efecto de los cultivos celulares en el comportamiento flagelar de EPEC. (A) La transcripción flagelar de EPEC y de *E. coli* K-12 se incrementó en cultivos celulares infectados e incubados durante 3 h. (B) La expresión del flagelo se ve favorecida en presencia de cultivos celulares para EPEC y *E. coli* K-12. Fuente: Elaboración propia, 2014.

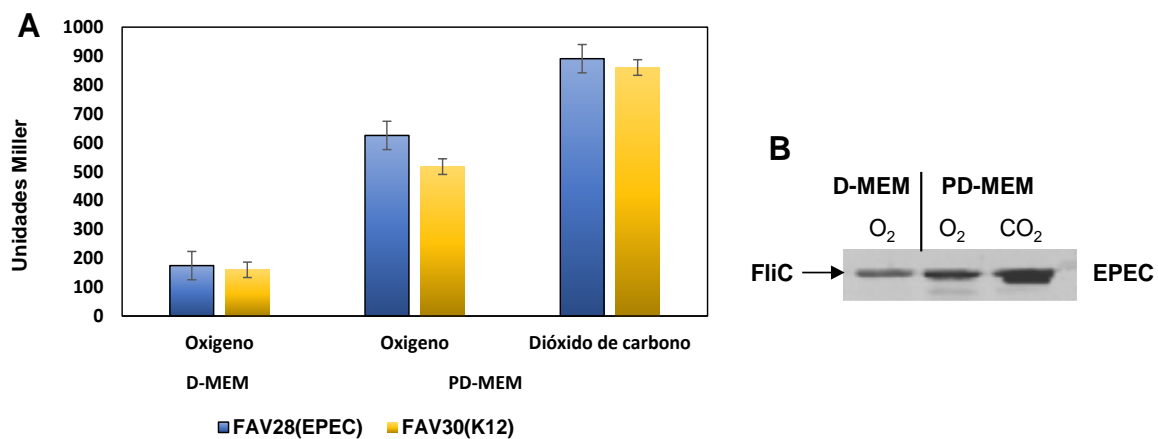
### IX.3.3. La transcripción y expresión de flagelo se favorece en medio D-MEM precondicionado (PD-MEM)

En base a los resultados del apartado anterior se trató de comprobar si los cultivos celulares influenciaban la expresión de flagelo por la presencia de las células o por la presencia de alguna molécula que fuera secretada por las células al medio,



para ello se preparó un medio al que se le denominó D-MEM precondicionado (PD-MEM). El D-MEM fue incubado por un periodo de 24-48 h con monocapas de células HeLa sin suero fetal ni antibióticos.

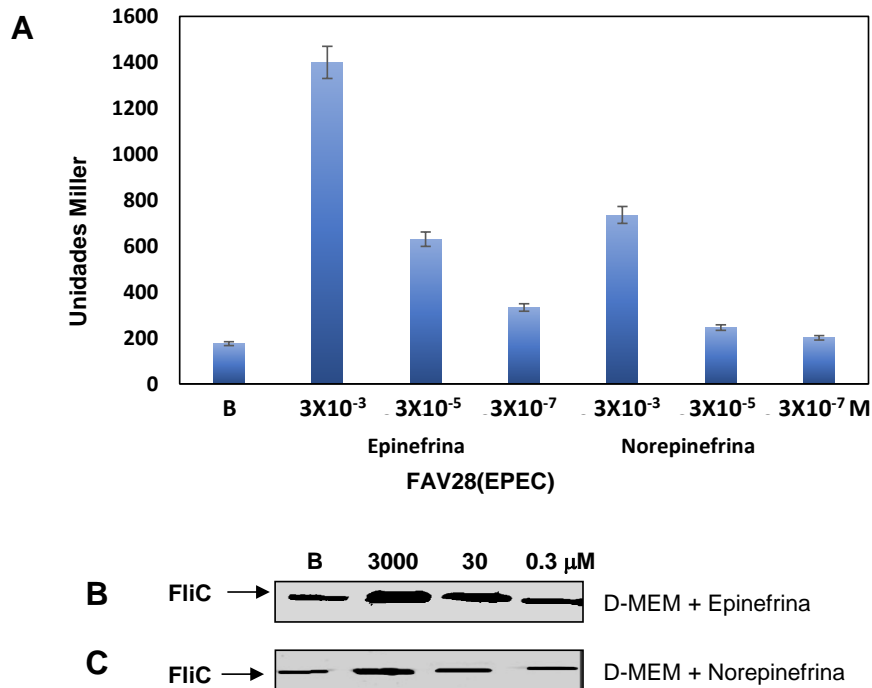
Este medio se utilizó para llevar a cabo los ensayos de actividad de  $\beta$ -galactosidasa y de síntesis de flagelina. Se observó que la transcripción flagelar de EPEC se incrementó en PD-MEM en comparación con el D-MEM incubado tanto en presencia de oxígeno (3.6 veces) como de dióxido de carbono (5.3 veces,  $p=0.001$ ) (Figura 12A). La expresión flagelar también incrementó en PD-MEM tanto en presencia de oxígeno como de dióxido de carbono al 5% (12B). Los datos obtenidos son semejantes a los que se obtuvieron en presencia de los cultivos celulares, lo que sugiere la presencia de una molécula secretada por las células al medio que está actuando como una señal positiva para la expresión del flagelo.



**Figura 12.** Efecto del medio D-MEM precondicionado en el flagelo de EPEC. Se observó que el medio D-MEM que estuvo en contacto con las células y que posteriormente se esterilizó por filtración estimuló la transcripción (A) y la expresión (B) flagelar de EPEC en presencia de oxígeno, pero la expresión se ve más favorecida en tensión de dióxido de carbono al 5%. Fuente: Elaboración propia, 2014.

### IX.3.4. Las catecolaminas estimulan la expresión del flagelo de EPEC.

Las catecolaminas como la epinefrina y la norepinefrina se han asociado en estudios previos con el incremento del crecimiento de algunas cepas de *E. coli* comensales y patogénicas, y con el incremento de las propiedades asociadas a la virulencia de algunos patogrupos de *E. coli* (Lyte, 2004). Con lo que respecta a la epinefrina se ha reportado que activa la expresión flagelar y la movilidad en *E. coli* O157:H7 (Sperandio *et al*, 2003). En este trabajo se utilizó epinefrina y norepinefrina como inductores potenciales de la expresión flagelar de EPEC. Las bacterias fueron crecidas aeróbicamente en D-MEM suplementado con diferentes concentraciones de estas hormonas (0.3, 30 and 3000  $\mu\text{M}$ ), se eligió sólo al medio D-MEM porque la transcripción flagelar es reducida en este medio comparado con LB y por lo tanto se observaron mejor los efectos ejercidos.



**Figura 13.** Comportamiento flagelar de EPEC en presencia de catecolaminas. (A) La transcripción flagelar muestra un pico máximo a la concentración de 3000  $\mu\text{M}$  para epinefrina y norepinfrina. (B) y (C) Expresión flagelar de EPEC, la mayor expresión fue a 3000  $\mu\text{M}$ . Fuente: Elaboración propia, 2014.

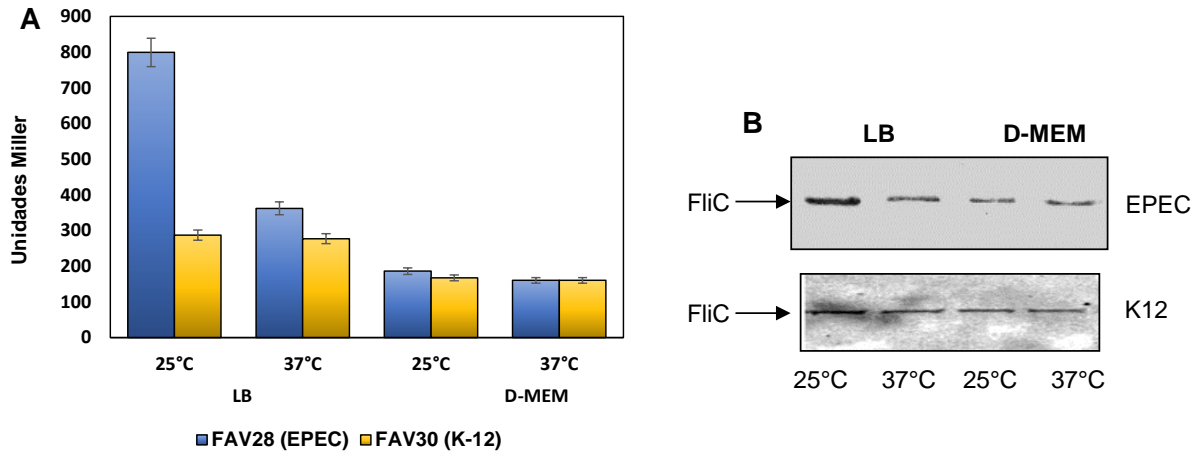
La presencia de epinefrina incrementó significativamente ( $p=0.001$ ) la transcripción flagelar de EPEC a las tres diferentes concentraciones empleadas en 1.9, 3.6 y 8 veces respectivamente. La norepinefrina mostró un incremento más discreto en la transcripción flagelar observándose 1.4 veces ( $p=0.05$ ) a  $30 \mu\text{M}$  y 4.2 veces ( $p=0.001$ ) a  $3000 \mu\text{M}$ , pero no se observó aumento en la transcripción flagelar a  $0.3 \mu\text{M}$  (Figura 13A). La expresión flagelar de EPEC mostró el mismo patrón dosis dependiente que la transcripción flagelar, observándose la máxima expresión a la concentración de  $3000 \mu\text{M}$  siendo menor el incremento en presencia de norepinefrina (Figura 13B y 13C).

Con respecto a la movilidad se observó un incremento moderado de la misma en presencia de epinefrina y norepinefrina a la concentración de  $30 \mu\text{M}$  (Tabla 5).

#### **IX.3.5. Comportamiento del flagelo de EPEC y *E. coli* K-12 a temperatura ambiente y corporal.**

Estos resultados brindan un panorama acerca de que el flagelo es más útil para la bacteria a temperatura ambiente y que le estaría sirviendo para mantenerse en estado de alerta a la bacteria patógena (EPEC) más que a la *E. coli* K-12, esto se corrobora con la observación de que a  $25^\circ\text{C}$  EPEC se mueve más que a  $37^\circ\text{C}$  (Tabla 5). Las dos cepas crecieron en forma similar tanto en LB como en D- MEM y no hubo diferencia significativa, por lo cual no se muestran los resultados en algún gráfico. Para la transcripción flagelar se observó que en los cultivos que se crecieron a  $25^\circ\text{C}$  en LB, hubo un incremento de 2.2 veces, lo que se considera como una diferencia significativa ( $p=0.005$ ), en D-MEM los cambios observados son mínimos para EPEC.

Para *E. coli* K-12 se observó un incremento ligero en la transcripción, pero no significativo, en LB pero no en D-MEM. En D-MEM no hubo diferencia significativa para las dos cepas (Figura 14A). La expresión flagelar se observó incrementada para EPEC en LB a  $25^\circ\text{C}$ , pero no se logran observar diferencias en *E. coli* K-12 (Figura 14B).

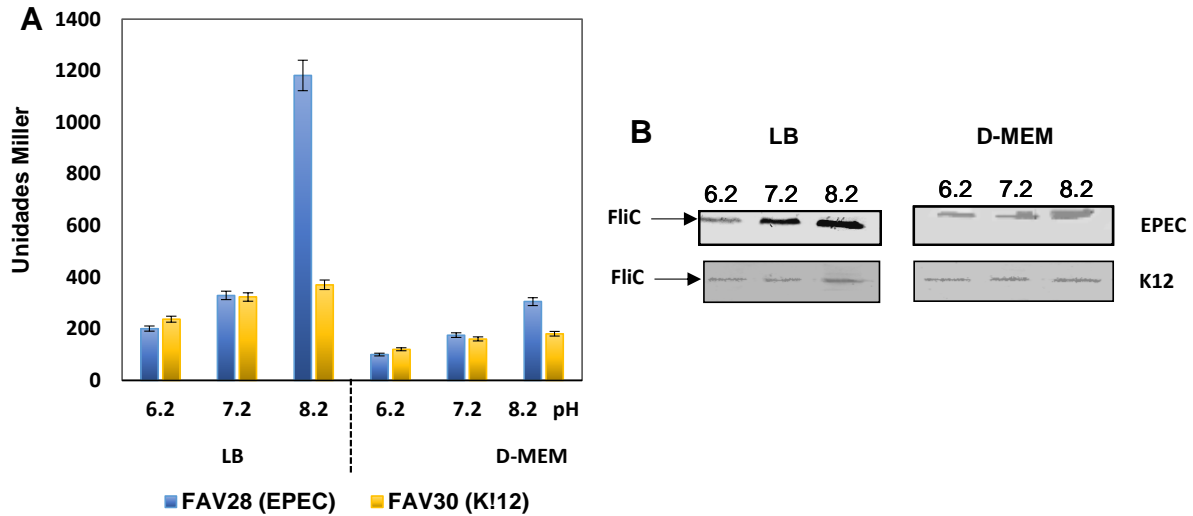


**Figura 14.** Efecto de la temperatura sobre el flagelo de EPEC y de *E. coli* K-12. (A) La transcripción flagelar para EPEC se incrementó 2.2 veces a 25°C con respecto a los 37°C, para *E. coli* K-12 no se logró observar diferencia significativa. (B) La expresión de flagelina para EPEC es mayor a 25°C en LB que en D-MEM y no se observaron cambios para *E. coli* K-12. Fuente: Elaboración propia, 2014.

### IX.3.6. Comportamiento del flagelo de EPEC y *E. coli* K-12 bajo diferentes valores de pH.

El valor de pH de cada medio fue medido antes y después del crecimiento para asegurar que no cambiara en más de 0.05 unidades de pH. Se utilizaron tres diferentes valores de pH 6.2, 7.2 y 8.2, el valor de pH óptimo para la transcripción y la expresión de flagelina fue 8.2, tanto en LB donde se incrementó 3.5 veces ( $p=0.0001$ ), como en D-MEM en donde se incrementó 1.7 veces ( $p=0.0046$ ) y fueron significativamente más bajos a un valor de 6.2, se observaron cambios más notorios en EPEC que en *E. coli* K-12 donde no hubo diferencia significativa (Figura 15A).

La selección de los valores de pH se hizo en base a que en el aparato digestivo la bacteria pasa del estómago hacia el intestino grueso experimentando un gradiente de pH, del ácido hasta el alcalino y a que cuando llega a los suelos, éstos pueden presentar diferentes valores de pH que podrían afectar su sobrevivencia en medios extraintestinales.



**Figura 15.** Efecto de diferentes valores de pH en la expresión flagelar de EPEC. Se observó que tanto la transcripción como la expresión flagelar fue mayor a valor de pH 8.2, observándose en LB para EPEC. Fuente: Elaboración propia, 2014.

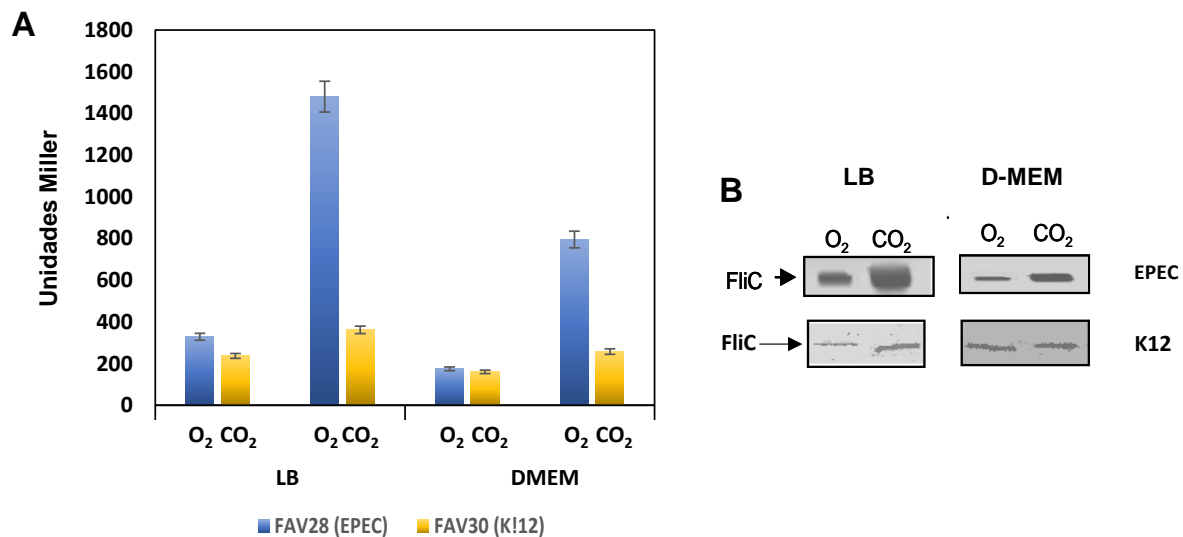
La inmunoelectrotransferencia mostró que la expresión flagelar para EPEC se incrementó a pH 8.2 en LB y un poco menos en D-MEM, para E.coli K-12 no se observó diferencia en la expresión flagelar (Figura 15B). El crecimiento bacteriano fue similar a los diferentes valores de pH.

### **IX.3.7. Comportamiento del flagelo de EPEC y E. coli K-12 en presencia de oxígeno o dióxido de carbono.**

Una de las características importantes que se presentan en el intestino es que las bacterias como *E. coli* viven en condiciones de tensión de oxígeno reducida, lo que podría actuar como una señal para activar genes bacterianos necesarios para la colonización intestinal, pero también es importante destacar que los coliformes en general son anaerobios facultativos y que en condiciones extraintestinales como aguas negras o residuales, donde la disposición de oxígeno se ve limitado, tomando

en cuenta estas situaciones los cultivos bacterianos fueron crecidos en presencia de oxígeno o en una atmósfera del 5% de dióxido de carbono.

Cuando los cultivos bacterianos fueron crecidos en presencia de 5% de CO<sub>2</sub> se observó que se estimuló la transcripción (Figura 16A) y la expresión del flagelo (Figura 16B) de EPEC tanto en LB (5 veces, p=0.0012) como en D-MEM (4.5 veces, p=0.0065), comparado con la condición de aireación. No se observaron cambios notorios para la cepa de *E. coli* K-12 (Figura 16A). No existió diferencia significativa en el crecimiento bacteriano. Es importante destacar que el dióxido de carbono es la condición sencilla que produjo los más altos niveles de expresión de flagelo tanto en LB como en D-MEM. La movilidad de EPEC se ve muy incrementada en presencia de dióxido de carbono al 5% (Tabla 5).



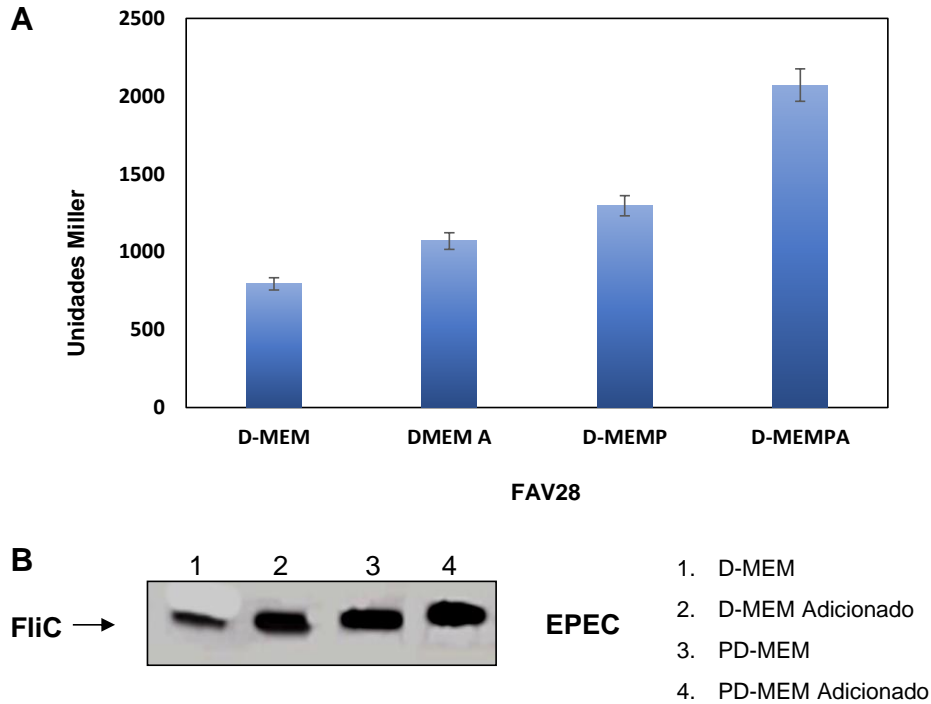
**Figura 16.** Comportamiento del flagelo en cultivos incubados en tensión de dióxido de carbono. Muestra el incremento de la transcripción flagelar de EPEC en LB (5 veces) y en D-MEM (4.5 veces) en presencia de dióxido de carbono al 5% (A). La expresión flagelar de EPEC se favoreció en esta condición como en *E. coli* K-12. Fuente: Elaboración propia, 2014.

### ***IX.3.8. Incremento de la transcripción y expresión flagelar de EPEC cultivada en un medio de cultivo que simula el ambiente intestinal.***

Con todos los datos obtenidos se procedió a elaborar un medio de cultivo con los componentes que mostraron incrementar la transcripción flagelar y que simulara las condiciones intestinales para saber si favorecía también su expresión, las concentraciones se ajustaron lo más parecidas al medio intestinal pero que a la vez permitieran ser medidas por los ensayos utilizados.

Se formularon medios adicionados con diferentes componentes en D-MEM y PD-MEM, las concentraciones finales que se alcanzaron de cada componente fueron las siguientes 5 mM de  $MgCl_2$ , 5 mM de  $MnCl_2$ , 5 mM de  $(NH_4)_2SO_4$ , 150 mM de NaCl, 0.1% de desoxicolato de sodio, el pH fue ajustado a 8.2 y los cultivos se incubaron en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%. La activación del promotor del flagelo de EPEC fue mayor en D-MEM y PD-MEM (13 veces) adicionados que en D-MEM solo ( $p=0.001$ ) (Figura 17A). Las condiciones que se trataron de emular en este medio son lo más parecidas a las existentes en la atmósfera intestinal, lo que sugiere que el flagelo desempeña una función importante en la patogénesis de la bacteria.

La expresión de flagelo determinada por inmunoelectrotransferencia presentó la misma tendencia que la transcripción confirmando estos datos (Figura 17B). Sólo se trabajó con la cepa de EPEC, dado que era la de interés para el estudio.



**Figura 17.** Comportamiento flagelar de EPEC crecido en medio diseñado. Muestra los resultados obtenidos para la transcripción y expresión flagelar de EPEC en el medio de cultivo diseñado con los componentes que por separado presentaron mayor actividad. (A) La transcripción flagelar se incrementó en todos los medios adicionados, especialmente en PD-MEM adicionado e incubado en atmósfera de dióxido de carbono al 5%. (B) La expresión flagelar presenta un patrón similar. Fuente: Elaboración propia, 2014.

### ***IX.3.9. Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de metales pesados que se pueden encontrar como contaminantes ambientales.***

Los metales pesados ensayados en este apartado, así como también sus respectivas concentraciones fueron elegidos en base a las Normas Oficiales Mexicanas NOM-127-SSA1-1994 y NOM-002-ECOL-1996, que establecen los límites permisibles de calidad y tratamientos a los que debe someterse el agua para su potabilización y los límites máximos permisibles de contaminantes en las descargas de aguas residuales a los sistemas de alcantarillado urbano y municipal respectivamente, tomando en cuenta los límites permisibles en suelos agrícolas y lodos de aguas residuales.



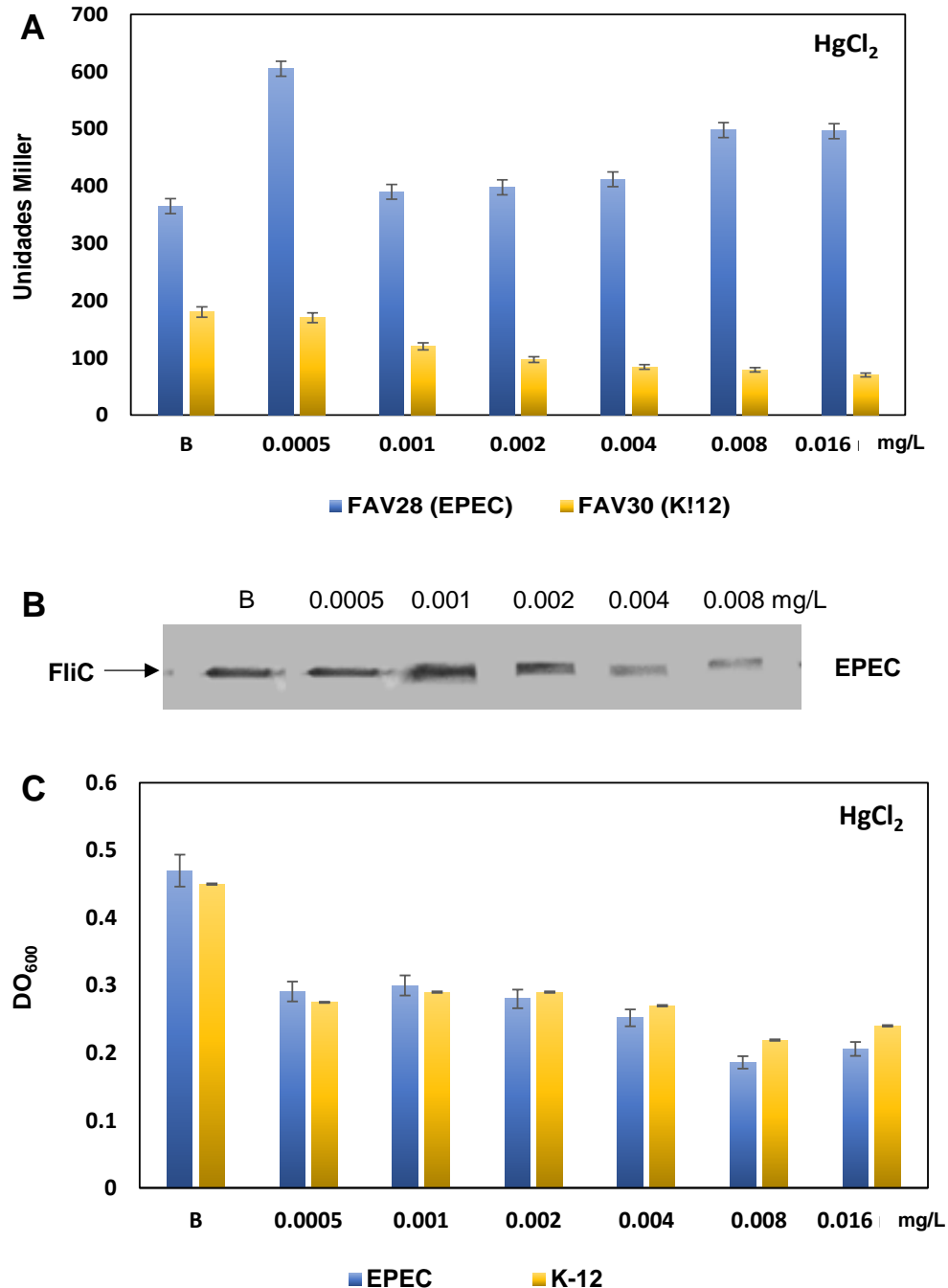
La mayoría de los metales pesados se probaron en forma de cloruros (cloruro de mercurio, cloruro de cobre, cloruro de cadmio, cloruro de cromo III y cloruro de hierro III), y sólo dos en forma diferente (sulfato de zinc y acetato de plomo).

Las concentraciones empleadas para el cloruro de mercurio fueron 0.0005, 0.001, 0.002, 0.004, 0.008 y 0.016 mg/L, la adición de cloruro de mercurio incrementó significativamente la transcripción flagelar de EPEC ( $p=0.043$ ) en 1.7 veces a la concentración de 0.0005 mg/L, pero para *E. coli* K-12 se observó una disminución dosis dependiente siendo significativa a partir de la concentración de 0.004 mg/L (Figura 18A). La expresión flagelar para EPEC se incrementó a la concentración de 0.001 y 0.002 disminuyendo hacia las dos últimas concentraciones y para *E. coli* K-12 presentó una disminución gradual (Figura 18B).

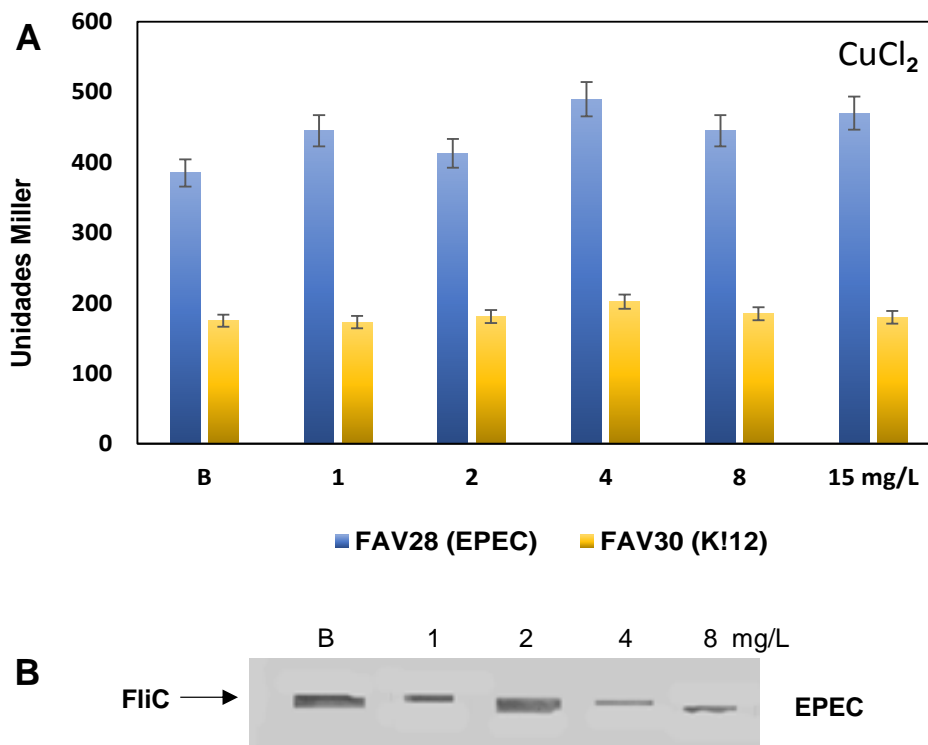
El crecimiento bacteriano disminuyó para EPEC y para *E. coli* K-12 en un 38% desde la adición de la dosis más baja empleada, es decir 0.0005 mg/L de mercurio y fue disminuyendo ligeramente a partir de esta concentración hasta un máximo del 58% y del 51.3%, respectivamente (Figura 18C).

El cloruro de cobre fue adicionado a las concentraciones de 1, 2, 4, 8 y 15 mg/L. La presencia de cobre incrementó la transcripción flagelar de EPEC pero no de forma significativa y para *E. coli* K-12 no la afectó (Figura 19A). La expresión flagelar para EPEC en presencia de cobre se ve un poco mayor a la concentración de 2 mg/L (Figura 19B) pero no existieron cambios para *E. coli* K-12. El crecimiento bacteriano no se afectó significativamente para EPEC ni para *E. coli* K-12 a las concentraciones usadas de cloruro de cobre.

Se adicionó cloruro de cadmio a las concentraciones de 0.001, 0.003, 0.009, 0.027, 0.1, 0.25, 0.50 y 0.75 mg/L. La adición de cualquiera de las concentraciones probadas de cadmio no afectó significativamente la transcripción flagelar de EPEC, aunque se ve una ligera disminución (23%) a la concentración de 0.75 mg/L.



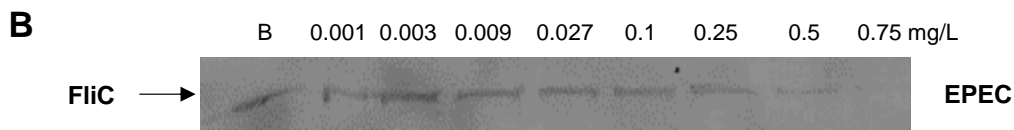
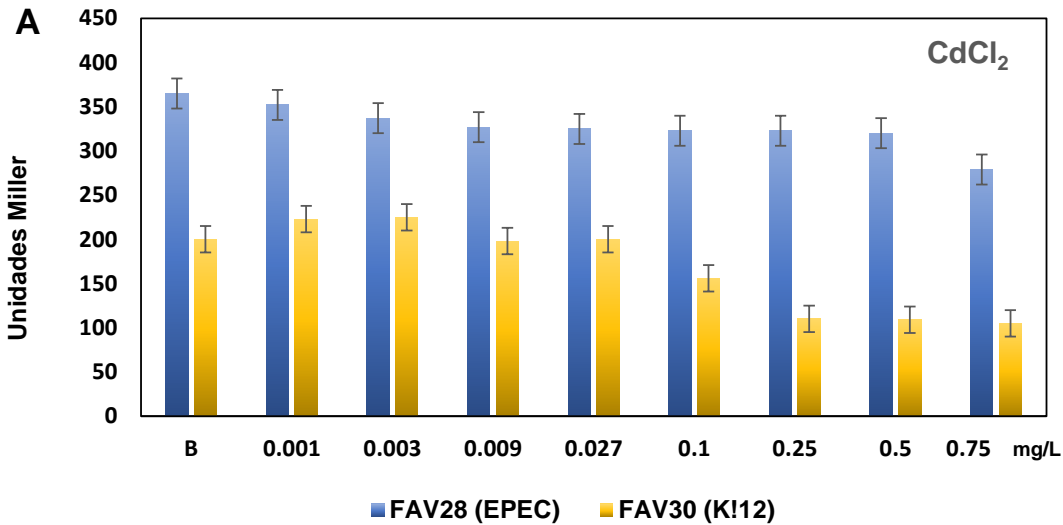
**Figura 18.** Comportamiento del flagelo de EPEC y su sobrevivencia en presencia de mercurio. (A) La presencia de mercurio incrementó significativamente la transcripción flagelar de EPEC en 1.7 veces a 0.0005 mg/L, para *E. coli* K-12 se observó una disminución dosis dependiente siendo significativa a partir de la concentración de 0.004 mg/L. (B) La expresión flagelar para EPEC y para *E. coli* K-12 presentó el mismo patrón que la transcripción flagelar. (C) El crecimiento bacteriano disminuyó para EPEC y para *E. coli* K-12 en un 38% con la adición de 0.0005 mg/L de mercurio y fue disminuyendo ligeramente a partir de esta concentración hasta un máximo del 58% y del 51.3%, respectivamente. Fuente: Elaboración propia, 2014.



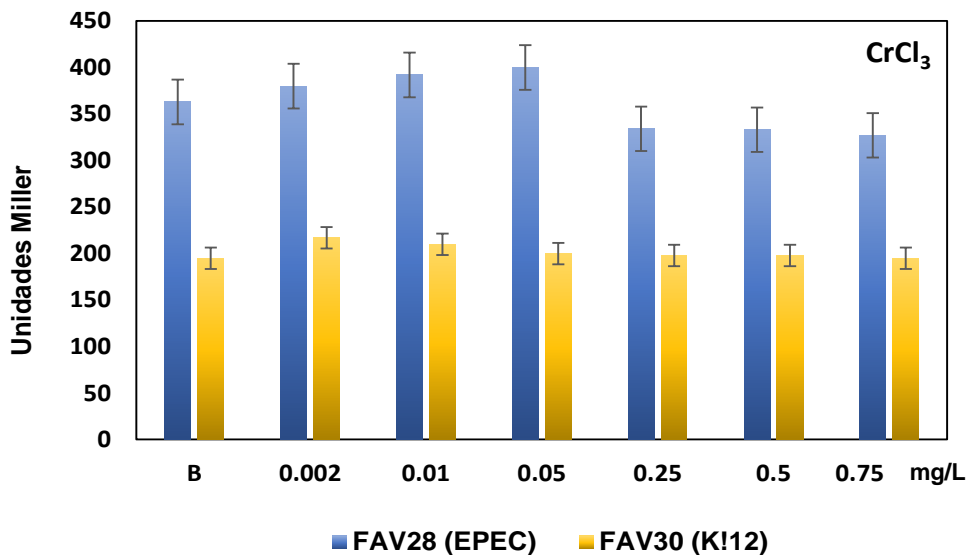
**Figura 19.** Comportamiento del flagelo de EPEC y *E. coli* K-1 2 en presencia de Cu<sup>+2</sup>. (A) La presencia de cobre no incrementó significativamente la transcripción flagelar de EPEC y para *E. coli* K-12 no la afectó. (B) La expresión flagelar para EPEC se ve ligeramente incrementadas a la concentración de 2 mg/L. Fuente: Elaboración propia, 2014.

Para *E. coli* K-12 la transcripción flagelar disminuyó significativamente ( $p=0.0001$ ) en un 47.5% a la concentración de 0.75 mg/L de cadmio (Figura 20A). Pero se observó un incremento moderado en la movilidad de EPEC desde la concentración de 0.15 mg/L (Tabla 5). La expresión flagelar se observó afectada para EPEC a la concentración de 0.75 mg/L de cloruro de cadmio (Figura 20B), en *E. coli* K-12 no se observaron cambios. No se afectó significativamente el crecimiento bacteriano para ninguna de las dos cepas a las concentraciones probadas.

El cloruro de cromo III se utilizó a las concentraciones de 0.002, 0.01, 0.05, 0.25, 0.5 y 0.75 mg/L. La adición de cromo no afectó la transcripción ni la expresión flagelar de EPEC ni de *E. coli* K-12 como lo muestra la Figura 21. Tampoco afectó el crecimiento bacteriano a las concentraciones probadas.

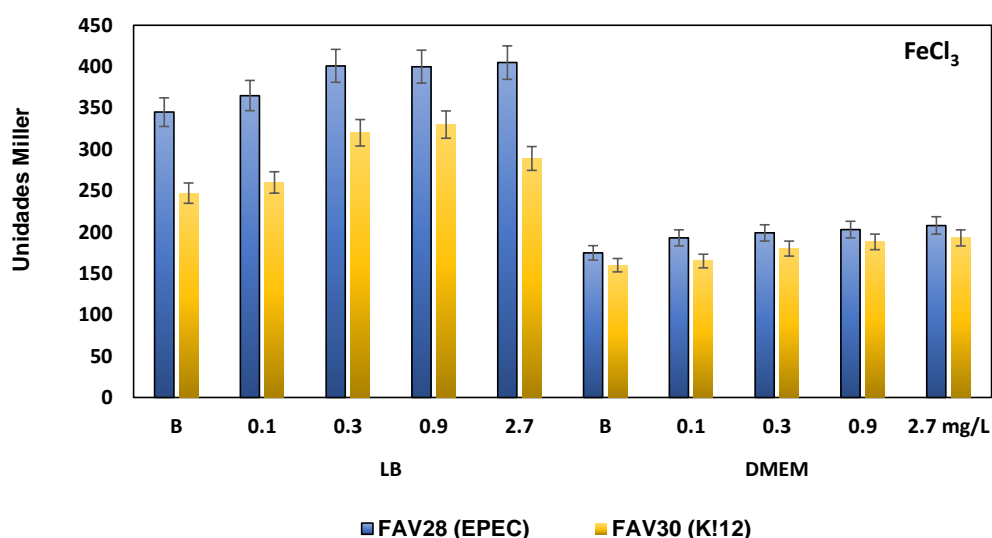


**Figura 20.** Efecto de cadmio en el flagelo de EPEC. (A) La adición de Cd<sup>2+</sup> no afectó significativamente la transcripción flagelar de EPEC, aunque se ve una disminución del 23% a 0.75 mg/L, para *E. coli* K-12 disminuyó en un 47.5% a la concentración de 0.75 mg/L. (B) La expresión flagelar se observó afectada para EPEC a la concentración de 0.75 mg/L de cloruro de cadmio. Fuente: Elaboración propia, 2014.



**Figura 21.** Efecto del cromo en el flagelo de EPEC. La adición de cromo no afectó la transcripción flagelar de EPEC ni de *E. coli* K-12. Fuente: Elaboración propia, 2014.

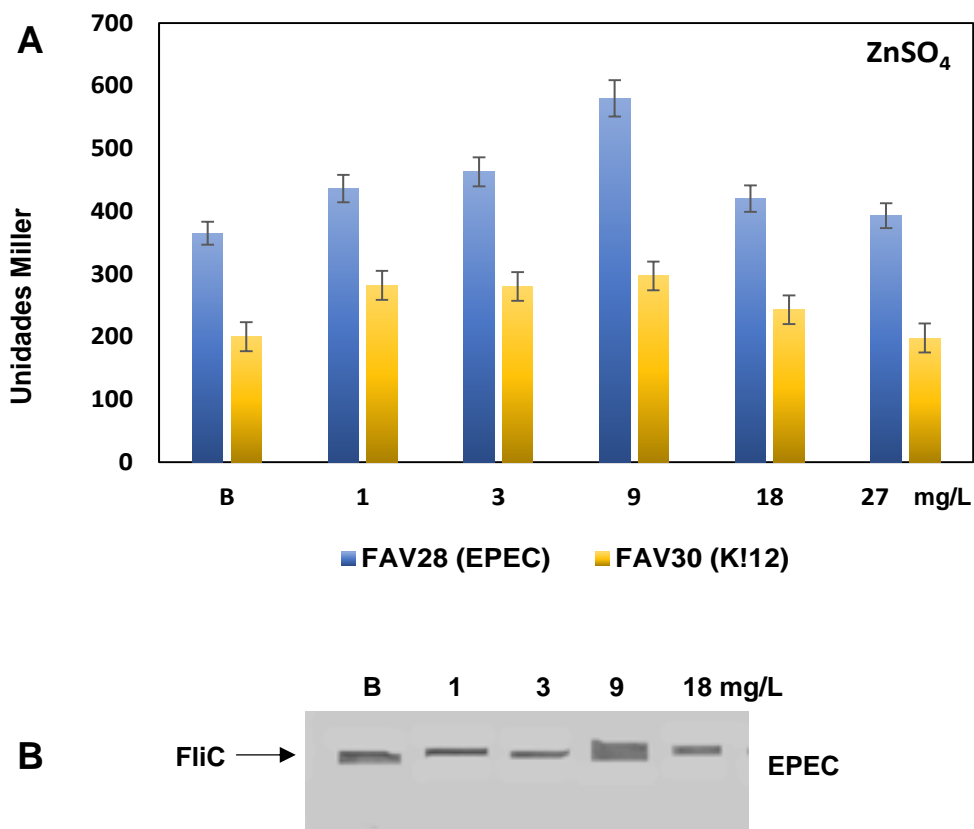
El cloruro de hierro III se adicionó a las concentraciones de 0.1, 0.3, 0.9, y 2.7 mg/L. Aunque la adición del ión  $\text{Fe}^{+3}$  incrementó aparentemente la transcripción flagelar no fue de forma significativa tanto para EPEC como para *E. coli* K-12 (Figura 22). En la expresión flagelar de EPEC y de *E. coli* K-12 no se observaron diferencias entre el medio adicionado y sin adicionar (datos no mostrados). El crecimiento bacteriano no se afectó significativamente a las concentraciones empleadas.



**Figura 22.** Hierro y su efecto sobre el flagelo de EPEC. Se observó que la transcripción flagelar de EPEC y de *E. coli* K-12 no se afectó significativamente por la presencia del cloruro de hierro III a las concentraciones utilizadas. Fuente: Elaboración propia, 2014.

El zinc se adicionó en forma de sulfato de zinc a las concentraciones de 1, 3, 9 y 27 mg/L. La presencia de Zn no afectó significativamente la transcripción flagelar de EPEC a pesar de que a la concentración de 9 mg/l se observó un ligero incremento, en *E. coli* K-12 no se afectó la transcripción flagelar (Figura 23A). La expresión flagelar en presencia de zinc, siguió un patrón similar a la transcripción flagelar de EPEC, observándose una mayor expresión flagelar para EPEC a 9 mg/L de zinc, al igual que la movilidad que se incrementó moderadamente (Figura 23B y Tabla 5), pero no se afectó la expresión flagelar de *E. coli* K-12 (datos no mostrados).

No se afectó el crecimiento bacteriano de EPEC ni de *E. coli* K-12 por la adición de las diferentes concentraciones de zinc.



**Figura 23.** Relación del flagelo de EPEC y el zinc. A) La presencia de Zn<sup>+2</sup> no afectó significativamente la transcripción flagelar de EPEC a pesar de que a la concentración de 9 mg/L se observó un ligero incremento, en *E. coli* K-12 no se afectó la transcripción flagelar. La expresión flagelar siguió un patrón similar a la transcripción flagelar de EPEC, observándose una mayor expresión flagelar para EPEC a 9 mg/L de zinc. Fuente: Elaboración propia, 2014.

El acetato de plomo incrementó de forma significativa la transcripción flagelar de EPEC desde la adición de 0.1 mg/L, pero el pico máximo lo presentó a la concentración de 10 mg/L (p=0.0076), para *E. coli* K-12 no se observó diferencia

significativa en la transcripción flagelar a las concentraciones de plomo empleadas (Figura 24A).

La expresión flagelar de EPEC disminuyó ligeramente desde la adición de la primera concentración de acetato de plomo (0.01 mg/L) (Figura 24B), para *E. coli* K-12 la expresión flagelar no mostró diferencia entre la adición del plomo con respecto al medio sin adicionar (datos no mostrados). El crecimiento bacteriano bajo la influencia de plomo presentó una disminución significativa tanto para EPEC (51%) ( $p=0.0084$ ) como para *E. coli* K-12 (57.4%) ( $p=0.001$ ) a la concentración de 100 mg/L (Figura 24C).

A pesar de que la expresión flagelar disminuyó a la concentración de 10 mg/L de acetato de plomo, EPEC presentó un incremento moderado en su movilidad a esta concentración (Tabla 5).

#### ***IX.3.10. Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de desinfectantes a base de metales pesados, de uso cotidiano.***

La persistencia de las bacterias en el agua o en el suelo garantiza su sobrevivencia en el ambiente, aún en presencia de agentes adversos como los metales pesados, desinfectantes y antisépticos. En muchos casos, el tratamiento con agentes desinfectantes no elimina completamente los microorganismos presentes, sólo reduce su número, retardando la acción indeseable de ellos (Brady, 2003, Codony, 2003).

Dos de los desinfectantes comúnmente empleados en agua para disminuir la carga bacteriana son: el cloruro de cobalto con aplicación en aguas residuales, que se emplea a una concentración de 0.2mg/L y se permite en el ambiente a una concentración de 0.02mg/L (EPA), y el nitrato de plata, la EPA recomienda que la plata en agua potable no exceda 0.1mg/L, y como desinfectante no más de 0.01mg/L.

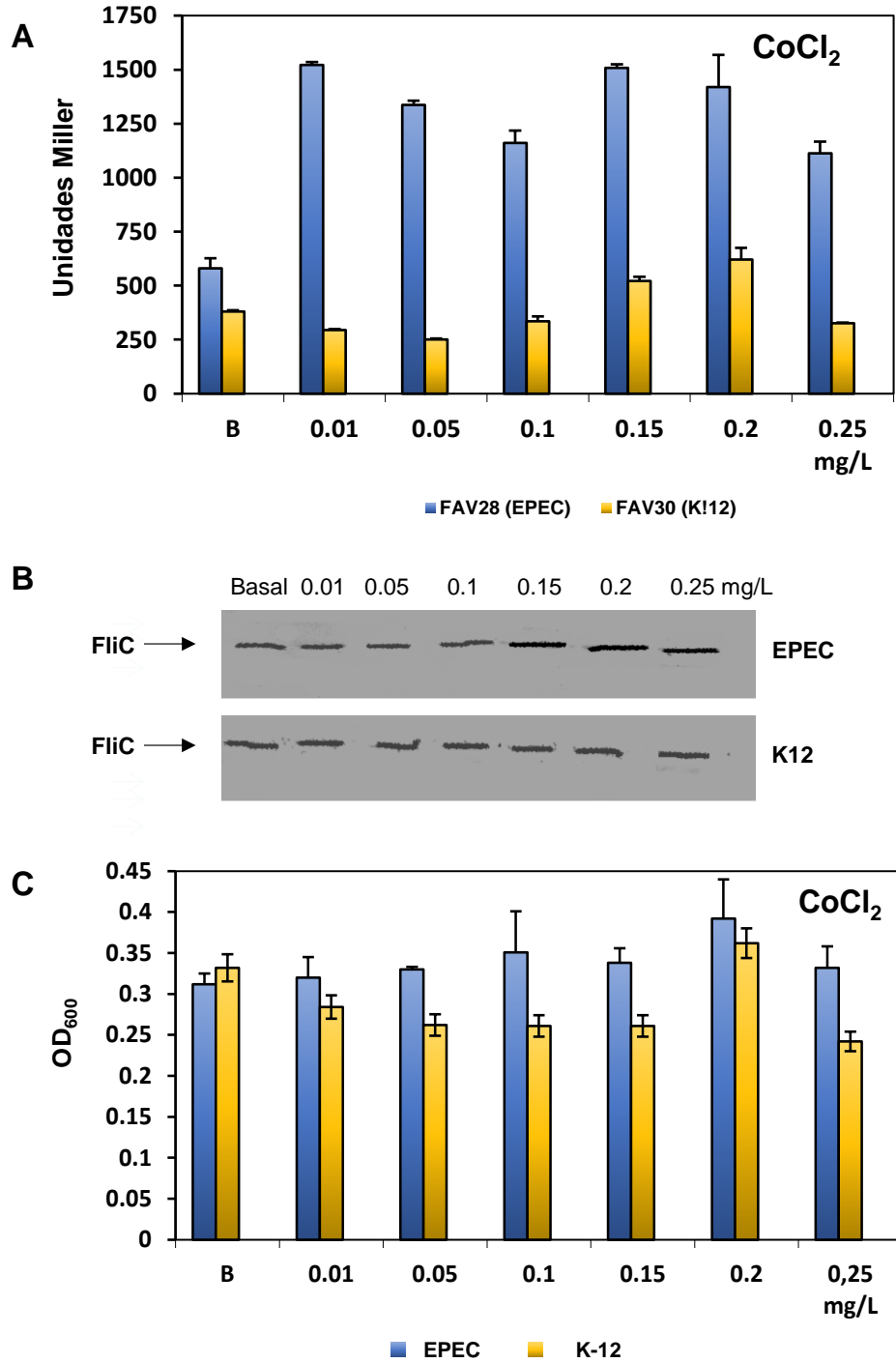


**Figura 24.** Efecto del plomo sobre la sobrevivencia de EPEC y su expresión flagelar. (A) El  $Pb^{+2}$  incrementó de forma significativa la transcripción flagelar de EPEC desde la adición de 0.1 mg/L, observándose el pico máximo a 10 mg/L, para *E. coli* K-12 no se observó diferencia significativa en la transcripción flagelar. (B) La expresión flagelar de EPEC disminuyó ligeramente desde la adición de la primera concentración de acetato de plomo (0.01 mg/L), para *E. coli* K-12 la expresión flagelar no mostró diferencia entre la adición del plomo con respecto al medio sin adicionar (datos no mostrados). El crecimiento bacteriano bajo la influencia de  $Pb^{+2}$  disminuyó significativamente en EPEC y en *E. coli* K-12 a la concentración de 100 mg/L. Fuente: Elaboración propia, 2014.

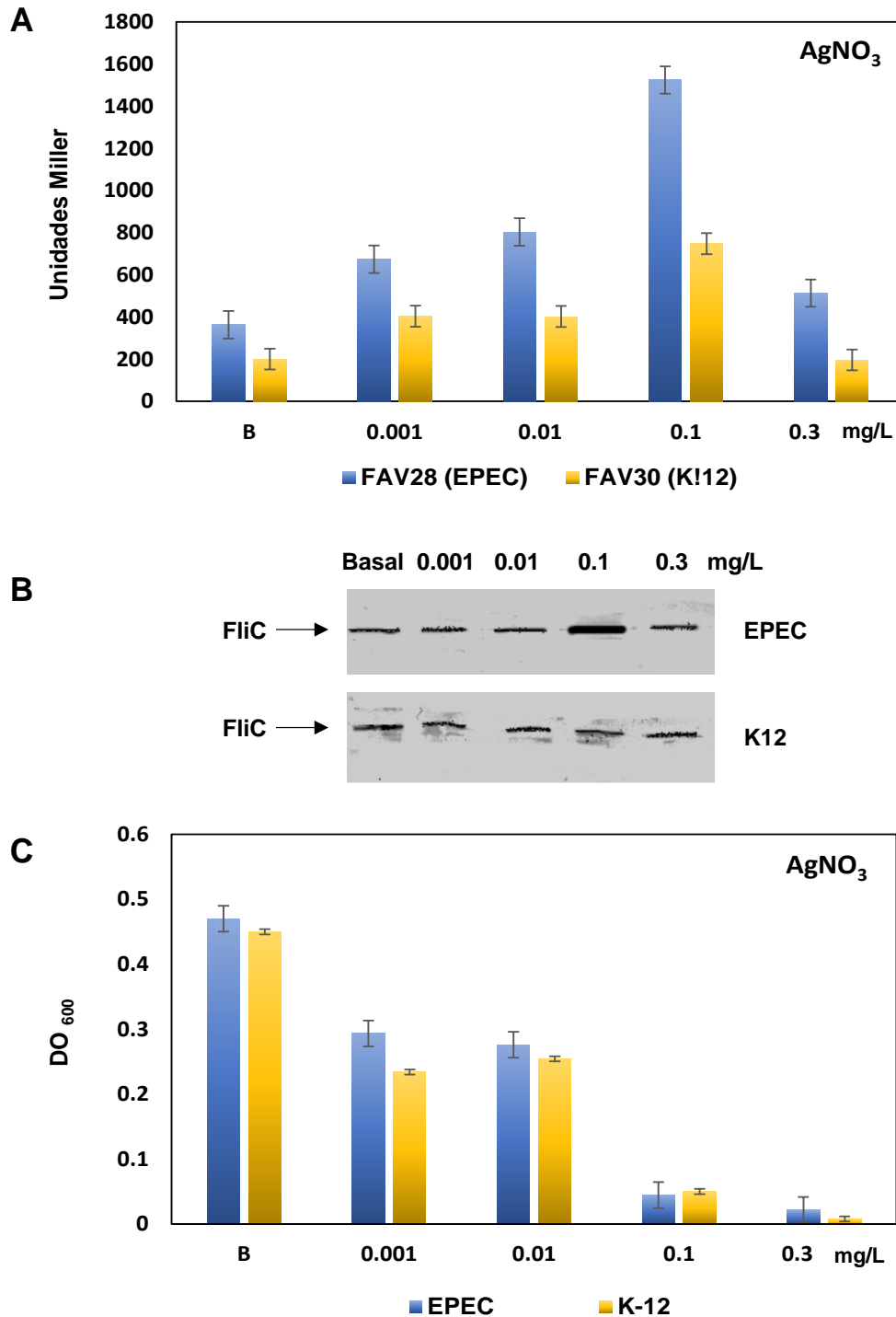


Las concentraciones de cloruro de cobalto que se probaron fueron: 0.01, 0.05, 0.1, 0.15, 0.20, 0.25 mg/L, y para nitrato de plata 0.001, 0.01, 0.1, 0.3 mg/L, la selección de los intervalos de las concentraciones se hizo una concentración abajo y una por arriba de los límites permitidos por la EPA. La transcripción flagelar se incrementó significativamente desde la primera concentración de 0.01 mg/L de cloruro de cobalto para EPEC, pero para *E. coli* K-12 se observó un incremento significativo en la transcripción flagelar a la concentración de 0.2 mg/L (Figura 25A), la transcripción flagelar está relacionada con la síntesis de RNA y para el caso del cobalto se ha reportado que *E. coli* no patógena a pesar de que disminuye su crecimiento incrementa la producción de RNA (Blundell y Wild, 1969). La expresión flagelar en presencia de cobalto mostró correlación con la transcripción flagelar tanto para EPEC como para *E. coli* K-12 (Figura 25B). El cobalto no afectó de forma significativa el crecimiento de EPEC a las diferentes concentraciones empleadas, aunque se observó un ligero incremento a la concentración recomendada por la EPA con respecto al cultivo no adicionado; para el caso de *E. coli* K-12 se observó una disminución dosis dependiente hasta 0.25 mg/L (Figura 25C).

A pesar de que el nitrato de plata es uno de los desinfectantes más utilizado para eliminar microorganismos (el prototipo es una cepa de *E. coli* K-12) de agua y verduras, se observó que no inhibió completamente el crecimiento de EPEC ni de la cepa de *E. coli* K-12 a las concentraciones que se recomiendan como desinfectante, a las concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L logran sobrevivir un número reducido de bacterias (Figura 19C), por lo que sería conveniente utilizar el nitrato de plata en combinación con otros compuestos químicos como el cobre (Kim, 2004; Hambidge, 2001). La transcripción flagelar de EPEC se incrementó a la concentración de 0.1 mg/L de nitrato de plata y se observó un incremento dosis dependiente hasta la concentración de 0.1 mg/L, después de dicha concentración se ve disminuida la transcripción. La cepa no patógena presentó un comportamiento similar (Figura 26A). La expresión flagelar de EPEC se incrementó a la concentración de 0.1 mg/L y después volvió a disminuir y para *E. coli* K-12 no se logró observar algún cambio (Figura 26B). A la concentración de 0.1 mg/L también se logra observar un incremento moderado en la movilidad de EPEC (Tabla 5).



**Figura 25.** Comportamiento de EPEC y de *E. coli* K-12 en presencia de diferentes concentraciones de cloruro de cobalto, en (A) se muestra que la transcripción flagelar de EPEC se incrementó desde la primera concentración y para *E. coli* K-12 se incrementó hasta 0.20 mg/L. (B) La expresión flagelar sigue un patrón similar a la transcripción flagelar. (C) El crecimiento de EPEC no se ve afectado significativamente y *E. coli* K-12 experimenta una disminución dosis dependiente hasta la concentración de 0.15 mg/L. Fuente: Elaboración propia, 2014.



**Figura 26.** Comportamiento del flagelo en presencia de  $\text{AgNO}_3$ . (A) La transcripción flagelar para EPEC y *E. coli* K-12 mostró un incremento dosis dependiente hasta la concentración de 0.1 mg/L, (B) La expresión flagelar de EPEC se incrementó a la concentración de 0.1 mg/L y para *E. coli* K-12 no se logró observar algún cambio. (C) La adición de  $\text{AgNO}_3$  no inhibió completamente el crecimiento de EPEC ni de la cepa de *E. coli* K-12 a las concentraciones que se recomiendan como desinfectante, sólo a las concentraciones de 0.1 y 0.3 mg/L. Fuente: Elaboración propia, 2014.

**IX.3.11. Movilidad de EPEC bajo las diferentes condiciones que afectaron la transcripción y expresión flagelar.**

La movilidad de EPEC en general estuvo relacionada a la mayor transcripción y expresión flagelar, excepto para los casos de Ca<sup>+2</sup>, en donde la transcripción no se observó incrementada a ninguna concentración empleada pero la bacteria presenta una alta movilidad (Tabla 5).

**Tabla 5.** Relación entre la transcripción de *fliC* y la movilidad en EPEC, bajo las diferentes condiciones probadas.

Nutriente adicionado	Transcripción de <i>fliC</i>	Movilidad
Cloruro de magnesio 5 mM	+	+
Sulfato de magnesio 5 mM	+	+
Cloruro de manganeso 5 mM	+	+
Cloruro de calcio 5 mM	+	+++
Sulfato de amonio 5 mM	+	++
Cloruro de sodio 200 mM	+	+
Bisulfito de sodio 5 mM	-	-
Bicarbonato de sodio 44 mM	-	-
Desoxicolato de sodio 0.1%	+	++
Epinefrina 30 µM	+	+++
Norepinefrina 30 µM	+	+++
25°C	+	++
pH 6.0	-	ND
pH 8.2	+	+
5% CO <sub>2</sub>	+	+++
Cloruro de mercurio 0.0005 mg/L	+	+
Cloruro de Cadmio 0.001 mg/L	-	+
Sulfato de zinc 9 mg/L	+	++
Acetato de plomo 10 mg/L	+	++
Cloruro de cobalto 0.15 mg/L	+	++
Nitrato de plata 0.1 mg/L	+	++

\*ND=No determinado;  
 (-)=No-móvil o transcripción disminuída;  
 (+)=poca movilidad;  
 (++) = movilidad moderada;  
 (+++) = alta movilidad.  
 Fuente:  
 Elaboración propia, 2014.

Para el caso de los metales pesados también se observó que a pesar de que EPEC esta expresando menos flagelo, el desplazamiento de la bacteria se mantiene parecido a cuando no está en presencia del metal o se ve incrementada (Tabla 5).

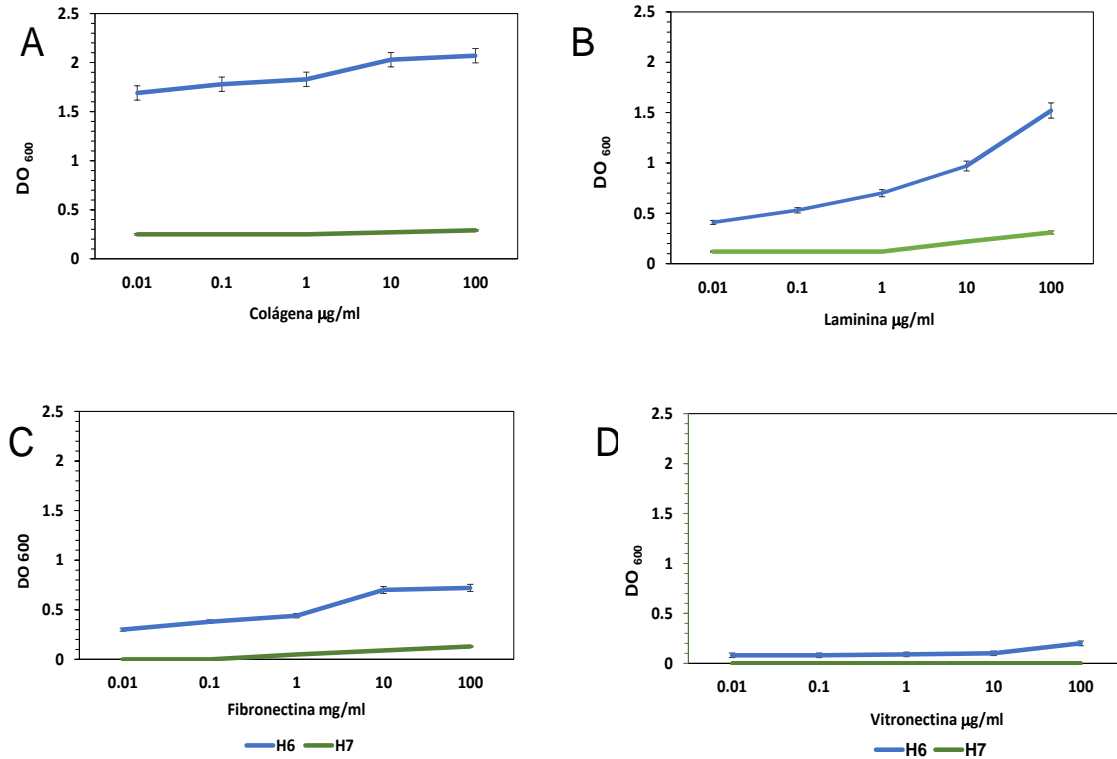
#### **IX.4. Relación del flagelo de EPEC en la adhesión y/o formación de biopelículas a superficies bióticas y/o abióticas.**

##### ***IX.4.1. Unión de flagelo H6 a proteínas de matriz extracelular (Colágena, laminina y fibronectina).***

El flagelo de EPEC es importante por la movilidad que le puede conferir a la bacteria, pero también se ha involucrado con la adherencia a células epiteliales (Girón *et al*, 2002) pero no estaba dilucidado como es que llevaba a cabo esa unión por lo que en el presente trabajo se determinó si el flagelo H6 de EPEC se unía a través de proteínas de matriz extracelular. Entre las proteínas reportadas se encuentran la colágena, laminina, fibronectina y vitronectina, por lo que fueron las utilizadas en el presente estudio. Se empleó como comparativo el flagelo H7 de *E. coli* enterohemorrágica. (EHEC) y el flagelo H34 de la cepa O86:H34.

Para determinar que proteína de matriz extracelular se unía al flagelo H6, placas sensibilizadas con flagelo H6, H7 y H34 purificados se hicieron reaccionar con diluciones seriadas de colágena, laminina, fibronectina y vitronectina (0.01 a 100 µg/mL) mediante un ensayo de ELISA.

Se observó que el flagelo H6 se unió en forma dosis dependiente a la colágena y en menor proporción a la laminina y a la fibronectina, la afinidad con respecto a la colágena fue del doble, en el caso de H7 se observó una afinidad muy baja hacia las proteínas probadas (Figura 27A, B y C), la vitronectina no fue reconocida por H6 (27D). El flagelo H34 mostró una afinidad aún menor que H7 por las proteínas de matriz extracelular (datos no mostrados).

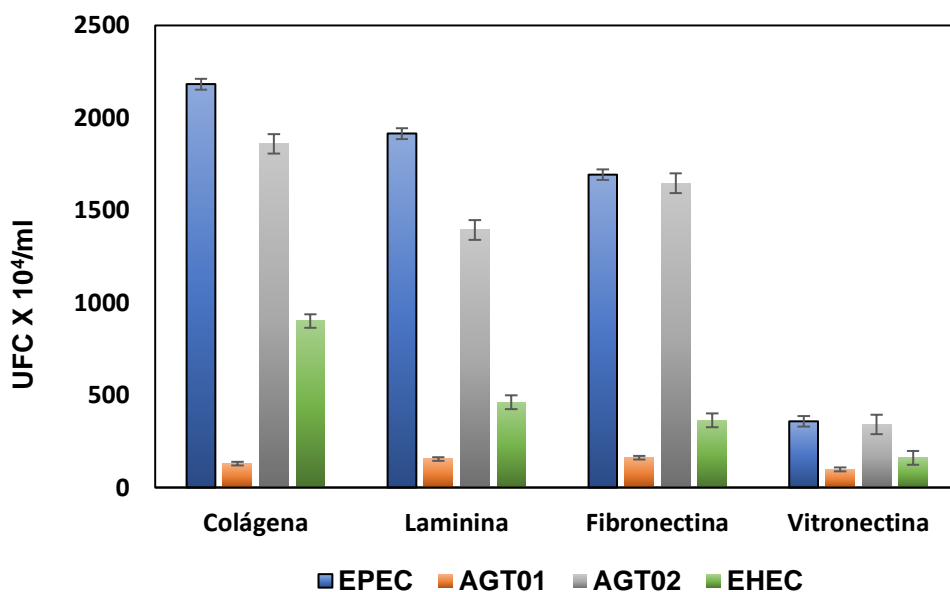


**Figura 27. Afinidad del flagelo H6 y H7 por las proteínas de matriz extracelular.** Se observó que el flagelo H6 se unió en forma dosis dependiente a la colágena (A) y en menor proporción a la laminina (B) y a la fibronectina(C), la afinidad con respecto a la colágena fue del doble, en el caso de H7 se observó una afinidad muy baja hacia las proteínas probadas, la vitronectina no fue reconocida por H6 (D). Fuente: Elaboración propia, 2014.

Para corroborar que este fenómeno de reconocimiento a las proteínas de matriz extracelular, no sólo era en el flagelo purificado, sino que correspondía a un efecto en la bacteria viva, se procedió a proveer evidencia de lo que pasaba en la mutante en flagelo de EPEC (AGT01) y la complementada en flagelo de EPEC (AGT02).

Las cepas de EPEC (O127:H6), AGT01, AGT02 y EHEC (O157:H7) fueron probadas en su habilidad para unirse con las proteínas de matriz extracelular para ello se incubaron con las proteínas de matriz extracelular inmovilizadas en portaobjetos redondos de vidrio, después de cumplir con el tiempo de incubación se plaquearon en medio LB y se realizó el recuento.

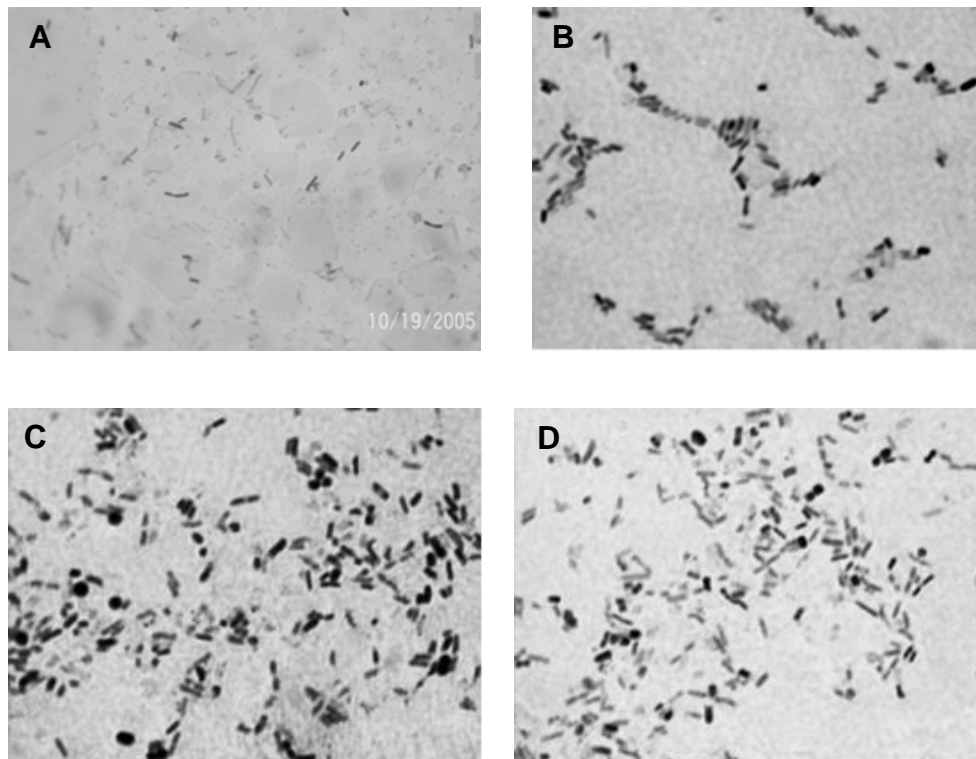
Los resultados mostraron que EPEC tiene una mayor afinidad por colágena, y después por laminina y fibronectina con respecto a EHEC (2.4 veces, 1.9 veces y 2.1 veces respectivamente), sus valores son muy similares a los de la cepa AGT02, en contraste con la mutante de flagelo (AGT01) para la cual los recuentos son muy bajos, lo que sugiere que la disminución en la adherencia es por la falta de flagelo H6. Para EHEC se observó un patrón parecido al observado con el flagelo purificado. Para vitronectina se observó que tanto EPEC como EHEC no tienen buena afinidad por ella (Figura 28).



**Figura 28.** Adherencia de EPEC, su mutante y su complementada en flagelo, y EHEC a proteínas de matriz extracelular. A diferencia de la cepa silvestre de EPEC, la mutante de flagelo (AGT01) mostró que muy pocas bacterias se unen a alguna de las proteínas de matriz extracelular probadas y que la afinidad se restaura en la cepa complementada en flagelo de EPEC (AGT02), EHEC mostró una menor afinidad por las cuatro proteínas de matriz extracelular probadas. Fuente: Elaboración propia, 2014.

#### ***IX.4.2. Formación de biopelículas sobre superficies abióticas en presencia de metales pesados.***

Para conocer si la formación de biopelículas a superficies inertes en presencia de metales pesados era uno de los factores que favorecía la persistencia de EPEC en el ambiente, la formación de biopelículas se monitoreo en presencia de los 8 metales pesados estudiados, a los 24, 48 y 72 h. Los resultados se reportan en la tabla 6. En general no se formaron biopelículas en presencia de los metales pesados, pero si se logró ver un aumento en la adherencia de EPEC al portaobjetos, como es el caso del cloruro de cobalto a las concentraciones de 0.1, 0.15 y 0.2 mg/L (Figura 29), del cloruro de mercurio a las 24 h y del nitrato de plata a las 24 y 48 h.



**Figura 29.** Formación de agregados bacterianos de EPEC en presencia de cobalto. Muestra el comportamiento de adherencia de EPEC a portaobjetos circulares de vidrio en presencia de cloruro de cobalto a las 24 h de incubación a temperatura ambiente. (A) Se observó que las bacterias adheridas al vidrio son muy escasas y que al adicionar el cloruro de cobalto a las concentraciones de (B) 0.1, (C) 0.15 y (D) 0.2 mg/L se incrementó. Fuente: Elaboración propia, 2014.



**Tabla 6.** Formación de biopelículas en presencia de diversos metales pesados a diferentes concentraciones a 24, 48 y 72 h de incubación a 25°C.

METAL PESADO	CONCENTRACION MG/L	FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS		
		24 h	48 h	72 h
Sulfato de zinc II	1	-	-	-
	3	-	-	-
	9	-	-	-
	18	-	-	-
	27	-	-	-
Cloruro de cobre II	1	-	-	-
	2	-	-	-
	4	-	-	-
	8	-	-	-
	15	-	-	-
Cloruro de mercurio II	0.0005	-	-	-
	0.001	AA	-	-
	0.002	-	-	-
	0.004	-	-	-
	0.008	-	-	-
Acetato de plomo II	0.01	-	-	-
	0.1	-	-	-
	1	-	-	-
	10	-	-	-
	100	-	-	-
Cloruro de cadmio II	0.001	-	-	-
	0.003	-	-	-
	0.009	-	-	-
	0.027	-	-	-
	0.1	-	-	-
	0.25	-	-	-
	0.5	-	-	-
0.75	-	-	-	
Cloruro de cromo III	0.002	-	-	-
	0.01	-	-	-
	0.05	-	-	-
	0.25	-	-	-
	0.5	-	-	-
Nitrato de plata I	0.001	AA	AA	-
	0.01	-	AA	-
	0.1	-	-	-
	0.3	-	-	-
Cloruro de cobalto II	0.01	-	-	-
	0.05	-	-	-
	0.1	-	-	-
	0.15	-	AA	-
	0.2	-	AA	-
0.25	-	-	-	

\*AA corresponde a aumento de adherencia

Fuente: Elaboración propia, 2014.

## X. DISCUSIÓN.

La producción y secreción de factores de virulencia de algunas bacterias patógenas están influenciadas por las características propias de la bacteria, del hospedero y del microambiente, que puede ser el hospedero mismo, un cuerpo de agua, etc., (Batabyal *et al.* 2013, Ochoa *et al.*, 2011). Algunas de las características que influyen sobre el crecimiento bacteriano pueden ser la fuente de nutrientes, sales, pH, temperatura, hormonas, gases disueltos y la presencia de agentes antimicrobianos, pueden activar la expresión de algunos genes de virulencia durante la infección o en nichos ambientales extraintestinales (Cotter y Miller, 1996; Mdzinarashvili, 2013; Mekalanos, 1992), en EPEC se ha reportado que su crecimiento en D-MEM a 37°C favorece la expresión de BFP (Puente *et al.*, 1996). Varios de los estudios que se han realizado sobre las señales que regulan la expresión de flagelo y la movilidad se han llevado a cabo en cepas de *Salmonella* y de *E. coli* K-12 (Adhler y Templeton, 1967; Walker *et al.*, 1999). Esto sugirió que el flagelo de EPEC también podría ser afectado por las condiciones, nutricionales, del hospedero y ambientales. Es importante recalcar que las bases moleculares del ensamble del flagelo, la quimiotaxis y la movilidad son muy complejas, ya que involucran varios elementos genéticos y reguladores que interactúan entre sí y que al parecer tienen marcadas diferencias entre un patogruppo y otro.

### **X.1. Cinética de transcripción y de expresión de la flagelina de EPEC y su implicación con el bicarbonato de sodio.**

Un reporte que sirve de base a este trabajo es el de Girón *et al.* en 2002, quienes observaron que la producción de flagelo de EPEC y la movilidad disminuían cuando la cepa se crece en D-MEM comparada con LB, en este estudio se

corroboraron esas observaciones y se demostró con los resultados obtenidos en la curva de crecimiento, que a pesar de que el crecimiento bacteriano es muy similar en LB y en D-MEM la transcripción y la expresión flagelar de EPEC se ven disminuidas en D-MEM.

Una de las sustancias probadas en este estudio que disminuyó la transcripción y expresión flagelar fue el bicarbonato de sodio tanto a la concentración de 22 mM como a la de 44 mM en LB, esta sustancia se sabe estimula la expresión de algunos genes de la región LEE en EHEC (Abe *et al*, 2002), pero estaría actuando como un inhibidor de la expresión flagelar de EPEC. La presencia de esta sustancia a una concentración de 44 mM en el medio D-MEM como parte de su composición podría explicar en parte porque este medio disminuye la expresión flagelar de EPEC.

## **X.2. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC bajo diferentes condiciones nutricionales.**

### ***X.2.1. La presencia de glucosa y sacarosa favorecen la transcripción y expresión flagelar de EPEC.***

Se probaron cuatro fuentes de carbono glucosa, sacarosa, acetato y citrato en medio M9, observándose que la glucosa y la sacarosa presentaron un efecto positivo en la transcripción y expresión flagelar de EPEC a las concentraciones entre 20 a 160 mM, estos resultados difieren de lo reportado anteriormente para *E. coli* K-12, que muestran que la glucosa a una concentración 0.1 M inhibe la movilidad, ejerciendo un efecto negativo sobre el flagelo por represión catabólica (Adhler y Templeton, 1967). Pero la regulación positiva por la glucosa aquí mostrada podría estar relacionada a un incremento en la disposición de energía por parte de la bacteria en su tránsito por el aparato digestivo hasta su órgano blanco. Está bien establecido que existe un gradiente de alta a baja concentración de glucosa desde el intestino delgado hasta el intestino grueso donde EPEC habita normalmente, la presencia de glucosa en el intestino delgado podría ser importante para iniciar la

síntesis de flagelo, ya que este organelo es requerido para que la bacteria se movilice y llegue hasta su nicho.

### **X.2.2. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC y *E. coli* K-12 en presencia de iones divalentes.**

Los cationes divalentes como  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  son importantes para la estabilidad e integridad de la membrana celular y para muchas funciones celulares. En este trabajo se demostró que la presencia de cationes divalentes como  $\text{Mg}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  pero no  $\text{Ca}^{2+}$ , favorecen la expresión y síntesis flagelar de EPEC y para apoyar este hallazgo se comprobó que la adición de EDTA (un agente quelante) revierte este incremento. Reportes previos establecen que el  $\text{Ca}^{2+}$  y el  $\text{Mg}^{2+}$  regulan la expresión de genes de virulencia en *Yersinia spp* y *Salmonella spp* respectivamente (Bijlsma y Groisman, 2005; Mekalanos, 1992). En EPEC la expresión de BFP y de las proteínas efectoras del SSTIII están influenciadas por la presencia de sales de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$  en los medios de cultivo (Kenny *et al*, 1997; Puente *et al*, 1996).

### **X.2.3. Influencia de las sales de amonio en la expresión flagelar.**

El nitrógeno es esencial para el crecimiento celular y el amonio es la fuente preferida de nitrógeno por muchos microorganismos inclusive en ambientes limitados de amonio como el agua de ríos y del mar (Rees *et al*, 2006), esto lo logra a través de un sistema de captura AmtB (proteína de transporte B de amonio/metilamonio) (Soupene *et al*, 1998) cuando las concentraciones de amonio están por debajo de 1mM, pero cuando se encuentra en ambientes con concentraciones más altas, el amonio entra por difusión pasiva unas 30 veces más rápido que el agua (Kim *et al*, 2012). Las tres sales de amonio empleadas incrementaron la transcripción flagelar a la concentración de 5 mM en EPEC, pero para *E. coli* K-12 aunque se observó un

ligero incremento no fue significativo, a 20 mM empieza a disminuir la transcripción flagelar, en presencia de sulfato de amonio la transcripción flagelar de *E. coli* K-12 empieza a disminuir desde la concentración de 5 mM, estos datos concuerdan con lo reportado en un estudio previo donde se observó que a una concentración de 10 mM de cloruro de amonio la movilidad era inhibida parcialmente (Adhler y Templeton, 1967). Los resultados aquí obtenidos tal vez se deban a que la bacteria se encuentra en condiciones óptimas a estas concentraciones y no es necesario que busque otro nicho.

#### **X.2.4. Influencia de las sales de sodio en la expresión flagelar.**

En EPEC y en *E. coli* K-12 en general se observó que el cloruro de sodio incrementó la transcripción y la expresión flagelar en un efecto dosis dependiente cuando se usaron concentraciones de 50 a 150 mM, pero a partir de la concentración de 250 mM se inicia su disminución de tal forma que la transcripción a 300 mM es muy parecida a la basal en los dos parámetros, siendo la tendencia de disminuir tanto de la transcripción como de expresión flagelar a partir de 250 mM, estudios previos mostraron que la adición de NaCl a 500 mM disminuían la transcripción y la síntesis flagelar y la movilidad (Shi *et al*, 1993).

### **X.3. Transcripción y expresión de flagelo de EPEC bajo diferentes condiciones ambientales intestinales y extraintestinales.**

#### **X.3.1. La presencia de sales biliares favorece la expresión del flagelo de EPEC.**

Las sales biliares son esteroides con propiedades detergentes, las cuales favorecen la digestión y absorción de las grasas en la pared intestinal (Danielsson, 1963). La sal biliar más abundante en los humanos son el colato y el desoxicolato que se encuentran conjugadas con glicina o taurina. Algunos reportes establecen que la bilis es importante para la expresión de factores de virulencia en *V. cholerae*

(Gupta y Chowdhury, 1997; Hung y Mekalanos, 2005; Schuhmacher y Klose, 1999). Sin embargo en *Proteus mirabilis* y en *E. coli* K-12 el desoxicolato de sodio al 0.1% inhibe la flagelación y la movilidad (D'Mello y Yotis, 1987). En este trabajo se mostró que el desoxicolato de sodio a las concentraciones usadas incrementó la transcripción y expresión del flagelo en EPEC, este es otro indicativo de que EPEC y *E. coli* K-12 no se regulan por los mismos mecanismos. En un estudio reciente se describe que el transcriptoma de *E. coli* O157:H7, después de su exposición a sales biliares, mostró que los niveles de RNAm para el regulón completo flagelo-quimiotaxis se incrementaron de 2 a 4 veces para los genes que codifican para la estructura del cuerpo basal del flagelo pero disminuyó 2 veces para los genes asociados con el filamento flagelar, el motor y la quimiotaxis y se redujeron los niveles de RNAm para 41 genes de la región LEE (Hamner *et al*, 2013). Estos resultados en conjunto hacen ver que los mecanismos moleculares que dictan el ensamble del flagelo, la quimiotaxis y la movilidad se deben a la implicación notablemente compleja de muchos elementos genéticos y redes reguladoras y que difieren en cada patogrupa, los resultados obtenidos en esta tesis y el reporte de Hamner son una gran aportación, que sienta las bases para comprender que el comportamiento flagelar de *E. coli* K-12 no es el mismo para las cepas patógenas y a la vez se reabre un campo de estudio con el flagelo de los otros patogrupos.

### ***X.3.2. La transcripción y expresión del flagelo de EPEC es favorecida en cultivos celulares.***

Se ha reportado que las células eucarióticas o algún producto celular secretado por ellas puede activar la expresión flagelar de EPEC (Girón *et al*, 2002), esto concuerda con los resultados obtenidos en el presente estudio en el que se observó que cultivos celulares de células HeLa incrementaron la transcripción y la expresión del flagelo de EPEC.

### **X.3.3. La transcripción y expresión de flagelo es favorecida en medio D-MEM precondicionado (PD-MEM)**

El medio D-MEM precondicionado (PD-MEM), favoreció la transcripción y la expresión flagelar de EPEC, tanto en presencia de oxígeno como de dióxido de carbono, los datos obtenidos son semejantes a los que se obtuvieron en presencia de los cultivos de células HeLa, lo que sugiere la presencia de una molécula secretada por las células al medio que está actuando como una señal positiva para la expresión de flagelo, estos datos concuerdan con lo observado por Girón *et al*, quien en 2002 reportó que el medio D-MEM inhibió la movilidad y la expresión flagelar y el PD-MEM la favoreció (Girón *et al*, 2002).

### **X.3.4. Las catecolaminas estimulan la expresión del flagelo de EPEC.**

La relación entre hormonas neuroendocrinas (catecolaminas) dentro de las cuales están incluidas la adrenalina y la noradrenalina, y la patogénesis bacteriana ha sido reconocida desde hace mucho tiempo (Lyte, 2004) niveles altos de noradrenalina en la luz intestinal desempeñan una función importante en las etapas tempranas de la sepsis (Alverdy *et al*, 2000). En este estudio se observó que las catecolaminas incrementan la expresión flagelar de EPEC, pero no de *E. coli* K-12, se ha reportado que altas concentraciones de noradrenalina incrementan el crecimiento de cepas de *E. coli* comensales y de cepas patógenas, y también se le ha relacionado con el aumento en la virulencia de *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* O157:H7 (Lyte *et al*, 1997; Sperandio *et al*, 2003).

### **X.3.5. Comportamiento del flagelo de EPEC y *E. coli* K-12 a temperatura ambiente y corporal.**

En cuanto a las dos temperaturas empleadas no hubo diferencia significativa en el crecimiento de EPEC y *E. coli* K-12, la transcripción flagelar de EPEC fue

mayor a 25°C en LB. Para *E. coli* K-12 no se observaron cambios significativos en la transcripción ni en la expresión flagelar, por lo que podemos concluir que no le afecta este intervalo de temperatura en su desarrollo. Los resultados aquí obtenidos para *E. coli* K-12 concuerdan con reportes previos que establecen que la temperatura óptima para el crecimiento de *E. coli* K-12 y a la cual no se afecta su movilidad es de 25°C a 37°C (Adler y Templeton, 1967), para el flagelo de EPEC no existen reportes previos, pero los resultados que se obtuvieron en este estudio coinciden con lo observado por inmunofluorescencia en *Hafnia alvei* (bacilo gramnegativo), la cual a 25°C presentó abundantes flagelos y a 37°C estaban en menor proporción (Padilla *et al*, 2009). Haciendo referencia que a temperatura ambiente la transcripción y la expresión flagelar se incrementaron esto puede ser un indicativo de que la bacteria al estar en condiciones diferentes a las intestinales busca mejores condiciones y activa este mecanismo.

### **X.3.6. Comportamiento del flagelo de EPEC y *E. coli* K-12 bajo diferentes valores de pH.**

*E. coli* comúnmente encuentra una amplia variedad de pH en el tracto digestivo humano, la colonización del intestino requiere que las bacterias sobrevivan a valores de pH estomacales tan bajos como de 1 o 2, hasta valores altos de pH 10 que se deben a la secreción pancreática, y después ya establecidas en el intestino delgado a valores de pH de 5 a 7 y en intestino grueso a valores de pH de 8-8.2 (Evans *et al*, 1988). El efecto del pH en las bacterias entéricas contribuye a la enfermedad, se ha observado que valores de pH bajos incrementan la expresión de algunos factores de virulencia como en *Vibrio cholerae* y *Salmonella entérica* (Bearson *et al*, 1998; Behari *et al*, 2001). En el presente estudio se observó que el valor de pH óptimo para la transcripción y la expresión de flagelina fue 8.2 para EPEC, para *E. coli* K-12 no se observó diferencia en la transcripción ni en la expresión flagelar. Se ha reportado que en *E. coli* K-12 *fliC* disminuye su transcripción flagelar y su movilidad a valores extremos de pH 5 y 8.7 (Maurer *et al*,



2005), esto se puede deber a que la flagelina no se ensambla de forma correcta (Chang *et al*, 2012), pero no existen reportes específicos para EPEC.

### ***X.3.7. Comportamiento del flagelo de EPEC y E. coli K-12 en presencia de oxígeno o dióxido de carbono.***

*E. coli* es un microorganismo anaerobio facultativo y es por ello que puede crecer bien en el intestino delgado y en el grueso. En el presente estudio se observó que el dióxido de carbono fue uno de los más importantes inductores de la expresión flagelar de EPEC en LB y D-MEM, varios estudios reportan que el oxígeno y el dióxido de carbono afectan directamente la producción de factores de virulencia mediante la regulación de la expresión de los genes o por alteración del valor de pH ambiental (Kenny *et al*, 1997; Yarwood y Schlievert, 2000).

### ***X.3.8. Incremento de la transcripción y expresión flagelar de EPEC crecida en un medio de cultivo que simula el ambiente intestinal.***

El medio de cultivo diseñado por la adición a PD-MEM, de 5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 5 mM de MnCl<sub>2</sub>, 5 mM de (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 150 mM de NaCl, 0.1% de desoxicolato de sodio, valor de pH ajustado a 8.2 y crecimiento en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%, promovió la transcripción y expresión flagelar de EPEC de forma óptima (13 veces comparado con el medio sin adicionar). Las condiciones que se trataron de emular en este medio son lo más parecidas a las existentes en la atmósfera intestinal, lo que sugiere que el flagelo desempeña una función importante en la patogénesis de la bacteria.

### **X.3.9. Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de metales pesados que se pueden encontrar como contaminantes ambientales.**

El ión  $\text{Cu}^{+2}$  es uno de los iones divalentes de transición más estables, presenta una alta afinidad por las metaloproteínas, en las bacterias el cobre es utilizado como catalizador para las reacciones de transferencia de electrones por algunas metaloenzimas. El cobre en condiciones anaerobias se encuentra en su forma  $\text{Cu}^{+1}$  que es la más reactiva, esta actúa directamente rompiendo las estructuras proteicas. Cuando el cobre se encuentra intracelularmente es controlado finamente ya que es altamente tóxico (Dupont *et al*, 2011). El cobre que se empleó en este estudio fue el ión  $\text{Cu}^{+2}$  el cual incrementó ligeramente la transcripción y la expresión flagelar de EPEC pero en *E. coli* K-12 no las afectó. El crecimiento bacteriano no se afectó significativamente para EPEC ni para *E. coli* K-12 a las concentraciones usadas de cloruro de cobre, esto se debió probablemente a que las enterobacterias patógenas excluyen del citoplasma el cobre no unido para evitar la competencia con los ligandos naturales de las metaloproteínas (Nies y Herzberg, 2013), lo hacen a través de tres mecanismos: exportando el cobre citoplásmico al periplasma por medio de ATPasas, detoxificando el cobre usando una oxidasa multicobre CueO o eliminando el cobre periplásmico exportándolo o secuestrándolo (Hodgkinson y Petris, 2012).

Los resultados obtenidos para el comportamiento de EPEC y *E. coli* K-12 son diferentes en presencia de  $\text{Hg}^{+2}$ , en inicio la transcripción flagelar para EPEC se mantiene por encima de la basal a todas las concentraciones de mercurio y para *E. coli* K-12 se observó una disminución dosis dependiente; la expresión flagelar para EPEC se incrementó a la concentración de 0.001 y 0.002 disminuyendo hacia las dos últimas concentraciones y para *E. coli* K-12 presentó una disminución gradual, mostrando que se activa una respuesta quimiotáctica más marcada en EPEC. El crecimiento bacteriano disminuyó para EPEC y para *E. coli* K-12 desde la concentración más baja, pero aún a la concentración de 0.016 mg/L ( $5.8 \times 10^{-5}$  mM) se mantiene aproximadamente un 40% de células viables. La resistencia a  $\text{Hg}^{+2}$  en la bacteria se debe a la presencia de una reductasa mercúrica, la cual reduce el  $\text{Hg}^{+2}$  a

Hg(0) en el citoplasma a donde es llevado por un sistema de transporte de iones Hg<sup>+2</sup> específico (Brown *et al*, 2002). Se ha mostrado previamente que bajo condiciones anaeróbicas que a valores de pH entre 6 y 8 la acumulación intracelular del Hg<sup>+2</sup> es muy baja, y en condiciones aeróbicas se observan concentraciones bajas a pH de 7.2 pero hacia 6.3 el incremento es importante (Golding *et al*, 2008), es importante hacer notar que en este estudio las condiciones fueron aerobias y el valor de pH de 7.2, y que no existen reportes previos sobre el comportamiento del flagelo de *E. coli* en presencia de Hg<sup>+2</sup>.

El cadmio es un metal pesado extremadamente tóxico sin función biológica conocida, que a concentraciones elevadas puede detener el crecimiento de *E. coli* K-12 acompañado de la elevación de un conjunto de proteínas que son inducidas (CDPs) únicamente ante la estimulación por estrés por cadmio que se codifican mayoritariamente en el operon *yodA* (Stojnev *et al*, 2007). Lo que se observó en este trabajo es que la adición de cadmio sólo afectó la transcripción y expresión flagelar ligeramente a la más alta concentración usada (0.75 mg/L ó 4X10<sup>-6</sup> mM), para *E. coli* K-12 los efectos fueron similares aunque en la transcripción se acentuaron más, el crecimiento bacteriano no se afectó significativamente para ambas cepas, estos resultados aparentemente no concuerdan pero reportes previos mencionan que la movilidad de *E. coli* K-12 se ve inhibida a concentraciones mayores a 1X10<sup>-5</sup> mM (Adler y Templeton, 1967), dosis que no fue incluida por considerarse extremadamente elevada.

La adición de cromo se hizo en forma de Cr<sup>+3</sup> debido a que es menos peligroso que el Cr<sup>+6</sup> que es altamente carcinogénico, a las concentraciones empleadas no se afectó la transcripción, la expresión flagelar, ni el crecimiento de EPEC ni de *E. coli* K-12, esto se debió probablemente a que los compuestos de Cr<sup>+3</sup> generalmente son poco activos debido a que los complejos Cr<sup>+3</sup>-agua no atraviesan con facilidad la membrana celular (Arakawa y Tang, 2008) y a que las concentraciones que se emplearon fueron bajas (1.26X10<sup>-8</sup> M – 4.7X10<sup>-6</sup> M), ya que un estudio reportó que a la concentración de 10<sup>-4</sup> M se estimula la movilidad de *E. coli* K-12 (Adler y Templeton, 1967).

El  $\text{Fe}^{+3}$  se encuentra principalmente en los espacios extracelulares en el hospedero, unido a transferrina, lactoferrina y ferritina, los sideróforos bacterianos secretados pueden remover el hierro desde estas proteínas y formar un complejo hierro-sideróforo que es reconocido por los receptores en la superficie bacteriana y es transportado por *E. coli* K-12 a través del sistema Efe B y su parólogo EfyX y por otros sistemas de tal manera que el hierro sea captado en la mayor cantidad posible en nichos limitados de hierro, en los que la bacteria compite con otros microorganismos en el ambiente o con las proteínas del hospedero para adquirir el hierro. El principal regulador del transporte del hierro es Fur y se activa in vitro cuando la concentración excede a  $10^{-6}$  M (Porcheron *et al*, 2013), en el presente estudio la concentración más alta que se empleó fue de  $1.6 \times 10^{-5}$  M posiblemente por eso no se observaron cambios significativos en la transcripción y expresión flagelar de EPEC ni de *E. coli* K-12, y tampoco se afectó el crecimiento bacteriano.

El zinc es un metal de transición, esencial en todos los organismos, en las bacterias desempeña funciones en la expresión de genes, en el metabolismo celular general y actúa como cofactor de algunos factores de virulencia. Proteínas ligadas al zinc en las bacterias están involucradas en la replicación del DNA, en la glicolisis, en la regulación del pH y en la biosíntesis de aminoácidos extracelulares y, como a diferencia de los otros metales de transición no sufre reacciones redox, ayuda al mantenimiento intracelular del sistema bufer redox; la concentración aproximada de zinc en *E. coli* K-12 es de  $10^{-4}$  M (Outten y O'halloran, 2001); esto explica el comportamiento en general que presentaron EPEC y *E. coli* K-12 en el presente estudio porque las concentraciones de Zn que se usaron estuvieron dentro de la cantidad que requiere la bacteria para su funcionamiento normal, ya que la concentración más elevada fue de 2.7 mg/L ( $1.6 \times 10^{-4}$ ), esto explica porque no se afectó el crecimiento, la transcripción, ni la expresión flagelar de forma significativa en general, excepto porque se observó un incremento ligero en la transcripción y en la expresión flagelar de EPEC a la concentración de 9 mg/L, esto nos indica una vez más que la regulación de EPEC y *E. coli* K-12 no son iguales. El zinc a pesar de ser indispensable, cuando no se halla unido a proteínas se considera tóxico, la

homeostasis del zinc en las enterobacterias se debe a la acción de una bomba que regula la entrada y salida del zinc (Wang *et al*, 2012).

El plomo es un metal tóxico que fue ampliamente usado en productos caseros, pinturas, pigmentos, mezclas plomizas y como aditivo en gasolina, aún en pequeñas concentraciones puede causar daños indeseables en la salud (Cech *et al*, 2006). En las bacterias es captado y transportado por una superfamilia de enzimas ATPasas, que transportan los cationes dentro y fuera de la célula o a los compartimentos intracelulares (Rosen, 2002). El  $Pb^{+2}$  incrementó de forma significativa la transcripción flagelar de EPEC a la concentración de 10 mg/L, para *E. coli* K-12 no se observó diferencia significativa en la transcripción flagelar a las concentraciones de  $Pb^{+2}$  empleadas, este es uno de los pocos casos en que la transcripción y la expresión flagelar no concuerdan, ya que la expresión flagelar para EPEC disminuyó ligeramente desde los 0.01 mg/L, *E. coli* K-12 no mostró diferencias. El crecimiento bacteriano disminuyó significativamente para EPEC y *E. coli* K-12 a la concentración de 100 mg/L. Estudios previos reportan también disminución del crecimiento de *E. coli* K-12 desde los 160  $\mu\text{g}/\text{mL}$  y la inhibición total a los 320  $\mu\text{g}/\text{mL}$  debido a daño en la membrana celular al intercambiarse el Pb (II) por el  $Ca^{+2}$  en los sitios de unión del LPS (Peng *et al*, 2007). Otro estudio sobre el flagelo de *Bacillus cereus* mostró que la expresión de flagelo era inhibida por la adición de 1 mM de acetato de plomo (Singh *et al*, 2014), las concentraciones que se emplearon en este estudio fueron menores ya que la más alta fue de 0.3 mM (100 mg/L).

#### **X.3.10. Comportamiento del flagelo de EPEC en presencia de desinfectantes a base de metales pesados, de uso cotidiano.**

La persistencia de las bacterias en el agua o en el suelo garantiza su sobrevivencia en el ambiente aún en presencia de agentes adversos como desinfectantes y antisépticos. En muchos casos, el tratamiento con agentes desinfectantes no elimina completamente los microorganismos presentes, sólo

reduce su número, retardando la acción indeseable de ellos (Brady, 2003, Codony, 2003). Entre los desinfectantes más usados para agua se encuentran el cloruro de cobalto y la plata.

El cloruro de cobalto es usado como un desinfectante en aguas residuales, aunque es un elemento natural en el medio ambiente, que puede estar en aire, agua y depositarse sobre la tierra; por lo que se está expuesto a respirarlo, beberlo y comerlo (Sánchez, 2001). El cobalto es necesario para el humano ya que forma parte de la vitamina B12, pero su sobredosis disminuye la actividad de la tiroides y puede favorecer la formación de bocio y causar alteraciones sanguíneas, trastornos del sistema nervioso, lesiones cardíacas y fibrosis pulmonar crónica. Los riesgos de los compuestos del cobalto son relativamente bajos, en comparación con otros metales pesados, pero una vez que ha entrado en el medio ambiente no puede ser retirado; pudiendo reaccionar con otras sustancias o ser absorbido por partículas del suelo o del agua, movilizándose bajo condiciones ácidas (Heldt, 2005). En este estudio se observó que el cobalto no afectó de forma significativa el crecimiento de EPEC a las diferentes concentraciones de cobalto empleadas, esto pudo ser debido a que en un inicio el cobalto es utilizado por los microorganismos para la biosíntesis de la vitamina B12 (Heldt, 2005) pero cuando es excesivo, le es tóxico y es eliminado a través de un sistema transportador secundario de cobalto y níquel, lo que hace posible que algunos microorganismos crezcan de forma similar a todas las concentraciones empleadas, estudios previos realizados con cepas de *E. coli* K-12 reportan su disminución en el crecimiento (Blundell y Wild, 1969; Ranquet *et al*, 2007), pero no existen reportes para EPEC. La transcripción flagelar se incrementó significativamente desde la primera concentración de 0.01 mg/l para EPEC y para *E. coli* K-12 se observó un incremento significativo a la concentración de 0.2 mg/l, la transcripción flagelar está relacionada con la síntesis de RNA y para el caso de cobalto se ha reportado que *E. coli* no patógena a pesar de que disminuye su crecimiento incrementa la producción de RNA (Blundell y Wild, 1969). La movilidad para EPEC se incrementó ligeramente a la concentración de 0.15 mg/l a diferencia de *E. coli* K-12 que mostró una disminución significativa a la misma concentración.

Los datos obtenidos en este estudio sugieren que la regulación de flagelo en presencia de cobalto para EPEC y *E. coli* K-12 pueden ser diferentes.

Algunos compuestos a base de plata sirven como desinfectante de frutas, verduras y agua (Silver, 2003). La plata se encuentra comúnmente en el ambiente combinada con otras sustancias como sulfuro, cloruro y nitrato, esta puede ser liberada al aire y al agua a través de procesos naturales como la erosión de rocas; o por actividades humanas como el procesamiento de minerales (Sánchez, 2001), la manufactura de cemento, la quema de combustibles fósiles y los procesos de fotografía. La formación de componentes insolubles con aniones, grupos sulfhídricos y materiales biológicos como las enzimas, forman parte de la capacidad biocida de la plata, la que desplaza las uniones de los átomos de hidrógeno entre los nitrógenos adyacentes de las purinas y las pirimidinas causando la desnaturalización del ácido desoxirribonucleico y evitando su replicación en las bacterias. A pesar de que el nitrato de plata es uno de los desinfectantes más utilizado por la población para eliminar microorganismos de agua y verduras, en el presente estudio se observó que EPEC sobrevivió a las concentraciones estimadas como biocidas y aún en concentraciones máximas permisibles por la normatividad, este sería uno de los factores que contribuyen a la persistencia de los microorganismos en el medio ambiente, por lo que sería conveniente utilizarlo en combinación con otros compuestos químicos (Hambidge, 2001; Kim, 2004; Rodriguez *et al*, 2007).

Los datos obtenidos concuerdan con lo reportado por Chang *et al* quienes observaron que el nitrato de plata disminuía la población bacteriana, pero las células que sobrevivían no presentaban daños severos aún a las 96 h de contacto (Chang *et al*, 2007), La resistencia de *E. coli* K-12 a la plata radica en la presencia del sistema CusCFBA que es un sistema responsable de la tolerancia de cobre<sup>+1</sup>/plata<sup>+1</sup>, pero que no ha sido reportado en EPEC que es el caso en estudio, pero podría ser ya sea ese sistema o uno parecido el que estuviera dando la resistencia a la plata en EPEC. También se observó que la transcripción de flagelo presentó su mayor incremento a la concentración en donde el crecimiento disminuyó, lo que lo involucra como uno de los posibles factores de sobrevivencia de EPEC. La plata también se ha reportado

como inhibidor de la formación de biopelículas, lo que constatamos en este trabajo (Silver, 2003).

#### **X.4. Relación del flagelo de EPEC en la adhesión y/o formación de biopelículas a superficies bióticas y/o abióticas.**

##### ***X.4.1. Unión de flagelo H6 a proteínas de matriz extracelular (Colágena, laminina y fibronectina).***

El antecedente previo a esta parte del proyecto es el reporte de que el flagelo de EPEC contribuye a la adherencia a células epiteliales (Girón *et al*, 2002), pero no se mostraba cual era el mecanismo mediante el cual se lleva a cabo la adherencia. Se ha demostrado que algunas proteínas o moléculas insertadas en la membrana celular sirven de receptores para los microorganismos, como es el caso de *C. difficile* para el que se reportó que *FliC* y *FliD* median la unión a la capa mucosa del intestino (Tasteyre *et al*, 2001), en *Brucella* (bacilo corto Gramnegativo) la adherencia a células epiteliales (células HeLa) en cultivo se debe a la interacción específica entre la proteína de superficie SP41 con los residuos de ácido siálico de la membrana celular (Catañeda *et al*, 2006).

La adherencia a células epiteliales es un paso crucial en la colonización bacteriana a las células intestinales. Estudios previos han mostrado que algunas proteínas de matriz extracelular sirven como receptores para varias bacterias patógenas (Joh *et al*, 1999; Westerlund *et al*, 1989). Entre las proteínas reportadas se encuentran la colágena, laminina, fibronectina y vitronectina, por lo que fueron las utilizadas en el presente estudio. Se empleó como comparativo el flagelo H7 de *E. coli* enterohemorrágica. (EHEC) y el flagelo H34 de la cepa O86:H34. El flagelo H6 de EPEC presentó mayor afinidad por colágena, laminina y fibronectina que el flagelo H7 de EHEC, y no presentó afinidad a la vitronectina. Se ha reportado que también *Borrelia burgdorferi* se une específicamente a colágena tipo I (Zambrano *et al*, 2004).



#### **X.4.2. Formación de biopelículas sobre superficies abióticas en presencia de metales pesados.**

Estudios previos han demostrado que algunas bacterias son capaces de formar biopelículas tanto en superficies bióticas como abióticas y que su formación se ve influenciada por factores ambientales, tal es el caso de *Pseudomonas aeruginosa* involucrada en la fibrosis *quística* y en la formación de biopelículas a diversos materiales, que es tal vez el microorganismo mejor estudiado en la producción de biopelículas (Alshalchi y Anderson, 2014; Tashiro *et al*, 2014), *Klebsiella pneumoniae* y *E. coli* (Sánchez *et al*, 2013). *E. coli* es un microorganismo altamente adaptado a diferentes ambientes, tanto dentro de su hospedero como extraintestinalmente, por lo que se ha considerado que puede formar biopelículas para persistir en ellos, se ha observado que existen diferencias notorias entre *E. coli* K-12, en la que se han llevado la mayoría de los estudios de biopelículas, y las cepas patógenas de *E. coli*, lo que si se ha logrado establecer es que las cepas patógenas silvestres responden de forma diferente a los cambios en las condiciones ambientales a las que están sometidas y que existe una alta complejidad genética y de efectores ambientales en la formación de biopelículas dentro de las especies de *E. coli* (Reisner *et al*, 2006).

Se ha determinado que el flagelo y la movilidad son críticos para la iniciación de la formación de las biopelículas, ya que el flagelo promueve el contacto inicial célula-superficie a diferencia de la quimiotaxis que no es tan necesaria porque mutantes no quimiotácticas forman biopelículas muy parecidas a las de las cepas tipo (Pratt y Kolter, 1998). Además del contacto inicial, el flagelo está relacionado en la dispersión de la biopelícula que es la última etapa de la formación de las biopelículas (Jackson *et al*, 2002).

Dado que las biopelículas se forman principalmente en condiciones adversas se sometió a EPEC a un estado de estrés en presencia de metales pesados a diferentes concentraciones para observar si se formaban biopelículas, pero no se logró observar biopelículas maduras, solo agregados bacterianos, aunque a pesar de

que no se formaron biopelículas las bacterias lograron sobrevivir, esto podría deberse a los diferentes mecanismos de resistencia que presenta *E. coli* frente a los metales pesados, explicado en apartados anteriores. No existen reportes previos de formación de biopelículas para *E. coli* patogénicas en presencia de metales pesados, sólo en cepas de *E. coli* K-12. Se ha reportado que las biopelículas son resistentes a los metales pesados (Harrison *et al*, 2005), pero otros resultados muestran que algunos iones metálicos como el Zn (II) y el Co (II), interfieren con la formación de biopelículas en cepas de *E. coli* uropatógenicas (Hancock *et al*, 2010), esto constata la idea de que la formación de biopelículas es compleja y se ve afectada por las condiciones ambientales.

## XI. CONCLUSIONES

1. Las condiciones nutricionales y microambientales afectan la transcripción y la expresión del flagelo de EPEC al igual que la adherencia.
2. Se corroboró que D-MEM reprime la transcripción y la expresión flagelar de EPEC probablemente por la presencia de bicarbonato de sodio.
3. Los nutrientes que favorecieron tanto la expresión como la expresión flagelar de EPEC fueron la glucosa a una concentración de 0.08 M y la sacarosa a una concentración de 0.04 M, el  $Mg^{+2}$  a la concentración de 5 mM, el amonio a la concentración de 5 mM y el NaCl a las concentraciones entre 150 y 250 mM, a diferencia del bisulfito de sodio y el bicarbonato de sodio que las reprimieron.
4. Las condiciones que simularon el microambiente intestinal en que se desarrolla EPEC favorecieron la transcripción y la expresión flagelar como son la adición de desoxicolato de sodio al 0.1%, la presencia de las catecolaminas epinefrina y norepinefrina a las concentraciones fisiológicas, los cultivos celulares y las sustancias secretadas por los cultivos de células HeLa.
5. Un medio de cultivo formulado a base de D-MEM preconicionado y adicionado con 5 mM de  $MgCl_2$ , 5 mM de  $MnCl_2$ , 5 mM de  $(NH_4)_2SO_4$ , 150 mM de NaCl, 0.1% de desoxicolato de sodio, pH=8.2 e incubado en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%, que simulaba las condiciones intestinales, favoreció la transcripción y expresión de flagelo. Lo que sugiere que el flagelo de EPEC no solo está involucrado con la movilidad sino también con la colonización intestinal, confiriéndole características de factor de virulencia.
6. Otras de las condiciones ambientales que favorecieron la transcripción y la expresión flagelar fueron la incubación a temperatura ambiente (25°C), valores de pH 8.2 (alcalino), la incubación del cultivo bacteriano en una atmósfera de dióxido de carbono al 5%.

7. De los metales pesados que se pueden encontrar en el ambiente, principalmente en cuerpos de agua naturales empleados sólo  $Hg^{+2}$  y  $Pb^{+2}$  inhibieron de forma importante el crecimiento bacteriano; y  $Hg^{+2}$ ,  $Pb^{+2}$  y  $Zn^{+2}$  incrementaron la transcripción y expresión flagelar de EPEC.
8. Los desinfectantes a base de metales pesados de Co y Ag, que son de uso cotidiano, no inhibieron totalmente el crecimiento bacteriano y favorecieron la transcripción y la expresión flagelar de EPEC.
9. El flagelo H6 de EPEC mostró mayor afinidad a la colágena que a otras proteínas de matriz extracelular, concluyéndose que es la molécula receptora para la adherencia entre el flagelo H6 de EPEC y las células del hospedero.
10. En presencia de metales pesados EPEC no formó biopelículas sobre superficies abióticas, pero si se observó la formación de algunos agregados bacterianos.
11. En general el comportamiento del flagelo de EPEC y de *E. coli* K-12 es diferente bajo las diferentes condiciones nutrimentales y ambientales probadas.

## XII. BIBLIOGRAFÍA.

1. Abe H, Tatsuno I, Tobe T, Okutani A, and Sasakawa C. 2002. Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun.* 70:3500-3509.
2. Adler J. and Templeton B. 1967. The effect of environmental conditions on the motility of *Escherichia coli*. *J Gen Microbiol* 46: 175-184.
3. Agladze K, Wang X, Romeo T. 2005. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *J Bacteriol.*187:8237–8246
4. Al-Hilali SA, Almohana AM. 2011. Occurrence and molecular characterization of enteropathogenic *Escherichia coli* serotypes isolated from children with diarrhea in Najaf, Iraq. *Indian J Med Microbiol.* 29(4):383-388.
5. Alshalchi SA, Anderson GG. 2014. Expression of the lipopolysaccharide biosynthesis gene *lpxD* affects biofilm formation of *Pseudomonas aeruginosa*. *Arch Microbiol.* Aug 31. DOI 10.1007/s00203-014-1030-y
6. Alverdy JC, Holbrook F, Rocha LS, Wu RL, Musch M, Chang E, Ohman D, and Suh S. 2000. Gut-derived sepsis occurs when the right pathogen with the right virulence genes meets the right host: evidence for in vivo virulence expression in *Pseudomonas aeruginosa*. *Ann Surg* 232:480-489.
7. Anderson GG, O'Toole GA. 2008. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:85–105.
8. Arakawa H. y Tang M. 2008. Recognition and Incision of Cr (III) Ligand-Conjugated DNA Adducts by the Nucleotide Excision Repair Proteins UvrABC: Importance of the Cr(III)–Purine Moiety in the Enzymatic Reaction. *Chem Res Toxicol.* 21(6):1284–1289.
9. Arcos-Pulido MP, Ávila-Navia SL, Estupiñán-Torres SM. y Gómez-Prieto AC. 2005. Indicadores microbiológicos de contaminación de las fuentes de agua. *NOVA Rev de Am Lat y el Caribe.* 3(4):69-79.
10. Avelino-Flores F, Chávez-Bravo E, Avelino-Huerta H, Mora-Carrera H, Castañeda-Roldán EI. 2012. *Escherichia coli* enterotoxigénica: Un Panorama Actualizado en “Modelos de la Patogénesis de las Enfermedades Infecciosas II”, Benemérita Universidad autónoma de Puebla. Puebla, México pp 65-80.
11. Beloin C, Roux A, Ghigo JM. 2008. *Escherichia coli* biofilms. *Curr Top Microbiol Immunol.* 322:249–289.
12. Batabyal P, Mookerjee S, Sur D, Palit A. 2013. Diarrheogenic *Escherechia coli* in potable water sources of West Bengal, India. *Acta Trop.* 127(3):153-157.
13. Berger CN, Sodha SV, Shaw RK, Griffin PM, Pink D, Hand P, Frankel G. 2010. Fresh fruit and vegetables as vehicles for the transmission of human pathogens. *Environ Microbiol.* 12:2385-2397.
14. Bearson B, Wilson L, y Foster JW. 1998. A low pH-inducible, PhoPQ-dependent acid tolerance response protects *Salmonella typhimurium* against inorganic acid stress. *J Bacteriol* 180:2409–2417.

15. Behari J, Stagon L, y Calderwood SB. 2001. *pepA*, a gene mediating pH regulation of virulence genes in *Vibrio cholerae*. J Bacteriol. 183:178–188.
16. Bijlsma, JJ, and Groisman EA. 2005. The PhoP/PhoQ system controls the intramacrophage type three-secretion system of *Salmonella enterica*. Mol Microbiol. 57:85-96.
17. Bowden G, Li Y. 1997. Nutritional Influences on Biofilm Development. Adv Dent Res. 11(1):81-99.
18. Branda SS, Vik S, Friedman L, Kolter R. 2005. Biofilms: The matrix revisited. Trends Microbiol. 13:20–26.
19. Brinkley C, Burland V, Keller R, Rose DJ, Boutin AT, Klink SA, Blattner FR, Kaper JB. 2006. Nucleotide sequence analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid pMAR7. Infect Immun 74: 5408-13.
20. Brown NL, Shih YC, Leangt C, Glendinningf KJ, Hobman JL y Wilson JR. 2002. Mercury transport and resistance. Biochemical Society Transactions. 30(4): 715-718.
21. Cabello C. F. 2010. Los roles del ambiente, de la higiene, de la epidemiología y de las vacunas en el desafío de las enfermedades infecciosas. Rev Chil Infect. 27(6): 565-569.
22. Castañeda-Roldán EI, Ouahrani-Bettache S, Saldaña Z, Avelino F, Rendón MA, Dornand J, Girón JA. 2006. Characterization of SP41, a surface protein of *Brucella* associated with adherence and invasion of host epithelial cells. Cell Microbiol. 8(12):1877-1887.
23. Cech I, Smolensky MH, Afshar M, Broyles G, Barczyk M, Burau K. y Emery R. 2006. Lead and Copper in Drinking Water Fountains—Information for Physicians. Sout Med J. 99(2):137-142.
24. Celli J, Deng W, and Finlay BB. 2000. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) attachment to epithelial cells: exploiting the host cell cytoskeleton from the outside. Cell Microbiol. 2:1-9.
25. Chang KC, Cheng SJ, Chen YC, Huang HR, Liou JW. 2013. Nanoscopic analysis on pH induced morphological changes of flagella in *Escherichia coli*. J Microbiol Immunol Infect. 46(6):405-142.
26. Chang Q, Yan L, Chen M, He H. y Qu J. 2007. Bactericidal Mechanism of Ag/Al2O3 against *Escherichia coli*. Langmuir 23: 11197-11199.
27. Chilcott GS and Hughes K. 2000. Coupling of flagellar gene expression to flagellar assembly in *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* and *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev. 64: 694-708.
28. Cho JC, Cho HB, Kim SJ. 2000. Heavy contamination of a subsurface aquifer and a stream by livestock wastewater in a stock farming area, Wonju, Korea. Environ Pollut 109:137-146.
29. Clements A, Young JC, Constantinou N and Frankel G. 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. Gut Microbes 3(2):71–87.
30. Colón-González M, Méndez-Ortiz MM, Membrillo-Hernández J. 2004. Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli* K-12. Res Microbiol. 155(7):514-521.
31. Contreras CA, Ochoa TJ, Lacher DW, DebRoy C, Navarro A, Talledo M, Donnermberg MS, Eckler L, Gil AI, Lanata CF, Cleary TG. 2010. Allelic variability of critical virulence genes (*eae*, *bfpA*, and *perA*) in typical and atypical EPEC in Peruvian children. J Med Microbiol. 59:25-31.
32. Cossío-Torres P, Domínguez-Cortinas G, Hernández-Cruz MT, Morales-Villegas R, Van Brussel E, Díaz-Barriga Martínez F. 2011. CHICOS y PIBES, propuestas innovadoras para la atención de la salud ambiental infantil en América Latina. Acta Toxicol Argent. 19(1): 5-15.

33. Cotter PA. and Miller JF. 1996. Triggering bacterial virulence. *Science* 273:1183-1184.
34. Crawford JA, Kaper JB. 2002. The N-terminus of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) Tir mediates transport across bacterial and eukaryotic cell membranes. *Mol Microbiol.* 46(3):855-68.
35. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 26(4):822-880.
36. Danese PN, Pratt LA, Dove SL, Kolter R. 2000. The outer membrane protein, antigen 43, mediates cell-to-cell interactions within *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol.* 37:424–432.
37. Danielsson H. 1963. Influence of bile acids on digestion and absorption of lipids. *Am J Clin Nutr.* 12:214-219.
38. Da Re S, Ghigo JM. 2006. A CsgD-independent pathway for cellulose production and biofilm formation in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 188:3073–3087.
39. Dean P, Maresca M, Schüller S, Phillips AD, Kenny B. 2006. Potent diarrheagenic mechanism mediated by the cooperative action of three enteropathogenic *Escherichia coli*-injected effector proteins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 103:1876-1881.
40. Díaz LE. 2014. La Nación: Salud Pública. [http://www.nacion.com/nacional/salud-publica/Epidemia-diarrea-afecto-personas\\_0\\_1407459248.html](http://www.nacion.com/nacional/salud-publica/Epidemia-diarrea-afecto-personas_0_1407459248.html). Consulta 9 de abril de 2014.
41. Dirección General de Epidemiología. 2012. Anuarios de morbilidad: Incidencia de casos nuevos de enfermedad por grupos de edad. Secretaria de Salud. <http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/anuarios.html>. Consulta: 13 de abril de 2014.
42. Donlan RM. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emerg. Inf. Dis.* 8:881–890.
43. Dower WJ, Miller JF and Ragsdale CW. 1988. High efficiency transformation of *E. coli* by high voltage electroporation. *Nucleic Acids Res.* 16(13): 6127–6145.
44. Dunne MW Jr. 2002. Bacterial adhesion: Seen any good biofilms lately? *Clin. Microbiol. Rev.* 15:155–166.
45. Dupont CL, Grass G, y Rensing C. 2011. Copper toxicity and the origin of bacterial resistance—new insights and applications. *Metallomics* 3:1109–1118.
46. Elliott SJ, Wainwright LA, McDaniel TK, Jarvis KG, Deng YK, Lai LC, McNamara BP, Donnenberg MS, Kaper JB. 1998. The complete sequence of the locus of enterocyte effacement (LEE) from enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69. *Mol Microbiol* 28:1-4
47. Erdem AL, Avelino F, Xicohtencatl-Cortes J, and Girón JA. 2007. Host Protein Binding and Adhesive Properties of H6 and H7 Flagella of Attaching and Effacing *Escherichia coli*, *J Bacteriol*, 189(20):7426–7435.
48. Evans DFG, Pye R, BramLey AG, Clark TJ, Dyson J. y Hardcastle D. 1988. Measurement of gastrointestinal pH profiles in normal ambulant human subjects. *Gut* 29:1035–1041
49. Flemming HC. y Wingender J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* 8:623–633.
50. Frankel G, Phillips AD, Rosenshine I, Dougan G, Kaper JB, Knutton S. 1998. Enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: more subversive elements. *Mol Microbiol.* 30:911-921.
51. Frankel G, Lider O, Hershkoviz R, Mould AP, Kachalsky SG, Candy DC, Cahalon L, Humphries MJ, Dougan G. 1996. The cell-binding domain of intimin from enteropathogenic *Escherichia coli* binds to beta1 integrins. *J Biol Chem.* 271:20359-20364.

52. Gavin R, Merino S, Altarriba M, Canals R, Shaw JG. and Tomas JM. 2003. Lateral flagella are required for increased cell adherence, invasion and biofilm formation by *Aeromonas spp.* *FEMS Microbiol Lett.* 224: 77-83.
53. Gesche E, Vallejos MV y Sáez TM. 2003. Eficiencia de anaerobios sulfito-reductores como indicadores de calidad sanitaria de agua. *Arch Med. Vet.* 35(1):99-107.
54. Ghosh P. 2004. Process of protein transport by the type III secretion system. *Microbiol Mol Biol Rev.* 68:771-795.
55. Girón JA. 2004. Role of flagella in mucosal colonization, *Clin Microbiol Review.* 8:557-584.
56. Girón JA, Torres AG, Freer E, and Kaper JB. 2002. The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol Microbiol.* 42: 361-370.
57. Girón JA, Ho AS, Schoolnik GK. 1993. Characterization of fimbriae produced by enteropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 175: 7391-7403.
58. Gismero-Ordoñez J, Dall'Agnol M, Trabulsi LR, Girón JA. 2002. Expression of the bundle-forming pilus by enteropathogenic *Escherichia coli* strains of heterologous serotypes. *J Clin Microbiol.* 40(6):2291-2296.
59. Golding G, Sparling R. y Kelly CA. 2008. Effect of pH on Intracellular Accumulation of Trace Concentrations of Hg (II) in *Escherichia coli* under Anaerobic Conditions, as Measured Using a *mer-lux* Bioreporter. *Appl Environ Microbiol.* 74(3): 667–675.
60. Gonzales L, Joffre E, Rivera R, Sjöling Å, Svennerholm AM, Iñiguez V. 2013. Prevalence, seasonality and severity of disease caused by pathogenic *Escherichia coli* in children with diarrhoea in Bolivia. *J Med Microbiol.* 62 (Pt 11):1697-1706.
61. Greenwood Z, Black J, Weld L, O'Brien D, Leder K, Von Sonnenburg F, Pandey P, Schwartz E, Connor BA, Brown G, Freedman DO, Torresi J, GeoSentinel Surveillance Network. 2008. Gastrointestinal infection among international travelers globally. *J Travel Med.* 15:195–202.
62. Gullian-Klanian M, Durán-Casanova JG, Isla-Esquivel ML, Suárez-Wegan E. y Alarcón-Sánchez A. 2011. Estudio de factores predisponentes de enfermedad diarreica aguda en la comunidad de San Simón, Yucatán en base a un análisis de vulnerabilidad nutricional y ambiental. *Población y Salud en Mesoamérica* 9(1):1-18.
63. Guillén A. 2011. Enfermedad diarreica: Un problema recurrente de Salud Pública. *Rev Peru Med Exp Salud Pú.* 28(1): 7-8.
64. Guttman JA, Samji FN, Li Y, Deng W, Lin A, Finlay BB. 2007. Aquaporins contribute to diarrhoea caused by attaching and effacing bacterial pathogens. *Cell Microbiol.* 9(1):131-141.
65. Gupta S, and Chowdhury R. 1997. Bile affects production of virulence factors and motility of *Vibrio cholerae*. *Infect Immun.* 65:1131-1134.
66. Hambidge A. 2001. Reviewig efficacy of alternative water treatment techniques. *Health Estate.* 55: 23-25.
67. Hamner S, McInerney K, Williamson K, Franklin MJ y Ford TE. 2013. Bile Salts Affect Expression of *Escherichia coli* O157:H7. Genes for Virulence and Iron Acquisition, and Promote Growth under Iron Limiting Conditions *PLOS ONE* 8(9): 1-14.
68. Hanahan D. 1983. Studies on Transformation of *Escherichia coli* with Plasmids. *J Mol Biol.* 166:557-580.
69. Hancock V, Dahl M, Klemm P. 2010. Abolition of biofilm formation in urinary tract *Escherichia coli* and *Klebsiella* isolates by metal interference through competition for fur. *Appl Environ Microbiol.* 76(12):3836-3841
70. Hao R, Qiu S, Wang Y, Yang G, Su W, Song L, Zhang J, Chen J, Jia L, Wang L, Song H. 2012. Quinolone-resistant *Escherichia coli* O127a:K63 serotype with an extended-



- spectrum-beta-lactamase phenotype from a food poisoning outbreak in China. *J Clin Microbiol.* 50(7):2450-2451.
71. Harwood VJ, Levine AD, Scott TM, Chivukula V, Lukasik J, Farrah SR y Rose JB. 2005. Validity of the indicator organism paradigm for pathogen reduction in reclaimed water and public health protection. *Appl Environ Microbiol.* 71(6):3163-3170.
  72. Harrison JJ, Ceri H, Roper NJ, Badry EA, Sproule KM, Turner RJ. 2005. Persister cells mediate tolerance to metal oxyanions in *Escherichia coli*. *Microbiol.* 151(10):3181-3195.
  73. Heldt D, Lawrence M, Lindenmeyer E, Deery E, Healthcote P, Rigby SE, Warren MJ. 2005. Aerobic synthesis of vitamin B12: ring contraction and cobalt chelation. *Biochem Soc Trans.* 33: 815-819.
  74. Herrera A y Suárez P. 2005. Indicadores bacterianos como herramientas para medir la calidad del agua costera. *Interciencia.* 30(3) 171-176.
  75. Hill RT, Straube WL, Palmisano AC, Gibson SL, and Colwell RR. 1996. Distribution of sewage indicated by *Clostridium perfringens* at a deep-water disposal site after cessation of sewage disposal. *Appl Environ Microbiol.* 62(5):1741-1741.
  76. Hodgkinson V. y Petris MJ. 2012. Copper homeostasis at the host-pathogen interface. *J Biol Chem.* 287:13549–13555.
  77. Hung C, Zhou Y, Pinkner JS, Dodson KW, Crowley JR, Heuser J, Chapman MR, Hadjifrangiskou M, Henderson JP, Hultgren SJ. 2013. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *M Bio.* 4(5):e00645-13
  78. Hung DT y Mekalanos JJ. 2005. Bile acids induce cholera toxin expression in *Vibrio cholerae* in a ToxT-independent manner. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102:3028-3033.
  79. Intergovernmental panel on climate change. 2014. IPCC Report: A changing climate creates pervasive risks but opportunities exist for effective response. Responses will face challenges with high warming of the climate. IPCC Secretariat. 31 de Marzo, 2014. [www.ipcc.ch](http://www.ipcc.ch).
  80. Jackson W, Suzuki K, Oakford L, Simecka SW, Hart ME, Romeo T. 2002. Biofilm formation and dispersal under the influence of the global regulator CsrA of *Escherichia coli*, *J. Bacteriol.* 184:290–301.
  81. Jerse AE, Yu J, Tall BD, Kaper JB. 1990. A genetic locus of enteropathogenic *Escherichia coli* necessary for the production of attaching and effacing lesions on tissue culture cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 87:7839-7843.
  82. Joh DER, Wann B, Kreikemeyer PS. and Hook M. 1999. Role of fibronectin-binding MSCRAMMs in bacterial adherence and entry into mammalian cells. *Matrix Biol.* 18:211–223.
  83. Josenhans C, and Suerbaum S. 2002. The role of motility as a virulence factor in bacteria. *Int J Med Microbiol.* 291: 605-614.
  84. Kapatral V. and Minnich SA. 1995. Co-ordinate, temperature-sensitive regulation of the three *Yersinia enterocolitica* flagellin genes. *Mol Microbiol.* 17: 49-56.
  85. Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.* 2:123-140.
  86. Karatan E. y Watnick P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol Rev* 73:310–347.
  87. Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, Finlay BB. 1997. Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* 91:511-520.
  88. Kim J, Cho M, Oh B, Choi S, y Yoon J, 2004. Control of bacterial growth in water using synthesized inorganic disinfectant. *Chemosphere,* 55: 775-780.
  89. Kim M, Zhang Z, Okano H, Yan D, Groisman A. y Hwa T. 2007. Need-based activation of ammonium uptake in *Escherichia coli*. *Mol Systems Biology* 8(616):1-10.

90. Kiiyukia C, Kawakami H. and Hashimoto H. 1993. Effect of sodium chloride, pH and organic nutrients on the motility of *Vibrio cholerae* non-01. *Microbios* 73: 249-255.
91. Knutton S, Rosenshine I, Pallen MJ, Nisan I, Neves BC, Bain C, Wolff C, Dougan G, Frankel G. 1998. A novel EspA-associated surface organelle of enteropathogenic *Escherichia coli* involved in protein translocation into epithelial cells. *EMBO J* 17:2166-2176.
92. Kozub-Witkowski E, Krause G, Frankel G, Kramer D, Appel B and Beutin L. 2008. Serotypes and virutypes of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* strains from stool samples of children with diarrhoea in Germany. *J Appl Microbiol.* 104(2):403-410.
93. Kubori T, Matsushima Y, Nakamura D, Uralil J, Lara-Tejero M, Sukhan A, Galán JE, and Aizawa, SI. 1998. Supramolecular structure of the *Salmonella typhimurium* type III protein secretion system. *Science* 280: 602-605.
94. Lääveri T, Pakkanen SH, Antikainen J, Riutta J, Mero S, Kirveskari J, Kantele A. 2014. High number of diarrhoeal co-infections in travellers to Benin, West Africa. *BMC Infect Dis.* 14(81):1-7.
95. Lacher DW, Steinsland H, Whittam TS. 2006. Allelic subtyping of the intimin locus (*eae*) of pathogenic *Escherichia coli* by fluorescent RFLP. *FEMS Microbiol Lett* 261:80-87.
96. La Ragione RM, Sayers AR, and Woodward MJ. 2000. The role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick model. *Epidemiol Infect.* 124: 351-363.
97. Lopez GU, Gerba CP, Tamimi AH, Kitajima M, Maxwell SL, Rose JB. 2013. Transfer efficiency of bacteria and viruses from porous and nonporous fomites to fingers under different relative humidity conditions. *Appl Environ Microbiol.* 79 (18):5728-5734.
98. Lortie LA, Harel J, Fairbrother JM, Dubreuil JD. 1991. Immunodot detection of *Escherichia coli* heat-stable enterotoxin b by using enhanced chemiluminescence reaction. *J Clin Microbiol.* 29(10):2250-2252.
99. Luna-Gierke RE, Griffin PM, Gould LH, Herman K, Bopp CA, Strockbine N, Mody RK. 2014a. Outbreaks of non-O157 Shiga toxin-producing *Escherichia coli* infection: USA. *Epidemiol Infect.* 7:1-11.
100. Luna-Gierke RE, Wymore K, Sadlowski J, Clogher P, Gierke RW, Tobin-D'Angelo M, Palmer A, Medus C, Nicholson C, McGuire S, Martin H, Garman K, Griffin PM, Mody RK. 2014b. Multiple-Aetiology Enteric Infections Involving Non-O157 Shiga Toxin-Producing *E coli*. *FoodNet, 2001-2010. Zoonoses Public Health.* Feb 1.
101. Lyte M. Microbial endocrinology and infectious disease in the 21st century. 2004. *Trends Microbiol.* 12(1):14-20.
102. Lyte M, Arulanandam B, Nguyen K, Frank C, Erickson A, y Francis D. 1997. Norepinephrine induced growth and expression of virulence associated factors in enterotoxigenic and enterohemorrhagic strains of *Escherichia coli*. *Adv Exp Med Biol* 412:331-339.
103. Long F, Su Ch, Zimmermann MT, Boyken SE, Rajashankar KR, Jernigan RL y Yu EW. 2010. Crystal structures of the CusA efflux pump suggest ethionin-mediated metal transport. *Nature.* 467 (7314): 484–488.
104. Madigan MT, Martinko JM, Dunlap PV, Clark DR. 2009. *Brock Biología de los microorganismos.* España: Pearson Educación.
105. MacNab R.M. 2000. Type III protein pathway exports *Salmonella* flagella. *ASM News* 66: 738-745.
106. Mah TF y O'Toole GA. 2001. Mechanisms of biofilm resistance to antimicrobial agents. *Trend Microbiol.* 9: 34-39.

107. Maurer LM, Yohannes E, Bondurant SS, Radmacher M y Slonczewski1 JL. 2005. pH Regulates Genes for Flagellar Motility, Catabolism, and Oxidative Stress in *Escherichia coli* K-12. *J Bacteriol.* 187(1): 304–319.
108. Mdzinarashvili T., Papukashvili I., Partskhaladze T, Shengelia N. y Khvedelidze M. 2013. Study of Environmental and Antimicrobial Agents Impact on Features of Bacterial Growth. *Cell Biochem Biophys.* 66:759–764.
109. Mekalanos JJ. 1992. Environmental signals controlling expression of virulence determinants in bacteria. *J Bacteriol.* 174:1-7.
110. Mellies JL, Elliott SJ, Sperandio V, Donnenberg MS, Kaper JB. 1999. The Per regulon of enteropathogenic *Escherichia coli*: Identification of a regulatory cascade and a novel transcriptional activator, the locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator (Ler). *Mol Microbiol.* 33(2):296-306.
111. Miller JH. 1972. *Experiments in Molecular Genetics.* Cold Spring Harbor Laboratory, USA: Cold Spring Harbor.
112. Monteverde M, Cipponeri M. y Angelaccio C. 2010. Saneamiento, educación, medio ambiente y diarreas: el caso del conurbano bonaerense. *Rev Latinoam Pob.* 3(6): 57-69
113. Nataro JP, Kaper JB. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 11:142-201.
114. Nicolle, L. E. 2005. Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging.* 22:627–639
115. Ochoa TJ, Mercado EH, Durand D, Rivera FP, Mosquito S, Contreras C, Riveros M, Lluque A, Barletta F, Prada A, Ruiz J. 2011. Frecuencia y patotipos de *Escherichia coli* diarrogénica en niños peruanos con y sin diarrea. *Rev Peru Med Exp Salud Púb.* 28(1): 13-20.
116. Nies DH. y Herzberg M. 2013. A fresh view of the cell biology of copper in enterobacteria. *Mol. Microbiol.* 87:447–454.
117. Ochoa TJ, Ruiz J, Molina M, Del Valle LJ, Vargas M, Gil AI, Ecker L, Barletta F, Hall E, Cleary TG, Lanata CF. 2009. High frequency of antimicrobial drug resistance of diarrheagenic *Escherichia coli* in infants in Peru. *Am J Trop Med Hyg.* 81(2):296-301.
118. Organización Mundial de la Salud. 2003. *Emerging Issue en water and Infectious Disease.* WHO Press. France 24.
119. Organización Panamericana de la Salud. 2011. *Agua y Saneamiento: Evidencias para políticas públicas con enfoque en derechos humanos y resultados en salud pública.* Washington, D. C.: OPS.
120. Outten FW, Huffman DL, Hale JA y O'halloran TV. 2001. The independent Cue and Cus systems confer copper tolerance during aerobic and anaerobic growth in *Escherichia coli*. : 30670–30677.
121. Peng L, Lifang R, Hongyu X, Xi L. y Chaocan Z. 2007. Study on the Toxic Effect of Lead (II) Ion on *Escherichia coli*. *Biol Trace Element Res* 115:195-202.
122. Pesavento C, Becker G, Sommerfeldt N, Possling A, Tschowri N, Mehliis A, Hengge R. 2008. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes Dev.* 22:2434–2446.
123. Pesavento C, Hengge R. 2012. The global repressor FliZ antagonizes gene expression by sigmaS-containing RNA polymerase due to overlapping DNA binding specificity. *Nucleic Acids Res.* 40:4783–4793.
124. Porcheron G, Garénaux A, Proulx J, Sabri M. y Dozois Ch. M. 2013. Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transports y stems for virulence. *Front Cel infect Microbiol.* 3(90): 1-24.
125. Pratt LA, Kolter R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: Roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol.* 30, 285–293.

126. Prescott LM, Harley JP, Klein DA. 2008 Microbiología. España: Mc Graw Hill Interamericana.
127. Puente JL, Bieber D, Ramer SW, Murray W. and Schoolnik GK. 1996. The bundle-forming pili of enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals. *Mol Microbiol.* 20: 87-100.
128. Qadri F, Svennerholm AM, Faruque AS, Sack RB. 2005. Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev.* 18:465-483.
129. Rees AP, Woodward EMS, Joint I. 2006. Concentrations and uptake of nitrate and ammonium in the Atlantic ocean between 60 degrees N and 50 degrees S. *Deep Sea Res Part II Top Stud Oceanogr* 53:1649–1665.
130. Reisner A. Krogfelt KA, Klein BM, Zechner EL, Molin S. 2006. In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of Environmental and Genetic Factors. *J Bacteriol.* 188(10):3572–3581.
131. Richardson K. 1991. Roles of motility and flagellar structure in pathogenicity of *Vibrio cholerae*: analysis of motility mutants in three animal models. *Infect Immun* 59: 2727-2736.
132. Rosen BP. 2002. Transport and detoxification systems for transition metals, heavy metals and metalloids in eukaryotic and prokaryotic microbes. *Comparative Biochem and Physiol Part A.* 133:689–693.
133. Roy D, Biswas B, Islam HM, Ahmed MS, Rasheduzzaman M, Sarower MG. 2013. Rapid identification of enterovirulent *Escherichia coli* strains using polymerase chain reaction from shrimp farms. *Pak J Biol Sci.* 16(21):1260-1269.
134. Salmanzadeh-Ahrabi S, Habibi E, Jaafari F, Zali MR. 2005. Molecular epidemiology of *Escherichia coli* diarrhoea in children in Tehran. *Ann Trop Paediatr.* 25(1):35-39.
135. Sánchez R. 2001. Evaluación de herbicidas y procesos del suelo (*Sorghum bicolor* (L) Moench) bajo sistemas de labranza: Convencional y Mínima en Chaguaramas (Estado Guárico). Tesis MSc, Facultad de Agronomía, Universidad Central de Venezuela. Maracay, Venezuela. 153 p.
136. Sanchez CJ Jr, Mende K, Beckius ML, Akers KS, Romano DR, Wenke JC, Murray CK. 2013. Biofilm formation by clinical isolates and the implications in chronic infections. *BMC Infect Dis.* 29:13:47.
137. Santona S, Diaz N, Fiori PL, Francisco M, Sidat M, Cappuccinelli P, Rappelli P. 2013. Genotypic and phenotypic features of enteropathogenic *Escherichia coli* isolated in industrialized and developing countries. *J Infect Dev Ctries.* 7(3):214-219.
138. Sarantuya J, Nishi J, Wakimoto N, Erdene S, Nataro JP, Sheikh J, Iwashita M, Manago K, Tokuda K, Yoshinaga M, Miyata K, Kawano Y. 2004. Typical enteroaggregative *Escherichia coli* is the most prevalent pathotype among *E. coli* strains causing diarrhea in Mongolian children. *J Clin Microbiol.* 42:133-139
139. Scaletsky IC, Silva ML, Trabulsi LR. 1984. Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* 45:534-536.
140. Schroten HF, Hanisch G, Plogmann R, Hacker J, Uhlenbruck G, Nobis-Bosch R. y Wahn V. 1992. Inhibition of adhesion of S-fimbriated *Escherichia coli* to buccal epithelial cells by human milk fat globule membrane components: a novel aspect of the protective function of mucins in the nonimmunoglobulin fraction. *Infect. Immun.* 60:2893–2899.
141. Schuhmacher DA, y Klose KE. 1999. Environmental signals modulate ToxT-dependent virulence factor expression in *Vibrio cholerae*. *J Bacteriol* 181:1508-1514.
142. Schwan, W. R., J. L. Lee, F. A. Lenard, B. T. Matthews, and M. T. Beck. 2002. Osmolarity and pH growth conditions regulate *fim* gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70:1391-402.

143. Shaheed A, Orgill J, Ratana C, Montgomery MA, Jeuland MA, Brown J. 2014. Water quality risks of 'improved' water sources: evidence from Cambodia. *Trop Med Int Health*. 19(2):186-194.
144. Shapiro L. 1995. The bacterial flagellum: from genetic network to complex architecture. *Cell* 80: 525-527.
145. Shi W, Li C, Luoise C, Adler J. 1993. Mechanism of Adverse Conditions Causing Lack of Flagella in *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 175(8):2236-2240
146. Silver S. 2003. Bacterial silver resistance: molecular biology, uses, and misuses of silver compounds. *FEMS Microbiology Review*. 27: 341-353.
147. Silvestry-Rodriguez N, Sicairos-Ruelas EE, Gerba CP, Bright KR. 2007. Silver as a disinfectant. *Rev Environ Contam Toxicol*. 191:23-45.
148. Singh AK, Dhanjal S. y Cameotra SS. 2014. Surfactin restores and enhances warming motility under heavy metal stress. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces* 116: 26–31.
149. Sistema de Información en Salud. 2008. Principales causas de mortalidad infantil (menores de un año) y Principales causas de mortalidad preescolar (de 1 a 4 años). Secretaría de salud. [www.sinais.salud.gob.mx](http://www.sinais.salud.gob.mx). Fecha de consulta: 28 de marzo de 2014.
150. Smith EJ, Thompson AP, O'Driscoll A, Clarke DJ. 2013. Pathogenesis of adherent-invasive *E. coli* Future. *Microbiol*. 8(10):1289-1300.
151. Soupene E, He L, Yan D. y Kustu S. 1998. Ammonia acquisition in enteric bacteria: Physiological role of the ammoniummethylammonium transport B (AmtB) protein. *Proc Natl Acad Sci USA*. 95:7030–7034.
152. Sperandio V, Torres AG, Jarvis B, Nataro JP, Kaper JB. 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100(15):8951-8956.
153. Sperandio V, Torres AG, Girón J.A and Kaper JB. 2001. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* 183: 5187-5197.
154. Stanier RY, Ingraham JL, Wheelis ML, Painter PR. 2010. Microbiología. España: Reverté S.A.
155. Stojnev T, Harichov J, Ferianc P. y Nyström T. 2007. Function of a Novel Cadmium-Induced YodA Protein in *Escherichia coli*. *Curr Microbiol*. 55: 99–104.
156. Stoodley P, Sauer K, Davies DG. y Costerton JW. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol*. 56:187–209.
157. Tashiro Y, Inagaki A, Ono K, Inaba T, Yawata Y, Uchiyama H, Nomura N. 2014. *Low concentrations of ethanol stimulate biofilm and pellicle formation in Pseudomonas aeruginosa*. *Biosci Biotechnol Biochem*. 78(1):178-181.
158. Tasteyre, A, Barc MC, Collignon A, Boureau H. y Karjalainen T. 2001. Role of *FliC* and *FliD* flagellar proteins of *Clostridium difficile* in adherence and gut colonization. *Infect. Immun*. 69:7937–7940.
159. Tobe T, Hayashi T, Han C, Schoolnik GK, Ohtsubo E, Sasakawa C. 1999. Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infect Immun* 67: 5455-5462.
160. Trabulsi LR, Keller R, Tardelli Gomes TA. 2002. Typical and atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *Emerg Infect Dis*. 8:508-513.
161. UN Task Team on Social Dimensions of Climate Change. 2011. The Social Dimensions of Climate Change Discussion draft.
162. Vila-Estapé J, Zboromyrska Y. 2012. Brotes epidémicos causados por *Escherichia coli* diarreagénicas. *Gastroenterol Hepatol*. 35(2):89-93.

163. Vidal JE, Canizález-Román A, Gutiérrez-Jiménez J, Navarro-García F. 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *Salud Púb Méx.* 49(5):376-386.
164. Vilchez S, Reyes D, Paniagua M, Bucardo F, Möllby R, Weintraub A. 2009. Prevalence of diarrhoeagenic *Escherichia coli* in children from León, Nicaragua. *J Med Microbiol.* 58(Pt 5):630-637.
165. Walker SL, Sojka M, Dibb-Fuller M, and Woodward MJ. 1999. Effect of pH, temperature and surface contact on the elaboration of fimbriae and flagella by *Salmonella* serotype Enteritidis. *J Med Microbiol.* 48: 253-261.
166. Wang D, Hosteen O. y Fierke CA. 2012. ZntR-mediated transcription of *zntA* responds to nanomolar intracellular free zinc. *J Inorg Biochem.* 111:173–181.
167. Wedley AL, Elajnef HM, Fletcher JN. 2013. Characterization of a novel EAST-negative enteropathogenic *E. coli* strain implicated in a food-borne outbreak of diarrhoea in adults. *APMIS.* 121(6):494-502.
168. Westerlund B, Kuusela P, Risteli J, Risteli L, Vartio T, Rauvala H, Virkola R, and Korhonen TK. 1989. The O75X adhesin of uropathogenic *Escherichia coli* is a type IV collagen-binding protein. *Mol Microbiol.* 3:329– 337.
169. Wood TK, Gonzalez Barrios AF, Herzberg M, Lee J. 2006. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Appl Microbiol Biotechnol.* 72:361–367.
170. World Health Organization. Global Health Observatory Data Repository. 2011. Number of deaths: World by cause. <http://apps.who.int/gho/data/node.main.CODNUMBER?lang=en>. 08/04/2014
171. Yarwood JM y Schlievert PM. 2000. Oxygen and carbon dioxide regulation of toxic shock syndrome toxin 1 production by *Staphylococcus aureus* MN8. *J Clin Microbiol.* 38:1797-1803.
172. Zhang X, Bremer H. 1995. Control of the *Escherichia coli* rmB P1 promoter strength by ppGpp. *J Biol Chem.* 270(19): 11181-11189.
173. Zambrano MC, Beklemisheva AA, Bryksin AV, Newman SA, Cabello FC. 2004. *Borrelia burgdorferi* binds to, invades, and colonizes native type I collagen lattices. *Infect Immun.* 72(6):3138-3146