

## 4 INTRODUCCIÓN

### 4.1 GENERALIDADES

*Escherichia coli* es una eubacteria, es un bacilo corto Gram negativo de la familia *Enterobacteriaceae*. Tiene una alta adaptabilidad ya que cuenta con procesos que confieren a la célula la capacidad de sensor su ambiente y moverse a regiones más favorables para su metabolismo. Parte de la estrategia de *Escherichia coli* involucra el prendido y apagado de genes. La célula sensa el ambiente y ajusta el patrón de expresión de sus 400 genes para obtener lo mas posible de lo que la vida le ofrece. Este sistema de regulación le ayuda a evadir las presiones selectivas.

*Escherichia coli* forma parte de la flora habitual en el tracto digestivo de humanos, sin embargo, existen algunas cepas patógenas causantes de diarrea, se dividen en seis categorías principales de acuerdo a sus diferentes mecanismos de patogenicidad, su interacción con la mucosa intestinal, síntomas diarreicos y características epidemiológicas las cuales muestran al menos una propiedad relacionada con la virulencia en un plásmido. Estas son: enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAaggEC), enterotoxigénica (ETEC) y difusiva-adherente (DAEC) (Nataro y Kaper, 1998). En la tabla 1 se muestra un resumen de las características de los diferentes grupos.

Tabla 1. Características de los grupos de *Escherichia coli* causantes de diarrea

Características de los grupos de <i>Escherichia coli</i> causante de diarrea			
Grupo	Síntomas clínicos	Epidemiología	Factores de patogenicidad
EPEC	Diarrea aguda, dolor abdominal, vómito y fiebre baja	Niños menores de 6 meses y hasta 2 años	Intimina (A/E), BFP, plásmido EAF
EHEC	Diarrea sin sangre, dolor abdominal, fiebre y vómito	Niños y adultos por comer carne cruda	Stx, intimina (A/E), pO157, toxina Shiga
EIEC	Diarrea con moco y sangre o diarrea acuosa	Niños menores de 6 meses	Invasividad, plásmido de 140Mda
<b>ETEC</b>	<b>Diarrea aguda acuosa</b>	<b>Niños menores de 5 años y diarrea del viajero</b>	<b>ST y LT, CFAs, Longus</b>
EAEC	Diarrea líquida con moco sin sangre	Recién nacidos y niños menores de 2 años	Citotoxina, fimbria AAFI y II, EASTI, proteínas Pet y Pic
DAEC	Diarrea acuosa sin sangre	Niños de 1 a 5 años	Fimbria F1845, OMP

LT- toxina termolábil; EAF- factor de adherencia de EPEC; ST- toxina termo estable; OMP- proteína de membrana externa; CFA- factor de colonización antigénico; Stx- toxina shiga; BFP- pilus de forma rizada; EAST- toxina ST de cepas enteroagregativas y A/E- adherencia y destrucción.

La interacción entre el hospedero y el patógeno durante la enfermedad es una batalla dinámica en la que los microbios deben defenderse del sistema inmune del humano. La supervivencia y multiplicación son las prioridades del microorganismo y el desarrollo de la enfermedad es sólo una manifestación de las interacciones necesarias para que esto suceda (Mekalanos, 1992).

Como la mayoría de los patógenos de la mucosa intestinal, *E. coli* sigue una estrategia de infección: adhesión, colonización del sitio mucoso, evasión de las defensas del hospedero, multiplicación y daño al hospedero. La habilidad más conservada dentro de las cepas diarreicas de *E. coli* es la de colonizar la superficie de la mucosa intestinal a pesar de la peristalsis y competencia por nutrientes de la flora autóctona del intestino (Nataro y Kaper, 1998).

El potencial patogénico de un microorganismo no puede atribuirse a un sólo determinante. El resultado de la interacción entre el hospedero y el microorganismo depende de una combinación de factores de virulencia (Finlay y Falkow, 1997). La adhesión específica a la célula blanco determina en gran parte la colonización de los tejidos epiteliales, pero existen determinantes específicos que contribuyen a pasos únicos en la patobiología del microbio.

La producción de la enfermedad por microorganismos patógenos depende de la habilidad de adherirse a la superficie del hospedero. No todos los factores de adhesión producidos por el patógeno son factores esenciales de virulencia, y el papel específico de una adhesina en particular en la enfermedad ha sido difícil de definir ya que un patógeno produce muchos factores de adherencia al mismo tiempo (Finlay y Falkow, 1997).

Algunos factores de virulencia son regulados en coordinación con señales ambientales cuya base común es un sistema de regulación que controla la expresión de genes que codifican para dichos determinantes de virulencia. Por ejemplo, la transición de un ambiente de baja temperatura a temperatura corporal ha sido correlacionada con cambios dramáticos en la expresión de determinantes de virulencia en varios organismos (Mekalanos, 1992).

## **4.2 FACTORES DE ADHERENCIA**

La bacteria cuenta con tres tipos de apéndices protéicos: flagelos, para la locomoción; organelos involucrados en la transferencia genética; y factores de adherencia denominados fimbrias o pili. Los últimos actúan como factores de adherencia durante la colonización en eucariotas. Las adhesinas bacterianas se pueden dividir en dos grandes grupos: adhesinas fimbriales; y adhesinas afimbriales. Una de

las características más importantes entre los pili es la conservación de la maquinaria molecular necesaria para la biogénesis y ensamble en la superficie bacteriana (Finlay y Falkow, 1997).

Una bacteria típica con fimbrias contiene de 100 a 300 elementos de este tipo que miden alrededor de 7nm de ancho y de 0.2 a 2  $\mu\text{m}$  de largo. Una fimbria consiste de  $\approx 1000$  subunidades repetidas de un solo polipéptido de  $\approx 17\text{kDa}$ . Las subunidades se arreglan en una hélice simple, son ácidas y extremadamente hidrofóbicas (Neidhardt *et al.*, 1987).

El papel de la adherencia es promover la colonización y posiblemente incrementar la eficacia de las enterotoxinas al disminuir la distancia que estas tienen que viajar para alcanzar su sitio blanco en las células epiteliales del intestino. La adherencia puede ser mediada por fimbrias o pili como en ETEC, o por un factor que produce adhesión y destrucción sobre las células epiteliales intestinales.

En las infecciones bacterianas, la enfermedad es consecuencia del crecimiento de los microorganismos en los tejidos del cuerpo. El patógeno penetra en la vía gastrointestinal y se multiplica en él. Los microorganismos pueden penetrar la mucosa gastrointestinal y crecer en ella, o atravesarla y alcanzar otros órganos sistémicos (Antón y Amejeiras, 2003). En la figura 1 se muestran los esquemas patogénicos de *E. coli* causante de diarrea.

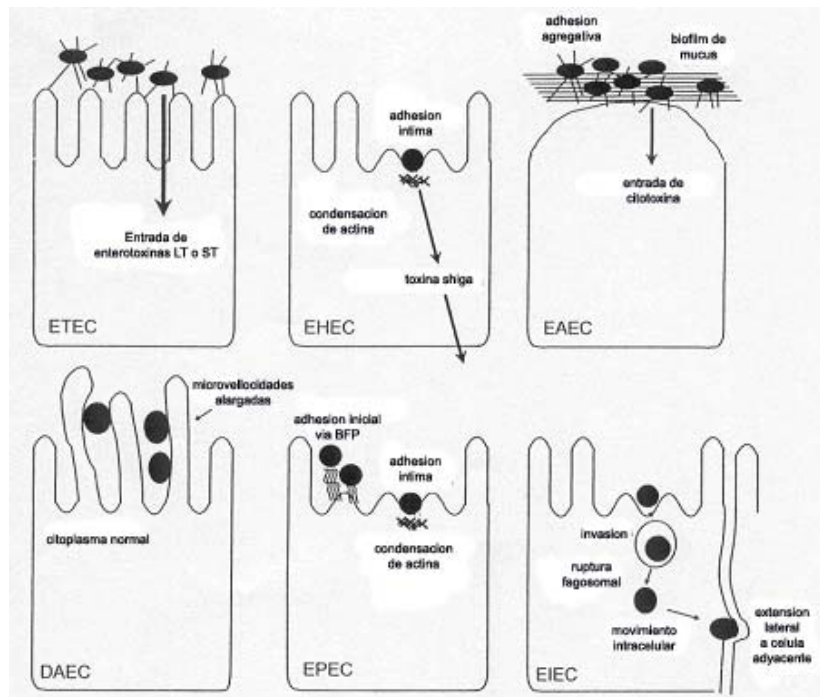


Figura 1. Esquemas patogénicos de *Escherichia coli* causante de diarrea. Cada una de las seis categorías de *E. coli* tiene una forma única de interacción con las células eucariotas. Estas descripciones se basan en estudios in citro y pueden no reflejar por completo el fenómeno ocurrido en humanos infectados (Nataro y Kaper, 1998).

Virtualmente todas las cepas de *Escherichia coli*, incluyendo las no patógenicas, presentan fimbrias de adherencia. Sin embargo, las cepas diarreicas poseen antígenos fimbriales específicos que permite la colonización de la mucosa interna del intestino delgado, en la cual no hay normalmente colonización (Nataro y Kaper, 1998).

*Escherichia coli* está categorizada de acuerdo a la presencia o ausencia de antígenos somáticos específicos termoestables (antígenos O) que son cadenas polisacáridas unidas al complejo LPS característico de las bacterias Gram negativas. Esta especificidad está determinada por la composición de azúcar o azúcar-amino y por la secuencia de estas cadenas externas de polisacáridos.

Los serotipos de *E. coli* son combinaciones específicas grupo O/antígeno H. Los antígenos H son los antígenos flagelares de los que hay al menos 56 tipos. El tipo H es importante para las cepas de *E. coli* diarreica porque la mayoría de las cepas de ETEC pertenecen a serotipos específicos lo que facilita su identificación. Pero la razón de su

asociación entre serotipos específicos y la producción de virulencia determinada por un plásmido permanece incierta (Evans y Evans, 2003).

Las bacterias patógenas producen muchas sustancias que son directa o indirectamente tóxicas a las células hospederas (Finlay y Falkow, 1997). Las cepas de ETEC se definen como aquellas que elaboran al menos uno de dos miembros de grupos definidos de enterotoxinas: ST (heat stable toxin) y LT (heat labile toxin).

Las toxinas LT de *E. coli* son toxinas oligoméricas relacionadas con la estructura y función a la enterotoxina del cólera (CT) expresada en *Vibrio cholerae*. Hay dos grupos de serotipos de LT, LT-I y LT-II. LT-I se expresa en cepas de *E. coli* que son patógenas para humanos y animales mientras que LT-II se expresa en aislados animales principalmente.

Después de unirse a la membrana de la célula, la toxina LT-I es endocitada y translocada a través de la célula. El blanco celular de LT es la adenilato ciclasa. Hay un aumento en el AMPc. La cascada de reacciones que se ocasiona lleva a una estimulación de secreción de Cl<sup>-</sup> e inhibición de absorción de NaCl por las células del intestino.

El aumento en contenido de iones lleva a que el agua pase de manera pasiva a través del camino paracelular resultando en una diarrea osmótica. LT-II aumenta los niveles de AMPc intracelular de manera similar a LT-I pero utilizando GD1 como receptor y no GM<sub>1</sub> (Nataro y Kaper, 1998).

La toxina ST es pequeña, monomérica que contiene múltiples residuos de cisteína, cuyas uniones son las responsables de la estabilidad al calor de estas toxinas. Hay dos clases de toxinas termoestables que difieren en estructura y mecanismo de acción.

La toxina producida por ETEC es STa. Su molécula blanco es la guanilato ciclase C(GC-C). Al unirse se estimula la actividad de GC que aumenta los niveles internos de cGMP estimulando la secreción de cloro y/o la inhibición de absorción de NaCl resultando en una secreción de fluido intestinal (Nataro y Kaper,1998).

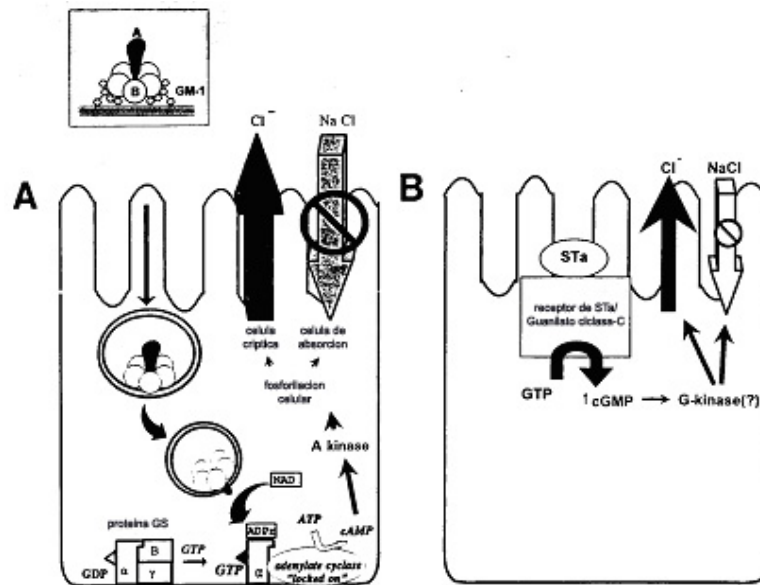


Figura 2. Mecanismo clásico de acción de las toxinas de ETEC. A. Toxina LT-I. B. Toxina STa. El texto explica en más detalle el mecanismo de acción de estas toxinas (Nataro y Kaper, 1998).

La diarrea causada por ETEC ocurre en todas las edades, pero la mortalidad es común en infantes, particularmente en niños menores a 5 años que viven en ciudades en vías de desarrollo, mal nutridos o que no fueron amamantados (Evans y Evans, 2003). ETEC es también causante de la diarrea conocida como diarrea del viajero.

Es una bacteria patógena con la habilidad de adherirse a tejidos específicos del hospedero antes de la colonización. La enfermedad causada por ETEC se caracteriza por una diarrea acuosa y sin sangre de considerable volumen que puede ser acompañada o no por una leve fiebre.

Para causar diarrea, ETEC debe adherirse a los enterocitos, dicho evento está mediado por la fimbria o pilus. La microscopía de transmisión de electrones muestra fimbrias en arreglo periférico a menudo con morfologías diversas (Nataro y Kaper, 1998).

*Escherichia coli* enterotoxigénica expresa una variedad de pili antigénicamente distintos llamados factores de colonización (CFAs), antígenos de superficie de coli (CSs) y posibles factores de colonización (PCFs) que favorecen la interacción de la bacteria con los enterocitos en el intestino. Estos determinantes de virulencia generalmente están codificados o regulados por plásmidos que también albergan genes para las toxinas termo-lábil (LT) y termo-estable (ST) responsables de la hipersecreción de agua y electrolitos.

Los factores de colonización se dividen de acuerdo a sus características morfológicas en CFA/I, que son fimbrias rígidas en forma de barra, CFA/III que es un pilus formado de paquetes y es homólogo a la familia fimbrial de tipo IV. CFA/II y IV están compuestos de diferentes estructuras fimbriales múltiples. En las cepas humanas de ETEC se encuentran CFA/I, CFA/II y CFA/IV en el 75% de las cepas (Nataro y Kaper, 1998).

Entre el 30 y el 50% de cepas dependiendo del estudio, no produce alguno de los CFAs conocidos, lo que sugiere la existencia de otros pili aún desconocidos. Un número considerable de cepas ETEC produce un pilus llamado Longus el cual está codificado en un plásmido de 90kpb.

El porcentaje de producción de Longus es variable ya que, 36.5% de cepas aisladas de muestras de niños mexicanos con diarrea fueron longus positivo, 20.7 % de cepas aisladas en Argentina y sólo 8.5 % de cepas aisladas en Bangladesh.

### **4.3 LONGUS**

Longus es un pilus de tipo IV denominado así por su gran longitud (>20µm). Representa lo que se cree es un factor de colonización intestinal conservado de ETEC y está compuesto por una subunidad de 22Kda (LngA) (Girón *et al.*, 1994) que comparte



similitudes considerables con la secuencia N-terminal de las subunidades CofA, TcpA y BfpA de la pilina del CFAlII de ETEC (Gutiérrez-Cázarez *et al.*, 2000). En la tabla 2 se mencionan las características generales del pilus.

Tabla 2. Características generales del pilus Longus de ETEC

<b>Características</b>	<b>Longus</b>
Longitud (Mm)	mayor a 20
Morfología	Polar
Expresión a	37°C
Localización genómica	Plásmido
Subunidad pilina (kDa)	LngA (22)
Factor de colonización	No comprobado

Tomada de Girón *et al.* 1997

Los grupos de genes típicos de fimbrias consisten de una serie que codifican para una subunidad proteica fimbrial y en proteínas accesorias requeridas para el procesamiento, secreción y ensamble de la estructura fimbrial (Nataro y Kaper, 1998). Una prepilina peptidasa; una proteína integral de membrana; una proteína hidrofílica localizada en el citoplasma; y un componente OM que forme un canal permitiendo la translocación del pili ya ensamblado.

En la figura 3 se muestra un diagrama de la biogénesis del pilus. La prepilina es procesada por la señal peptidasa de PilD que rompe la secuencia líder de la parte N-terminal de la subunidad pilina. La pilina madura PilE se ensamblan por un complejo de ensamble de la membrana interna. La translocación del pilus a través de la membrana externa es mediada por PilQ con la asistencia de otros factores. La adhesina PilC se incorpora en la punta del organelo en crecimiento (Soto y Hultgern, 1999).

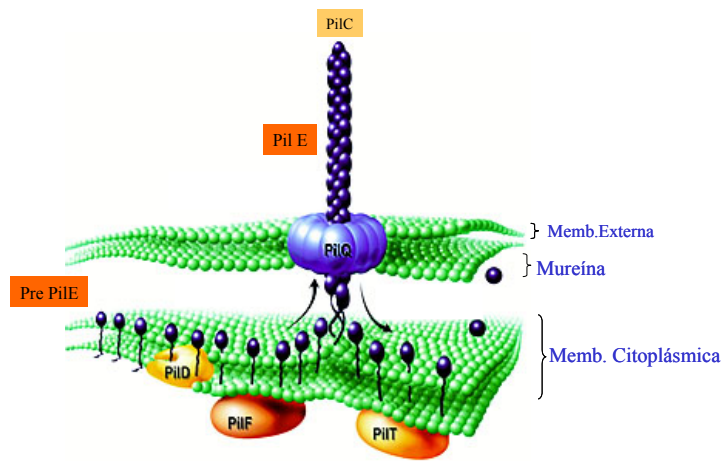
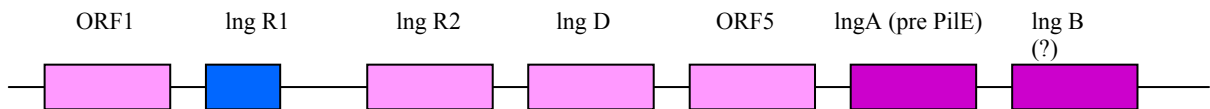


Figura 3. Biogénesis de un pilus tipo IV. Modelo de las condiciones que operan en células silvestres en las que un pilus de tipo IV se está formando y siendo traslocado a la superficie celular por la secrecina Pil Q (Wolfgang, *et al*, 2000).

En el caso de Longus se sabe que la subunidad protéica es LngA y hasta ahora el esquema del plásmido que codifica para la formación de Longus es el siguiente:



Los pili se clasifican con base en su serología, morfología, características bioquímicas y receptores específicos. Sus subunidades contienen características específicas que incluyen una secuencia amino terminal inusual en la que falta la secuencia líder clásica, y en su lugar utiliza una peptidasa líder específica que remueve una secuencia peptídica básica (Finlay y Falkow, 1997).

La expresión de CFAs, CSs y PCFs está restringida a serotipos, biotipos y fenotipos ST o LT. La proporción de cepas con estos antígenos varía de acuerdo a la ubicación geográfica. Longus es producido en cepas de ETEC humana sin importar el origen geográfico, el serotipo, la presencia de CFAs y la producción de LT y/o ST de la bacteria, lo que lo hace diferente. Los pili de tipo IV se encuentran en muchos otros organismos patógenos como *Vibrio cholerae* o *Neisseria gonorrhoeae*. Se cree que estos pili están involucrados en la adherencia bacteriana a las células hospederas (Knutton *et al.*, 1999).

A pesar de las diferencias bioquímicas entre Longus y los CFAs, estos antígenos tienen algunas características en común. Están codificados por plásmidos de elevado peso molecular junto con la información para la producción de enterotoxinas ST y/o LT; la mayoría producen aglutinación de eritrocitos en presencia de D-manosa; su expresión está modulada por la temperatura; son antígenos que inducen inmunidad protectora y generalmente están involucrados en la adherencia al intestino.

Longus es producido en cepas de ETEC humana sin importar el origen geográfico, el serotipo, la presencia de CFAs y la producción de LT y/o ST de la bacteria, lo que lo hace diferente a otros factores de adherencia como lo es el CFaIII que se encuentra sólo en ETEC que produce LT. Los pili de tipo IV se encuentran en muchos otros organismos patógenos como *Vibrio cholerae* o *Neisseria gonorrhoeae*. Se cree que estos pili están involucrados en la adherencia bacteriana a las células hospederas (Knutton *et al.*, 1999).

Se tiene una secuencia parcial del plásmido pE9034A. La secuencia tiene 7 posibles marcos de lectura abierta en tandem. Cinco de ellos están en la misma orientación transcripcional y dos de ellos, una proteína cinasa hipotética, una transposasa, se transcribe en orientación invertida (Gómez-Duarte *et al.*, 1999).

En el sexto marco de lectura *lngA* codifica para la prepilina de Longus. Tiene una longitud de 708 pares de bases que codifican para una proteína de 236 aminoácidos (25,170 Da) que es procesada por una peptidasa prepilina que produce una pilina madura de 206 residuos (Gutiérrez-Cázares, *et al.*, 2000). La secuencia de aminoácidos deducida tiene homología con CofA (78% de identidad) prepilina de CFaIII, con TcpA, pili tipo IV de *V. cholerae* (35% de identidad) y con la flagelina de fase I PFI (27% de identidad 50/119).

En el séptimo marco de lectura, *lngB* codifica para una proteína de 367 aminoácidos. La secuencia de aminoácidos deducida tienen homología con CofB (77% de identidad, 283/367) proteína similar a pilina tipo IV, TcpA pili tipo IV de *Vibrio cholerae* (38% de identidad, 17/44) y pilina tipo IV de *Eikenella corrodens* (26% de identidad, 39/150) (Girón, no publicado).