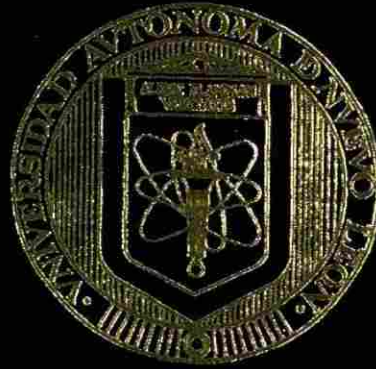


UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



ADHERENCIA E INVASION DE *Escherichia coli*
SEPTICEMICA AVIAR A CELULAS EPITELIALES

Por

ROSA MARIA RAMIREZ SANTOYO

Como requisito parcial para obtener el Grado de:
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en
Microbiología

SEPTIEMBRE DEL 2007

2007

TD
Z5320
FCB
2007
.R35

ADHERENCIA E INVASION DE *Escherichia coli*
SPECTROSCOPICA AVIAR A CELULAS EPITELIALES

LIBROS



1020160699



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ADHERENCIA E INVASION DE *Escherichia coli* SEPTICEMICA
AVIAR A CÉLULAS EPITELIALES**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por
DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

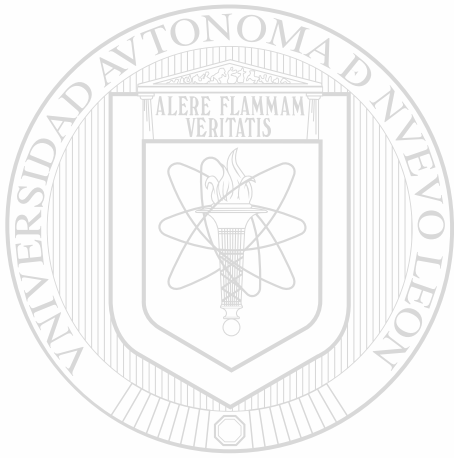
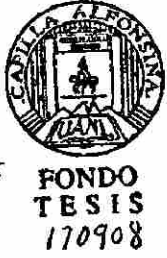
ROSA MARÍA RAMÍREZ SANTOYO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología**

SEPTIEMBRE, 2007

1045898

TD
25320
F0B
2007
• R 35



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4- Septiembre - 08
Derechilisa de la Cruz

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



**ADHERENCIA E INVASION DE *Escherichia coli* SEPTICEMICA
AVIAR A CÉLULAS EPITELIALES**

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Por

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

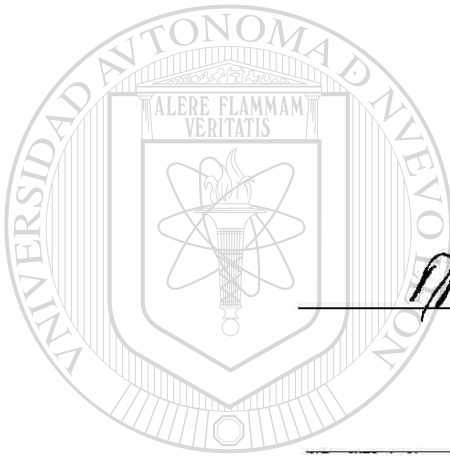
ROSA MARÍA RAMÍREZ SANTOYO

**Como requisito parcial para obtener el Grado de
DOCTOR EN CIENCIAS con especialidad en Microbiología**

SEPTIEMBRE, 2007

**ADHERENCIA E INVASION DE *Escherichia coli* SEPTICEMICA
AVIAR A CÉLULAS EPITELIALES**

Comité de Tesis



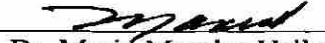

Dra. Norma L. Heredia Roja

Director

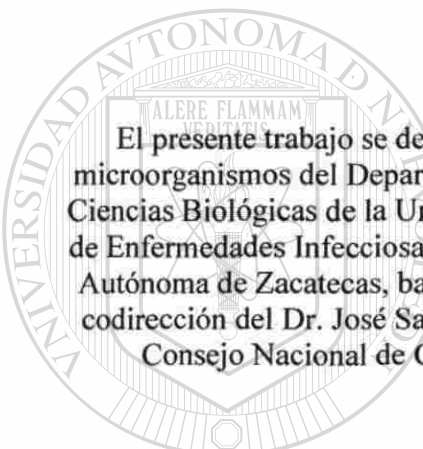
Dr. Carlos E. Hernández Luna

Secretario


Dr. Santos García Alvarado
Vocal


Dr. Mario Morales Vallarta
Vocal


Dr. Juan Francisco Contreras Cordero
Vocal



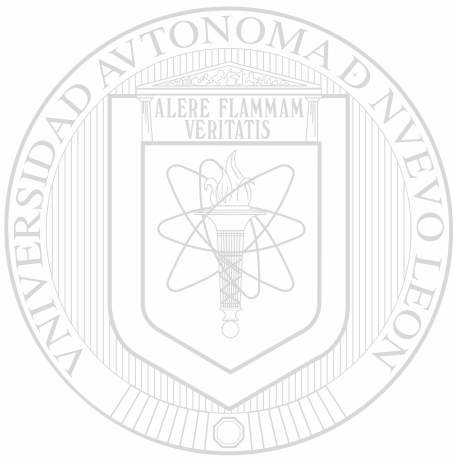
El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León y en el Departamento de Enfermedades Infecciosas de la Unidad de Biología Experimental de la Universidad Autónoma de Zacatecas, bajo la dirección de la Dra. Norma Laura Heredia Rojas y la codirección del Dr. José Santos García Alvarado. Este proyecto fue financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México (Proyecto 30593-B).

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



DEDICATORIAS



A JOSE LUIS

DIEGO y

JOSE ANTONIO

UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
AGRADECIMIENTOS.....	i
LISTA DE TABLAS.....	ii
LISTA DE FIGURAS.....	iii
RESUMEN.....	iv
ABSTRACT.....	v
1. INTRODUCCION.....	1
2. HIPOTESIS.....	3
3. OBJETIVOS.....	
3.1 Objetivo general.....	4
3.2 Objetivos particulares.....	5
4. ANTECEDENTES.....	6
4.1 <i>Escherichia coli</i>	6
4.2 Colisepticemia aviar.....	7
4.3 Patogénesis.....	8
4.4 Factores asociados a la patogenicidad.....	8
4.5 Adherencia bacteriana.....	12
4.6 Matriz Extracelular.....	13
4.6.1 Laminina.....	13
4.6.2 Fibronectina.....	14
4.7 Adherencia bacteriana a la MEC.....	15
4.7.1 Adherencia bacteriana a la laminina.....	16
4.7.2 Adherencia bacteriana a la fibronectina.....	17
4.8. Internalización bacteriana a células no fagocíticas.....	20

5.	MÉTODOS.....	24
5.1	Cepas bacterianas y condiciones de cultivo.....	24
5.2	Producción de anticuerpos a fibronectina y laminina.....	25
5.3	Producción de anticuerpos anti- <i>E. coli</i>	26
5.4	Adherencia de APEC a fibronectina y laminina por	28
5.4.1	Far dot blot.....	28
5.4.2	Ensayo basado en ELISA.....	29
5.5	Adhesinas de unión de APEC a laminina y fibronectina.....	30
5.5.1	Extracto de APEC	30
5.5.2	PAGE-SDS y Far western blot.....	30
5.6	Unión de APEC a explantes traqueales.....	31
5.7	Cultivo de células de epitelio traqueal de pollo.....	31
5.8	Adherencia a células epiteliales por APEC.....	33
5.9	Invasión de APEC a células epiteliales en cultivo.....	34
5.9.1	Ensayos de protección con gentamicina.....	34
5.9.2	Microscopía confocal.....	34
5.10	Análisis estadístico.....	35
6.	RESULTADOS.....	36
6.1	Detección de anticuerpos policlonales.....	36
6.1.1	Anticuerpos anti-laminina y anti-fibronectina.....	36
6.1.2	Anticuerpos anti- <i>E. coli</i>	37
6.2	Adherencia de APEC a fibronectina y laminina.....	38
6.3	Unión cuantitativa de APEC a fibronectina y laminina.....	38
6.4	Adhesinas de APEC que median unión a fibronectina y laminina.....	39
6.5	Adherencia bacteriana a explantes de tejido traqueal.....	40
6.6	Establecimiento del cultivo celular primario.....	40
6.7	Adherencia a células epiteliales en cultivo.....	41
6.8	Invasión bacteriana a células epiteliales en cultivo.....	42
7.	DISCUSION.....	48
8.	CONCLUSIONES.....	55
	LITERATURA CITADA.....	56

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León por la oportunidad brindada.

A la Universidad Autónoma de Zacatecas por las facilidades otorgadas y por ofrecerme el espacio para mi desempeño académico.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología por la beca otorgada para realizar mis estudios de Doctorado y por ser la fuente del financiamiento de este trabajo bajo el proyecto de investigación 30593-B.

Agradezco de manera especial a la Dra. Norma Heredia Rojas y al Dr. José Santos García por su confianza y por la asesoría para la realización de este trabajo.

A la M en C. Yolanda Almanza Márquez por haberme heredado su pasión por el estudio de la Microbiología, pero sobre todo por su amistad.

LISTA DE TABLAS

Tabla	Página
1. Adherencia de cepas de <i>E. coli</i> a explantes de traquea de pollo y a células epiteliales en cultivo.....	40
2. Internalización bacteriana a células de epitelio traqueal en cultivo.....	43



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



LISTA DE FIGURAS

Figura	Página
1. Detección de anticuerpos anti-laminina y anti-fibronectina.....	36
2. Detección de anticuerpos anti- <i>E. coli</i>	37
3. Detección de anticuerpos anti- <i>E. coli</i> por inmunofluorescencia.....	37
4. Unión de APEC YA21 a proteínas de la MEC.....	38
5. Adherencia de APEC YA 21 a laminina, fibronectina y fetuina.....	38
6. Unión de fibronectina y laminina a proteínas de APEC.....	39
7. Cultivos primarios de células epiteliales de traquea de pollo.....	41
8. Adherencia bacteriana a células epiteliales en cultivo.....	42
<hr/>	
9. Secciones ópticas de la interacción de APEC YA21 y células epiteliales por Microscopio confocal (MC).....	44
10. Invasión de APEC YA21 a células epiteliales en cultivo por MC.....	45
11. Interacción de APEC YA21 con células epiteliales por MC.....	46
12. Interacción de <i>E. coli</i> K12DH5 α con células epiteliales por MC.....	47

RESUMEN

En la septicemia aviar, al igual que en la mayoría de las infecciones bacterianas, la adherencia del patógeno a los tejidos del huésped es importante para el desarrollo de la enfermedad, adicionalmente algunas bacterias tienen la capacidad de penetrar a la célula huésped como un mecanismo de patogenicidad.

En este trabajo se investigó la capacidad de una cepa de *Escherichia coli* patogénica aviar (APEC) para unirse a la fibronectina (Fn) y laminina (Lm), componentes importantes de la matriz extracelular. Además se estableció un cultivo primario de células epiteliales obtenidas de traquea de pollos para medir la adherencia de la cepa APEC y determinar si la bacteria es capaz invadir *in vitro* a estas células, lo cual se comparó con una cepa de referencia K12 DH5 α .

Los resultados mostraron la unión de la bacteria a la Fn y Lm y la adhesión reveló ser dependiente de la concentración bacteriana por ensayos basados en ELISA. Mientras que por medio de Far wester blot utilizando un extracto crudo de la cepa APEC se observó una banda inmunoreactiva de ~130 kDa en los ensayos de interacción con la Fn y una banda de ~30 kDa en el caso de Lm, sugiriendo que las uniones son mediadas por proteínas bacterianas específicas. La adhesión a la traquea es considerada importante en la patogenicidad de la cepas causantes de septicemia, la cepa APECYA21 mostró capacidad para unirse a explantes de este tejido, lo cual fue acorde con la adhesión que mostró tener sobre células de epitelio traqueal mantenidas en cultivo. Finalmente, se observó que la cepa de estudio pudo invadir células de epitelio traqueal de pollo, lo cual es compatible con la naturaleza de la enfermedad.

Estos resultados podrán ser la base para estudios posteriores encaminados a dilucidar el significado de la adherencia a componentes de la matriz extracelular y los efectos de la invasión bacteriana en la patogénesis de las infecciones causadas por APEC.

ABSTRACT

Avian septicemia is a systemic disease where bacteria attach and invade the avian respiratory tract and enter the bloodstream and vital organs. The disease frequently occurs after respiratory tract damage. The tissue damage allows bacteria to encounter an exposed basement membrane, where laminin and fibronectin are important components and this could be a primary site for infection.

Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) cause this extraintestinal disease utilizing several virulence factors. Adhesion to the trachea is the critical initial step for septic APEC pathogenicity.

In this work the ability of APEC to bind fibronectin and laminin was investigated. Using far western dot blot analysis, we demonstrated the ability of this microorganism to bind such glycoproteins *in vitro*. Results from an ELISA based approach indicate that the binding was bacterial-dose dependent. Furthermore, two specific APEC polypeptides of 30 kDa and 130 kDa reacted with laminin and fibronectin respectively.

Furthermore, the ability of this isolate to associate with models of tracheal epithelium was investigated. The APEC isolate was able to adhere to an avian tracheal explant model of infection. In addition, a primary cell culture, derived from chicken tracheal epithelium was development and demonstrated the ability of APEC to attach and invade avian tracheal epithelium cells *in vitro*. These results are critical to the understanding of the initial point of entry of APEC in the avian model of septic infection. In addition, our results are compatible with the nature of the disease and give information to understand the pathogenesis of avian septicemia.

Further evaluation of the potential bacterial adhesins may provide insights into pathogenesis of colibacillosis.

INTRODUCCION

Escherichia coli patogénica aviar causa diferentes síndromes en aves, siendo la septicemia la manifestación más severa. Esta enfermedad tiene gran importancia en la industria avícola, principalmente en la del pollo de engorda, debido a las pérdidas económicas que ocasiona, tanto por la morbilidad, como por la alta mortalidad que se presenta, aunada a esta problemática está la falta de vacunas exitosas para prevenir el padecimiento.

Aún cuando se han descrito diversos factores de virulencia en las cepas de *Escherichia coli* patogénica aviar, se desconocen algunos eventos en la patogénesis de esta enfermedad que ayuden a entender completamente su fisiopatología y que con estos conocimientos se puedan proponer estrategias que coadyuven en su prevención y control.

La principal entrada de la bacteria es por vía aérea y la septicemia aviar frecuentemente se presenta en el contexto de daño en el tracto respiratorio ocasionado previamente por patógenos primarios como virus o micoplasmas, de manera que pueden estar expuestos componentes de la matriz extracelular. Poco se conoce acerca de las interacciones de *Escherichia coli* patogénica aviar con este tipo de moléculas, las cuales pudieran contribuir potencialmente a la colonización bacteriana en los tejidos. Otro aspecto de la enfermedad es su naturaleza sistémica que implica la entrada de la bacteria en el torrente circulatorio para llegar a órganos vitales y ocasionar la muerte de las aves afectadas por este patógeno. No se tiene totalmente claro los mecanismos por medio de los cuales la bacteria atraviesa la barrera epitelial y alcanza la vía sanguínea, trabajos

previos sugieren que una vía potencial para que esto ocurra podría ser la internalización de *Escherichia coli* patogénica aviar en células epiteliales de vías aéreas.

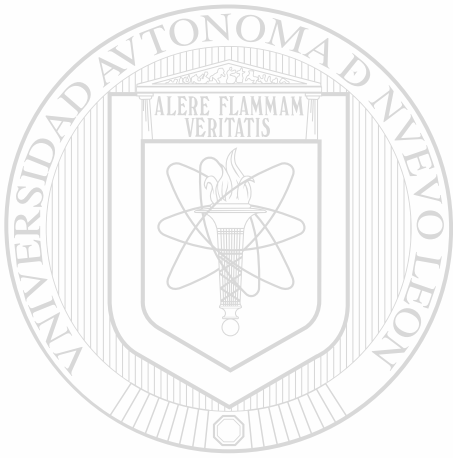
En los últimos años se ha reconocido que algunos patógenos bacterianos pueden inducir su entrada a células epiteliales, evento denominado “invasión inducida por la bacteria”, lo cual puede permitir a estos microorganismos situarse en un nicho protegido o en algunos casos conferirles la capacidad para atravesar epitelios, por tanto esto se ha considerado un aspecto importante en la patogénesis de algunas enfermedades.

Para dilucidar eventos que pudieran estar asociados con las infecciones causadas por *Escherichia coli* patogénica aviar, uno de los objetivos de este trabajo fue determinar la capacidad de la bacteria para unirse a la fibronectina, proteína ampliamente distribuida en la matriz extracelular así como a la laminina, componente importante de la membrana basal. Otro de los objetivos planteados fue conocer si *E. coli* patogénica aviar se adhiere e invade a células epiteliales de origen aviar mantenidas en cultivo.

Los resultados indicaron que *E. coli* patogénica aviar une a fibronectina y laminina inmovilizada lo cual ocurre de manera dependiente de la concentración bacteriana, además se detectaron potenciales adhesinas que pudieran mediar esta unión. Se observó además que este patógeno bacteriano puede internalizarse en células epiteliales, lo cual pudiera ser explicado en base a la naturaleza de la enfermedad. Considerando estos hallazgos, será importante llevar a cabo más estudios que nos permitan entender el significado de estos eventos en la fisiopatología de la septicemia aviar.

HIPOTESIS

Escherichia coli septicémica aviar se adhiere a componentes de la matriz extracelular y a células epiteliales y es capaz de internalizarse en células epiteliales en cultivo



UANL

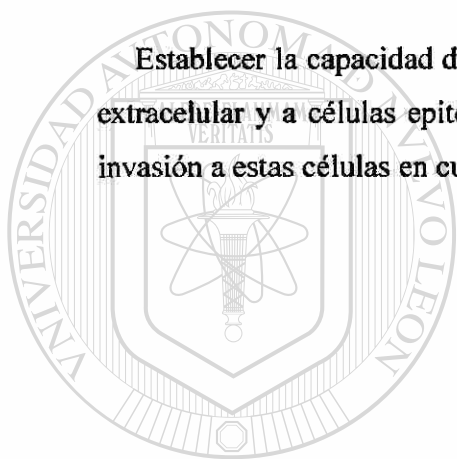
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

OBJETIVO GENERAL

Establecer la capacidad de adherencia de *Escherichia coli* patogénica aviar a la matriz extracelular y a células epiteliales de origen aviar, así como determinar su habilidad de invasión a estas células en cultivo.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS



OBJETIVOS PARTICULARES

- 1.- Determinar la capacidad de adherencia de *Escherichia coli* patogénica aviar a fibronectina y laminina.
- 2.- Medir el grado de adhesión por *Escherichia coli* patogénica aviar a células de epitelio traqueal de pollo mantenidas en cultivo.
- 3.- Establecer la capacidad invasiva de *Escherichia coli* patogénica aviar a células de epitelio traqueal de pollo mantenidas en cultivo.

ANTECEDENTES

4.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una enterobacteria gramnegativa, anaerobia facultativa, no esporulada que mide usualmente entre 2-3 μm de largo y 0.6 μm de ancho y forma parte de la microflora normal intestinal de los animales y del hombre, aunque no es la especie predominante de este hábitat, ya que solo constituye del 0.1 al 1% del total de la biota intestinal (Hirsh, 2004).

Algunas cepas de *E. coli* son patógenas y se caracterizan porque muestran especificidad de huésped y portan atributos de virulencia característicos. En 1885 Theodor Escherich identificó a *E. coli* en muestras clínicas humanas e inicialmente la denominó *Bacterium coli*, posteriormente Lignieres en 1894, describió una enfermedad causada por *E. coli* en aves y demostró la patogenicidad del microorganismo (Blanco *et al.*, 1996).

Al grupo de enfermedades causadas por cepas de este microorganismo se le denomina colibacilosis, término que se utiliza para designar diversas manifestaciones entéricas y sistémicas en diferentes especies animales. Actualmente se clasifica a las cepas patógenas de *E. coli* en aquellas que causan enfermedades intestinales y las que originan enfermedades extraintestinales, las manifestaciones clínicas de las enfermedades dependen del sitio infectado (Blanco *et al.*, 1996; Blanco *et al.*, 1998).

La colibacilosis en aves es una enfermedad infectocontagiosa, cosmopolita, sobreaguda, aguda o crónica que muestra diferentes síndromes principalmente extraintestinales, los cuales son de gran importancia en la industria avícola a nivel mundial (Gross, 1991; Dho Moulin y Fairbrother, 1999; La Ragione y Woodward, 2002).

4.2 Colisepticemia aviar.

E. coli patógena aviar (APEC) produce una variedad de infecciones extraintestinales que incluyen: peritonitis, celulitis, salpingitis, sinovitis, infección del saco vitalino, síndrome de la cabeza hinchada, coligranuloma, y principalmente la enfermedad respiratoria y la septicémica, estas últimas son las que ocasionan grandes pérdidas económicas en la industria avícola, especialmente en la del pollo de engorda (Gross, 1991; Dho Moulin y Fairbrother, 1999; La Ragione y Woodward, 2002).

La manifestación más severa de la colibacilosis aviar es la septicemia (colisepticemia) que ocurre frecuentemente en parvadas afectadas por otras infecciones respiratorias; se cree que *E. coli* puede actuar como patógeno oportunista después de la acción del *Mycoplasma gallisepticum* o de virus como el de la bronquitis infecciosa y el de la traqueitis (Gross, 1991; Majó *et al.*, 1997), sin embargo, experimentalmente se ha reproducido la septicemia inoculando solamente *E. coli* en aves libres de patógenos (Nakamura *et al.*, 1992).

La septicemia aviar puede presentarse en aves de todas las edades, pero afecta principalmente a animales entre cinco y doce semanas de edad, produciendo altos índices de morbilidad y en casos extremos una mortalidad superior al 20% (Gross, 1991; Ginns *et al.*, 2000). Se ha establecido que existe una serie de factores predisponentes que son importantes en la presentación de la enfermedad, los cuales reflejan el inadecuado manejo zootécnico de las granjas de cría de pollos; entre los que destacan temperaturas extremas, hambre, sed, mala ventilación, exceso de población, de polvo y de vapores de amoníaco (Dozois *et al.*, 2000; La Ragione y Woodward, 2002).

La mayor parte de las pérdidas económicas en las granjas de cría intensiva de pollos o pavos, además de las causadas por la mortalidad, se producen por la falta de desarrollo de las aves y por el costo de los tratamientos (Ginns *et al.*, 2000).

Para la prevención de la septicemia aviar se han ensayado diferentes protocolos de vacunas (Kwaga *et al.*, 1994; Penhambari y Gyles, 1998; Amosko *et al.*, 2004), sin embargo, los resultados hasta ahora han sido muy limitados ya que solo protegen contra la cepa homóloga de la cual se derivaron. La terapia antimicrobiana es una importante herramienta en la reducción de la mortalidad asociada con la colibacilosis aviar, sin embargo, el uso indiscriminado de los antibióticos es probablemente la causa principal del alto porcentaje de resistencia detectado en ese tipo de cepas (Blanco *et al.*, 1997).

4.3 Patogénesis

La septicemia aviar es una enfermedad sistémica en la cual la bacteria alcanza el torrente sanguíneo y órganos internos. La vía de entrada de APEC es principalmente aérea, debido a la inhalación de polvo contaminado con heces, posteriormente la bacteria coloniza el epitelio traqueal, para luego pasar a pulmón, probablemente este es un sitio importante para la diseminación de la bacteria. APEC tiene la capacidad de evadir la fagocitosis y resiste a los efectos bactericidas del complemento y esto trae como consecuencia una infección generalizada con la llegada de la bacteria a los órganos parenquimatosos y la muerte de las aves (Blanco *et al.*, 1996; Dho Moulin y Fairbrother 1999, La Ragione y Woodward 2002).

Otra manera de causar la infección generalizada puede ser a través de los sacos aéreos y no se descarta que la infección pueda ocurrir porque la bacteria atraviese la pared intestinal, pasando a la sangre y de ahí a otros órganos, incluso a los propios sacos aéreos (Leithner y Heller, 1992).

4.4 Factores asociados a la patogenicidad.

Algunos componentes bacterianos, se han relacionado con la capacidad de las cepas APEC para colonizar, persistir y causar daño durante su trayecto por el huésped. Dho Moulin y Fairbrother, (1999) han clasificado estos factores de virulencia como: a) los que dan a la bacteria capacidad para adherirse al tracto respiratorio, b) los que confieren resistencia a la acción bactericida del suero, c) aquellos que permiten la multiplicación

bacteriana a través de expresión de sideróforos de hierro y d) los que producen efectos citotóxicos.

Además, la mayoría de las cepas APEC pertenecen a un reducido número de serotipos, lo que le confiere valor epidemiológico. Blanco *et al.*, (1998) reportaron que aproximadamente el 60% de las cepas causantes de septicemia se engloban en tres serotipos el O1:K1, O2:K1 y O78:K80, mientras que los serogrupos más comunes son O2, O35 y O78.

Entre los factores que confieren capacidad de adherencia a los tejidos del huésped destacan la fimbria tipo 1 (F1); un alto porcentaje de cepas APEC expresan esta molécula y aún cuando su papel en la patogenicidad no es muy claro; se ha observado que las cepas que la expresan tienen una gran capacidad de adherencia a epitelio de la tráquea y a sacos aéreos y también se cree que es importante en la colonización de pulmones. F1 está constituida por una proteína principal, Fim A, asociada a las proteínas Fim F, Fim G y en la parte terminal se localiza la adhesina Fim H, que es la responsable de la habilidad de esta fimbria para unirse a los receptores de α -D-manosa, los cuales se encuentran sobre diversas células epiteliales de mucosas y varias células inflamatorias (Dozois *et al.*, 1994; Vidotto *et al.*, 1997). Otra fimbria importante aún cuando se han observado en baja proporción en las cepas APEC es la denominada P, que se expresa en cepas que colonizan los sacos aéreos, pulmones y órganos internos, lo que esto sugiere que puede estar involucrada en la colonización de órganos sistémicos y subsecuentemente en la septicemia (Dozois *et al.*, 1992; Dho Moulin y Fairbrother, 1999).

La fimbria curli es un polímero de 15 a 17 kDa, se expresa *In Vitro* bajo condiciones de baja osmolaridad y es otro de los apéndices bacterianos de las cepas APEC, a la cual se le ha atribuido la capacidad de mediar la unión al plasminógeno y a otras proteínas de la cascada de la coagulación, además parece estar relacionada con la adhesión a proteínas como la fibronectina y laminina, (Provence and Curtis 1992; Hammar *et al.*, 1996) aunque en cepas APEC no se comprobado este último evento. El papel de curli en la colisepticemia aviar no ha sido completamente elucidado, se sugiere que puede contribuir

en la colonización temprana y en los estados iniciales de la infección (Maurer *et al.*, 1998), adicionalmente los ensayos de Gophna *et al.* (2001) sugieren que niveles altos en la expresión de curli pueden mediar la internalización de la bacteria a líneas de células eucariotes mantenidas en cultivo.

Otro factor asociado a la patogenicidad de cepas APEC es la proteína Tsh (hemaglutinina sensible a la temperatura), que pertenece a una familia de autotransportadores. De acuerdo a Dho Moulin y Faibrother (1999), existe una alta incidencia de los genes *tsh* en cepas patógenas comparada con *E. coli* aislada de aves clínicamente sanas. Tsh es importante en la colonización en sacos aéreos, en los que podría actuar como una proteasa sobre un sustrato específico en estos órganos (Stathopoulos *et al.*, 1999; Dozois *et al.*, 2000). Más recientemente en estudios realizados por Kostakioti *et al.*, (2004) se atribuye a un dominio funcional de Tsh que es secretado (Tsh_s), la capacidad para adherirse a fibronectina y al colágeno tipo IV.

Por otra parte, aunque el flagelo no es considerado una adhesina, en cepas APEC se ha demostrado que la mutación del flagelo, disminuye de manera significativa la adherencia a una línea celular de secreción mucosa, lo cual apoya el concepto de que el flagelo es importante en la mediación de la penetración a la mucosa. Otros reportes demuestran que el flagelo es importante en la colonización, invasión y persistencia en un modelo de colisepticemia en aves libre de patógenos (La Ragione *et al.*, 2000a, b).

La resistencia al suero es un factor de virulencia importante en cepas APEC, se ha demostrado que diferentes estructuras bacterianas contribuyen en este evento como la cápsula, el plásmido ColV y proteínas de membrana externa (Wooley *et al.*, 1992; Mellata *et al.*, 2003a). Así, se ha reportado que cepas APEC que portan el antígeno K1 son más resistentes a los efectos bactericidas del suero que cepas con otros antígenos capsulares (Blanco *et al.*, 1996). Por su parte el plásmido ColV que ha sido detectado con alta frecuencia en aislamientos extraintestinales de *E. coli*, codifica para la síntesis de la colicina V, y se le atribuyen funciones como la resistencia a la acción lítica de complemento y a la fagocitosis; en cepas APEC se ha demostrado que son más virulentas

las cepas que portan este plásmido que aquellas que carecen de él (Waters y Crosa, 1991; Blanco *et al.*, 1996). Además, Tivendale *et al.*, (2004) han sugerido que en el plásmido ColV se localizan los genes *tsh*. Un factor de virulencia sumamente importante en las cepas APEC es la resistencia a la fagocitosis como lo muestran los trabajos de Mellata *et al.*, (2003b).

La expresión de sideróforos aerobactina está relacionada con la patogenicidad de cepas APEC para la captación de hierro y se tiene conocimiento de que el gen de aerobactina se localiza en el plásmido ColV (Dho Moulin y Faibrother, 1999).

En relación a la producción de toxinas por las cepas APEC, se ha reportado que la toxina letal de pollos (CLT) puede estar involucrada en el proceso patogénico de la septicemia aviar, aunque su expresión no está distribuida ampliamente (Dho Moulin y Faibrother, 1999) también se ha identificado a la toxina vat, que induce la formación de vacuolas en células en cultivo y se ha reportado que las cepas que la producen son muy virulentas (Parreira y Gyles, 2003).

Sin embargo, aún cuando ha habido grandes avances en el conocimiento de los factores asociados a la patogenicidad de las cepas causantes de la colisepticemia aviar, no se tienen claros diversos eventos en la fisiopatología de esta enfermedad como son aquellos que ocurren después de la adherencia de la bacteria al epitelio traqueal y que permiten la diseminación bacteriana por todo el organismo. No se descarta la posibilidad de que las cepas APEC puedan adherirse a componentes de la matriz extracelular, al quedar ésta expuesta después de un daño previo a los tejidos, causados por patógenos primarios, como una manera para la colonización de los tejidos; otro proceso eventual sería el que la bacteria pudiera internalizarse en células epiteliales como una estrategia para atravesar los epitelios y alcanzar el torrente sanguíneo. Por tal motivo se describen a continuación reportes de la adherencia bacteriana a células epiteliales y a componentes de la matriz extracelular, así como eventos de la invasión bacteriana a células epiteliales por diversos patógenos que fueron considerados como antecedentes del trabajo que se desarrolló.

4.5 Adherencia bacteriana.

La interacción entre bacterias y los tejidos del huésped o proteínas solubles es crucial en el desarrollo de la mayoría de las enfermedades infecciosas tanto para la adhesión primaria y la colonización tejido-específica como para la invasión del patógeno en los diferentes tejidos de su huésped. La adherencia bacteriana ocurre entre moléculas de superficie del microorganismo que pueden ser fimbriales o afimbriales y receptores del huésped generalmente constituidos por glicolípidos o glicoproteínas; las bacterias no adherentes son rápidamente eliminadas por mecanismos inespecíficos de defensa del huésped, tales como el peristaltismo, el movimiento ciliar y el flujo de líquidos, o por el recambio de células del epitelio y de la capa mucosa (Hultgren *et al.*, 1993; Preissner y Shingh, 2000).

Diversas adhesinas microbianas pueden mediar la unión a los tejidos, al inicio de la infección, pudiendo unirse a células no fagocíticas o a la matriz extracelular (MEC) y muchos microorganismos invasivos entran a la célula del huésped después de unirse a estructuras de superficie; la adhesión no solo es necesaria al inicio de la infección sino que puede ocurrir durante el trayecto bacteriano para unirse a moléculas blanco como parte de las estrategias de patogenicidad y dado que la superficie de las células del huésped contienen proteínas, glicoproteínas y glicolípidos, éstos pueden ser receptores para la unión bacteriana, de igual manera la MEC como fuente rica en glicoproteínas puede ser utilizada por la bacteria como nicho de adherencia (Preissner y Shingh, 2000; Tran van y Sansonetti, 2000).

La unión a la célula puede conducir a alteraciones estructurales y/o funcionales de las proteínas del huésped y a la activación de mecanismos celulares que influyen en la invasión del patógeno a células y tejidos; no solamente facilitando la entrada de patógenos a las células huésped, sino que así también éstos puedan escapar de la acción de ciertos antibióticos. Algunas interacciones con componentes del huésped, sean estos solubles o inmovilizados, pueden enmascarar la superficie microbiana y por lo tanto

interferir con la presentación del antígeno y proveer de una estrategia de evasión de la respuesta inmune (Preissner y Shingh, 2000; Tran van y Sansonetti, 2000).

4.6 Matriz Extracelular.

La MEC es un tejido activo biológicamente compuesto por una compleja mezcla de proteínas y polisacáridos que afectan las actividades celulares en un organismo, las interacciones entre las células eucariontes y los componentes de la MEC, son mediados por los receptores celulares específicos –las integrinas- que unen a la MEC con el citoesqueleto. Las proteínas que forman la MEC, son de dos tipos funcionales; las adhesivas, en donde se incluyen a la fibronectina y laminina entre otras, y las estructurales como el colágeno (Alberts *et al.*, 2002).

La lámina basal, es una matriz extracelular bien definida y especializada, se presenta como una delgada capa flexible de 40 a 200 nm de grosor que delinea a los epitelios del revestimiento interno del conducto respiratorio, digestivo y vasos sanguíneos; también rodea a algunos tipos celulares. En la constitución de la lámina basal es fundamental la laminina, la cual tiene sitios de unión con receptores de la membrana plasmática, algunos autores también consideran a la fibronectina como un componente de la lámina basal, mientras que el colágeno tipo IV es una proteína estructural (Alberts *et al.*, 2002; Preissner y Shingh, 2000).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

4.6.1 Laminina.

La laminina es una glicoproteína, que como ya se señaló, se localiza predominantemente en la lámina basal delineando epitelios. Su peso molecular es de entre 850 y 900 kDa, es producida por una variedad de células, incluyendo a las embrionarias y epiteliales. La molécula heterotrimérica consiste en las cadenas de polipéptidas: A (α) de 400 kDa, B1 (β) de 220 kDa y B2 (γ) de 220 kDa, las cuales son ensambladas dentro de una estructura en forma de cruz con tres brazos cortos y uno largo, conectadas por un puente disulfuro que se localiza en el centro de la cruz (Skubitz *et al.*, 1988; Fujiwara *et al.*, 2001). La laminina contiene un 15% de carbohidratos, y puede interactuar con otras moléculas de laminina, con colágeno tipo IV, con

glicosaminoglicanos como heparán sulfato y con receptores de membrana plasmática, con estos últimos a través de diferentes receptores celulares entre ellos las integrinas. (Fijiwara *et al.*, 2001)

4.6.2 Fibronectina.

La fibronectina es una glicoproteína heterodimérica de la MEC con un peso molecular de 450-550 kDa que contiene de un 4-9% de carbohidratos, y presenta dos formas: la plasmática que se localiza en plasma, saliva, líquido cerebroespinal y amniótico, y la forma celular que es insoluble, localizándose en los tejidos conectivos intersticiales y en la MEC, y está en su mayoría unida a la superficie de la célula o depositada como un multímero insoluble en la MEC e interactúa con la célula por medio de las integrinas (Sarén *et al.*, 1999; Wierzbicka y Schwarzbauer, 2003). Las fibronectinas usualmente existen como un dímero compuesto por dos cadenas semejantes unidas por un par de puentes disulfuro cerca de su extremo carboxilo terminal; cada monómero consiste en unidades repetitivas denominadas tipo I, II y III. Tiene sitios de glicosilación predominantemente en repeticiones tipo III, los cuales estabilizan a la molécula contra la hidrólisis y modulan su afinidad para algunos sustratos (Wierzbicka y Schwarzbauer, 2003).

En la fibronectina celular, cada subunidad está dividida en una serie de dominios de unión, tiene forma en varillas separadas por regiones flexibles y contiene: a) sitios de enlace para otros componentes de la matriz que ayudan a unir moléculas diversas en una red estable; y b) sitios de enlace para receptores situados en la superficie de la célula que sirven para mantener una unión estable entre la MEC y la célula e incluyen dominios de unión para las integrinas que son receptores celulares que enlazan la MEC con el citoesqueleto, sitios de unión con el colágeno, para la heparina, para la actina y para proteínas del plasma como la fibrina, así como para proteoglicanos (Pankov y Yamada, 2002; Wierzbicka y Schwarzbauer, 2003).

4.7 Adherencia bacteriana a la MEC.

La capacidad de las bacterias para adherirse a elementos de la MEC ha sido considerada como una estrategia de patogenicidad de manera que, la identificación y caracterización de componentes que median la adhesión a la MEC, es indispensable para entender los aspectos moleculares de la patogénesis. Se ha reconocido que muchos microorganismos expresan adhesinas para la matriz extracelular del huésped, a estas adhesinas en general se les ha llamado componentes microbianos superficiales que reconocen moléculas adhesivas de la matriz las cuales se abrevian como MSCRAMMs (del inglés: microbial surface components recognizing adhesive matrix molecules) (Patti *et al.*, 1994), sin embargo, pocas MSCRAMMs han sido identificadas y caracterizadas.

Patti *et al.*, (1994) señaló que para que una molécula pueda ser considerada como una MSCRAMM debería cumplir con tres características: a) localizarse en la superficie celular microbiana, b) reconocer un ligando macromolecular, localizado exclusivamente en la MEC, o bien, moléculas de la MEC que puedan tener una forma soluble y localizarse en los líquidos corporales, y c) la interacción entre MSCRAMM y componentes de la MEC, debe ser de alta afinidad y especificidad; sin embargo más recientemente se han descrito adhesinas que median unión con uno o varios componentes de la MEC (Nallapareddy *et al.*, 2000; Fink *et al.*, 2002).

La interacción bacteriana a formas insolubles de proteínas de la MEC, que se encuentran en la superficie de las células epiteliales es importante ya que además de permitir la fijación de los patógenos a la MEC, esta unión puede también promover la adhesión de la bacteria a la célula huésped mediante un mecanismo puente, en el cual el patógeno se adhiere con la proteína de la MEC y ésta a su vez interactúa con la célula eucarionte mediante receptores de superficie, como las integrinas (Tran van y Sansonetti, 2000).

Tejidos dañados por diferentes tipos de trauma, en los cuales queda expuesta la MEC son blanco de colonización e infección, ya que diversos microorganismos expresan

componentes de superficie que reconocen a moléculas de la MEC (Preissner y Shingh 2000).

4.7.1 Adherencia bacteriana a la laminina

A continuación se describen diferentes patógenos bacterianos que han mostrado unión con la laminina, se ha reportado por ejemplo que, debido a que la exposición a laminina es más frecuente en tejidos inflamados, bacterias como *Pseudomonas aeruginosa* se une a esta proteína de la lamina basal del epitelio del tracto respiratorio dañado, una vez que ha quedado expuesta y se cree que la afinidad bacteriana por la laminina puede tener algún significado biológico en la patogénesis de la infección (Plotkowski *et al.*, 1996).

También se ha demostrado que uno de los patógenos neonatales más importantes para los humanos, el *Streptococcus agalactiae* daña el epitelio pulmonar lo cual conduce a la exposición de la membrana basal, con la consecuente unión a la laminina, evento que se sugiere es crítico para la colonización del epitelio y la invasión de la bacteria al torrente sanguíneo (Spellenberg *et al.*, 1999). En algunos casos, se ha señalado que la unión a la laminina se utiliza como un mediador para la adhesión del patógeno con la célula huésped (Kukkonen *et al.*, 1998; Terao *et al.*, 2002; Dubreuil *et al.*, 2002) y en otros casos ha quedado demostrado que la unión bacteriana con la laminina contribuye a la virulencia (Tahir y Skurnik, 2002).

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

La interacción específica de bacterias con la laminina es mediada por diversas moléculas de superficie, se han reportado como adhesinas a estructuras fimbriales (Virkola *et al.*, 1993; Hammar *et al.*, 1996; Kukkonen *et al.*, 1998) y no fimbriales como proteínas de membrana externa (Flügel *et al.*, 1991; Plotkowski *et al.*, 1996; Valkonen *et al.*, 1997; Cameron, 2003), componentes del LPS (Valkonen *et al.*, 1994; Dubreuil *et al.*, 2002) o proteínas de membrana con función de autotransportadores (Fink *et al.*, 2002).

En algunas infecciones causadas por patógenos con capacidad de unirse a laminina se han logrado detectar anticuerpos dirigidos contra las adhesinas bacterianas que median

esta interacción, lo que indica que en esos casos la adhesina es expresada *in vivo* durante dichas infecciones (Cameron, 2003).

También se ha demostrado que la adherencia a la laminina puede promover la penetración bacteriana a través de los tejidos, así se conoce que algunas cepas de *Salmonella entérica* serovar Typhimurium se unen a las cadenas α -manosa de laminina, por medio de la fimbria tipo 1, y adicionalmente expresan un receptor plasminógeno que les confiere capacidad para degradar a la laminina y potencialmente penetrar a través de la membrana basal, sin embargo, estos hallazgos y su contribución a la virulencia necesitan ser analizados *in vivo* (Kukkonen *et al.*, 1998). Mientras que en el caso de cepas de *E. coli* causantes de infección intestinal diarreica y septicemia en bovinos, se cree que la adherencia a la laminina potencializa la translocación de la bacteria a través de las barreras epiteliales del intestino hacia la circulación, en este caso la unión es mediada por la fimbria G (F17) y se cree que este evento podría incrementar la colonización potencial del microorganismo a tejido intestinal dañado (Saarela *et al.*, 1996).

Por otro lado en cepas de *E. coli* asociadas a la meningitis del recién nacido en humanos, se ha establecido que un mecanismo de patogenicidad es la adhesión a la membrana basal subendotelial. Ensayos *In Vitro* han demostrado que las cepas que expresan la fimbria S, se adhieren fuertemente a la laminina inmovilizada, esta unión pudiera ser importante en la patogénesis de la enfermedad ya que se ha encontrado que la fimbria S se expresa en sangre y líquido cerebrospinal en un modelo experimental murino (Virkola *et al.*, 1993).

4.7.2 Adherencia bacteriana a la fibronectina

La fibronectina es el prototipo de proteínas de adhesión a la que se unen microorganismos patógenos, se ha reportado la unión de más de 16 especies bacterianas y la interacción con bacterias gram positivas a sido ampliamente caracterizada. Diversos microorganismos utilizan a la fibronectina como mediador para adherirse a la célula huésped (Preissner y Shingh, 2000) y además esta unión puede ser un mecanismo puente para la internalización bacteriana a la célula huésped, como ha sido reportado en

Streptococcus equi cuya unión con la fibronectina es determinante para promover la internalización a las células epiteliales (Lindmark y Guss, 1996), de igual forma, la fibronectina media la internalización de *S. pyogenes*, a la célula huésped a través de la unión de la proteína M con la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Chaussee *et al.*, 2000). Para *Neisseria meningitidis* la adherencia a la fibronectina determina su internalización a la célula epitelial y se ha sugerido que este evento, tiene un posible papel en la patogénesis de la meningitis causada por esta bacteria (Eberhard *et al.*, 1998). También se reconoce que la adherencia bacteriana con la fibronectina es un paso clave en la patogénesis de las infecciones causadas por algunas bacterias como es el caso de *Staphylococcus aureus*, el cual presenta una familia de adhesinas tipo MSCRAMM, que inducen a la adherencia y la internalización a la célula huésped, estas adhesinas pueden actuar como moléculas puente entre la FnBP y la integrina $\alpha_5\beta_1$ (Shinha *et al.*, 2000; Heyer *et al.*, 2002).

En otro tipo de microorganismos como *Campylobacter jejuni*, la capacidad de unión a la fibronectina es clave para una exitosa invasión a la célula huésped, como lo han demostrado los resultados de Monteville y Konkel, (2002) mientras que en la enfermedad de Lyme un evento importante en su patogenia es la capacidad de *Borrelia burgdorferi* para unirse al epitelio, se tienen evidencias de que los anticuerpos anti-fibronectina inhiben por competencia la adherencia de la espiroqueta a las células epiteliales, lo cual sugiere, que la unión a fibronectina está involucrada en la adherencia a la célula huésped (Probert y Johnson, 1998).

Se han identificado diversas moléculas bacterianas que median la unión con la fibronectina como el ácido teicoico en *Staphylococcus epidermidis* (Williams *et al.*, 2002) y proteínas de pared celular en diferentes especies de estreptococos (McArthur *et al.*, 2004). Algunas micobacterias unen a la fibronectina a través de proteínas de superficie, y esta interacción facilita la colonización al permitir la unión bacteriana en áreas donde el epitelio se encuentra dañado (Secott *et al.*, 2002).

En infecciones causadas por *Haemophilus ducreyi* un miembro de la familia de autotransportadores promueve su adhesión *In Vitro* a la fibronectina y laminina y se

especula que esta unión es importante en la colonización del tracto respiratorio por este patógeno (Fink *et al.*, 2002). En el caso de *Erysipelothrix rhusiopathiae* una proteína de superficie media la adherencia a la fibronectina (Shimoji *et al.*, 2003), mientras que en *C. jejuni* y en *Yersinia enterocolitica* la unión con esta molécula se atribuye a proteínas de membrana externa (Konkel *et al.*, 1997; Monteville *et al.*, 2003; Shuze-Kopp *et al.*, 1993)

En algunas infecciones, se han detectado anticuerpos anti-moléculas de unión a la fibronectina, sin embargo se desconoce su significado en el proceso patogénico, además se ha considerado tan importante la adherencia bacteriana a la fibronectina de manera que se ha propuesto el uso de moléculas de unión a la fibronectina como inmunógenos para prevenir infecciones como se reportó para *S. pyogenes* (McArthur *et al.*, 2004)

Los sitios de unión a los diferentes dominios estructurales y funcionales de la fibronectina son importantes en la adhesión específica con las bacterias como se ha reportado para *H. influenzae* que interactúa específicamente con el dominio de 45 kDa de unión al colágeno (Virkola *et al.*, 2000), por su parte *S. pyogenes* se une a la región N-terminal (Oehmcke *et al.*, 2004) y en *N. meningitidis* el sitio de unión ha sido localizado en el dominio de unión a la célula de 75 kDa (Eberhard *et al.*, 1998). *Streptococcus pneumoniae* se une a la fibronectina inmovilizada en el dominio de unión a la heparina, en el extremo carboxilo terminal, un sitio distinto al que se pegan la mayoría de las bacterias (van Der *et al.*, 1995), también *Mycobacterium tuberculosis*, se adhiere a este dominio (Pasuola *et al.*, 2002).

En la patogénesis de la infección causada por cepas enterotoxigénicas de *E. coli* en becerros, se ha considerado que además de la producción de toxinas la unión a la fibronectina puede representar un mecanismo de patogenicidad, al mediar adherencia a los tejidos. Visai *et al.*, (1991) examinaron la unión *In vitro* de estas cepas con fragmentos proteolíticos de la fibronectina y demostraron que la bacteria es capaz de interactuar tanto con el dominio aminoterminal como con el dominio de unión a la heparina.

Para el caso de las cepas APEC, se ha atribuido a la fimbria curli, la unión a fibronectina y laminina (Provence y Curtis, 1992) sin embargo solo se encontró en la literatura este reporte. Posteriormente Kostakioti *et al.*, (2004) señalaron que el autotransportador Tsh compuesto por: d una secuencia señal *sec*, un dominio asociado a membrana y un polipéptido secretorio de 106 kDa, es capaz de unirse *In Vitro* a la fibronectina y al colágeno tipo IV, pero no a la laminina, a través de su dominio secretorio denominado Tsh_s.

4.8. Internalización bacteriana a células no fagocíticas

En varias infecciones la adhesión a la superficie de la célula o incluso a componentes de la MEC puede dar como resultado la internalización bacteriana a la célula huésped lo cual se considera un aspecto importante en la patogénesis de algunas enfermedades. Aunque las células fagocíticas están adaptadas para internalizar patógenos, las células no fagocíticas profesionales usualmente no endocitan partículas grandes, sin embargo, algunos patógenos bacterianos pueden inducir su propia entrada a la célula huésped, evento denominado, invasión o fagocitosis inducida por la bacteria; esto le permite al patógeno situarse en un nicho protegido y, en algunos casos le confiere la capacidad de pasar a través de las barreras epiteliales (Ireton y Cossart, 1998).

La fagocitosis y la invasión bacteriana son mecánicamente similares; ambas son iniciadas por interacciones receptor-ligando que activan señalizaciones en la célula huésped, permitiendo que el citoesqueleto de actina proporcione la fuerza necesaria para internalizar la partícula dentro de una vacuola. Las bacterias invasivas han desarrollado dos mecanismos principales de internalización: el primero denominado “cremallera” que involucra el contacto directo entre ligando bacteriano y receptores celulares que circulan al microorganismo, este mecanismo utiliza las vías normalmente involucradas en la adhesión celular y otro es el de “disparo”, en el cual la bacteria envía señales a la célula para inducir dramáticas protusiones membranosas y extensos rearrreglos del citoesqueleto que conducen a la macropinocitosis y a una virtual entrada pasiva de la bacteria. Este proceso se asemeja a la respuesta de la célula huésped a factores de crecimiento (Finlay y Cossart, 1997). Estos dos mecanismos de invasión han sido ampliamente estudiados en

patógenos intracelulares facultativos, para el caso del evento de “cremallera” los modelos de estudio han sido *Yersinia pseudotuberculosis* y *Listeria monocytogenes*, mientras que *Salmonella* Typhimurium y *Shigella flexineri* utilizan el tipo “disparo” (Cossart y Lecuit, 2000).

Sin embargo, diversos estudios reportan que algunos patógenos extracelulares son capaces de penetrar a células fagocíticas no profesionales como se ha descrito para *H. influenzae* que puede penetrar a células humanas en cultivo (Ketterer *et al.*, 1999). Se ha reportado que *Klebsiella pneumoniae*, invade células epiteliales y que la despolimerización de microfilamentos de actina inhibe su internalización (Oelschlaeger y Tall, 1997). En el caso de *Neisseriae gonorrhoeae* y *N. meningitidis* se ha encontrado que la invasión a células en cultivo es mediada por la interacción entre proteínas de membrana externa llamadas Opa y su receptor en la célula huésped, (Harvey *et al.*, 1997; Edwards *et al.*, 2000), por su parte *Campylobacter jejuni* es capaz de invadir células intestinales de origen humano *in vitro* (Monteville and Konkel 2002; Monteville *et al.*, 2003). En todos estos patógenos se asume que la internalización bacteriana es un mecanismo de patogenicidad.

Para el caso de *E. coli* diarriogénica en humanos, con la excepción de las cepas de *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), las infecciones han sido catalogadas como extracelulares debido a que el patógeno se localiza fuera de la célula eucarionte donde, hasta hace poco, se consideraba que causaba daño solamente por la expresión de productos tales como toxinas; sin embargo, en la actualidad algunos reportes que indican que las infecciones intestinales debido a *E. coli* además de las causadas por EIEC pueden incluir una fase intracelular (Meier *et al.*, 1996).

Asimismo, se ha demostrado que cepas de *E. coli* causantes de enfermedades extraintestinales como son aquellas que originan infecciones del tracto urinario en humanos, son capaces de penetrar a células epiteliales (Palmer *et al.*, 1997; Kansau *et al.*, 2004), además se reconoce que la fimbria tipo I media tanto la adherencia como la invasión a células epiteliales de la vejiga urinaria. Ha sido evidenciado que las cepas que

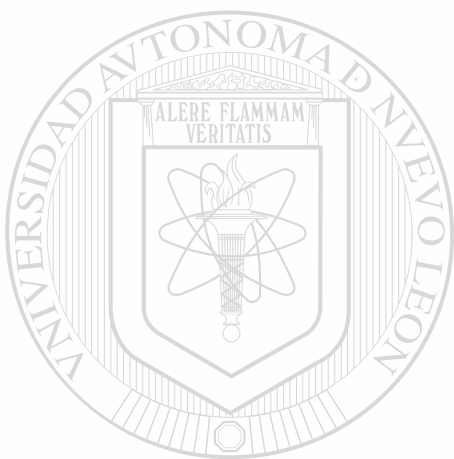
expresan esta fimbria invaden a las células epiteliales que delimitan el lumen de la vejiga y que subsecuentemente se replican formando focos masivos de *E. coli* intracelular (Mulvey *et al.*, 2001; Mulvey, 2002).

En otra enfermedad causada por cepas de *E. coli* extraintestinal, la meningitis del recién nacido en humanos, se ha observado que la bacteria tiene la capacidad de invadir células epiteliales y endoteliales, pudiendo atravesar la barrera hemato-encefálica e inducir rearrreglos del citoesqueleto *In Vitro* en células endoteliales (Prasadarao *et al.*, 1999; Kim, 2001). También se ha demostrado en la meningitis hematogena experimental que varios determinantes microbianos contribuyen en la invasión a células endoteliales (Prasadarao *et al.*, 1999; Huang *et al.*, 1999; Kim, 2001).

En el caso de la septicemia aviar, no son completamente entendidos los mecanismos por medio de los cuales la bacteria atraviesa la barrera epitelial y alcanza el torrente sanguíneo. Pourbakhsh, *et al* (1997), examinaron pollos después de haberlos inoculado con APEC a través de los sacos aéreos y observaron bacterias adheridas a células epiteliales así como dentro de éstas, también se localizaron en el lumen de los sacos aéreos, lo cual podría sugerir que una vía potencial para iniciar la invasión a los tejidos es la internalización de *E. coli* aviar en células epiteliales. Resultados de otros investigadores demuestran que APEC es capaz de internalizarse *In Vitro* en células HeLa y HEp-2 (La Ragione, *et al.*, 2000a; Gophna, *et al.*, 2001; Silveira, *et al.*, 2002).

Aún cuando se ha establecido el papel de algunos factores de virulencia de APEC en el desarrollo de la septicemia aviar (Dho Moulin y Fairbrother, 1999; La Ragione y Woodward, 2002), poco se conoce acerca de las interacciones de la bacteria con componentes de la MEC, lo cual consideramos que es importante definir dado que, la enfermedad generalmente se presenta en el contexto de daño en el tracto respiratorio ocasionado por patógenos primarios o por factores físicos predisponentes, lo que pudiera ocasionar que la MEC quedara expuesta siendo un blanco para la colonización bacteriana como ha sido reportado en otros procesos infecciosos. Por otra parte, tampoco se ha analizado la interacción de las cepas APEC con células epiteliales en cultivo

considerando para esto, la especificidad del huésped y la vía natural del inicio de la infección, con la ventaja de que este tipo de cultivo podría representar un modelo más adecuado para el estudio de diversos aspectos del desarrollo de la enfermedad que las líneas celulares humanas que han sido utilizadas. En este trabajo se establecieron cultivos primarios de células de epitelio traqueal de pollo y en estos se analizó la capacidad de adherencia e invasión de una cepa APEC aislada de un caso clínico de septicemia aviar.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

MÉTODOS

5.1 Cepas bacterianas y condiciones de cultivo

Para este estudio se utilizó la cepa APEC designada YA21 que previamente había sido aislada de órganos parenquimatosos de un pollo enfermo con signos clínicos de septicemia aviar, el cual fue sacrificado en el laboratorio para evitar inconvenientes en la toma de muestras por la diseminación bacteriana post-mortem. *E. coli* se identificó por medio de pruebas bioquímicas y la cepa bacteriana YA21 se conservó en viales conteniendo medio de cultivo semisólido denominado medio para guardar *E. coli* (Caldo nutritivo 10g, NaCl 5 g, Bacto-agar 6 g/L de agua destilada, pH 7.2), a temperatura ambiente y en la oscuridad (Almanza, 1992). Posteriormente la cepa APEC YA21 fue caracterizada en función de su fenotipo para algunos factores asociados a la patogenicidad; los resultados mostraron que esta cepa bacteriana expresa la fimbria tipo 1 y la fimbria curli, estudios de colicinogenia mostraron que la cepa porta el plásmido ColV, se detectó que es móvil y se determinó adicionalmente su perfil de resistencia a los antibióticos (Ramírez *et al.*, 2001).

Para el presente trabajo la cepa YA21 se creció a partir de una asada del medio para guardar *E. coli* en 1 ml de caldo infusión cerebro corazón (Difco Laboratories Detroit MI, USA) durante toda la noche a 37°C en condiciones estáticas. Después de diluirse 1:150 en caldo fresco, el cultivo se incubó a 37°C en agitación continua a 250 rpm/min y se cosechó después de 2 h cuando las bacterias se encontraban en la fase logarítmica de

crecimiento, centrifugando a 6000 X g por 10 minutos a 4°C. El botón celular se lavó tres veces con solución amortiguadora de fosfatos (PBS). La densidad bacteriana se ajustó a una absorbancia de 1.5 (DO₆₂₀) con PBS, que correspondía a una población bacteriana de 10⁸ ufc/ml.

La cepa de laboratorio *E. coli* K12 DH5 α , (Gibco Life Technologies) fue usada como control negativo en los ensayos de adherencia e invasión debido a que previamente se ha reportado que no invade células epiteliales en cultivo (Almeida *et al.*, 1996). Esta cepa se mantuvo conservada en viales conteniendo medio para guardar *E. coli* a temperatura ambiente y para los estudios comparativos se cultivó y se ajustó la población bacteriana de la misma manera como se describió para la cepa APEC YA21.

5.2 Producción de anticuerpos policlonales anti-fibronectina y anti-laminina

Para obtener anticuerpos anti-laminina y antifibronectina se siguió el protocolo descrito por Valkonen *et al.*, (1997) haciendo algunas modificaciones. Se inmunizaron conejos machos Nueva Zelanda de tres meses de edad, uno de ellos para producir anticuerpos anti-laminina y otro para anticuerpos anti-fibronectina, previo a la inmunización se obtuvo suero para ser utilizado como control.

Inicialmente se inoculó vía subcutánea 10 μ g de laminina purificada (Sigma Chemical Co St Louis MO) mantenida en 500 μ l de agua destilada estéril mezclada con igual volumen de adyuvante completo de Freud (Sigma Chemical Co St Louis MO) en diferentes puntos de la cadera y hombros. Las siguientes inoculaciones se hicieron semanalmente durante cuatro ocasiones, utilizando la misma concentración de proteína, pero usando adyuvante incompleto de Freud (Sigma Chemical Co St Louis MO). Los anticuerpos anti-fibronectina fueron producidos siguiendo este mismo esquema de inmunización utilizando fibronectina purificada (Sigma Chemical Co St Louis MO). Una semana después de la última inoculación, los conejos se sangraron por punción cardiaca, se separó el suero y este se descomplementó a 56°C durante 45 min. Se hicieron alícuotas del suero y se congelaron a -20°C.

La detección de los anticuerpos policlonales anti-laminina y los anti-fibronectina se realizó por medio de Western blot, usando como control el suero preinmune de los conejos. Para este efecto se realizó una electroforesis en geles de poliacrilamida bajo condiciones disociantes (PAGE-SDS) de la fibronectina (Sigma Chemical Co St Louis MO) y de laminina (Sigma Chemical Co St Louis MO) respectivamente. En el corrimiento electroforético de la fibronectina la concentración de acrilamida en el gel separador fue del 7.5% mientras que en el de laminina fue del 5% y para ambos casos se colocaron 3µg de proteína por carril. Las electroforesis se corrieron a 35mA en una cámara Miniprotean (Bio-Rad Laboratorios USA) durante aproximadamente 1 h. Posteriormente uno de los geles fue teñido con azul de Coomassie y a partir de geles no teñidos se realizó la electrotransferencia a membranas de nitrocelulosa utilizando una cámara transblot (Bio-Rad Laboratorios USA) a 25 mA, durante toda la noche a 4°C. Al término de la transferencia las bandas fueron observadas utilizando el colorante verde rápido al 0.1%, y la membrana de nitrocelulosa fue cortada en tiras que contenían las proteínas transferidas. Se procedió a bloquear los sitios inespecíficos de unión incubando las membranas con PBS-Tween 20 al 0.05% (PBST) toda la noche a 4°C, luego se incubaron con el suero de conejo a probar usando diferentes diluciones: 1:200, 1:500 y 1:1000 en PBST-3% de leche durante 1h a temperatura ambiente y en agitación suave, pasado este tiempo las membranas se lavaron tres veces por 5 minutos cada vez con PBS y se incubaron por 1h con anti-IgG de conejo conjugado a peroxidasa (Sigma Chemical Co St Louis MO) usando una dilución 1: 5000 en PBST-3% de leche. Las membranas se lavaron nuevamente por tres veces y luego la reacción se reveló utilizando diaminobencidina (Sigma Chemical Co St Louis MO) al 0.05% en PBS y H₂O₂ (0.01%) como catalizador.

5.3 Producción de anticuerpos anti-*E. coli*

Se utilizó un conejo macho de 3 meses de edad al que se inoculó un extracto crudo de la cepa APEC YA21 que se obtuvo de acuerdo al protocolo descrito por Verdugo *et al.*, (1993) con algunas modificaciones. Para obtener el extracto de proteínas, la cepa APEC YA21 se cultivó y cosechó como se describe en la sección “Cepas bacterianas y condiciones de cultivo”, Después de obtener el botón celular, este se resuspendió en 500

μl de 10mM Na_2HPO_4 , -2% Triton X 100. La suspensión bacteriana fue sonicada a 30 w, 5 veces por 30 s cada vez con periodos de enfriamiento de 30 s. luego se centrifugó a 6 000 X g por 2 min, se recuperó el sobrenadante y se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford.

La inmunización del conejo se realizó después de obtener el suero preinmune inoculando por vía subcutánea en cadenas y hombros con 200 μg de proteínas del extracto de APEC YA21 mezcladas con 200 μl de adyuvante completo de Freud, y agua estéril hasta completar un volumen de 1 ml. Las inoculaciones se repitieron los días 7, 14 y 21 utilizando la misma concentración de proteínas pero con adyuvante incompleto de Freud. El día 28 se sangró al conejo por punción cardíaca, se separó el suero, se descomplementó y se hicieron alícuotas para mantenerlo en congelación hasta su uso.

La detección de anticuerpos anti-*E. coli* se realizó por dot blot y por inmunofluorescencia. Para el dot blot, se gotearon 3 μg del extracto de APEC YA21 en una membrana de nitrocelulosa y se fijaron por 10 min a 37°C, luego se siguió el procedimiento de inmunodetección arriba descrito, utilizando el suero inmune de conejo inoculado con el extracto APEC YA21 a diluciones 1:200, 1:500, y 1:1000 y como control el suero pre-inmune a las mismas diluciones.

Debido a que los anticuerpos anti-*E. coli* serían utilizados en los ensayos de microscopia confocal se decidió detectar la producción y su por inmunofluorescencia. Cincuenta μl de una suspensión de APEC YA21 se colocaron por triplicado en cubreobjetos y se fijaron con formaldehído al 2% por 10 min a temperatura ambiente, las preparaciones se lavaron con PBS y se cubrieron con PBS-SFB al 10% (PBS-SFB) por 30 min, luego se lavaron tres veces con PBS por 5 min cada vez y se incubaron con suero de conejo anti-*E. coli* a diluciones 1:100, 1:200 y 1:500 en PBS-SFB por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda, luego se volvieron a lavar tres veces PBS y se incubaron con anti-IgG de conejo conjugado a FITC (Sigma Chemical Co St Louis MO) a una dilución 1:500 en PBS-SFB en cámara húmeda y en oscuridad durante 1 h, nuevamente se lavaron tres veces con PBS y finalmente las preparaciones se montaron

sobre portaobjetos y se observaron en un microscopio equipado con lámpara de epifluorescencia (Axiovert, Zeiss).

5.4 Adherencia de APEC a fibronectina y laminina

5.- *Adherencia de APEC a fibronectina y laminina*

La adherencia de la cepa APEC YA21 a fibronectina o a laminina inmovilizadas fue examinada por Far dot blot de acuerdo a lo descrito por Fink *et al.*, (2002) con algunas modificaciones. Esta es una técnica también llamada “blot de afinidad” o “blot ligando” debido a que no es solo la detección de una reacción antígeno-anticuerpo sino que como su denominación lo indica detecta la unión de un ligando (Edmondson y Roth, 2001) que para este caso son la proteínas de la MEC arriba señaladas.

Fibronectina celular (Sigma Chemical Co St Louis MO) y laminina (Sigma Chemical Co St Louis MO) fueron agregadas (3µg) por separado sobre membranas de nitrocelulosa (Bio-Rad Laboratories USA). Las membranas se incubaron 10 min a 37°C para fijar las proteínas y se bloquearon con PBST como antes se describió.

Posteriormente las membranas se incubaron con una suspensión bacteriana conteniendo 10^8 ufc/ml de APEC por 2 h a temperatura ambiente con agitación suave, luego las membranas fueron lavadas cinco veces con PBS e incubadas con suero de conejo conteniendo anticuerpos policlonales anti-*E. coli* a una dilución de 1:200 en PBST-3% leche por 1 h, pasado este tiempo se lavó tres veces con PBS y se agregó anti-IgG de conejo conjugado con peroxidasa (Sigma Chemical Co St Louis MO) diluido 1:5000 en PBST-3% de leche. Después de 1 h la reactividad fue revelada con diaminobencidina como antes se describió.

Los controles negativos consistieron en realizar ensayos en los cuales los anticuerpos anti-*E. coli* fueron reemplazados por PBS y ensayos en los que el segundo anticuerpo fue también reemplazado por PBS. La fetuina bovina (Sigma Chemical Co St Louis MO), que ha sido utilizada como control negativo de acuerdo a lo descrito por Eberhard *et al.*,

(1998) y por Bauer y Spinola, (1999) fue también colocada ($3\mu\text{g}$) sobre membranas de nitrocelulosa y se siguió todo el procedimiento descrito para la fibronectina y laminina.

5.4.2 Ensayo basado en ELISA.

Para determinar la interacción entre la cepa YA21 APEC con fibronectina y laminina también se realizó un ensayo tipo ELISA como describió previamente Bauer y Spinola, (1999). Para lo cual, la fibronectina, laminina y fetuina fueron preparadas (de manera separada) a una concentración de $10\ \mu\text{g}/\text{ml}$ en amortiguador de cubrimiento (0.25M NaCO_3 , $0.25\text{M Na}_2\text{CO}_3$ pH 9.6). A partir de estas soluciones se colocaron $100\ \mu\text{l}/\text{pozo}$ por triplicado de la proteína correspondiente en placas de microtitulación (Coming Co, Cambridge MA). Luego las placas fueron incubadas a 35°C toda la noche y pasado este tiempo los pozos se lavaron tres veces con PBST y se bloquearon los sitios inespecíficos de unión con $100\ \mu\text{l}$ de PBST-SFB por 1 h, finalmente los pozos fueron lavados tres veces con PBS.

Paralelamente la cepa APEC YA21 se creció como se describió en la sección “Cepas bacterianas y condiciones de cultivo” y a partir de una suspensión bacteriana conteniendo $10^8\ \text{ufc}/\text{ml}$ se hicieron diluciones decimales en PBST y de estas se agregaron $100\ \mu\text{l}$ por pozo. Las placas se incubaron a temperatura ambiente y después de 1 h, los pozos se lavaron tres veces con PBS para remover las bacterias no unidas, mientras que las bacterias adherentes se detectaron mediante la adición de $100\ \mu\text{l}$ de una dilución 1:1000 del suero policlonal anti-*E.coli*, pasada 1h los pozos fueron lavados tres veces con PBS y se incubaron con anti-IgG de conejo (Sigma Chemical Co St Louis MO) conjugado con peroxidasa (1:5000).

Finalmente la reacción fue visualizada al agregar el sustrato de la peroxidasa: OPD-SIGMAFAST (Sigma Chemical Co St Louis MO) y la absorbancia (A_{490}) fue medida. Como control de este ensayo la suspensión bacteriana fue reemplazada con PBS. Todos los experimentos se realizaron por triplicado y la unión bacteriana se estableció como el

valor promedio de los pozos probados menos el valor promedio de A_{490} de los pozos control.

5.5 Adhesinas de unión de APEC con laminina y fibronectina

Para examinar qué moléculas bacterianas participan en la adherencia de la fibronectina y laminina se realizó un Far western blot de acuerdo al procedimiento básico descrito por Edmondson y Roth, (2001) utilizando un extracto proteínico de la cepa APEC YA21 y con algunas adecuaciones como a continuación se describe.

5.5.1 Extracto de APEC.

El extracto de APEC YA21 se obtuvo como se describe en la sección “Producción de anticuerpos anti-*E. coli*”, al cual se le agregó 0.02mM de PMSF como inhibidor de proteasas y se midió la concentración de proteínas por el método de Bradford.

5.5.2 PAGE-SDS y Far western blot.

El extracto crudo de la cepa APEC YA21 fue separado por PAGE-SDS utilizando en el gel separador concentración de acrilamida en gradiente del 8-18% y en el gel concentrador una concentración del 4%. Fueron colocados 50 μ g de proteína por carril y el corrimiento electroforético se realizó a 35mA por aproximadamente 90 min utilizando una minicámara (Bio-Rad Laboratorios, USA), posteriormente las proteínas fueron electrotransferidas a membranas de nitrocelulosa utilizando una cámara transblot (Bio-Rad Laboratorios USA) a 25 mA durante toda la noche a 4°C.

Para el procedimiento de Far western blot, las membranas se lavaron tres veces con PBS y se bloquearon con PBST conteniendo 1% de albúmina sérica bovina (PBST-ASB) por 1 h a temperatura ambiente. Luego se incubaron con 50 μ g de laminina o en su caso con 50 μ g fibronectina en PBST-ASB toda la noche a 4°C con agitación suave y pasado este tiempo las membranas se lavaron cinco veces en PBST y se incubaron 1 h con suero de conejo conteniendo anticuerpos policlonales anti-laminina o anti-fibronectina según correspondiera (1:200 en PBST-BSA). Posteriormente las membranas se lavaron tres

veces con PBS y se incubaron por 1 h con anti-IgG de conejo (1:5000) conjugado con peroxidasa (Sigma Chemical Co).

Después de lavar las membranas por tres ocasiones con PBS, la unión fue detectada mediante quimiluminiscencia utilizando el sistema ECL™ (Amersham Pharmacia Biotech, Buckinghamshire England) y exponiendo las membranas a una película (Kodak Co, Rochester, NY) en un cassette con pantalla intensificadora. Los controles negativos consistieron en ensayos sin fibronectina o laminina y ensayos en los cuales los anticuerpos anti-laminina o anti-fibronectina fueron reemplazados por PBS.

5.6 Unión de APEC a explantes traqueales

La adherencia de APEC a explantes traqueales fue realizada por una modificación del ensayo descrito por La Ragione *et al.*, (2000a). Brevemente, pollos de una semana de edad fueron sacrificados por dislocación cervical y fragmentos de traquea de aproximadamente 2 cm de longitud fueron extraídos asépticamente y colocados en solución salina balanceada de Hank (HBSS) (Gibco BRL). El tejido adyacente a las traqueas se removió y estas se lavaron suavemente dos veces con HBSS y se colocaron de manera individual en HBSS estéril fresca contenida en tubos estériles de 15 ml (Corning Costar Co Cambridge MA). Se agregó 1 ml del inóculo bacteriano conteniendo 10^8 ufc/ml y se incubó a 37°C en agitación a 250 rpm por una hora. Luego los fragmentos de la traquea se lavaron seis veces con HBSS para eliminar las bacterias no adherentes y las bacterias adherentes se despegaron del tejido utilizando Triton X 100 al 1% en PBS incubando por 10 min a temperatura ambiente y agitando el tejido. Las bacterias despegadas se cuantificaron por siembra en agar MacConkey. Los ensayos se hicieron por duplicado en tres ocasiones.

5.7 Cultivo de células de epitelio traqueal de pollo.

El cultivo celular se realizó considerando los procedimientos para el cultivo primario de epitelio traqueal murino y de perro descritos por Davidson *et al.*, (2000) y Coleman *et al.*, (1984) respectivamente. Pollos de una semana de edad fueron sacrificados por dislocación cervical y empapados con etanol al 70%, se obtuvieron sus traqueas cortando

a nivel de la bifurcación de los bronquios primarios. El tejido adherente fue eliminado y las traqueas fueron abiertas haciendo un corte longitudinal. Se lavaron con PBS y fueron transferidas a medio de colección el cual consistió en una mezcla 1:1 de medio Eagle modificado por Dulbecco y de medio Ham F-12 (DMEM/F12 Gibco BRL, Life Technologies) conteniendo 100 UI/ml de penicilina y 100µg/ml de estreptomicina.

Las traqueas fueron transferidas en grupos de cinco a tubos conteniendo 20 ml de medio de disociación el cual consistió en DMEM/F12, 100 UI/ml de penicilina, 100µg/ml de estreptomicina, 1.4 mg/ml de pronasa (Roche Diagnostic Co) y 0.1 mg/ml de DNasa (Sigma Chemical Co St Louis MO) y se incubaron a 37°C por 1 h, para posteriormente detener la digestión enzimática agregando 3 ml de suero fetal bovino (SFB). El tubo conteniendo las traqueas fue agitado invirtiendo cuidadosamente unas 12 veces, para disociar las células epiteliales.

Las “cáscaras” de las traqueas se sacaron de la suspensión y se transfirieron a otro tubo conteniendo 10 ml de medio DMEM/F12 100 UI/ml de penicilina, 100 µg/ml de estreptomicina 5% de SFB y 120 UI/ml de insulina (Gibco BRL Life Technologies), que en adelante se referirá como medio de cultivo. El tubo conteniendo las traqueas se agitó nuevamente otras 12 veces para liberar más células epiteliales y lo que quedaba como “cáscara” de traquea fue eliminado.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Las suspensiones celulares resultantes se juntaron y centrifugaron a 120 X g por 5 min a temperatura ambiente, posteriormente el sobrenadante fue eliminado y los botones se resuspendieron y se lavaron en 10 ml de medio de cultivo, esta suspensión se colocó en cajas de cultivo de 60 mm de diámetro (Corning Costar Co Cambridge MA) y fue incubada a 37°C y 5% de CO₂ por 3 h, con el objetivo de eliminar células no epiteliales. Después de la incubación, el medio de cultivo conteniendo las células que no se habían pegaron a la caja fue recolectado y centrifugado a 120 X g por 5 min. El botón resultante conteniendo células epiteliales se resuspendió en medio de cultivo fresco.

Las células epiteliales fueron sembradas sobre cubreobjetos de vidrio de 15 mm de diámetro colocados dentro de placas de 24 pozos (Corning Costar Co Cambridge MA); los cubreobjetos previamente se cubrieron con 25 μ l de una solución de colágeno (Sigma Chemical Co St Louis MO) (0.5 mg/ml de colágeno en agua destilada con 0.2% de ácido acético glacial) y se secaron durante toda la noche a 4°C.

Finalmente las células epiteliales se incubaron a 37°C con 5% de CO₂ y 90% de humedad relativa y se dejaron crecer sumergidas sobre los cubreobjetos cubiertos con colágeno. El cultivo fue mantenido cambiando el medio de cultivo inicialmente a las 24 h y luego cada 2 días, hasta que las células formaron monocapas. Estos cultivos fueron utilizados para los ensayos posteriores.

5.8 Adherencia de APEC a células epiteliales en cultivo

Los ensayos de adherencia a células en cultivo fueron realizados como previamente describió Polotsky *et al.*, (1997), comparando la capacidad unión entre la cepa APEC YA21 y la cepa K12 DH5 α . Las células epiteliales crecidas en monocapa y sobre cubreobjetos como se detalló en la sección anterior, fueron incubadas en DMEM/F12 100 (Gibco BRL Life Technologies) (al que en adelante se referirá como medio de cultivo libre de antibióticos) por 24. Luego se lavaron dos veces en HBSS y se les agregó 1 ml de inóculo bacteriano correspondiente (10⁷ ufc/ml) preparado en medio de cultivo libre de antibióticos. Después de incubar por 1 h a 37°C y 5% de CO₂ las monocapas fueron lavadas cinco veces con PBS para eliminar las bacterias no adherentes y luego se fijaron por 15 min con metanol al 70% y se tiñeron con Giemsa al 10% durante 45 min.

Estas preparaciones se lavaron cinco veces con agua desionizada, se secaron al aire y se montaron en laminillas, las cuales fueron examinadas en microscopio de luz visible (Axiovert 200M, Zeiss). Se calculó el índice de adherencia como sugieren Tarkkanen *et al.*, (1997), contando el promedio de bacterias adheridas a 50 células epiteliales. Los experimentos se hicieron por duplicado un total de tres ocasiones.

5.9 Invasión de APEC a células epiteliales en cultivo

5.9.1 Ensayos de protección con gentamicina.

La internalización bacteriana de APEC a células epiteliales fue medida usando el procedimiento llamado “protección con gentamicina” (Meier *et al.*, 1996). Las células epiteliales de traquea de pollo se sembraron directamente en placas de 24 pozos (10^5 células/pozo) y se incubaron a 37°C , en medio libre de antibióticos durante toda la noche. Las células fueron lavadas con el medio de cultivo libre de antibióticos, luego se agregó el inóculo bacteriano conteniendo 10^7 ufc/ml y se incubó por 3 h a 37°C y 5% de CO_2

Después de este tiempo, las células se lavaron seis veces con HBSS y se les agregó medio de cultivo fresco conteniendo $100\ \mu\text{g/ml}$ de gentamicina (Gibco BRL) con el fin de matar a las bacterias extracelulares. Después de una incubación de 90 min bajo las condiciones antes descritas, las células fueron lavadas en tres ocasiones con HBSS y posteriormente se lisaron agregando Triton X100 al 1% en PBS e incubando por 10 min a temperatura ambiente. Las bacterias intracelulares que fueron así liberadas se cuantificaron mediante la siembra en placas de agar MacConkey que fueron incubadas por 18-24 h a 37°C .

Cada ensayo se realizó por duplicado, en dos ocasiones y los resultados fueron expresados como la capacidad de invasión bacteriana que se calculó como el porcentaje del inóculo de bacterias que sobrevivieron al tratamiento con gentamicina.

5.9.2 Microscopía confocal.

La detección de APEC dentro de células epiteliales de traquea de pollo también fue realizada usando un procedimiento de doble fluorescencia (Tsarfaty *et al.*, 1999; Ketterer *et al.*, 1999). Las células crecidas sobre cubreobjetos fueron infectadas con la cepa APEC YA21 y con la K12 DH5 α como se describió en el punto anterior. Posteriormente las células epiteliales se lavaron seis veces con PBS para remover las bacterias extracelulares y se fijaron con formaldehído al 2% por 10 min a temperatura ambiente seguido de tres lavados con PBS por 5 min cada uno. Las células fijadas se permeabilizaron con Triton X

100 al 0.1% en PBS por 15 min a temperatura ambiente, posteriormente se lavaron con PBS y se bloquearon por 30 min con PBST-SFB.

Las preparaciones se cubrieron con 50 μ l de suero de conejo anti-*E. coli* (1:100 en PBS-SFB) durante 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda, luego se lavaron tres veces con PBS-SFB y se incubaron con anticuerpos anti-IgG de conejo conjugados con FITC (Sigma Chemical Co St Louis MO) (1:500 en PBS-SFB) por 1 h. Después de lavar en tres ocasiones con PBS y se cubrieron con 50 μ l de faloidina conjugada a rodamina (2.5 μ g/ml) (Sigma Chemical Co St Louis MO) para teñir los filamentos de actina y se dejaron incubando 1 h a temperatura ambiente en una cámara húmeda. Las preparaciones se lavaron en tres ocasiones con PBS, se montaron en PBS-glicerol (1:1wt/vol). La interacción de las bacterias con las células epiteliales fue examinada con un microscopio laser confocal (CLSM 5 Pascal Zeiss) equipado con un laser de Ar a 488 nm y uno de HeNe a 543 nm, configurado en un Axiovert 200M.

5.10 Análisis estadístico

Para determinar si existían diferencias significativas entre la cepa APEC YA21 y la cepa de laboratorio *E. coli* K12DH5 α en la adherencia a explantes de traquea y en la adherencia e invasión a células epiteliales en cultivo se utilizó una prueba *t* Student.

RESULTADOS

6.1 Detección de anticuerpos policlonales

6.1.1 Anticuerpos anti-laminina y anti-fibronectina.

La tinción con azul de Commassie del corrimiento electroforético de la fibronectina y laminina permitió verificar la pureza de estas proteínas: en el caso de la laminina se distinguieron las dos bandas características, una de 400 kDa (cadena A) y otra banda correspondiente a las cadenas polipeptídicas B1 y B2 de ~220 y 210 kDa; mientras que para la fibronectina se observó una banda a nivel de los 240 kDa y otra de 220 kDa. En el Western blot las bandas reactivas indicaron la producción de anticuerpos anti-laminina y anti-fibronectina en los conejos inmunizados para tal fin (Fig 1).

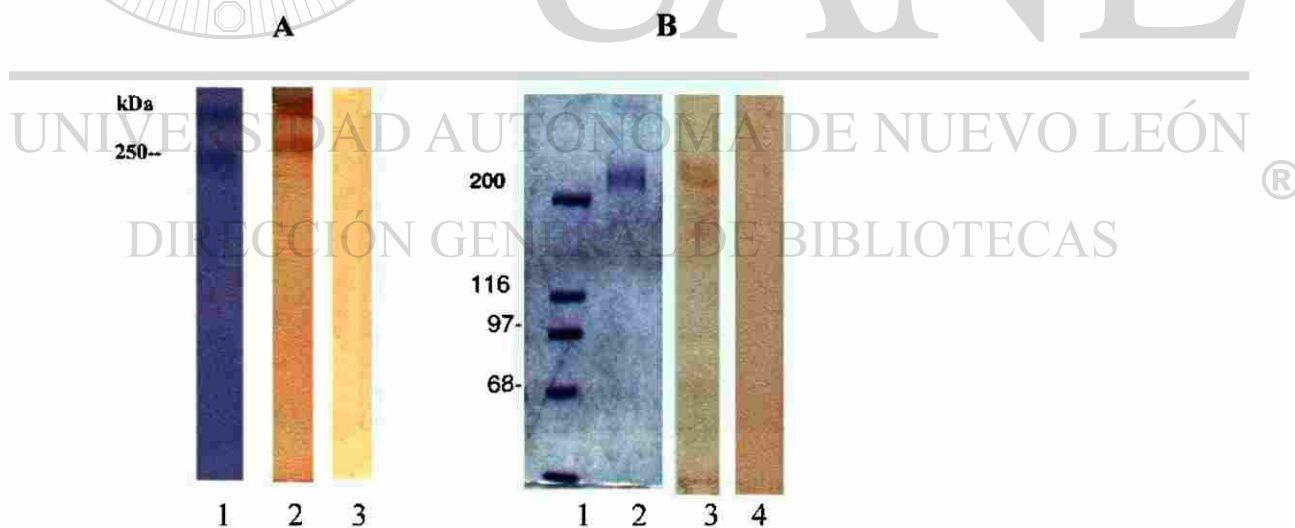


Figura 1. Detección de anticuerpos policlonales anti-laminina y anti-fibronectina.

A) Laminina 1) PAGE SDS al 5%, 2) Western blot con antisuero de conejo dilución 1:200, 3) Western blot con suero preinmune 1:500. B) Fibronectina 1) Estándares de peso molecular, 2) PAGE SDS al 7.5%, 3) Western blot con antisuero de conejo dilución 1:200 4) Western blot con suero preinmune dilución 1:500.

6.1.2 Anticuerpos anti-*E. coli*.

Los anticuerpos anti-*E. coli* fueron detectados por dot blot, observando reactividad con las tres diluciones del antisuero de conejo probadas. Por inmunofluorescencia se detectaron bacterias claramente fluorescentes con la dilución del suero anti-*E. coli* 1:200. Estos anticuerpos fueron luego utilizados en los ensayos de adherencia y de invasión por microscopía confocal (Fig 2 y 3).

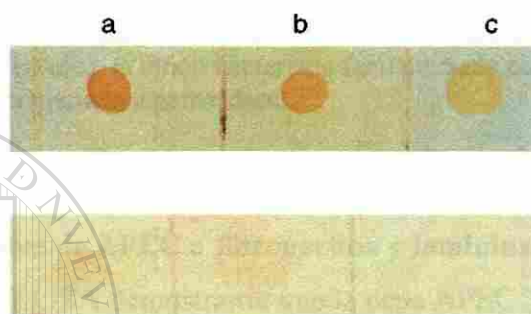


Figura 2. Detección de anticuerpos anti-*E. coli*. Tres μg de un extracto crudo de APEC YA21 fueron fijados en membranas de nitrocelulosa y se incubaron con el suero obtenido del conejo inmunizado (1) y como control el suero preinmune (2) seguido de anti IgG de conejo conjugado a peroxidasa. Diluciones del suero anti-*E. coli* a) 1:200, b) 1:500 y c) 1:1000.



Figura 3. Detección de anticuerpos anti-*E. coli* por inmunofluorescencia. Las bacterias se fijaron con formaldehído al 2%, se bloquearon con PBS-10% de SFB y se incubaron con suero de conejo anti-*E. coli* (1:200) en PBS-SFB por 1 h a temperatura ambiente en cámara húmeda seguido de la incubación con anti IgG de conejo conjugado a FITC (Sigma Chemical Co) (1:500) por 1 h.

6.2 Adherencia de APEC a la fibronectina y laminina

El far dot blot reveló una contundente reactividad en la interacción de la cepa APEC YA21 con la fibronectina y laminina, mientras que la reactividad con la fetuina fue poco apreciable (Fig 4).

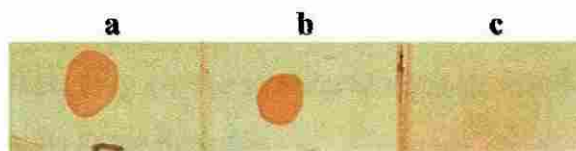


Figura 4. Unión de APEC YA21 a fibronectina y laminina. Tres μg de: a) fibronectina, b) laminina y c) fetuina se colocaron en una membrana de nitrocelulosa y se incubaron con una suspensión de APEC (10^8 ufc), la unión bacteriana fue detectada con un suero anti-*E. coli* seguido de anti:igG de conejo conjugado a peroxidasa.

6.3 Unión cuantitativa de APEC a fibronectina y laminina

Los ensayos tipo ELISA demostraron que la cepa APEC YA21 se une a la laminina y a la fibronectina con un patrón dependiente de la concentración bacteriana, la fetuina mostró menor grado de unión (Fig 5).

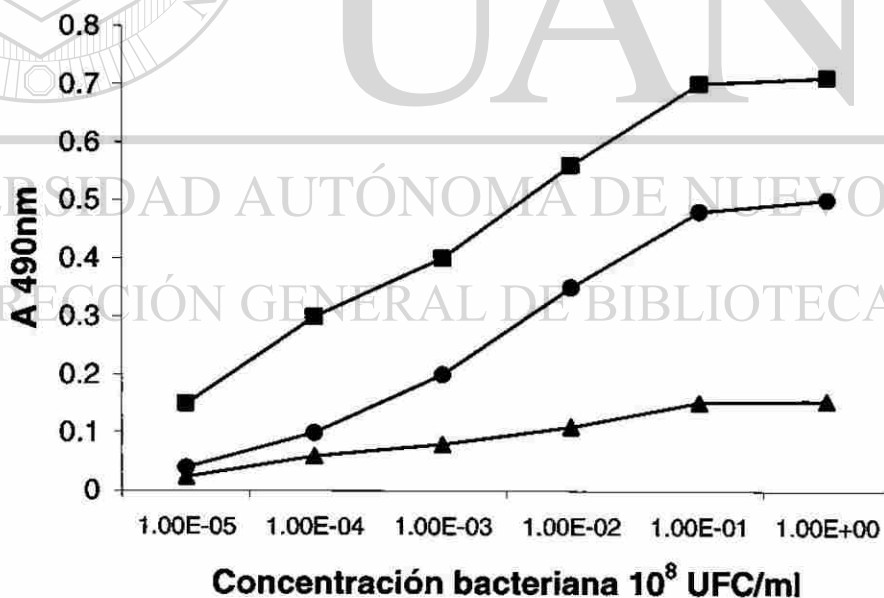


Figura 5. Adherencia de APEC YA21 a laminina fibronectina y fetuina. Diluciones decimales de una suspensión bacteriana conteniendo 10^8 ufc/ml se agregaron a pozos precubiertos con fibronectina(●), laminina(■) y fetuina (▲) ($1\mu\text{g}$ /pozo). La unión fue detectada con un suero anti-*E. coli* seguido de anti-IgG de conejo-peroxidasa.

6.4 Adhesinas de APEC que median unión a fibronectina y laminina

Cuando el gel del corrimiento electroforético del extracto de APEC YA21 fue teñido con azul de Coomassie, se observó un bandeo complejo. En el ensayo de Far western blot para el caso de la interacción bacteriana con laminina se detectó una banda inmunoreactiva de ~30 kDa, mientras que en el caso de la interacción con la fibronectina fue una banda de ~130 kDa (Fig. 6). No se observó señal de reactividad cuando se omitió a la fibronectina o laminina como ligandos.

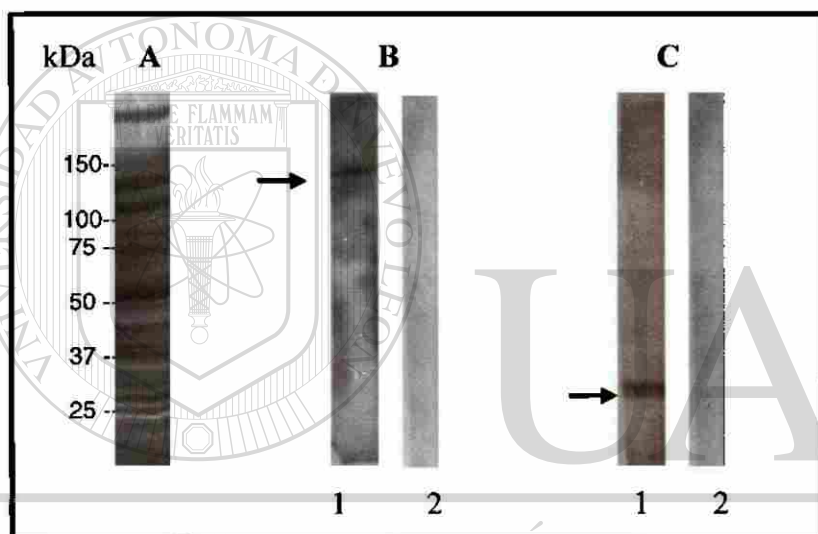


Figura 6. Unión de APEC a fibronectina y laminina por Far western blot. A) Extracto de proteínas APEC YA21 teñidas con azul de Coomassie. Los extractos proteínicos de APEC fueron transferidos a nitrocelulosa e incubados con (B1) y sin (B2) fibronectina así como con (C1) y sin (C2) laminina (50µg/ml). Los números de la izquierda indican la masa molecular de proteínas estándar y las flechas las bandas de ~130 kDa y de ~30 kDa inmunoreactivas en la interacción de APEC con fibronectina y laminina respectivamente.

6.5 Adherencia bacteriana a explantes de tejido traqueal

Como un primer punto en este estudio se realizó un ensayo de adherencia bacteriana a explantes de tejido traqueal para conocer si la cepa APEC utilizada tenía la capacidad para unirse a este tejido del tracto respiratorio de aves.

No se detectó crecimiento bacteriano en la traquea antes de la incubación con las cepas bacterianas APEC YA21 o K12 DH5 α , lo cual se verificó por siembra en agar MacConkey. Los resultados de adherencia al este tejido mostraron que hubo una diferencia significativa en la capacidad de unión de la cepa YA21 APEC en comparación con la cepa control *E. coli* K12 DH5 α (Tabla 1).

Tabla 1.

Adherencia de cepas de *E. coli* a explantes de traquea de pollo y a células epiteliales en cultivo

Cepa	◆ Explantes de traquea	Células epiteliales en cultivo (Índice de adherencia/50 células)
APEC YA21	*(6.8 \pm 1.3)X10 ⁶	*230 \pm 44
DH5 α	(2.1 \pm 1)X10 ²	31 \pm 9

◆ Promedio las bacterias obtenidas después despegarlas del tejido con Triton X100 al 1%

* Diferencia significativa con referencia a la cepa de *E. coli*, no patogénica DH5 α (p<0.05)

6.6 Establecimiento del cultivo celular primario

Se establecieron los cultivos primarios de epitelio traqueal de pollo sobre cubreobjetos tratados con colágeno. Se pudieron observar células ciliadas y no ciliadas en la población de células epiteliales disociadas, además se detectó movimiento de los cilios después de disociar las células epiteliales del tejido.

Células con morfología de fibroblastos se adhirieron a la caja de cultivo en 2 - 3 h de iniciado el cultivo. Las células epiteliales recolectadas del medio de cultivo en este lapso de tiempo, y que se transfirieron a otra caja de cultivo, pudieron proliferar de modo que

los cultivos celulares se extendieron en una forma radiada a partir de pequeñas colonias, como pudo observarse a partir del día 3 de iniciado el cultivo (Fig 7).

A)



B)

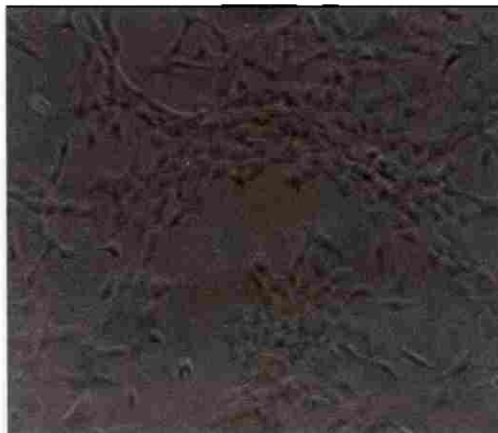


Figura 7. Cultivo primario de células de epitelio de traquea de pollo observado en microscopio de contraste de fases. Las células fueron crecidas sobre cubreobjetos tratados con colágeno, A) Fibroblastos que se adhieren al frasco de cultivo en 2-3 h después de iniciado el cultivo, B) Células epiteliales proliferando en un cultivo de 3 días (400X).

6.7 Adherencia bacteriana en células epiteliales en cultivo

En estos ensayos se observó que las cepas de *E. coli* se unen a las células epiteliales de traquea de pollo mostrando un patrón denominado agregativo, el cual se caracteriza por el pegado de las bacterias formando pequeños agrupamientos sobre las células o entre las células, según lo descrito previamente en cepas de *E. coli* intestinales en humanos (Fig 8). La cepa APEC YA21 mostró alta capacidad de adherencia en las células epiteliales en comparación con la cepa de *E. coli* K12 DH5 α ($p < 0.05$) (Tabla 1).

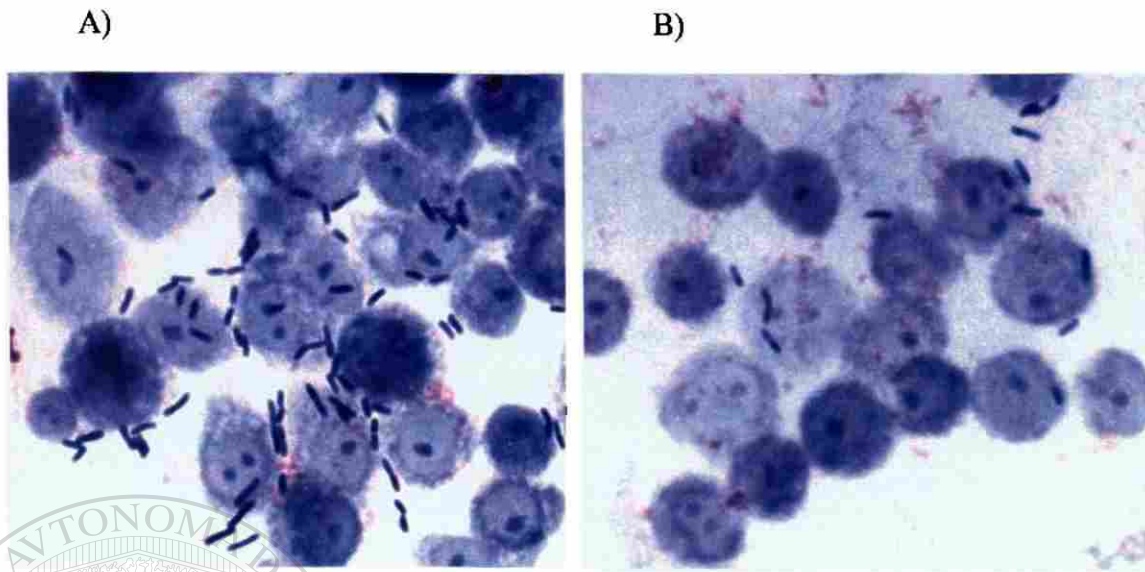


Figura 8. Adherencia bacteriana a células epiteliales en cultivo. Fotografía de células epiteliales de traquea de pollo infectadas con la cepa APEC YA21 (A) y *E. coli* K12 DH5 α (B). La adherencia bacteriana mostró un patrón agregativo (400X).

6.8 Invasión bacteriana a células epiteliales en cultivo

Para determinar la habilidad de invasión de APEC en células epiteliales obtenidas de la traquea, se realizó el ensayo de protección con gentamicina que se basa en el hecho de que este antibiótico elimina solo las bacterias extracelulares y no las intracelulares ya que no atraviesan la membrana celular. En estos ensayos se determinó que la cepa APEC YA21 tuvo una eficiencia de invasión del 0.3%, mientras que en los ensayos con la cepa *E. coli* K12 DH5 α no se detectaron bacterias intracelulares, después de lisar las células epiteliales (Tabla 2).

Tabla 2

Internalización bacteriana a células de epitelio traqueal en cultivo

Cepa	No. de bacteria intracelulares*/ 10 ⁵ células
APEC YA21	*3x10 ⁴
K12 DH5α	ND

* Promedio de bacterias liberadas después lisar las células epiteliales con Triton X-100.

ND: No detectada

*Diferencia significativa con referencia a la cepa de *E. coli*. K12 DH5α (p<0.05)

Los análisis por microscopía confocal demostraron que la cepa APEC YA21 se unió a la superficie de las células en cultivo y que puede internalizarse en estas. La figura 9 muestra una galería de secciones ópticas de aproximadamente 0.5 μm colectadas en el eje x-y de las preparaciones de células epiteliales infectadas con la cepa APEC YA21. La figura 10 es la serie compilada de las secciones ópticas de la misma imagen y en la que puede observarse bacterias dentro de las células. La figura 11 sugiere que existe una co-localización de la bacteria con los filamentos de actina, lo cual es indicado por el cambio del color de la bacteria endocitada de verde a naranja. Mientras que en la figura 12 se observa que la cepa DH5α no se internalizó en las células epiteliales mantenidas en cultivo.

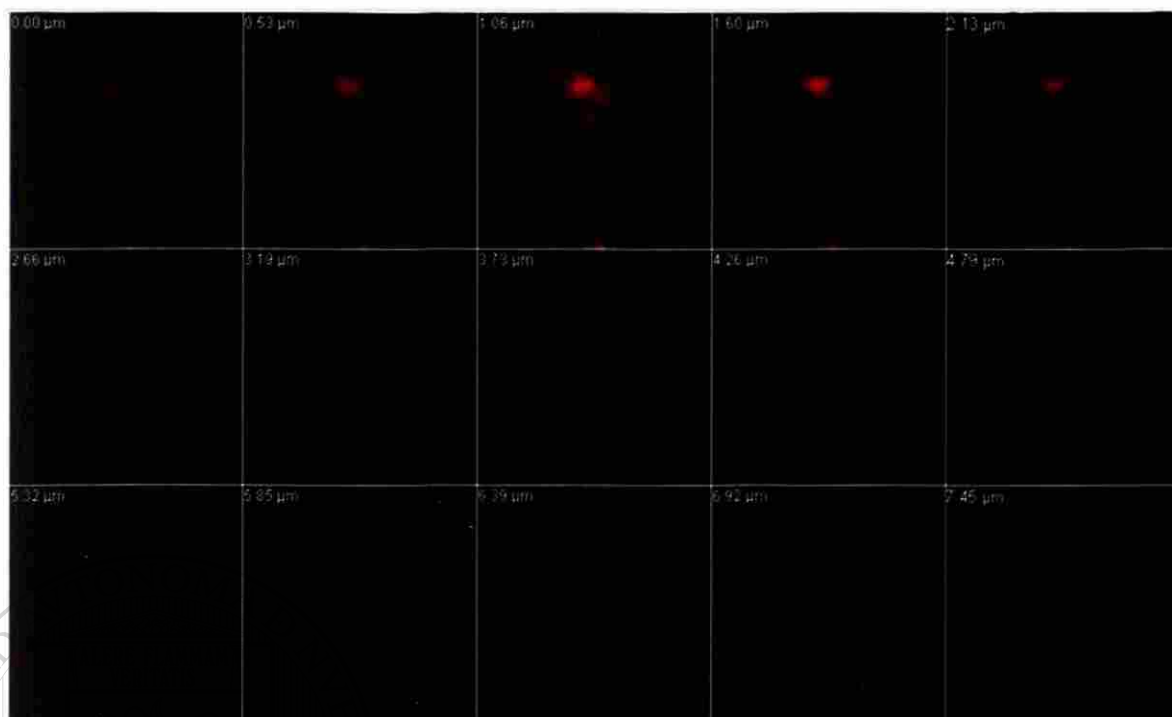


Figura 9. Secciones ópticas de la interacción de APEC YA21 con células epiteliales por Microscopia confocal. Las bacterias y células epiteliales de traquea de pollo se incubaron por 3 h, luego las bacterias se marcaron con anticuerpos anti-*E. coli* seguido de anti-IgG de conejo-FITC y las células con faloidina-TRITC. Se observan 15 diferentes planos focales de aproximadamente 0.5µm cada uno para las dos tinciones simultáneamente (400X).

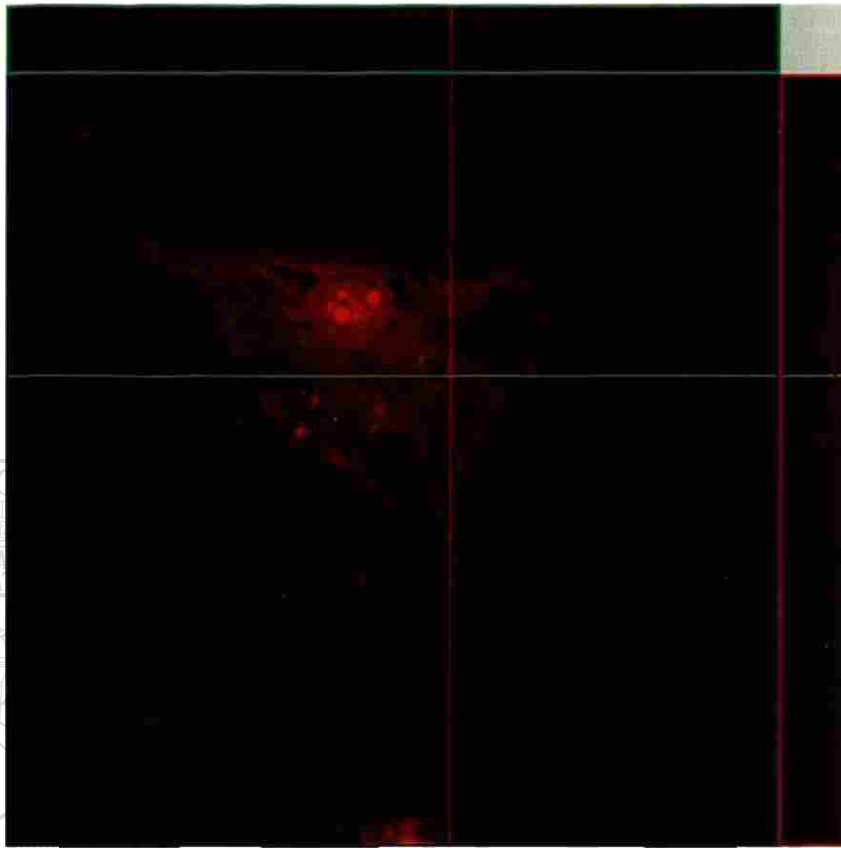


Figura 10. Invasión de APEC YA21 a células epiteliales en cultivo. Imagen del análisis por de la interacción bacteriana con células epiteliales mostrando una compilación de las 15 secciones ópticas observadas en la figura 9. Se observan bacterias adheridas a las células epiteliales y el análisis por microscopio confocal permite observar en las secciones horizontal y vertical la localización de una bacteria dentro de la célula epitelial. ®

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

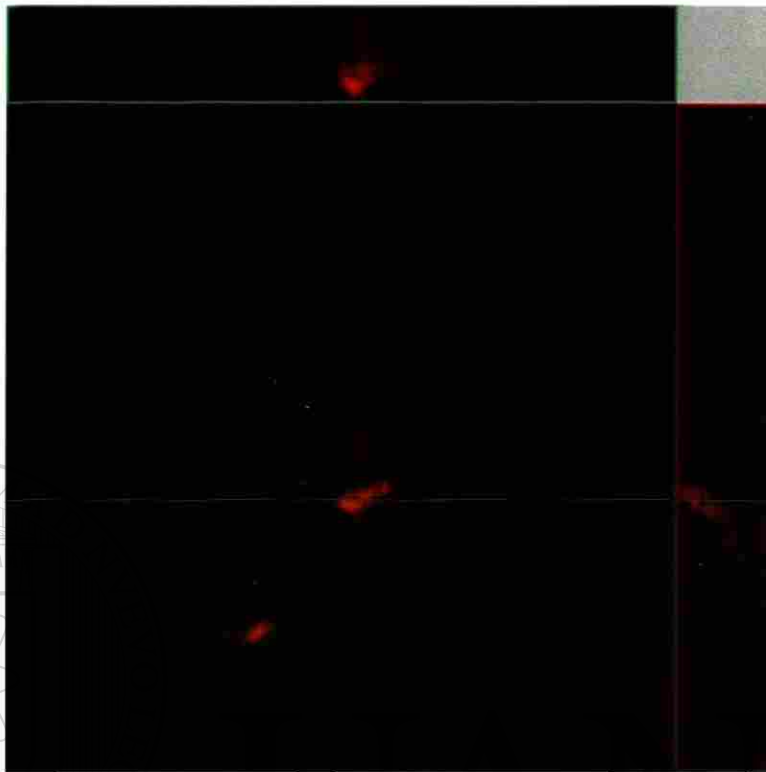


Figura 11. Interacción de APEC YA21 con células epiteliales. Imagen colectada por microscopía confocal de células de epitelio traqueal de pollo infectadas durante 3 h con la cepa APEC YA21. Una serie de 10 secciones ópticas de $0.5\mu\text{m}$ colectadas en el eje x - y fueron compiladas para producir esta imagen. La co-localización de la marca verde de las bacterias y la marca roja de las células puede ser observada en las bacterias teñidas por un color naranja, lo cual sugiere una asociación entre los filamentos de actina con la bacteria.

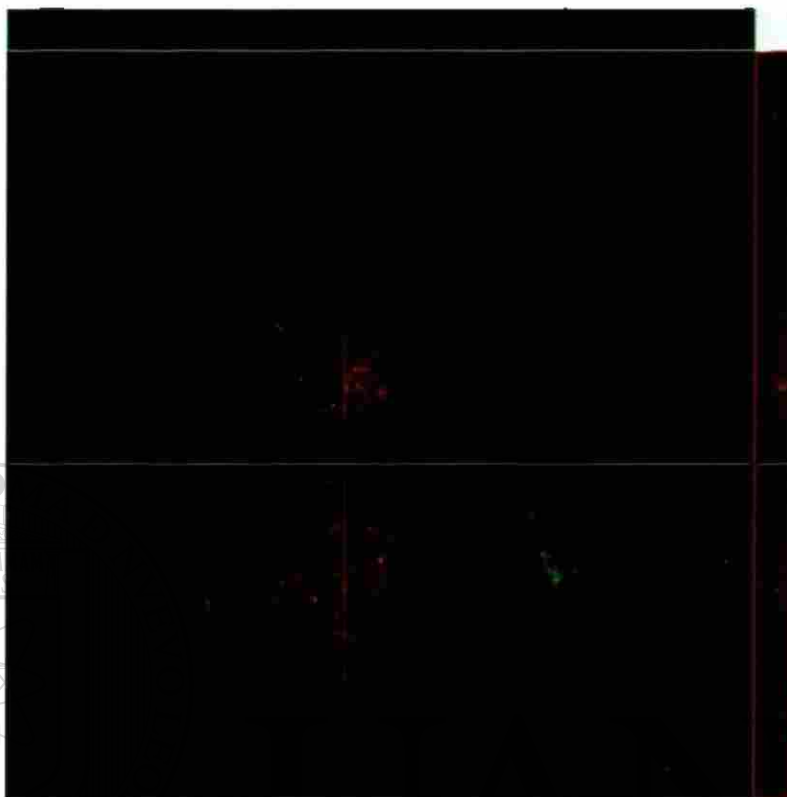


Figura 12.- Interacción de *E. coli* K12 DH5 α con células epiteliales por microscopía confocal. Imagen colectada de células de epitelio traqueal de pollo infectadas por 3 h con la cepa *E. coli* K12 DH5 α , marcadas como se describe en material y métodos. Una serie de secciones ópticas de 0.5 μ m colectadas en el eje *x-y* fueron compiladas para producir la imagen. No se observa co-localización de la marca verde de las bacterias con la marca roja de las células.

DISCUSION

Los resultados de este trabajo mostraron que la cepa APEC YA21 puede unirse *in Vitro* a laminina inmovilizada y asumiendo el hecho de que esta es una glicoproteína componente importante de las membranas basales que delimitan a los epitelios, pudiera ser considerado como un evento importante para la colonización de tejidos del huésped en sitios donde la laminina, estuviera expuesta por daños a los tejidos del tracto respiratorio de aves afectadas por la colisepticemia. Esto ocurre habitualmente como una consecuencia de infecciones primarias causadas por virus o micoplasmas. Sin embargo, para tener datos más precisos del papel de esta interacción en la patogenicidad de las cepas APEC y en el desarrollo de la septicemia aviar, es necesario realizar más estudios al respecto.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Por otra parte, la unión bacteriana a la fibronectina ha mostrado ser uno de los mecanismos usados por algunos patógenos que tiene como resultado promover la internalización de la bacteria en células epiteliales, debido a que las bacterias pueden unirse a las integrinas localizadas sobre la superficie de las células epiteliales y esto puede servir como un puente entre las bacterias y la célula (Lindmark y Guss, 1999). La fibronectina tiene sitios específicos para la unión del colágeno, para integrinas y para la heparina, y se ha reportado que algunas bacterias se pegan de manera específica a alguno de estos dominios estructurales; la mayoría de los patógenos tienen como blanco de unión el dominio N-terminal de esta molécula (Oehmcke *et al.*, 2004).

De acuerdo a los resultados de este trabajo se determinó la unión de APEC a la fibronectina, ahora será importante establecer la relevancia de esta unión, en eventos como la adherencia e invasión de APEC a la célula epitelial ya que como se observó en este mismo estudio, la cepa APEC YA21 mostró tener la habilidad tanto para unirse en la célula y para internalizarse en esta; por otra parte será importante precisar el sitio de unión bacteriano a los dominios estructurales de la fibronectina.

Un número de adhesinas expresadas por enterobacterias, principalmente de tipo fimbrial interactúan específicamente con alguna proteína de la MEC, así la fimbria Dr de *E. coli* uropatogénica se une al fragmento amino-terminal 7S del colágeno tipo IV y la fimbria tipo 3 de varias especies de enterobacterias se une al colágeno tipo V (Sebghati *et al.*, 1998). Además, la fimbria S de cepas de *E. coli* que causa meningitis en humanos median la unión a la laminina (Virkola *et al.*, 1993), mientras que una proteína de superficie de *E. coli* enteroinvasiva denominada Lamb-like ha sido identificada como unidora de laminina (Valkonenn, 1991). La fimbria tipo 1 de algunas especies de *Salmonella* participa en la unión bacteriana con laminina, y cepas de *E. coli* enterotoxigénica en becerros, se unen a fibronectina, aunque en este último caso se desconoce la adhesina responsable de la interacción (Visai *et al.*, 1991).

De manera que las cepas de *E. coli* se adhieren con la MEC por una variedad de mecanismos que pueden ser relevantes en diferentes situaciones clínicas. Además, otras estructuras de superficie pueden mediar la unión a la MEC incluyendo al LPS, y a Omps como ocurre en la adherencia de *Helicobacter pylori* a la laminina (Dubreuil *et al.*, 2002), o en el caso de *C. jejuni* en el que las Omps median la unión a la fibronectina (Konkel *et al.*, 1997; Monteville *et al.*, 2003).

En particular, las cepas APEC sintetizan diferentes adhesinas y como consecuencia pueden unirse con un repertorio de ligandos, lo que puede conferirles un alto grado de adaptabilidad en su interacción con el huésped (La Ragione y Woodward, 2002). Con el objetivo de identificar las adhesinas que median la unión de APEC a la fibronectina y laminina, se examinó la interacción de proteínas bacterianas obtenidas por una extracción

con detergente a partir de la cepa APEC YA21 y en el caso de la interacción bacteriana con laminina se detectó una banda de 30 kDa, mientras que para la interacción APEC con fibronectina fue una banda inmunoreactiva de 130 kDa.

En investigaciones previas, se ha atribuido la unión de las cepas APEC con la fibronectina y laminina a la fimbria curli, ésta estructura de superficie bacteriana fue descrita por primera vez en un aislamiento de *E. coli* asociado con mastitis bovina, y se caracteriza por ser un apéndice de superficie delgado que causa agregación entre las bacterias (Hammar *et al.*, 1996). Varios estudios han sugerido que curli puede contribuir a la colonización inicial en la colisepticemia aviar, sin embargo, el papel de curli en la patogénesis de la enfermedad no está completamente dilucidado (Gophna *et al.*, 2001). Adicionalmente, otra proteína ha sido involucrada en la adhesión de cepas APEC con componentes de la MEC, el autotransportador Tsh. Así, Kostakioti *et al.*, (2004) reportaron que el dominio secretorio de esta molécula denominado Tsh_s fue capaz de adherirse *in vitro* a la fibronectina y al colágeno tipo IV aunque no a laminina, cuando se analizó esta unión por medio de ensayos tipo ELISA utilizando en estas pruebas las proteínas contenidas en el sobrenadante de un cultivo de una cepa APEC que expresó Tsh.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

Los resultados en el presente estudio indican que probablemente otras moléculas adicionales a curli cuya masa molecular es de 15-17kDa y a Tsh_s de 106 kDa podrían mediar la unión de APEC a la fibronectina y a laminina. La detección de dos bandas inmuno-reactivas en los ensayos de Far western blot, una la interacción de la cepa APEC YA21 con laminina y otra en la interacción con la fibronectina podría representar el hecho de que estos dos componentes de la MEC son reconocidos por adhesinas ligando-específicas. Indudablemente que la purificación y caracterización de estas adhesinas potenciales, permitirán un mejor entendimiento del mecanismo de adherencia a la fibronectina y laminina por las cepas APEC. Además, las implicaciones de la interacción de APEC con laminina y fibronectina en la patogénesis de la colisepticemia aviar *in vivo* deberán ser investigados.

Otro aspecto importante de la septicemia aviar es su naturaleza sistémica y el hecho de que no se tiene totalmente claro como la bacteria alcanza la corriente sanguínea para luego afectar a órganos vitales y causar la muerte en las aves. El cuestionamiento acerca de si las cepas APEC invaden a células epiteliales de vías áreas ha sido motivo de estudio, y para tratar de contribuir en el conocimiento sobre este aspecto, en este trabajo se estableció un cultivo primario de células de epitelio traqueal para en estas analizar *in vitro* la capacidad de adherencia e invasión de la cepa APEC YA21.

Inicialmente se hizo una prueba de adhesión a explantes de traquea de pollo, para definir la capacidad de la cepa APEC YA21 para unirse a este tejido y los resultados indicaron que las cepas patogénicas se unen de manera significativa a los explantes en comparación con la cepa de laboratorio K12 DH5 α , considerándose esta habilidad de unión como una característica importante del proceso infeccioso en la septicemia aviar (Dho Moulin y Lafont, 1982; Yerushalmi *et al.*, 1990). Este hallazgo fue acorde con los resultados que indicaron que esta cepa APEC se adhirió también de manera significativa a células epiteliales de traquea de pollo mantenidas en cultivo cuando se comparó con la cepa control.

Estudios previos han demostrado que APEC puede adherirse e invadir líneas celulares de origen humano mantenidas en cultivo y algunos factores implicados en la adherencia bacteriana han sido identificados. Así, Silveira *et al.*, (2002) reportaron que cepas APEC aisladas de pollos con septicemia aviar se adhirieron *in vitro* a células HeLa, HEP-2 y a células de riñón obtenidas de embrión de pollo, y sugirieron que la F1 y otras fimbrias participaron en este evento. Por otra parte, La Ragione *et al.*, (2000) reportaron que APEC se adhiere a células HEP-2 a través de la fimbria F1 y de manera similar Stehling *et al.*, (2003) demostraron la habilidad de una cepa APEC para unirse a células HEP-2.

La septicemia aviar es iniciada vía el tracto respiratorio, en contraste con la mayoría de las enfermedades causadas por *E. coli* en humanos y en otras especies animales y considerando que el tropismo innato de APEC por el tejido respiratorio puede relacionarse con la presencia de receptores específicos para las adhesinas bacterianas, uno

de los objetivos de este trabajo fue establecer un cultivo de células epiteliales de traquea de pollo para analizar la adherencia e invasión por APEC.

De acuerdo a los resultados la cepa APEC YA21 se adhirió a las células epiteliales de traquea mostrando un patrón de unión denominado agregativo, según la clasificación de tipos de unión descrita en cepas de *E. coli* en humanos. Otros autores han observado que APEC se une a líneas celulares en cultivo con este mismo patrón y en otros casos se ha visto el patrón llamado difuso (La Ragione *et al.*, 2000a; Silveira *et al.*, 2002; Stehling *et al.*, 2003). La clasificación de tipos morfológicos de adherencia es importante dado que en cepas de *E. coli* de humanos se ha establecido una correlación de éstos con el proceso patogénico y con la virulencia (Polotsky *et al.*, 1997); de manera que esta observación podrían ser considerada en estudios tendientes establecer este tipo de correlación o para determinar que adhesina media la unión de APEC a células epiteliales de origen aviar.

Los análisis cuantitativos de invasión en este trabajo indican que la cepa YA21 APEC entra a las células epiteliales de pollo con una eficiencia de 0.3%. Estudios reportados previamente por La Ragione *et al.*, (2000) mostraron que cepas APEC invadieron células HEp 2 y células HT2916E con eficiencias de 0.1 y 0.01% respectivamente. Por su parte Germon, *et al.*, (2005) investigaron la capacidad de las cepas APEC para invadir células endoteliales de la microvasculatura de cerebro humano (HBMEC) y encontraron una alta eficiencia de invasión de 2.5%.

De acuerdo al trabajo de Germon, *et al.*, (2005) se sugiere que el gene *ibeA* participa en la invasión de cepas APEC a células HBMEC. Mientras que Gophna *et al.*, (2001) demostraron que niveles altos de la expresión de la fimbria curli pueden mediar la entrada de APEC a células HeLa en un rango de 0.19 a 0.34%; aunque también se ha propuesto que la fimbria curli no es el único factor de virulencia de APEC involucrado en el proceso de internalización. Considerando estos antecedentes será importante dilucidar que factores median la invasión de cepas APEC a células epiteliales de traquea de pollo y precisar su papel en la patogenicidad y en la virulencia.

Las condiciones de cultivo bacteriano pueden influir en el evento de invasión bacteriana *in vitro* teniendo como consecuencia un efecto en los niveles de invasividad para una cepa bacteriana dada y una línea celular en particular. Esto puede explicar las diferencias en la magnitud de la invasión por cepas APEC reportada en publicaciones previas y los resultados del presente trabajo.

Stehling, *et al.*, (2003) reportaron que una cepa APEC aislada de un caso clínico del síndrome de la cabeza hinchada (enfermedad no sistémica), se adhiere pero no invade células HEP-2, lo cual podría reflejar una asociación entre el evento de invasión y el tipo de infección causado por las cepas APEC. Adicionalmente Germon *et al.*, (2005) demostraron una reducción significativa en la virulencia en pollos cuando se inactivó el gene *ibeA* asociado con la invasión. Acorde con esta información cabe señalar que la cepa APEC YA21 utilizada en este estudio ha mostrado tener alto grado de virulencia en un modelo aviar ($DL_{50} 6 \times 10^7$) (Almanza, 1992) y podría ser utilizada para analizar el papel de la invasión en la virulencia.

Para establecer evidencias de la entrada de la cepa APEC YA21 a las células epiteliales de pollo, se realizaron análisis de microscopía confocal, los resultados demostraron que las bacterias están localizadas dentro de las células.

En términos generales la invasión bacteriana es iniciada por una interacción ligando-receptor que activa las señalizaciones de la célula huésped y los microorganismos patogénicos pueden utilizar dos diferentes mecanismos para invadir a la célula huésped: el tipo disparo o tipo cremallera. En infecciones extraintestinales por *E. coli* asociadas con tracto urinario en humanos se ha demostrado que la bacteria invade células epiteliales a través de un mecanismo parecido al de cremallera y esto se asocia a la patogénesis de la enfermedad (Kansu *et al.*, 2004). Seguramente estudios futuros se enfocarán en conocer los mecanismos de invasión celular por APEC y a determinar su papel en la fisiopatología de la enfermedad.

Los cultivos primarios de células de epitelio aéreo de aves pueden ser utilizados como un modelo de estudio de las interacciones bacteria-célula. Los resultados reportados en el presente trabajo fortalecen los hallazgos sobre estudios de la invasión de APEC a células epiteliales, sin embargo, esto no es suficiente para explicar como las cepas APEC que penetran en el huésped a través de tracto respiratorio pueden causar septicemia. Futuros estudios deberán dilucidar el papel preciso de la invasión bacteriana en la patogenicidad de APEC.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

CONCLUSIONES

1. La cepa APEC YA21 se unió *in vitro* a la fibronectina y lamina inmobilizadas y esta unión es dependiente de la concentración bacteriana.
2. Una adhesina potencial de la cepa APEC YA21 de ~130kDa medió *in vitro* la interacción bacteriana con la fibronectina y otra de ~30kDa medió la unión con laminina

3. La cepa APEC YA21 se adhirió a células epiteliales en cultivo obtenidas a partir de traquea de pollo y tuvo la habilidad de invadir este tipo celular.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

LITERATURA CITADA

Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. 2002. *Molecular Biology of the Cell*. Garland Science: New York pp. 1090-1112.

Almanza, Y. 1992. Influencia del plásmido ColV en la fagocitosis *in vitro* de *Escherichia coli*. Tesis (M en C) UNAM.

Almeida RA, Luther DA, Kumar SJ, Calvino LF, Bronze MS. 1996. Adherence of *Streptococcus uberis* to bovine mammary epithelial cells and extracellular matrix proteins. *Journal Veterinary Microbiology* 43:385-392.

Amosko K, Prysliak T, Potter A, Collinsun K, Kay W, and Allan B. 2004. Attenuation of an avian pathogenic *Escherichia coli* strain due to a mutation in the *rpsL* gene. *Avian Disease* 48:19-25.

Bauer ME, Spinola SM. 1999. Binding of *Haemophilus ducreyi* to extracellular matrix proteins. *Infection and Immunity* 6:2649-2653.

Blanco M, Blanco JE, Mora A, Blanco J. 1996. *Escherichia coli* septicémicos aviares: serotipos, factores de virulencia, resistencia antibióticos y desarrollo de vacunas. *Medicina Veterinaria* 13:525-535.

Blanco JE, Blanco M, Mora A, Blanco J. 1997. Prevalence of bacterial resistance to quinolones and other antimicrobials among avian *Escherichia coli* strains isolated from septicemic and healthy chickens in Spain. *Journal Clinical Microbiology* 35:2184-2185.

Blanco JE, Blanco M, Mora A, Casen WH, García V, Vázquez ML, Blanco J. 1998. Serotypes of *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens in Galicia (Northwest Spain). *Veterinary Microbiology* 61:229-235.

Cameron CE. 2003. Identification of a *Treponema pallidum* laminin-binding protein. *Infection and Immunity* 71:2525-2533.

Chaussee MS, Cole RL, van Putten M. 2000. Streptococcal erythrogenic toxin B abrogates fibronectin-dependent internalization of *Streptococcus pyogenes* by cultured mammalian cells. *Infection and Immunity* 68:3226-3232.

Coleman DL, Tuet IK, Widdicombe JH. 1984. Electrical properties of dog tracheal epithelial cells grown in monolayer culture. *American Journal of Physiology* 246:C355-C359.

Cossart P, Lecuit M. 2000. Microbial pathogens; an overview. In: *Cellular Microbiology*. Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. (eds) ASM Press: Washington DC pp. 1-10.

Davidson DJ, Kilanowski FM, Randell SH, Sheppard DN, Dorin JR. 2000. A primary culture model of differentiated murine tracheal epithelium. *American Journal of Physiology Lung* 276: L766-L778.

Dho-Moulin M, Lafont JP. 1982. *Escherichia coli* colonization of the trachea in poultry: comparison of virulent and avirulent strains in gnotoxenic chickens. *Avian Disease* 26:787-797.

Dho-Moulin M, Fairbrother JM. 1999. Avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC). *Veterinary Research* 30:299-316.

DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

Dozois CM, Fairbrother JM, Harel JB. 1992. *pap* and *pil*-related DNA sequences and other virulence determinants associated with *Escherichia coli* isolated from septicemic chickens and turkeys. *Infection and Immunity* 60:2648-2656.

Dozois CM, Chanteloup N, Dho-Moulin M, Desautels C, Fairbrother J. 1994. Bacterial colonization and in vivo expression of F1 (Type 1) fimbrial antigens in chickens experimentally infected with pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Disease* 38:231-239.

Dozois CM, Dho-Moulin M, Brée A, Fairbrother JM, Desautels C. 2000. Relationship between the Tsh autotransporter and pathogenicity of avian *Escherichia coli* and localization and analysis of the *tsh* genetic region. *Infection and Immunity* 68:4145-4154.

Dubreuil JD, Del Giudice G., Rappuoli R. 2002. *Helicobacter pylori* interactions with host serum and extracellular matrix proteins: potential role in the infectious process. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 66:617-629.

Eberhard T, Virkola R, Korhonen T, Kronvall G, Ullberg M. 1998. Binding to human extracellular matrix by *Neisseria meningitidis*. *Infection and Immunity* 66:1791-1794.

Edmondson DG, Roth SY. 2001. Identification of proteins interaction by Far Western Analysis. *Current Protocols in Molecular Biology* 20.6.1-20.6.10.

Edwards J, Shao J, Ault K, Apicella M. 2000. *Neisseria gonorrhoeae* elicits membrana ruffling and cytoskeletal rearrangements upon infection of primary human endocervical and ectocervical cells. *Infection and Immunity* 68:5354-5363.

Fujiwara H, Kikkawa Y, Sanzen N, and Sekiguchi K. 2001. Purification and characterization of human laminin-8. *The Journal of Biological Chemistry* 276:17550-17558.

Fink DL, Green B, Geme III JW. 2002. The *Haemophilus influenzae* Hap autotransporter binds to fibronectin, laminin and collagen IV. *Infection and Immunity* 70:4902-4907.

Finlay B, Cossart P. 1997. Exploitation of mammalian host cell functions by bacterial pathogens. *Science* 276:718-725.

Flügel A, Schulze-Koops Heesemann J, Kühn K, Sorotin L, Burkhardt H, von der Mark K, Emmrich F. 1994. Interaction of enteropathogenic *Yersinia enterocolitica* with complex basement membranes and the extracellular matrix proteins, collagen type IV, laminin-1 and -2, and nidogen/entactin. *The Journal of Biological Chemistry* 269:29732-29738.

Germon P, Chen Y, He L, Blanco JE, Brée A, Shouler C, Huang S, Moulin-Shouler M. 2005. *ibeA*, a virulence factor of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 151:1179-1186.

Ginns C, Benham ML, Adams LM, Whitehear KG, Bettelheim KA, Crabb BS, Browning GF. 2000. Colonization of the respiratory tract by a virulent strain of avian *Escherichia coli* requires carriage of a conjugative plasmid. *Infection and Immunity* 68:1535-1541.

Gophna U, Barley M, Seiffers R, Oelschlager TA, Hacker J, Ron EZ. 2001. Curli fibres mediate internalization of *Escherichia coli* by eukaryotic cells *Infection and Immunity* 69:2659-2665.

Gross WB. 1991. Colibacillosis. In: *Diseases of Poultry*. Calnek BW, Barnes HJ, Beard CW (eds). Iowa State University Press. Ames Iowa. pp. 138-144.

Hammar M, Zhao B, Sattar N. 1996. Nucleator-dependent intercellular assembly of adhesive curli organelles in *Escherichia coli*. *Proceedings National Academic Science USA*. 93:6562-6566

Harvey HA, Ketteter MB, Preston A, Lubaroff D, Williams R, Apicella MA. 1997. Ultrastructural analysis of primary human urethral epithelial cell cultures infected with *Neisseria gonorrhoeae*. *Infection and Immunity* 65:2420-2427.

Heyer G, Saba S, Adamon R, Rush W, Soong G, Cheung A, Prince A. 2002. *Staphylococcus aureus agr* and *sarA* functions are required for invasive infection but not inflammatory responses in the lung. *Infection and Immunity* 70:127-133.

Hirsh DC. 2004. Enterobacteriaceae. In: *Veterinary Microbiology*. Hirsh DC, MacLanchlan NJ, Walker RL (eds). Blackwell Publishing. Iowa, USA pp. 61-68.

Huang S, Chen Y, Fu Q, Stins M, Wang Y, Wass C, Kim K. 1999. Identification and characterization of an *Escherichia coli* invasion gene locus, *ibeB*, required for penetration of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity* 67:2103-2109

Hultren SJ, Abraham S, Caparon M, Falk P, St Geme III J, Normark S. 1993. Pilus and nopilus bacterial adhesins: assembly and function in cell recognition. *Cell*. 73:887-901.

Ireton K, Cossart P. 1998. Interaction of invasive bacteria with host signaling pathways. *Current Opinion Cell Biology* 10:276-283.

Kansau I, Berger C, Hospital M, Amsellem R, Nicolas V, Servin A, Bernet-Camard M. 2004. Zipper-like internalization of Dr-Positive *Escherichia coli* by epithelial cells is preceded by an adhesin-induced mobilization of raft-associated molecules in the initial step of adhesion. *Infection and Immunity* 72:3733-3742

Ketterer MR, Shao J, Hornick D, Buscher B, Bandi V, Apicella M. 1999. Infection of primary human bronchial epithelial cells by *Haemophilus influenzae*: macropinocytosis as a mechanism of airway epithelial cell entry. *Infection and Immunity* 67:4161-4170.

Kim KS. 2001. *Escherichia coli* translocation at the blood-brain barrier. *Infection and Immunity*. 69:5217-5222.

Konkel ME, Garvis ST, Tipton SL, Anderson DE, Cieplak W. 1997. Identification and molecular cloning of a gene encoding a fibronectin protein (CadF) from *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology* 24:953-963.

Kostakioti M, Stathopoulos C. 2004. Functional analysis of the autotransporter from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain. *Infection and Immunity* 72:5548-5554.

Kukkonen M, Saarela S, Lähteenmäki K, Hynönen U, Westerlund-Wikström B, Rhen M, Korhonen T K. 1998. Identification of two laminin-binding fimbriae, the type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and the G fimbria of *Escherichia coli*, as plasminogen receptors. *Infection and Immunity* 166:4965-4970.

Kwaga JK, Allan BJ, van Der Hurk JV, Seida H, Potter A. 1994. A carAB mutant of avian pathogenic *Escherichia coli* serogroup O2 is attenuated and effective as a live vaccine against colibacillosis in turkeys. *Infection and Immunity* 62:3766-3772.

La Ragione RM, Cooley WA, Woodward MJ. 2000a. The role of the fimbriae and flagella into the adherence of avian strains of *Escherichia coli* O78:K80 to tissue culture cells and tracheal and gut explants. *Journal Medical Microbiology* 49:327-338.

La Regione RM, Sayers AR, Woodward MJ. 2000b. The Role of fimbriae and flagella in the colonization, invasion and persistence of *Escherichia coli* O78:K80 in the day-old-chick. *Model. Epidemiology and Infection* 124:351-363.

La Ragione RM, Woodward MJ. 2002. Virulence factors of *Escherichia coli* serotypes associated with avian colisepticaemia. *Research in Veterinary Science* 73:27-35.

Leitner G, Heller ED. 1992. Colonization of *Escherichia coli* in young turkeys and chickens. *Avian Disease* 36:211-220.

Lindmark H, Guss B. 1999. SFS a novel fibronectin-binding protein from *Streptococcus equi*, inhibits the binding between fibronectin and collagen. *Infection and Immunity* 67:2383-2388.

Majó N, Gilbert X, Vilafranca M, O Loan CJ, Costa LI, Pagés Allen G, Costa L, Pagés A, Ramis A. 1997. Turkey rhinotraqueitis virus and *Escherichia coli* experimental infection in chickens: histopatological, immunocytochemical and microbiological study. *Microbiology Veterinary* 57:29-40.

Maurer JJ, Brown TP, Steffens WL, Thayer SG. 1998. The occurrence of ambient temperature-regulated adhesins, curli, and the temperature-sensitive hemagglutinin Tsh among avian *Escherichia coli*. *Avian Disease* 42:106-118.

McArthur J, Medina E, Mueller A, Chin J, Currie BJ, Sriprakash K, Talay S, Chatwal G, Walter S. 2004. Intranasal vaccination with streptococcal fibronectin binding proteins Sfb fails to prevent growth and dissemination of *Streptococcus pyogenes* in a murine skin infection model. *Infection and Immunity* 72:7342-7245.

Meier C, Oelschlaeger T, Merkert H, Korhonn T, Hacker J. 1996. Ability of *Escherichia coli* that cause meningitis in newborns to invade epithelial and endothelial cells. *Infection and Immunity* 64:2391-2399.

Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss III R, Brown PK, Arné P, Brée A, Desautels C, Fairbrother JM. 2003a. Role of virulence factors in resistance of avian pathogenic *Escherichia coli* to serum and in pathogenicity. *Infection and Immunity* 71:536-540.

Mellata M, Dho-Moulin M, Dozois CM, Curtiss III R, Lehoux B, Fairbrother JM. 2003b. Role of avian pathogenic *Escherichia coli* virulence factors in bacterial interaction with chicken heterophils and macrophages. *Infection and Immunity* 71:494-503.

Monteville MR, Konkel ME. 2002. Fibronectin-facilitated invasion of T84 eukaryotic cells by *Campylobacter jejuni* occurs preferentially at the basolateral cell surface. *Infection and Immunity* 70:6665-6671.

Monteville MR, Yoon JE, Konkel ME. 2003. Maximal adherence and invasion of INT 407 cells by *Campylobacter jejuni* requires the CadF outer-membrane protein and microfilament reorganization. *Microbiology* 149:153-165.

Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. 2001. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infection and Immunity* 69:4572-4579.

Mulvey MA. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology*. 5:257-271.

Nakamura K, Cook J, Fraizer J, Narita M. 1992. *Escherichia coli* multiplication and lesions in the respiratory tract of chickens inoculate with infectious bronchitis virus and/or *E. coli*. *Avian Disease* 36:881-890.

Nallapareddy SR, Qin X, Weinstock GM, Höök M, Murray BE. 2000. *Enterococcus faecalis* adhesin, ace, mediates attachment to extracellular matrix proteins collagen type IV and laminin as well as collagen type I. *Infection and Immunity* 68:5218-5224.

Oehmcke S, Podbielski A, Kreikemeyer B. 2004. Function of the fibronectin-binding serum opacity factor of *Streptococcus pyogenes* in adherence to epithelial cells. *Infection and Immunity* 72:4302-4308.

Oelschlaeger T, Tall B. 1997. Invasion of cultured human epithelial cells by *Klebsiella pneumoniae* isolated from urinary tract. *Infection and Immunity* 65:2950-2958.

Palmer L, Reilly T, Utsalo S, Donnenberg M. 1997. Internalization of *Escherichia coli* by human renal epithelial cells is associated with tyrosine phosphorylation of specific host cell proteins. *Infection and Immunity* 65:2570-2575.

Pankov R, Yamada KM. 2002. Fibronectin at a glance. *Journal of Cell Science* 115:3861-3863.

Parreira VR, Gyles CL. 2003. A novel pathogenicity island integrated adjacent to the thrW gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infection and Immunity* 71:5087-5096.

Pasuola R, Wisniowski P, Martin II WJ. 2002. Fibronectin facilitates *Mycobacterium tuberculosis* attachment to murine alveolar macrophages. *Infection and Immunity* 70:1287-1292.

Patti JM, Allen BL, McGavin M. 1994. MSCRAMM-mediated adherence of microorganisms to host tissues. *Annual Review Microbiology* 48:585-617.

Peghambari SM, Gyles CL. 1998. Construction and characterization of avian *Escherichia coli cya crp* mutants. *Avian Disease* 42:698-710.

Plotkowski MC, Tournier JM, Puchelle E. 1996. *Pseudomonas aeruginosa* strains possess specific adhesins for laminin. *Infection and Immunity* 64:600-605.

Polotsky Y, Nataro JP, Kotler D, Barreto TJ, Orenstein JM. 1997. HEp-2 cell adherence patterns, serotyping, and DNA analysis of *Escherichia coli* isolates from eighth patients with AIDS and chronic diarrhea. *Journal Clinical Microbiology* 35:1952-1958.

Pourbakhsh SA, Boulianne M, Martineau-Doizé B, Dozois CM, Desautels C, Fairbrother JM. 1997. Dynamics of *Escherichia coli* infection in experimentally inoculated chickens. *Avian Disease* 41:221-233.

Prasadarao NV, Wass CA, Huang SH, Kim KS. 1999; Identification and characterization of a novel Ibe10 binding protein that contributes to *Escherichia coli* invasion of brain microvascular endothelial cells. *Infection and Immunity*. 67:1131-1138.

DIRECCION GENERAL DE BIBLIOTECAS

Preissner KY, Shingh C. 2000. Extracellular matrix and host cell surface. In: *Cellular Microbiology*. Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. (eds). ASM Press, Washington DC. pp. 46-69.

Probe WS, Jhonson B. 1998. Identification of a 47kDa fibronectin-binding protein expressed by *Borrelia burgdorferi* isolated B31. *Molecular Microbiology* 30:1003-1008.

Provence DL, Curtis III R. 1992. Role of *crl* in avian pathogenic *Escherichia coli* a knockout mutation of *crl* does not affect hemagglutination activity, fibronectin binding, or curli production. *Infection and Immunity* 60:4460-4467.

Ramírez RM, Moreno A, Almanza Y. 2001. Factores de virulencia de *Escherichia coli* asociados a la colisepticemia en pollos de engorde. *Revista Argentina de Microbiología*. 33:52-57.

Saarela S, Westerlund-Wikström B, Rhen M, Korhonen TK. 1996. The GafD protein of the G (F17) fimbrial complex confers adhesiveness of *Escherichia coli* to laminin. *Infection and Immunity* 64:2857-2860.

Sarén A, Virkola R, Hacker J, Korhonen TT. 1999. The cellular form of human fibronectin as an adhesion target for the S fimbriae of meningitis associated *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 67:2671-2676.

Schuze-Koop H, Burkhardt H, Heesemann J, Kirsch T, Swoboda B, Bull C, Goodman S, Emmrich F. 1993. Outer membrane protein YadA of *Enteropathogenic Yersiniae* mediates specific binding to cellular but not plasma fibronectin. *Infection and Immunity* 61:2513-2519.

Sebghati TA, Korhonen TK, Hornick DB. 1998. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infection and Immunity* 66:2887-2894.

Secott TE, Lin TL, Wu CC. 2002. Fibronectin attachment protein is necessary for efficient attachment and invasion of epithelial cell by *Mycobacterium avium* subsp. *Paratuberculosis*. *Infection and Immunity* 70:2670-2675.

Shimoji Y, Ogawa Y, Osaki M, Kabeya H, Maruyama S, Mikami T, Sekizaki T. 2003. Adhesive surface proteins of *Erysipelothrix rhusiopathiae* bind to polystyrene, fibronectin, and type I and IV collagens. *Journal Bacteriology* 185:2739-2748.

Silveira WD, Ferreira A, Brocchi M, Hollanda LM, Castro AF, Yamada AT, Lancellotti M. 2002. Biological characteristics and pathogenicity of avian *Escherichia coli* strains. *Veterinary Microbiology* 85:47-53.

Sinha B, Francois P, QueY-A, Hussain M, Heilmann C, Moreillon P, Lew D, Krause KH, Peters G, Herrmann M. 2000. Heterologously expressed *Staphylococcus aureus* fibronectin-binding proteins are sufficient for invasion of host cells. *Infection and Immunity* 68:6871-6878.

Skubitz PN, McCarthy JB, Charonis AS, Furcht LT. 1988. Localization of three distinct heparin-binding domains of laminin by monoclonal antibodies. *Journal Biology Chemistry* 263:4861-4868.

Spellenberg B, Rozdzinsk E, Simon M, Werber-Heynen J, Schnitzler N, Lüftreken R, Polbielski A. 1999. Lmb, a protein with similarities to the Iral adhesin family, mediates attachment of *Streptococcus agalactiae* to human laminin. *Infection and Immunity* 67:871-878.

Stathopoulos C, Provence DL, Curtiss III R. 1999. Characterization of the avian pathogenic *Escherichia coli* hemagglutinin Tsh, a member of the immunoglobulin A protease-type family of autotransporters. *Infection and Immunity* 67:772-81.

Stehling E, Yano T, Brocchi M, Silveira WD. 2003. Characterization of a plasmid-encoded adhesin of avian pathogenic *Escherichia coli* (APEC) strain isolated from a case of swollen head syndrome (SHS). *Veterinary Microbiology* 95:111-120.

Tarkkanen A, Virkola R, Clegg S, Coronen T. 1997. Binding of the type 3 fimbriae of *Klebsiella pneumoniae* to human endothelial and urinary bladder cells. *Infection and Immunity* 65:1546-1549.

Terao Y, Kawabata S, Kunitomo E, Nakagawa I, Hamada S. 2002. Novel laminin-binding protein of *Streptococcus pyogenes*, Lbp, is involved in adhesion to epithelial cell. *Infection and Immunity* 70:993-997.

Thair YE, Skurnik M. 2001. YadA the multifaceted Yersinia adhesins. *Journal Medical Microbiology* 291:209-218.

Tivendale KA, Allen JL, Ginns CA, Crabb BS, Browning GF. 2004. Association of *iss* and *icuA*, but not *tsh* with plasmid-mediated virulence of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* 72:6554-6560.

Tran Van G, Sansonetti P. 2000. Cell adhesion molecules and bacterial pathogens. In: *Cellular Microbiology*. Cossart P, Boquet P, Normark S, Rappuoli R. (eds). ASM Press, Washington D.C. pp. 46-69.

Tsarfaty I, Altstock R, Mittelman L, Sandovsky-Losica H, Jadoun J, Fabian I, Segal E, Sela S. 1999. Confocal microscopy in the study of the interactions between microorganism and cells. In: Microbial Ecology and Infectious Disease. Rosenberg E. (ed). ASM Press: Washington DC. pp. 75-87.

Valkonen KH, Veijola B, Dagberg B, Uhlin BE. 1991. Binding of basement membrane laminin by *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 5:2133-2141.

Valkonen KH, Wadström T, Moran AP. 1994. Interaction of lipopolysaccharides of *Helicobacter pylori* with basement membrane protein laminin. Infection and Immunity 62:3640-3648.

Valkonen KH, Wadström T, Moran AP. 1997. Identification of the N acetylneuraminylactose specific laminin-binding protein of *Helicobacter pylori*. Infection and Immunity 65:916-923.

van Der FM, Chun N, Wizemann TM, Min J, McCarthy J. 1995. Adherence of *Streptococcus pneumoniae* to immobilized fibronectin. Infection and Immunity. 63:4317-4322.

Verdugo A, López Y, Puentes J Ruiz G, Calva V. 1993. Early diagnosis of typhoid fever by outer membrane protein preparations. European Journal Microbiol Infections Diseases 12:248-254.

Vidotto M, Navarro H, Gaziri L. 1997. Adherence pili of pathogenic strains of avian *Escherichia coli*. Veterinary Microbiology 59:79-85.

Virkola R, Jackko P, Hacker J, Korhonen TK. 1993. Sialyloligosaccharide chains of laminin as an extracellular matrix target for S fimbriae of *Escherichia coli*. Infection and Immunity 61:4480-4484.

Virkola R, Brummer M, Rauvala H, van Alphen L, Korhonen TM. 2000. Interaction of fimbriae of *Haemophilus influenzae* type B with heparin-binding extracellular matrix proteins. Infection and Immunity 68:5696-5701.

Visai L, Bozzini S, Petersen T, Speciale L, Speziale P. 1991. Binding sites in fibronectin for an enterotoxigenic strain of *Escherichia coli* B342289c. *Federation of European Biochemical Societies* 290:111-114.

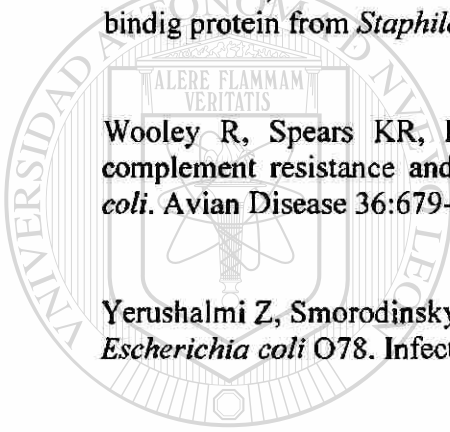
Waters VL, Crosa JH. 1991. Colicin V virulence plasmids. *Microbiology Reviews* 55:437-450.

Wierzbicka I, Schwarzbauer J. 2003. The ins and out of fibronectin matrix assembly. *Journal of Cell Science* 116:3269-3276.

Williams RJ, Henderson B, Sharp LJ, Nair SP. 2002. Identification of a fibronectin-binding protein from *Staphylococcus epidermidis*. *Infection and Immunity* 70:6805-6810.

Wooley R, Spears KR, Brown J, Nolan LK, Fletcher OJ. 1992. Relationship of complement resistance and selected virulence factors in pathogenic avian *Escherichia coli*. *Avian Disease* 36:679-684.

Yerushalmi Z, Smorodinsky N, Naveh M, Ron E. 1990. Adherence pili of avian strains of *Escherichia coli* O78. *Infection and Immunity* 58:1129-1131.



UANL

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN



DIRECCIÓN GENERAL DE BIBLIOTECAS

