



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE INFECTÓMICA  
Y PATOGÉNESIS MOLECULAR

“Efecto del zinc y el hierro sobre el crecimiento y factores de virulencia de  
*Escherichia coli* enterotoxigénica”

Tesis

Que presenta

**Q. F. B. Diana Melissa Contreras Zapata**

Para obtener el grado de

Maestra en Ciencias

en la especialidad de Infectómica y Patogénesis Molecular

Directores de tesis:

**Dra. Ana Lorena Gutiérrez Escolano**

**Dr. Julio César Torres Romero**

**Ciudad de México**

**Enero, 2019**

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Genética Molecular de la Facultad de Química de la Universidad Autónoma de Yucatán bjo la tutoría del Dr. Julio César Torres Romero, en el laboratorio 2 del Departamento de Infectómica y Patogénesis Molecular bajo la tutoría de la Dra. Ana Lorena Gutierrez Escolano y en el Departamento de Biomedicina bajo la tutoría de la Dra. María Teresa Estrada García del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del IPN  
Así mismo, se contó con las asesorías del Dr. José Luis Rosales Encina y Dr. Víctor Katsutoshi Tsutsumi Fujiyoshi.

Durante el desarrollo de este trabajo se contó con el apoyo económico del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT N° 0261257).

## **AGRADECIMIENTOS**

Gracias a mis tutores, Dra. Lorena Gutierrez Escolano y Dr. Julio César Torres Romero por la paciencia, enseñanzas y el apoyo brindado durante este largo camino.

Gracias a todo el cuerpo de investigadores que evaluaron y tuvieron tiempo para dirigir este trabajo desde su planteamiento hasta la conclusión del mismo.

Gracias Dra. Teresa Estrada García y Dra. Catalina López Saucedo por su apoyo incondicional, sus enseñanzas, su tiempo y dedicación, pero sobre todo por permitirme formar parte de su equipo de trabajo.

A dos seres increíbles que me inspiraron a incursionar en este camino, Moisés y Roberto, gracias por su apoyo, enseñanzas, paciencia, palabras de aliento y sobre todo por su amistad.

A mis compañeros y amigos: Mario, Ale, Jime, Sam, Héctor, Sandy, Helena, Loremy y Paola que hicieron que el camino hacia la meta sea increíble.

A mis padres y hermano por la paciencia, palabras de aliento y por contribuir a que este sueño fuera posible.

Gracias al CONACyT por el apoyo brindado durante el transcurso de la maestría.

## **DEDICATORIA**

A mi padre:

No tengo las palabras suficientes para expresar lo agradecida que estoy por tu apoyo incondicional para que esto se hiciera realidad. Viejito, eres mi todo, gracias por ser mi complice, por creer en mí y por impulsarme a seguir adelante. Te amo.

## CONTENIDO

RESUMEN.....	1
ABSTRACT.....	2
I. ANTECEDENTES.....	3
1. Enfermedad diarreica aguda (EDA).....	3
1.1 Epidemiología.....	3
1.2 Agentes causales.....	5
2. Enfermedad diarreica por <i>Escherichia coli</i> .....	6
2.1 Clasificación.....	6
2.2 Mecanismos moleculares de patogenicidad.....	6
3. ETEC.....	8
3.1 Mecanismos de patogénesis.....	8
3.2 Adhesión.....	9
3.3 Enterotoxinas.....	10
4. Crecimiento y expresión de factores de virulencia por <i>E. coli</i> .....	14
4.1 Dependencia de Hierro.....	14
4.2 Dependencia de Zinc.....	17
5. Regulación transcripcional en <i>E. coli</i> .....	18
5.1 Regulación del crecimiento y expresión de factores de virulencia de <i>E. coli</i> por Fe <sup>2+</sup> y Zn <sup>2+</sup> .....	18
5.2 Regulación en la expresión de factores de virulencia de los patotipos de <i>E. coli</i> por Fe <sup>2+</sup> y Zn <sup>2+</sup> .....	19
5.3 Regulación en la expresión de factores de virulencia de ETEC por Fe <sup>2+</sup> y Zn <sup>2+</sup> .....	19
II. JUSTIFICACIÓN.....	21
III. HIPÓTESIS.....	21
IV. OBJETIVOS.....	22
GENERAL.....	22
PARTICULARES.....	22
V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	23
VI. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
VII. RESULTADOS.....	32
Efecto del Fe <sup>2+</sup> en el crecimiento de las cepas de referencia H10407 y ATCC 35401 de ETEC.....	32

<b>Análisis a nivel de transcritos de las toxinas LT y ST, y de la fimbria CFA/I a las 3 h de la curva de crecimiento con dipirilo de las cepa H10407. ....</b>	<b>34</b>
<b>Efecto del Zn<sup>2+</sup> en el crecimiento de las cepas de referencia H10407 y ATCC 35401 de ETEC.....</b>	<b>38</b>
<b>Análisis a nivel transcrito de las toxinas LT, ST y la fimbria CFA/I a las 3 h de la curva de crecimiento con tratamientos de ZnSO<sub>4</sub>. ....</b>	<b>45</b>
<b>VIII. DISCUSIONES .....</b>	<b>47</b>
<b>IX. CONCLUSIÓN.....</b>	<b>52</b>
<b>X. REFERENCIAS .....</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro. 1.</b> Clasificación de los patotipos de <i>E. coli</i> asociados con diarrea y sus mecanismos de patogenicidad.	7
<b>Cuadro. 2.</b> Descripción de las cepas bacterianas.	24
<b>Cuadro. 3.</b> Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción de PCR.	25
<b>Cuadro. 4.</b> Iniciadores para la amplificación de los genes que codifican a los factores de virulencia LT, ST y CFA/I de ETEC.	25
<b>Cuadro. 5.</b> Concentraciones de ZnSO <sub>4</sub> y FeSO <sub>4</sub> .	26
<b>Cuadro. 6.</b> Reactivos para la extracción de RNA bacteriano.	28
<b>Cuadro. 7.</b> Reactivos, volúmenes y concentraciones para la generación de cDNA.	30
<b>Cuadro. 8.</b> Ubicación genómica de las secuencias codificantes de las toxinas LT y ST, y la fimbria CFA/I de ETEC H10407.	31

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Fig. 1.</b> Mortalidad a nivel mundial por diarrea en niños menores de 5 años.	4
<b>Fig. 2.</b> Incidencia en el porcentaje de EDA en niños menores de 5 años.	5
<b>Fig. 3.</b> Microscopía electrónica de transmisión de ETEC H10407.	9
<b>Fig. 4.</b> Estructura molecular de la toxina LT.	11
<b>Fig. 5.</b> Mecanismo de acción de las toxinas LT y ST.	13
<b>Fig. 6.</b> Mecanismos de obtención del hierro en el hospedero.	16
<b>Fig. 7.</b> Crecimiento de la cepa ATCC 35401 en caldo LB en presencia de hierro.	32

<b>Fig. 8.</b> Crecimiento de la cepa H10407 en caldo LB en presencia de hierro y dipirilo.	33
<b>Fig. 9.</b> Evaluación por RT-PCR del perfil de expresión a las 3h de los genes <i>elt</i> , <i>sta2</i> , <i>cfa</i> y <i>gapA</i> en presencia de dipirilo.	34
<b>Fig. 10.</b> Evaluación por RT-PCR del perfil de expresión a las 5h y 7h de los genes <i>elt</i> , <i>sta2</i> , <i>cfa</i> y <i>gapA</i> en presencia de dipirilo.	35
<b>Fig. 11.</b> Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>cfaA</i> .	36
<b>Fig. 12.</b> Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>eltAB</i> .	36
<b>Fig. 13.</b> Análisis <i>in silico</i> de la región promotora de <i>estAB</i> .	37
<b>Fig. 14.</b> Crecimiento de las cepas H10407 y ATCC 35401 en presencia de zinc (D.O.= 595 nm).	39
<b>Fig. 15.</b> Crecimiento de las cepas H10407 y ATCC35401 en presencia de zinc (UFC/mL).	40
<b>Fig. 16.</b> Evaluación por PCR punto final la presencia de los genes <i>eltB</i> , <i>estA</i> y <i>cfa/I</i> que codifican para los factores de virulencia LT, ST y CFA/I.	41
<b>Fig. 17.</b> Análisis de la densidad del amplicón de los genes <i>eltB</i> y <i>estA</i> de las cepas H10407 y ATCC 35401.	42
<b>Fig. 18.</b> Evaluación por PCR punto final la presencia de los genes <i>eltB</i> , <i>estA</i> y <i>cfa/I</i> en DNA total.	43
<b>Fig. 19.</b> Evaluación por RT-PCR del perfil de expresión a las 3h de los genes <i>eltB</i> , <i>estA</i> , <i>cfa/I</i> y <i>gapA</i> en presencia de zinc.	45

## RESUMEN

Las infecciones gastrointestinales son un problema de salud pública que ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en México y países en vías de desarrollo, afectando principalmente a niños menores de 5 años. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), es uno de los principales agentes causales de diarrea, se caracteriza por la producción de enterotoxinas (LT y ST) y factores de colonización (CFs). En el presente trabajo, se evaluó el efecto del hierro ( $\text{Fe}^{2+}$ ) y el zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) sobre el crecimiento y la expresión de los genes que codifican para las toxinas LT y ST, y la fimbria CFA/I de las cepas de ETEC H10407 y ATCC 35401. La tasa de crecimiento se evaluó mediante espectrofotometría (D.O.) y conteo de unidades formadoras de colonias (UFC/mL), y la expresión de los genes que codifican los factores de virulencia mediante RT-PCR punto final. En la fase experimental, se observó que  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  a bajas concentraciones pueden actuar como micronutrientes que favorecen el crecimiento de las cepas de ETEC. En cuanto a la expresión génica, se demostró que la cepa ATCC 35401 no es estimulada por ningún metal pero en la cepa H10407 el  $\text{Fe}^{2+}$  induce la expresión del gen que codifica la toxina ST y el  $\text{Zn}^{2+}$  induce la expresión del gen que codifica la toxina LT y la fimbria CFA/I. Por lo anterior, concluimos que el  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  son micronutrientes importantes que influyen de manera diferencial en la expresión de genes de ETEC asociados a su virulencia.

## ABSTRACT

Gastrointestinal diseases are a public health issue which causes most cases of morbidity and mortality in Mexico and other developing countries, mostly affecting children below the age of 5. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the main pathogens that causes diarrhea, and it is characterized by the production of enterotoxins (LT and ST) and by colonization factors (CFs). In the present work we evaluate the effect of iron ( $\text{Fe}^{2+}$ ) and zinc ( $\text{Zn}^{2+}$ ) in the growth and expression of genes, which encode for the LT and ST toxins, and the fimbria CFA/I of the strain of ETEC H10407 and ATCC 35401. The growth ratio was evaluated through spectrometry and by the amount of colony forming units (CFU/mL); moreover, the expression of the genes that encode for the virulence factors, was analyzed at transcript level by end-point RT-PCR. During the experimental phase, it was shown that  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  in low concentrations are essential micronutrients that favor the growth of ETEC strains. ATCC 35401 strain,  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  did not stimulate the expression of the evaluated genes; nevertheless, in the H10407 strain iron stimulate the expression of the gene responsible for ST toxin expression, while zinc induces the expression of the gene that codes for LT toxin and fimbriae CFA/I. Therefore, we conclude that  $\text{Fe}^{2+}$  and  $\text{Zn}^{2+}$  are important micronutrients that affect in different ways the expression of ETEC genes associated with its virulence.

## **I. ANTECEDENTES**

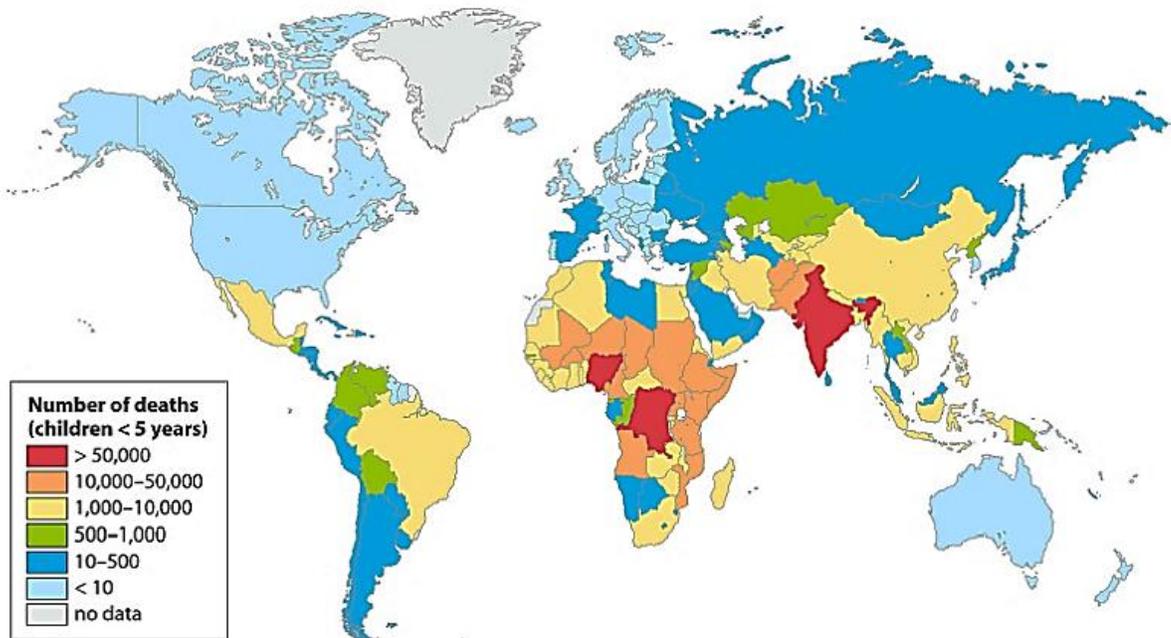
Las infecciones gastrointestinales son un problema de salud pública, ocupan los primeros lugares de morbilidad y mortalidad en países en vías de desarrollo, afectando principalmente a niños menores de 5 años.

### **1. Enfermedad diarreica aguda (EDA)**

La diarrea es un síndrome clínico menor a 2 semanas de evolución caracterizado por la disminución en la consistencia y un aumento en la frecuencia (mayor a 3 veces al día) de las deposiciones; puede estar acompañado de vómitos, dolor abdominal y fiebre (Wilcox 2018).

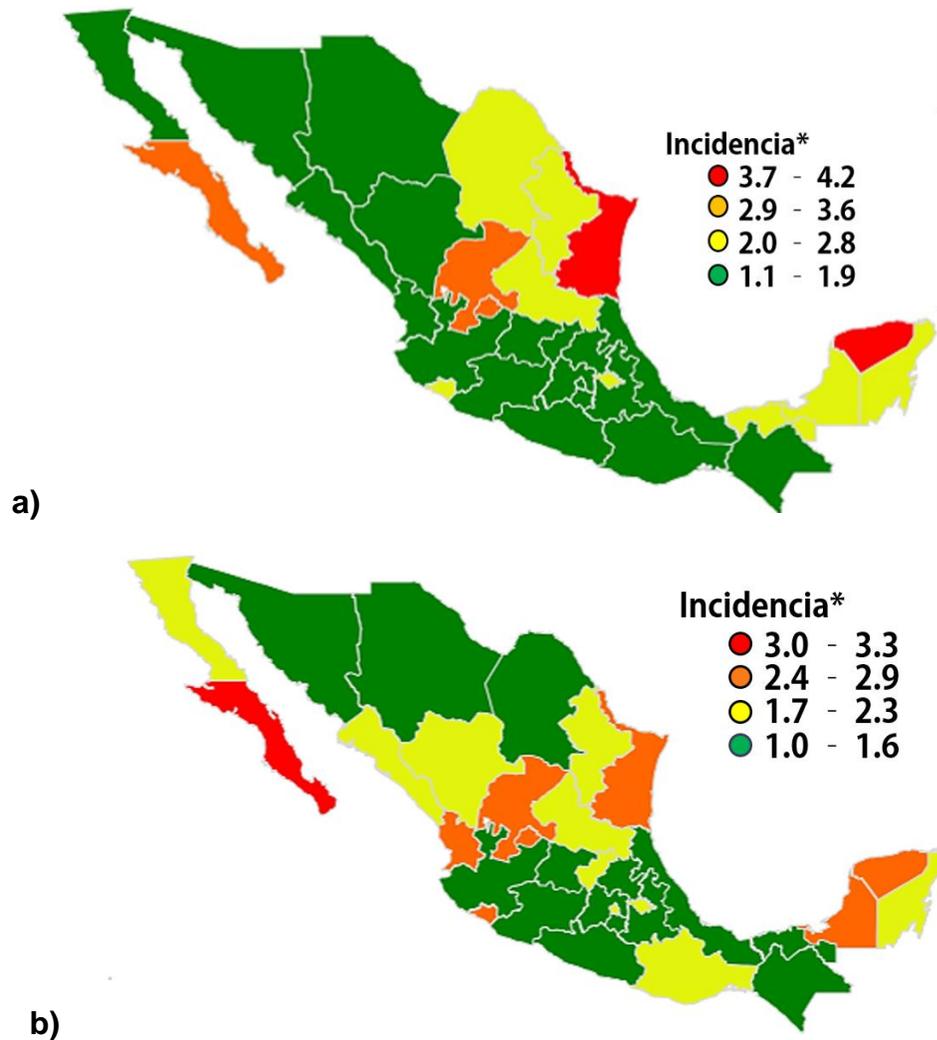
#### **1.1 Epidemiología**

La Organización Mundial de la Salud (OMS) reporta la existencia aproximadamente dos mil millones de casos de enfermedad diarreica a nivel mundial cada año, y 1.9 millones de niños menores de 5 años de edad fallecen a causa de esta enfermedad, fundamentalmente en los países en vías de desarrollo. Esto asciende a 18% de todas las muertes de niños en ese intervalo de edad, y significa que más de 5,000 niños mueren cada día como resultado de enfermedades diarreicas. El 78% de todas las muertes infantiles provocadas por diarrea ocurren en África y el sureste Asiático. Se estima que cada niño menor de 5 años de edad presenta un promedio de tres episodios anuales de diarrea aguda. A nivel mundial, la diarrea es la segunda causa de muerte (después de la neumonía), particularmente en menores de 1 año (**Figura 1**). Entre las consecuencias directas de la diarrea infantil se incluye desnutrición, disminución del crecimiento y trastornos del desarrollo cognitivo (Croxen, *et al.* 2013).



**Figura 1. Mortalidad a nivel mundial por diarrea en niños menores de 5 años.**

En México, la enfermedad diarreica es la segunda causa de morbilidad y la quinta causa de mortalidad en niños menores de 5 años. La Dirección General de Epidemiología (DGE) reporta que las entidades federativas con mayor incidencia de enfermedad diarreica aguda (EDA) en este grupo etario durante la semana epidemiológica 46 del 2017 fueron: Yucatán (4.2), Tamaulipas (3.8), Baja California Sur (3.7), Aguascalientes (3.1) y Zacatecas (**Figura 2a**). En el 2018, la entidad federativa con mayor incidencia en la semana epidemiológica 46 fue Baja California Sur (3.3), precedida por Tamaulipas (2.9), Zacatecas (2.7), Nayarit (2.6), Yucatán (2.6) (**Figura 2b**).



**Figura 2. Incidencia en porcentaje de EDA en niños menores de 5 años.** Datos obtenidos por la DGE durante la semana epidemiológica 46 en México, **a)** 2017 y **b)** 2018.

### 1.2 Agentes causales

Muchos agentes etiológicos, incluidos virus, bacterias y protozoarios, son responsables de la mortalidad relacionada con la diarrea en niños menores de 5 años. Desde un punto de vista fisiopatológico, existen dos mecanismos básicos para la generación de la diarrea: 1) el mecanismo osmótico donde hay un incremento en la osmolaridad luminal, como ocurre con la diarrea asociada por rotavirus y 2) el mecanismo secretor donde hay una estimulación para la liberación de iones por las enterotoxinas producidas por bacterias patógenas

como *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) o mediante inflamación, como es el caso de las diarreas asociadas a cepas de *Shigella*. La mayor parte de estos patógenos gastrointestinales se transmiten por el consumo de alimentos o bebidas contaminados con heces (Sinha, *et al.* 2012, Whyte LA & Jenkins HR, 2012).

## **2. Enfermedad diarreica por *Escherichia coli*.**

*E. coli* es un microorganismo bacilar Gram negativo, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, el cual fue descrito en 1885 por Theodor Escherich, al analizar la materia fecal de niños con diarrea. Este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal de los infantes desde las primeras horas de nacimiento coexistiendo como comensal propio de la biota intestinal; sin embargo, la alta plasticidad que presenta en su genoma conduce a la aparición de cepas que pueden actuar como agentes patógenos (Croxen & Finlay 2010; Shulman, *et al.* 2007).

### **2.1 Clasificación**

Las cepas de *E. coli* causantes de diarrea se han clasificado en 6 grupos patógenos o patotipos, cada uno definido por los factores de virulencia que poseen como las adhesinas, los factores modificadores de la superficie celular, las toxinas, los mecanismos de interacción con las células de la mucosa intestinal (adhesión e invasión), los sistemas de secreción, los serotipos y las diferentes características epidemiológicas y clínicas. Los patotipos son: 1) *E. coli* enteroagregativa (EAEC), 2) *E. coli* enteroinvasora (EIEC), 3) *E. coli* enteropatógena (EPEC) dividida en dos grupos: típica y atípica; 4) *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), 5) *E. coli* productora de toxina shiga (STEC/EHEC) y 6) *E. coli* enterodifusa adherente (DAEC) (Bekal, *et al.* 2003; Darbandi, *et al.* 2016; Kaper, *et al.* 2004; Nataro & Kaper 1998).

### **2.2 Mecanismos moleculares de patogenicidad**

Las cepas patógenas de *E. coli* comparten factores de virulencia para originar enfermedad en el humano (**Cuadro 1**). La adhesión a las células epiteliales mediante prolongaciones semirígidas, conocidas como fimbrias o pilis, son un

requerimiento indispensable para todos los patotipos, excepto para EIEC. Posteriormente, subvierten los procesos celulares del hospedero mediante la secreción de proteínas que promueven el secuestro y la manipulación de las vías de señalización para favorecer la invasión a los enterocitos, la evasión del sistema inmune y la eficiente colonización del epitelio, como resultado se da la generación de diarrea (Croxen & Finlay 2010; Clements, *et al.* 2012; Vila Estape & Zboromyrska 2012).

**Cuadro 1.** Clasificación de los patotipos de *E. coli* asociados con diarrea y sus respectivos mecanismos de patogenicidad.

Patotipo de <i>E. coli</i>	Tipo de diarrea	Mecanismo de patogenicidad – factores de virulencia
ETEC	Acuosa	<p><b>Adhesión:</b> Factores de colonización (CFA/I, CFA/II)</p> <p><b>Toxinas:</b> termolábil (LT), termoestable (ST) y citolisina A (ClyA)</p> <p><b>Autotransportadores de serin proteasas:</b> Autotransportador A de ETEC (EatA)</p> <p><b>Adhesión:</b> íntima, BFP (pili tipo IV), Paa, LPF, Iha, EhaA</p>
EPEC	Acuosa	<p><b>Sistema de secreción:</b> tipo III codificado por LEE</p> <p><b>Autotransportadores de serin proteasas:</b> EspC</p> <p><b>Adhesión:</b> íntima, Paa, Toxina B (ToxB), Efa-1 (factor de <i>E. coli</i> para adherencia), LPF, proteína A de membrana externa (OmpA), autotransportador de EHEC codificado por el gen A (EhaA), proteína de unión a inmunoglobulinas de <i>E. coli</i> (EibG)</p>
EHEC/STEC	Diarrea acuosa	
	Colitis hemorrágica (síndrome urémico hemolítico)	<p><b>Toxinas:</b> Stx-1 o Stx-2, Atx</p> <p><b>Autotransportadores de serin proteasas:</b> Pic, Pet</p> <p><b>Adhesión:</b> AAF, adhesina homóloga IrgA (iha)</p> <p><b>Sistema de secreción:</b> tipo III codificado por LEE</p> <p><b>Autotransportadores de serin proteasas:</b> EspP</p>

Patotipo de <i>E. coli</i>	Tipo de diarrea	Mecanismo de patogenicidad – factores de virulencia
EIEC	Disentería	<p><b>Adhesión:</b> Adherencia, plásmido (genes codifican proteínas de invasión)</p> <p><b>Otros:</b> pINV plásmido que codifica proteínas de invasión</p> <p><b>Autotransportadores de serin proteasas:</b> SepA (proteína extracelular de Shigella) y SigA</p> <p><b>Adhesión:</b> Fimbria de adherencia agregativa (AAF)</p> <p><b>Toxina:</b> Enterotoxina 1 termoestable (EAST-1) toxina de Shigella 1 (ShET-1), Hemolisina E (HlyE)</p>
EAEC	Acuosa	<p><b>Autotransportadores de serin proteasas:</b> plásmido codificador de toxina (Pet), proteína involucrada en la colonización intestinal (Pic),</p>
DAEC	Aguda	<p><b>Adhesión:</b> Adhesinas fimbrial (Dr) y afimbrial (Afa)</p> <p><b>Autotransportadores de serina proteasas:</b> Sat</p>

Continuación del **Cuadro 2.**

### 3. ETEC

ETEC es uno de los principales agentes causales de la diarrea infecciosa en países en vías de desarrollo y es conocida por ser el agente causal de la “diarrea del viajero” en personas que visitan zonas endémicas. Mundialmente, se estima que la incidencia de la infección producida por ETEC es de aproximadamente 650 millones de casos de diarrea y de 380, 000 muertes en niños menores de 5 años. Las cepas de este patotipo comprenden un gran número de serotipos que producen una variedad de factores de colonización y enterotoxinas (Sizemore, *et al.* 2004).

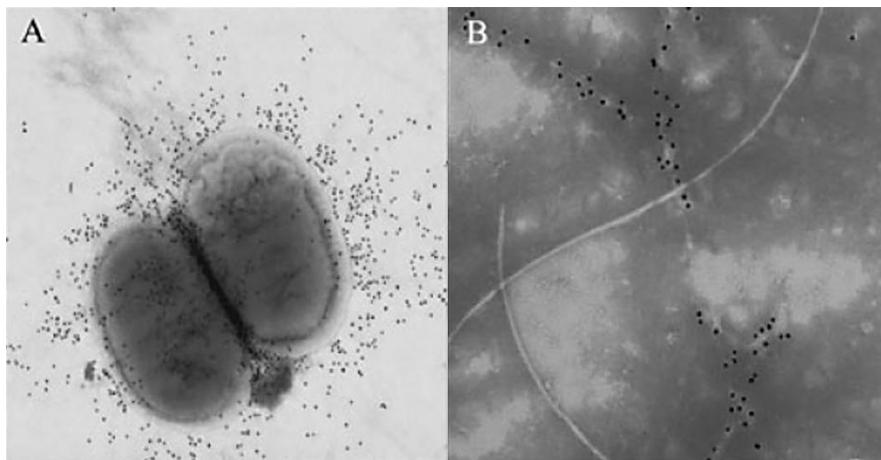
#### 3.1 Mecanismos de patogénesis

La patogénesis describe el origen y la evolución de una enfermedad con todos los factores involucrados en ella. La patogénesis de ETEC, que desencadena la pérdida de grandes volúmenes de agua y iones, principalmente Na<sup>+</sup>, K<sup>+</sup>, Cl<sup>-</sup> y HCO<sub>3</sub><sup>-</sup>, es un fenómeno multifactorial que incluye los mecanismos de adhesión y la producción de toxinas (Hodges & Gill 2010).

### 3.2 Adhesión

Para establecer la infección, ETEC debe adherirse a las células del intestino delgado mediante la expresión de una o más estructuras fimbriales conocidas como factores de colonización (CFs, por sus siglas en inglés *Colonization Factors*), antígenos de la superficie de Coli (CSs, por sus siglas en inglés, *Coli Surface Antigens*) o factores de colonización putativos (PCF, por sus siglas en inglés, *Putative Colonization Factors*) (Madhavan & Sakellaris 2015). Estas estructuras proteicas están clasificadas, con base en sus características morfológicas, en 3 principales categorías: estructuras rígidas (CFA/I), estructuras flexibles (CFA/III) y estructuras delgadas, flexibles pero fuertes (CFA/II compuesta por CS1, CS2 y CS3; y CFA/IV por CS4, CS5 y CS6) (Nataro & Kaper 1998).

Se han identificado diversos CFs entre los que destacan la fimbria CFA/I (**Figura 3**), la cual consiste en aproximadamente 1000 copias de la unidad principal CfaB y una copia de la adhesina CfaE. El ensamblaje de estas estructuras requiere de una proteína chaperona periplásmica (CfaA) y de una proteína de membrana externa que son codificadas por el mismo operón (CfaC) (Li, *et al.* 2009; Mu, *et al.* 2008).



**Figura 3: Microscopía electrónica de transmisión de ETEC H10407.** Donde se observa la morfología bacilar típica y la expresión de la fimbria CFA/I mediante inmunomarcaje, donde: A. magnificación de 30x, B. magnificación de 50x. Tomado y modificado de Baker, *et al.* 2009.

Para determinar la función de la subunidad CfaE de la fimbria CFA/I, Baker y cols realizaron mutaciones puntuales en la secuencia de aminoácidos que la codifica, lo que restringió la capacidad de ETEC H10407 de hemaglutinar eritrocitos humanos. Esta pérdida en la función de la fimbria afecta la adhesión de la cepa a los enterocitos del hospedero y por consiguiente, disminuye su virulencia (Baker, *et al.* 2009).

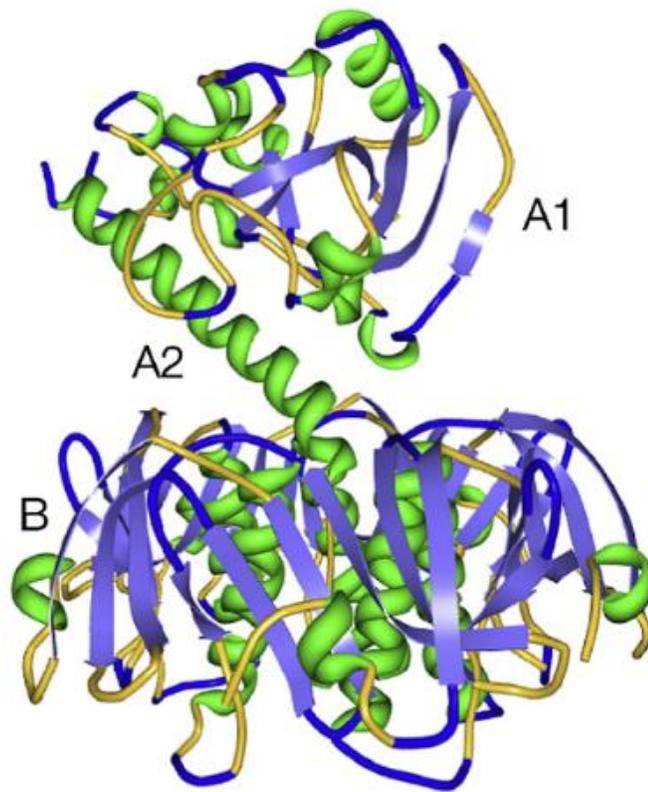
Asimismo, un alto porcentaje de cepas de ETEC que infectan al humano contienen al pili tipo IV (T4P) denominado Longus, que es codificado por el plásmido CS20. Longus está compuesto por una subunidad estructural repetitiva denominada LngA de 22 kDa y su secuencia de aminoácidos N-terminales comparte similitudes con el pili tipo IV. Al realizar mutaciones dirigidas en el gen que lo codifica, *IngA*, en una cepa silvestre, ETEC E9034A; las clonas resultantes disminuyeron su adhesión al epitelio, pero la expresión de otros factores de colonización evitó la pérdida total de la capacidad de adherencia (Mazariego-Espinosa, *et al.* 2010).

### **3.3 Enterotoxinas**

Una vez colonizado el intestino delgado, ETEC secreta proteínas al medio extracelular entre las que se incluyen las enterotoxinas, termo-lábil (LT, por sus siglas en inglés, *Heat-Labile Enterotoxin*) y termo-estable (ST, por sus siglas en inglés, *Heat-stable Toxin*), las cuales se ha demostrado que son las proteínas responsables de la inducción del eflujo de agua y electrolitos de las células epiteliales intestinales (Fleckenstein, *et al.* 2010; Horstman & Kuehn 2000).

LT es una proteína multimérica de 84 kDa compuesta de una subunidad A simple y una subunidad B pentamérica que es codificada por el operón *eltAB* compuesto por dos genes, *eltA* y *eltB*, que tienen una superposición de 4 nucleótidos en su secuencia. La secuencia de *eltAB* tiene una identidad de aproximadamente el 80% con la secuencia *ctxAB* que codifica a la toxina de *Vibrio cholerae* y ambas toxinas tienen un total de 240 aminoácidos (Joffré, E., *et al.* 2015).

La subunidad A presenta dos dominios unidos por un puente disulfuro: **A1** es el sitio activo y A2 es una porción helicoidal que permite anclar a la subunidad B (**Figura 4**) (Spangler 1992). Los péptidos B de la holotoxina se unen a los carbohidratos de los gangliósidos GM1 y GD1b ubicados en la superficie de las células epiteliales del intestino delgado, siendo la subunidad A traslocada hacia el citoplasma del enterocito a través de la membrana plasmática para posteriormente ser transportada mediante vía retrograda hacia el aparato de Golgi donde será procesada en A<sub>1</sub> y A<sub>2</sub>.



**Figura 4. Estructura molecular de la toxina LT:** Proteína multimérica de 84 kDa compuesta de una subunidad A simple y una subunidad B pentamérica. Tomado de Protein Data Bank: LTB (Merritt, *et al.* 1994).

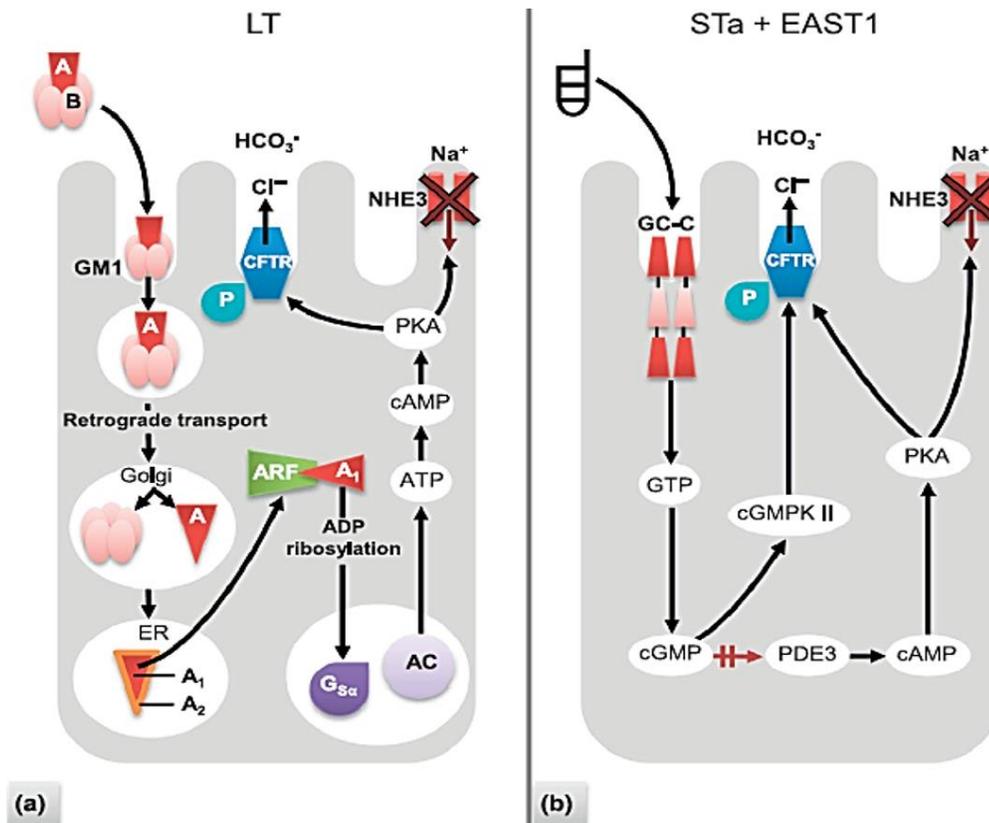
Una vez en el citoplasma A<sub>1</sub>, los factores de ribosilación del ADP (ARFs por sus siglas en inglés, *ADP-ribosylation factors*) la activan y potencian su actividad ADP-ribosil transferasa que actúa sobre el factor Gsa, un intercambiador de guanina que normalmente se activa tras su interacción con una molécula de GTP. El ADP-ribosil añadido al factor Gsa promueve la

liberación del GDP permitiendo la unión de GTP, la pérdida de su función hidrolítica intrínseca y su disociación de las subunidades G $\beta\gamma$ . El complejo ADP-ribosil-Gsa-GTP activa a la unidad catalítica del adenilato ciclasa, acelerando la conversión de ATP a AMP cíclico. El resultado de la activación permanente del adenilato ciclasa permite el incremento de los niveles de AMPc intracelular que conducen a la activación de la cinasa PKA que, a su vez, activa a la proteína reguladora de conductancia transmembranal de la fibrosis quística (CFTR por sus siglas en inglés, *Cystic Fibrosis Transmembrane Regulator*) que desencadena la secreción de Cl<sup>-</sup>. Esta enterotoxina también estimula al sistema nervioso entérico y la síntesis de prostaglandinas que, aunado al aumento del AMPc desencadenan la secreción de electrolitos y agua que conducen a la diarrea (**Figura 5a**). Como la absorción global intestinal permanece intacta, las pérdidas masivas de sodio, cloro, bicarbonato y líquidos se pueden sustituir mediante fórmulas orales, lo que reduce las tasas de mortalidad del 50% a menos de 1% (Fleckenstein, *et al.* 2010).

Asimismo, esta enterotoxina que puede unirse a otros esfingolípidos del hospedero e interactuar con los azúcares residuales del antígeno sanguíneo de tipo A, es secretada a través de un sistema de secreción de tipo II (T2S, por sus siglas en inglés, *Type II Secretion*) el cual consiste en un complejo multiproteico conformado por 12 a 15 componentes que se sitúan en la membrana interna y externa de la bacteria permitiendo la liberación controlada de la toxina hacia el periplasma a través de transporte Sec-dependiente (Johnson, *et al.* 2006; Mudrak & Kuehn 2010; Tauschek, *et al.* 2002).

EPEC produce dos tipos distintos de toxina ST que están relacionadas estructural, funcional e inmunológicamente: 1) STa/STI que presenta un papel importante en las enfermedades humanas y 2) STb/STII en animales, especialmente puercos. Esta enterotoxina es codificada por un plásmido trasmisible como un prepropéptido de 72 aminoácidos. La pre-secuencia de aminoácidos (1-19 aa) es un péptido señal que dirige su traslocación a través de la membrana interna, proceso mediado por la maquinaria Sec. Durante su

traslocación a través de la membrana externa se escinde para generar a la enterotoxina madura (STh, 54 a 72 aa ; STp, 55 a 72 aa), pequeños péptidos ricos en cisteína que se unen al dominio extracelular de la guanilil ciclasa c (GC-C) presente en la zona apical de las células del epitelio intestinal. Ésta interacción activa el dominio catalítico intracelular de la GC-C permitiendo la acumulación intracelular de GMPc (Hughes, *et al.* 1978; Schulz, *et al.* 1990). El incremento del GMPc activa a la cinasa II dependiente de GMPc que fosforila a CFTR conduciendo a la secreción de cloro, la inhibición de la absorción de NaCl y la pérdida de agua (Chao, *et al.* 1994).



**Figura 5. Mecanismo de acción de las toxinas LT y ST.** A<sub>1</sub> es la subunidad activa de toxina LT, A<sub>2</sub> fija A<sub>1</sub> a B; la IB se fija a la subunidad GM1.

## **ANTECEDENTES DIRECTOS**

### **4. Crecimiento y expresión de factores de virulencia por *E. coli***

La habilidad de las enterobacterias para proliferar y colonizar los tejidos del hospedero depende directamente de su habilidad para obtener nutrientes. El estricto requerimiento por iones metálicos durante la proliferación y la patogénesis es debido a la participación de estos en procesos que van desde el metabolismo bacteriano hasta la expresión de los factores de virulencia, es por ello que las cepas patógenas de *E. coli* deben competir por los nutrientes con el hospedero y numerosos microorganismos comensales que residen en los tramos inferiores del intestino (Skaar 2010).

Durante la infección, una de las líneas de defensa del hospedero es la inmunidad nutricional, proceso que consiste en restringir el acceso a los nutrientes eN proteínas de almacenamiento que son capaces de quelar los iones metálicos y así, limitar las concentraciones disponibles para las bacterias patógenas (Kehl-Fie and Skaar 2010).

*E. coli* ha desarrollado sistemas de detección, adquisición y transporte que le permiten censar las alteraciones en las concentraciones de los elementos distribuidos dependiendo de su función biológica y de sus características químicas. Las fuentes elementales para la nutrición de este microorganismo son el carbono, hidrógeno, oxígeno, nitrógeno, azufre, fósforo, potasio, magnesio, calcio; destacando los elementos traza como el hierro, zinc, cobalto, manganeso, cobre y molibdeno (Skaar 2010).

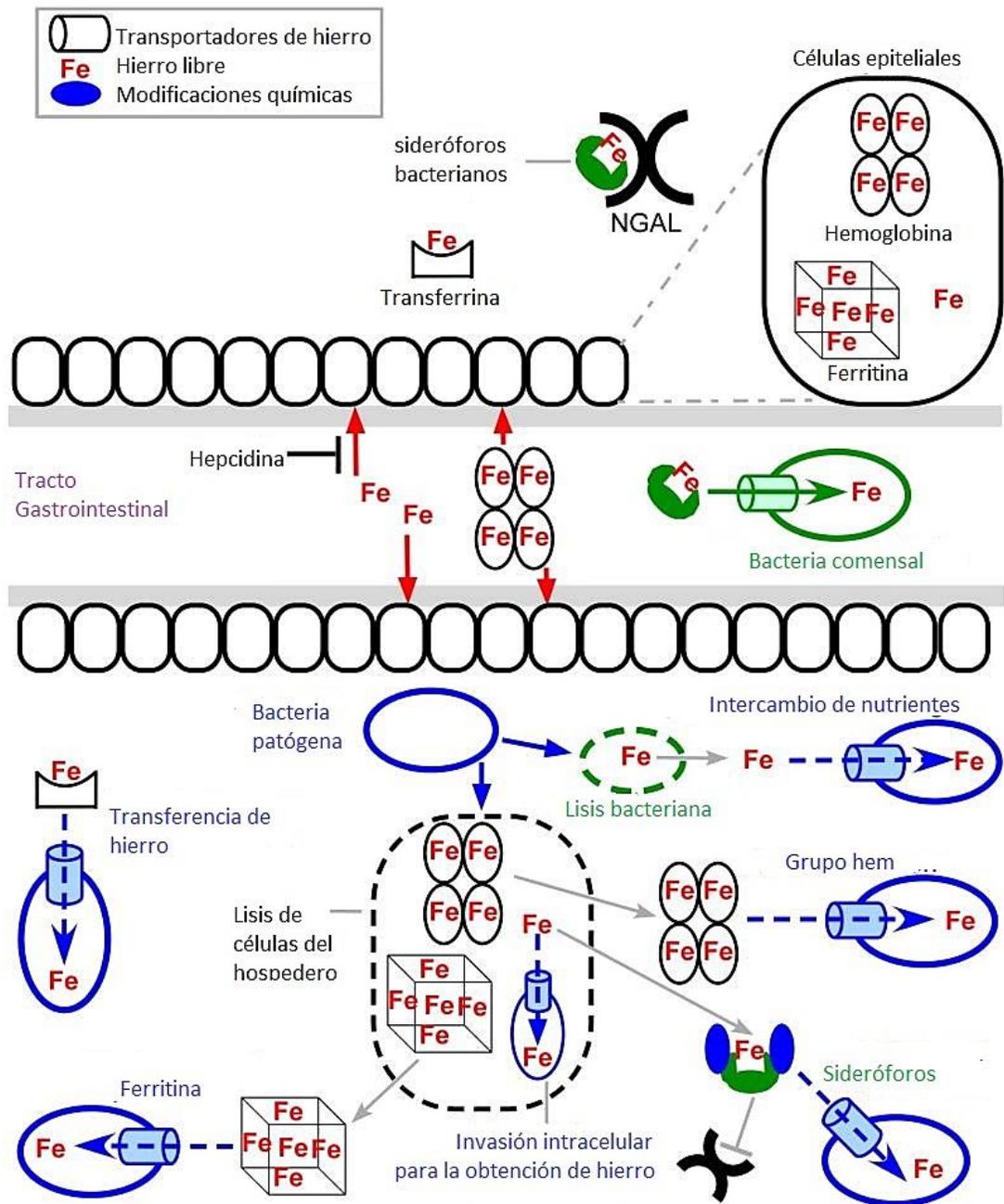
#### **4.1 Dependencia de Hierro**

El  $Fe^{2+}$ , a diferencia de otros nutrientes esenciales, no se encuentra disponible en el hospedero debido a que intracelularmente está asociado a proteínas de almacenamiento como la ferritina, la hemoglobina y la mioglobina, y extracelularmente a la transferrina y la lactoferrina; lo que constituye un factor limitante para el crecimiento y proliferación bacteriana. Además, el ambiente aeróbico y el pH neutro aseguran que el hierro extracelular sea insoluble ( $Fe^{3+}$ ). En conjunto, estos factores aseguran que la cantidad de hierro libre

disponible para los microorganismos invasores sea menor a los requerimientos necesarios para su replicación (Skaar, 2010).

En particular, los requerimientos de este ion dependen directamente de los procesos celulares en los que está involucrado, como la generación de energía, la replicación del DNA, el transporte de oxígeno y en los sistemas de protección contra el estrés oxidativo. La detección del hierro en el medio extracelular por parte de la bacteria involucra un control transcripcional mediado por el regulador de la expresión de genes involucrados en la captación de  $\text{Fe}^{2+}$  (FUR, por sus siglas en inglés, *Ferric Uptake Regulator*) el cual, en presencia del metal se une a secuencias específicas en la región promotora de los genes regulados por este ion con el fin de inhibir su expresión. En ausencia de hierro, FUR pierde la capacidad de unirse y los genes pueden transcribirse (Skaar 2010).

En *E. coli* la expresión de diversos genes que codifican a proteínas involucradas en la captación, proceso y almacenamiento de  $\text{Fe}^{2+}$ , son reguladas por el sistema FUR. El mecanismo empleado para la captación de este metal es la producción y secreción de quelantes férricos de bajo peso molecular y alta afinidad conocidos como sideróforos que lo solubilizan para poder transportarlo. Las bacterias Gram (-) captan los complejos hierro-sideróforo mediante receptores de la membrana externa en un proceso impulsado por el potencial de la membrana citosólica y mediado por el sistema transductor de energía TonB-ExbB-ExbD (**Figura 6**) (Skaar 2010).



**Figura 6. Mecanismos de obtención del hierro en el hospedero:** bajo condiciones normales las bacterias comensales presentes en el tracto gastrointestinal usan sideróforos como sistemas de obtención de hierro. Tomado y modificado de (Ma, *et al.* 2015).

## 4.2 Dependencia de Zinc

El  $Zn^{2+}$  es un ion metálico esencial que a diferencia del  $Fe^{2+}$ , no participa en reacciones redox pero está involucrado en la expresión génica bacteriana, el metabolismo celular y es cofactor de factores de virulencia, por lo tanto, las fluctuaciones en su concentración tanto en el medio extracelular como en el intracelular afecta la fisiología y la supervivencia de los microorganismos patógenos (Porcheron, *et al.* 2013). Se ha demostrado que la muerte celular puede ser inducida en diferentes tipos celulares a través de la disminución de la concentración de  $Zn^{2+}$  del medio de cultivo con el uso de quelantes, siendo su homeostasis crucial en el crecimiento, sobrevivencia y virulencia de las especies patógenas (Grass, *et al.* 2002; Kumari, *et al.* 2017).

La detección de los niveles de este metal en las enterobacterias involucra un control transcripcional mediado por el regulador de la expresión de genes involucrados en la captación de zinc (ZUR, por sus siglas en inglés, *Zinc Uptake Regulator*) que activa o inhibe la expresión de los genes que codifican a proteínas involucradas en los sistemas de adquisición de alta y baja afinidad como transportadores, canales y bombas de iones divalentes. El transporte y la distribución de este ión a través de la membrana interna es mediado principalmente por dos tipos de transportadores, el ZnuABC que pertenece al grupo C9 de la familia de transportadores ABC que actúa en concentraciones moderadas de Zn, y el transportador ZupT, perteneciente a la familia ZIP que actúa en concentraciones bajas de Zn y además, puede transportar Fe (Gilston, *et al.* 2014, Hantke 2005).

El  $Zn^{2+}$  presenta un efecto antimicrobiano disminuyendo la severidad y el riesgo de padecer ataques de diarrea prolongados. Estudios de Surjawidjaja *et al.* (2004) demuestran que concentraciones entre 1.2 y 1.8 mg/ml de sulfato de zinc hepta-hidratado ( $ZnSO_4$ ) inhiben el crecimiento de patógenos asociados con gastroenteritis. De acuerdo a los reportes de Sazawal k *et al.* (2004) pequeñas dosis diarias de 20 mg, equivalentes a 88 mg de sulfato de zinc, son efectivas para inhibir el crecimiento de especies patógenas

manifestando que no solo tiene un efecto terapéutico sino también bactericida (Surjawidjaja, *et al.* 2004)

## **5. Regulación transcripcional en *E. coli***

Las bacterias son microorganismos con un mecanismo complejo y eficiente para responder a los estímulos externos modificando su patrón de expresión génica. El principal paso en la regulación de la expresión génica es el inicio de la transcripción, cuyo principal componente es la RNA polimerasa (RNAP). El reconocimiento de los promotores por la RNAP es determinado por el tipo de factor sigma ( $\sigma$ ) asociado. El orden a nivel transcripcional es determinado por el tamaño del promotor y por el impedimento alostérico de la RNAP por la unión de proteínas en regiones río arriba (-35 a -65 nucleótidos) del promotor.

### **5.1 Regulación del crecimiento y expresión de factores de virulencia de *E. coli* por $Fe^{2+}$ y $Zn^{2+}$**

Debido a que el  $Fe^{2+}$  y el  $Zn^{2+}$  son considerados nutrientes necesarios para el crecimiento bacteriano, se han realizado múltiples estudios donde hay un incremento en la proliferación de *E. coli* en presencia de estos iones. La supervivencia bacteriana depende entonces, de las propiedades estructurales, fisiológicas y/o genéticas que les permiten adaptarse a los cambios de su medio externo (Appenzeller, *et al.* 2005).

La respuesta transcripcional de *E. coli* a concentraciones elevadas de iones metálicos como el zinc, cadmio, cobre, níquel y hierro ha sido evaluada para lograr entender los mecanismos que le permiten mantener la homeostasis correspondiente a cada uno de ellos (Yamamoto and Ishihama 2005). Sin embargo, poco se conoce acerca de la respuesta de este microorganismo ante la deficiencia de dichos iones, por ello, mediante el uso de TPEN (*N, N, N', N'*-tetrakis (2- pirimidilmetil) etilendiamina), un quelante de  $Zn^{2+}$  permeable a la membrana plasmática celular, se generó un estado de estrés en la bacteria que hizo posible estudiar el comportamiento en la ausencia de Zn. Mediante, microarreglos de DNA y RT-PCR, se analizaron los niveles de expresión génica donde se observan cambios significativos en la transcripción de

diversos genes, en particular, una regulación positiva de los genes que codifican a componentes del sistema de transporte ZnuABC como el gen *znuC* que codifica a la ATPasa del complejo y el gen *znuA* que codifica a un componente periplásmico específico de  $Zn^{2+}$  (Sigdel, *et al.* 2006).

### **5.2 Regulación en la expresión de factores de virulencia de los patotipos de *E. coli* por $Fe^{2+}$ y $Zn^{2+}$**

El efecto del  $Zn^{2+}$  sobre los niveles de transcrito del gen *bfp* que codifica al pili Bfp de EPEC se evaluó mediante PCR tiempo real (qRT-PCR, por sus siglas en inglés, *Quantitative real-time PCR*) demostrando que este ion actúa como inhibidor de la ecto-5'-nucleotidasa (enzima propia del hospedero que cataliza la hidrólisis del 5'-AMP extracelular a adenosina) y reduce la abundancia de los RNA mensajeros (mRNA) codificados por el gen *bfp*; evento que favorece la disminución significativa de la adhesión de las bacterias al epitelio (Crane, *et al.* 2007).

En EAEC se ha demostrado que el Zn inhibe la adhesión al epitelio, la formación de biopelículas, la expresión de factores de virulencia; y favorece la producción de citocinas que benefician al hospedero infectado (Medeiros, *et al.* 2013).

### **5.3 Regulación en la expresión de factores de virulencia de ETEC por $Fe^{2+}$ y $Zn^{2+}$**

Poco se sabe con respecto al efecto de estos iones sobre los factores de virulencia de ETEC, sin embargo, algunos reportes en la literatura proporcionan información fundamental para inferir que actúan en los diferentes procesos involucrados en su patogénesis.

Mediante hemaglutinación, Karjalainen *et al.* (1991) examinaron el efecto del sulfato ferroso ( $FeSO_4$ ) en la actividad de la fimbria CFA/I de ETEC H10407. Sus resultados demostraron que la función de CFA/I es sensible a las fluctuaciones en la concentración de hierro en forma de sal en el medio de cultivo (0.0008, 0.03, 0.0125, 0.05 y 0.2 mM de  $FeSO_4$ ). Lo anterior, se confirmó mediante la generación de cepas de H10407 mutadas en sitios

específicos del gen que codifica a la fimbria CFA/I, encontrando que el efecto represivo es mediado por la proteína FUR que interactúa con el promotor ubicado en el gen que codifica a *cfaB* (Karjalainen, *et al.* 1991).

En años recientes, para identificar que componentes del ambiente intestinal modulan la expresión de CFA/I, se expuso a la cepa H10407 a diferentes estímulos como mucinas, bicarbonato, norepinefrina, lincomicina, fuentes de carbono y cationes ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ ), Haines *et al.* encontraron que al añadir 1,10-fenantrolina al medio de cultivo, se obtenía como resultado una disminución en la expresión de este factor de colonización (Haines, *et al.* 2015).

Hasta la fecha, se ha reportado por diferentes autores el efecto del  $\text{Zn}^{2+}$  y el  $\text{Fe}^{2+}$  a nivel transcripcional en general, sin embargo, los efectos específicos que ejercen en la expresión de las enterotoxinas LT, ST y la fimbria CFA/I y otros factores de colonización no son del todo conocidos. Por ello, estudiar las variaciones en estos factores de virulencia generará información indispensable para entender el mecanismo de patogénesis de ETEC y los factores que influyen en la misma.

## **II. JUSTIFICACIÓN**

Durante una infección gastrointestinal por bacterias se produce un desequilibrio osmótico que conduce a la secreción de iones indispensables para las células del hospedero, como el  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{HCO}_3^-$ ,  $\text{Fe}^{2+}$  y el  $\text{Zn}^{2+}$ . Estos dos últimos elementos se caracterizan por participar en el establecimiento, crecimiento y la proliferación bacteriana. A la fecha son pocos los estudios relacionados con los cambios inducidos por  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en el crecimiento bacteriano, expresión de factores de virulencia en cepas de ETEC. La determinación de los efectos de estos iones sobre cepas ETEC, una de las principales causantes de diarrea en niños menores de 5 años, permitirá expandir estos conocimientos para la prevención de las infecciones producidas por este patógeno.

## **III. HIPÓTESIS**

El crecimiento y la expresión de los genes *estA*, *eltA*, *eltB* y *cfal* de cepas ETEC de referencia presentan una regulación diferencial por el efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .

## **IV. OBJETIVOS**

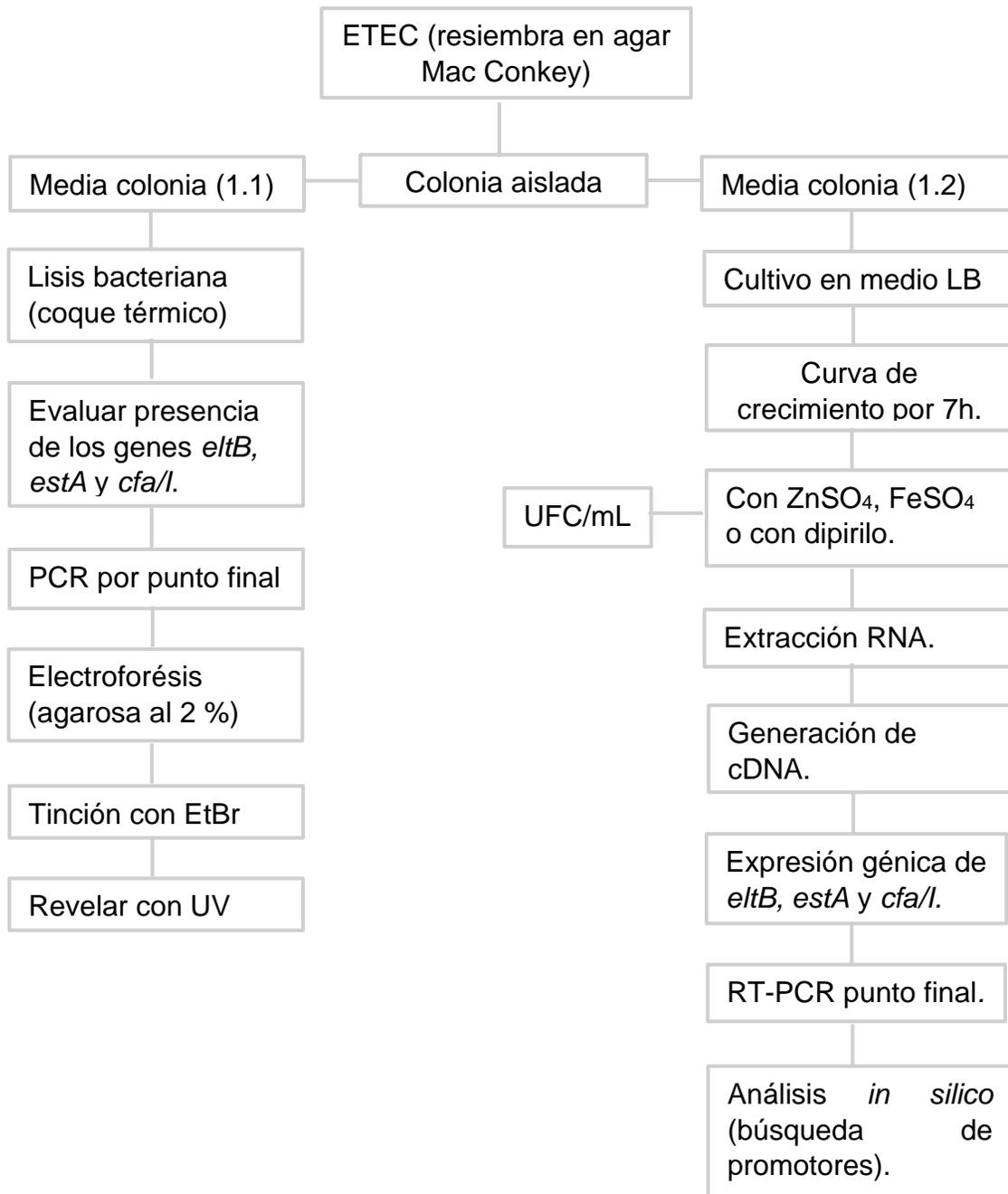
### **GENERAL**

Evaluar el efecto del  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en el crecimiento y expresión de factores de virulencia en cepas de ETEC.

### **PARTICULARES**

- Determinar el efecto de concentraciones diferenciales de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$  en la multiplicación bacteriana de las cepas de ETEC: H10407 y ATCC 35401.
- Analizar *in vitro* a nivel transcrito la expresión de las las toxinas LT, ST y la fimbria CFA/I de las cepas de ETEC a diferentes concentraciones de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .
- Analizar *in silico* las regiones promotoras de las toxinas LT, ST y la fimbria CFA/I en búsqueda de elementos regulatorios dependientes de  $\text{Fe}^{2+}$  y  $\text{Zn}^{2+}$ .

## V. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



## VI. MATERIALES Y MÉTODOS

**Cultivo bacteriano.** Las cepas de referencia (**cuadro 2**) se cultivaron en agar MacConkey por 24 h, al término se seleccionó una colonia aislada y se tomó la mitad de ella para ser inoculada en medio Luria Bertani (LB) líquido que se incubó por 16 h a 37 °C sin agitación.

**Cuadro 2.** Descripción de las cepas bacterianas.

<i>E. coli</i> patotipo	Cepa	Descripción	Adhesión	Referencia
ETEC	H10407	ETEC prototípica O78:H11	Mediada por CF	Evans <i>et al.</i> , 1975
ETEC	ATCC 35401	O78:H11	–	ATCC

*Preparación de 1 LT de caldo LB: Se disolvieron 10 g de peptona (MCD labt®), 5 g de extracto de levadura (MCD lab®) y 10 g de NaCl (PM. 58.44 g/mol, CTR®). en 800 mL de agua Mili-Q en agitación constante, se ajustó el pH hasta 7 con NaOH 1M o con HCL concentrado y se aforó a 1000 mL. Se esterilizó por autoclave 15 lbs, 121°C por 15 minutos.*

**Obtención del lisado bacteriano.** Se re-suspendió media colonia lactosa (+) aislada de medio Mac Conkey en 1mL de agua estéril. Posteriormente, las bacterias se lisaron por choque térmico (un solo pase en agua hirviendo y manteniendo en hielo hasta su uso).

**Determinar la presencia de genes por PCR punto final durante la curva de crecimiento.** Del lisado bacteriano, se tomaron 2 µL y se analizó la presencia de los genes que codifican a las enterotoxinas ST, LT y a la fimbria CFA/I por PCR punto final la cual se llevó acabo con la mezcla de reacción descrita en el **cuadro 3**.

**Cuadro 3.** Componentes y concentraciones de la mezcla de reacción de PCR.

Componentes	Concentración en la reacción
Taq Buffer 10X	1X
MgCl <sub>2</sub>	1.70 mM
dNTPs	75 µM
Primers (sentido y antisentido)	0.4 µM
Taq polimerasa	0.5 U/µL
DNA	2 µL
H <sub>2</sub> O	Hasta alcanzar un volumen de 25 µL

**Programa de amplificación.** Para la amplificación de los fragmentos de DNA de interés se emplearon los oligonucleótidos presentados en el **cuadro 4** y un termociclador (BioRad®). Primeramente, se realizó una desnaturalización inicial a 95 °C por 3 minutos, posteriormente se sometieron a 30 ciclos que constan de una desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, alineamiento a la T<sub>m</sub>' específica de cada oligonucleótido por 45 segundos y una extensión a 72 °C por 1 minuto. Se realizó una extensión final a 72 °C por 10 minutos.

**Cuadro 4.** Iniciadores para la amplificación de los genes que codifican a los factores de virulencia LT, ST y CFA/I de ETEC.

Factor de virulencia	Gen	Secuencia de oligonucleótidos de 5' a 3'		Producto (pb)	Autor
		Sentido	Antisentido		
LT	<i>eltB</i>	ACG GCG TTA CTA TCC TCT C	TGG TCT CGG TCA GAT ATG TG	274	Sjoling, Qadri et al. 2006
ST	<i>estA</i>	TCA CCT TCC CCT CAG GAT G	TAC AAG CAG GAT TAC AAC AC	160	Sjoling, Qadri et al. 2006

<b>CFA/I</b>	<i>cfa/I</i>	GCT CTG ACC ACA ATG TTG A	TTA CAC CGG ATG CAG AAT A	364	Ghosal, Bhowmick <i>et al.</i> 2007
--------------	--------------	------------------------------	------------------------------	-----	---

**Detección de los productos de PCR por electroforesis.** Para la detección del amplificado se emplearon 5 µL del amplicón y se analizó en un gel de agarosa al 2% con amortiguador TAE 1X (Gibco BRL®). Se tiñó el gel con 1µg/mL de bromuro de etidio (EtBr, 10 mg/mL, Norgen Biotek Corporation®) por 15 min en un contenedor con 100 mL de agua MiliQ. Posteriormente, se reveló en un transiluminador de luz ultravioleta y se capturó el resultado con un equipo automatizado (ImageMaster VDS-Parmacia Biotech).

*Preparación de buffer TAE 50X. Se disolvieron 242.0 g de tris base (PM. 121.14 g/mol, Sigma-Aldrich®), 57.1 ml de ácido acético glacial (PM. 60.05 g/mol, Merck®) y 37.2 g de EDTA (PM. 292.24 g/mol, Sigma-Aldrich®) en 800 ml de H<sub>2</sub>O Milli-Q en agitación constante, se aforó a 1000 mL y se esterilizó por autoclave 15 lbs, 121°C por 15 minutos.*

**Cinética de crecimiento.** Para determinar la concentración mínima inhibitoria (MIC) de sulfato de zinc (ZnSO<sub>4</sub>) y sulfato ferroso (FeSO<sub>4</sub>), las cepas bacterianas se cultivaron en caldo LB por 16h (precultivo), se analizó la presencia de los genes y a partir de ese cultivo se tomaron alícuotas que se añadieron a caldo LB suplementado con diferentes concentraciones de cada compuesto por separado por 7h, a 37°C, sin agitación (**cuadro 5**). Los datos fueron graficados en GraphPad® versión 6 para la obtención de la curva de crecimiento tiempo-dependiente y analizados mediante el método de comparaciones múltiples de Dunnett.

**Cuadro 5.** Concentraciones de ZnSO<sub>4</sub> y FeSO<sub>4</sub>.

<b>Condición</b>	<b>[ZnSO<sub>4</sub>] µM</b>	<b>[FeSO<sub>4</sub>] µM</b>
1	0	0
2	250	250
3	500	500

4	1000	1000
5	2000	2000

---

*Preparación de la solución madre de ZnSO<sub>4</sub> (PM. 287.54 g/mol, Fermont®) de 50 μM se disolvió en agua estéril y se esterilizó por filtración (0.22 μm). La solución madre de FeSO<sub>4</sub> (PM. 278.02 g/mol, MCD lab®) de 25 μM se disolvió en agua estéril y se esterilizó por autoclave 15 lbs, 121°C por 15 minutos.*

Las bacterias se cultivaron a 37 °C sin agitación por 7 horas y se evaluó la tasa de crecimiento (turbidez del medio) por nefelometría en un equipo de espectrofotometría iMark® (BioRad), a una longitud de onda de 595 y 600 nm. (Lee, *et al.* 2005).

**Análisis de curvas de tolerancia.** Las cepas se cultivaron en caldo LB por 16h, se analizó la presencia de los genes y a partir de ese cultivo se tomaron alícuotas que se añadieron a caldo LB suplementado con 200 μM de dipirilo a 37°C, sin agitación, siguiendo una cinética de crecimiento de 7 horas (Kumari, *et al.* 2017). Los datos fueron graficados en GraphPad® versión 6 para la obtención de la curva de crecimiento tiempo-dependiente y analizados mediante el método de comparaciones múltiples de Dunnett.

*Preparación de la solución madre de dipirilo 200 μM (PM. 156.18 g/mol, Sigma aldrich®): se disolvió en agua estéril y se esterilizó por filtración (0.22 μm).*

**Determinación de unidades formadoras de colonias (UFC/mL).** Se realizaron diluciones seriadas base 100 y se sembraron en agar soya tripticasa (MCD lab®) a las 0, 1, 2, 3, 5 y 7 horas de la curva de crecimiento. Transcurrido el tiempo de incubación de las placas, se contaron las colonias que crecieron en ellas. Para obtener el resultado se consideró la cantidad de cultivo sembrada (0.01 μL) y el factor de dilución (100). Se calculó la media de las dos placas sembradas por cada condición y se multiplicó por 100. El resultado se expresó en UFC/mL. Los datos fueron graficados en GraphPad® versión 6 para la obtención de la curva de crecimiento tiempo-dependiente y analizados mediante el método de comparaciones múltiples de Dunnett.

**Extracción de RNA.** (1) Se midió la densidad óptica (D.O.) de los cultivos suplementados con ZnSO<sub>4</sub>, FeSO<sub>4</sub> o dipirilo a las 3h (D.O<sub>600</sub>=595nm). (2) Se tomaron y centrifugaron 10 mL del cultivo, a 13,000 r.p.m por 5 minutos para obtener el botón bacteriano, se descartó el sobrenadante, se resuspendió en 50 µL de amortiguador TE-L (Tris EDTA -Lisozima 1mg/mL) y se incubó por 5 minutos a temperatura ambiente (T.A.) (**cuadro 6**).

**Cuadro 6.** Reactivos para la extracción de RNA bacteriano.

D.O.	Trizol (µL)	Cloroformo (µL)	isopropanol (µL)	Etanol(µL)
<b>1</b>	1000	200	500	1000
<b>0.100</b>	100	20	50	100
<b>0.500</b>	500	100	250	500
<b>0.600</b>	600	120	300	600

(3) Se añadió trizol (Invitrogen™) (sol. Monofásica de fenol, isotiocianato de guanidina y otros componentes), se homogenizó con micropipeta y se incubó por 5 minutos a T.A. (4) Se añadió cloroformo, se homogenizó con ayuda del vórtex a velocidad media, se incubó por 3 minutos a T.A. y se centrifugó a 13, 000 r.p.m a 4 °C por 20 minutos. (5) Se separó la fase acuosa en un tubo eppendorf nuevo y se añadió isopropanol, se mezcló suavemente por inversión y se incubó por 10 minutos a T.A. (6) Centrifugar a 13, 000 r.p.m a 4 °C y descartar el sobrenadante. (7) Se lavó dos veces el botón blanco con etanol, se dejó secar y se resuspendió con agua DEPC. (8) Se realizaron alícuotas de 10 µL y se almacenaron a -80 °C hasta su uso (Chomczynski & Sacchi 1987).

*Preparación de la solución de trabajo amortiguadora TE (Tris-EDTA). En un tubo falcón de 50 mL se mezcló 1 mL de Tris-Cl 100 mM, 20 µL de EDTA 500 mM y se aforó con agua DEPC hasta alcanzar un volumen total de 10 mL.*

*Preparación de H<sub>2</sub>O libre de RNAsas. En una botella de vidrio, se añadió 1 ml de DEPC (dietilpirocarbonato, Merck®) a 1000 µl de Milli-Q. Se dejó toda la noche en agitación constante y se esterilizó por autoclave 15 lbs, 121°C por 15 minutos.*

**Evaluación de la integridad del RNA.** Se evaluó mediante la relación A<sub>260</sub>/A<sub>280</sub> en el Nanodrop i2000® y la visualización de las subunidades 16S y 23S se realizó por electroforesis en un gel de agarosa al 1.5%.

**Tratamiento con DNAsa turbo.** Para eliminar el DNA genómico, las muestras de RNA se trataron con DNAsa I (Ambion®). Para ello, se preparó una solución de trabajo de 30 ng/µL de RNA (volumen final de 100 µL) por cada condición. De la solución anterior, se tomaron 6.3 µL (190 ng/ µL de RNA) y se depositaron en un tubo Eppendorf. Se añadieron 5 µL de buffer 10X, 1.5 µL de DNAsa turbo y 37.7 µL de agua DEPC (volumen final 50 µL). Se homogenizó e incubó a 37 °C por 45 minutos. Al concluir el tiempo de incubación, se añadieron 2.5 µL de EDTA 15 mM y se incubó a 75 °C por 10 minutos para inactivar a la enzima. Se realizó una PCR punto final control para confirmar que el tratamiento fue exitoso y descartar falsos positivos en la generación del DNA complementario (cDNA).

*Preparación de EDTA 15 mM a partir de una solución madre de 0.5 M: 30 µL de EDTA + 970 µL de H<sub>2</sub>O DEPC.*

**Retrotranscripción del RNA.** La síntesis del cDNA se llevó acabo empleando el Kit *High Capacity cDNA Reverse Transcription* (Applied Biosystems®) y una mezcla de oligos aleatorios de ocho nucleótidos (en lugar de oligos dT) en un termociclador (BioRad®). La mezcla de reacción de volumen final de 30 µL, se realizó de acuerdo a lo señalado en el **cuadro 7**.

**Cuadro 7.** Reactivos, volúmenes y concentraciones para la generación de cDNA.

<b>Reactivo</b>	<b>[Inicial]</b>	<b>Volumen</b>	<b>[Final]</b>
Amortiguador	10X	3 $\mu$ L	1X
dNTPs	100 mM	1.2 $\mu$ L	4 mM
Oligos aleatorios	10X	3 $\mu$ L	1X
RT	50 U/ $\mu$ L	1.5 $\mu$ L	2.5 U/ $\mu$ L
Inhibidor de RNAsas	–	1.5 $\mu$ L	–
RNA DNAsa (+)	190 ng	19.8 $\mu$ L	72 ng

La mezcla de reacción se incubó en un termociclador BioRad® siguiendo las instrucciones del fabricante: 25 °C por 10 minutos, posteriormente 2 h a 37 °C y por último, 85 °C por 5 minutos. Se realizaron alícuotas de 5  $\mu$ L y se almacenaron a -80 °C hasta su uso.

**PCR-transcriptasa reversa.** Se realizó una dilución 1:5 del cDNA para su uso en la RT-PCR. Se empleó el mismo programa de amplificación de punto final de la página 25 con un aumento a 40 ciclos.

**Análisis densitométrico.** El análisis densitométrico se realizó con el software Image J (<http://rsb.info.nih.gov/nih-image>), los resultados se expresaron como densidad óptica relativa (DOR).

**Análisis *In silico*.** Para analizar la presencia de regiones promotoras presentes en las secuencias de los genes que codifican a la toxina LT y ST, y a la fimbria CFA/I que puedan ser reguladas por la presencia de zinc o hierro; se realizó la búsqueda en el servidor KEGG (<https://www.genome.jp/kegg/>) de las secuencias completas de los plásmidos pETEC948 (94797 pb, No. de acceso en GenBank FN649418) y pETEC666 (66681 pb, No. de acceso en GenBank FN649417) que codifican a los genes EatA, STa 2 (*sta2*), CFA/I

(*cfaABCD*), Etp y STa 1 (*sta1*), LT (*eltA* y *eltB*), respectivamente. Posteriormente, se procedió a ubicar dentro del plásmido la región codificante para cada gen (**cuadro 8**).

**Cuadro 8.** Ubicación genómica de las secuencias codificantes de las toxinas LT y ST, y la fimbria CFA/I de ETEC H10407.

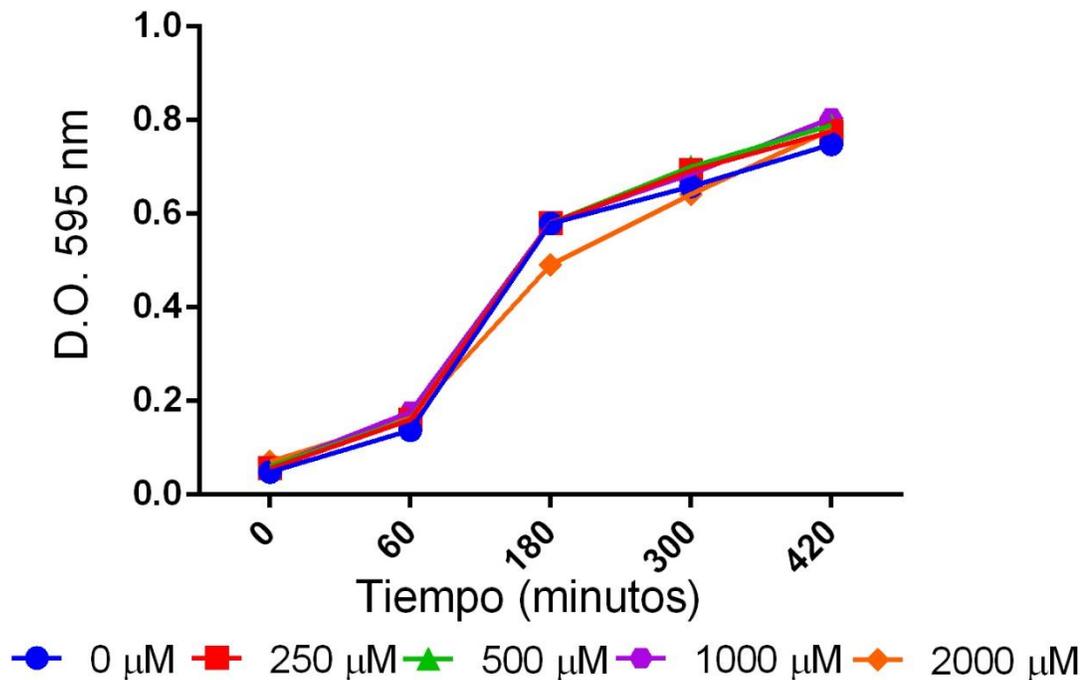
<b>Gen</b>	<b>Código</b>	<b>Ubicación (región, nt)</b>
<i>sta2</i>	ETEC_p948_0360	35727-35945, cadena complementaria
<i>cfaA</i>	ETEC_p948_0390	37826-38542, cadena codificante
<i>cfaB</i>	ETEC_p948_0400	38571-39083, cadena codificante
<i>cfaC</i>	ETEC_p948_410	39148-41757, cadena codificante
<i>cfaE</i>	ETEC_p948_420	41761-42843, cadena codificante
<i>cfaD</i>	ETEC_p948_1080	89307-90104, cadena codificante
<i>eltA</i>	ETEC_p666_0660	50594-51730, cadena complementaria
<i>eltB</i>	ETEC_p666_0650	50223-50597, cadena complementaria

Las regiones indicadas en la cuadro previo, se buscaron en la base de datos de NCBI (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) para su posterior análisis en el servidor BROM (http://www.softberry.com/berry.phtml?topic=bprom&group=programs&subgroup=gfindb) de Softberry, programa de reconocimiento del promotor sigma 70 con aproximadamente el 80% de precisión y especificidad, el cual nos permite la predicción *in silico* de promotores bacterianos.

## VII. RESULTADOS

### Efecto del $\text{Fe}^{2+}$ en el crecimiento de las cepas de referencia H10407 y ATCC 35401 de ETEC.

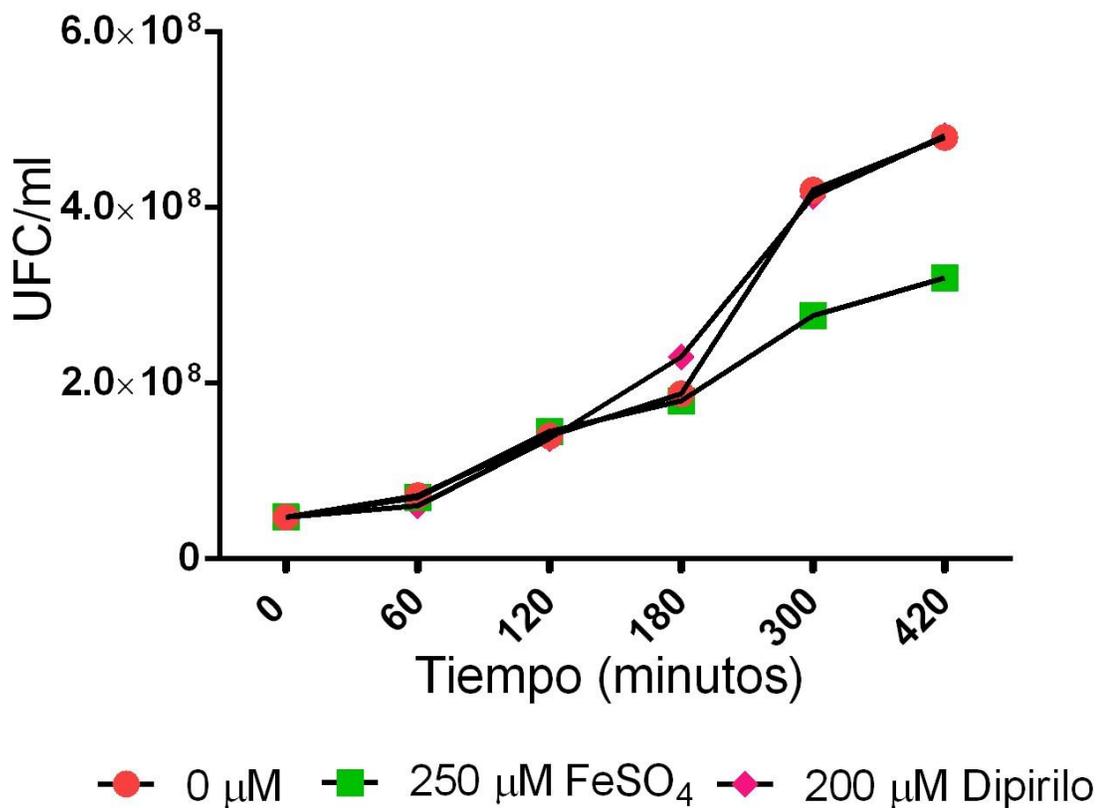
Se evaluó el efecto del hierro en la tasa de multiplicación por espectrofotometría a través de una cinética de 7h. Como se observa en la **figura 7**, este nutriente no presenta un efecto sobre el crecimiento de la cepa de ETEC evaluada, en relación al cultivo que no se suplemento con el metal.



**Figura 7. Crecimiento de la cepa ATCC 35401 en caldo LB en presencia de hierro.** La cepa se incubó en caldo LB suplementado con concentraciones crecientes de  $\text{FeSO}_4$  a  $37^\circ\text{C}$  por 7h y monitoreadas espectrofotométricamente para el registro de las D.O. a la 1, 3, 5 y 7h. Los datos fueron recolectados de tres estudios independientes.

Al no observar cambios en el crecimiento y debido a que la turbidez del caldo puede ser ocasionada por las bacterias viables y los detritos bacterianos, se

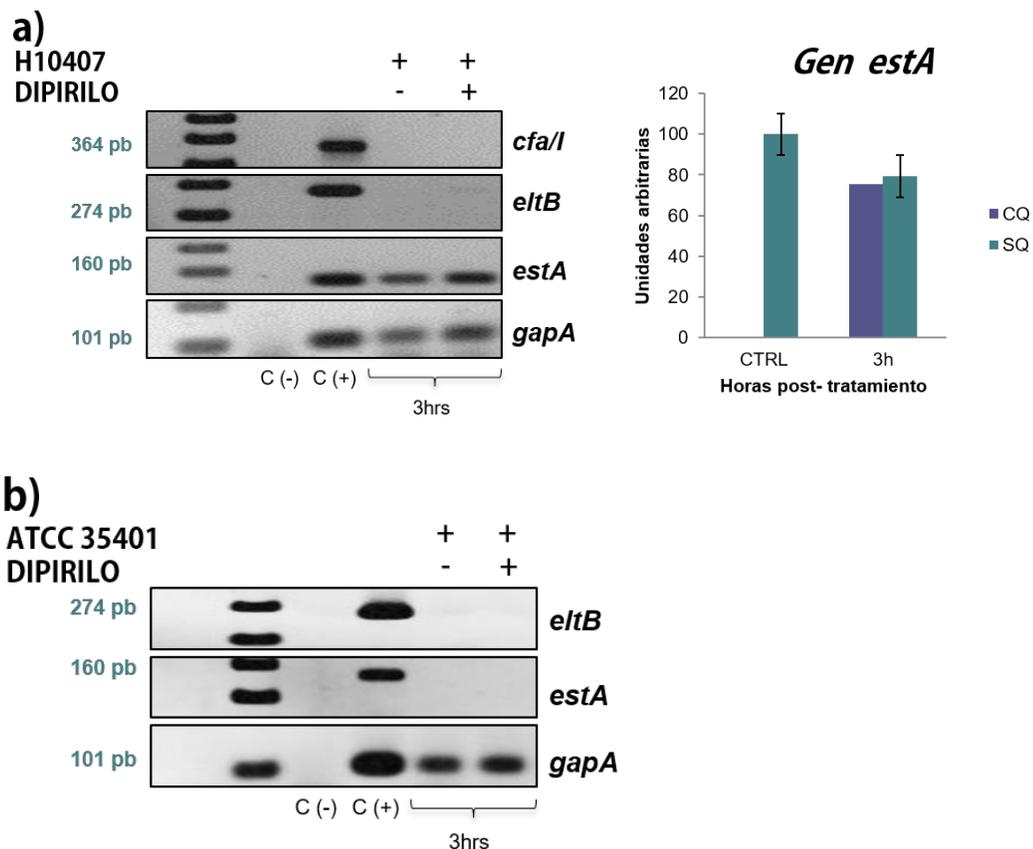
procedió a la cuantificación bacteriana mediante UFC/ml; estos análisis se realizaron empleando la cepa H10407 ya que presenta los tres factores de virulencia de nuestro interés: LT, ST y CFA/I. Por otra parte, se incubó a la cepa en presencia de un quelante de hierro, dipirilo, para generarle un estrés por inanición del nutriente y ver los cambios que se puedan generar en la tasa de crecimiento. Como podemos observar en la **figura 8**, la suplementación con 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  hierro disminuyó el crecimiento de la cepa, en relación al cultivo que no se suplementó con el metal. A diferencia de cuando se utilizó el dipirilo, el cual no tuvo efecto en el crecimiento de la cepa, en comparación a las bacterias cultivadas en caldo sin suplementar.



**Figura 8. Crecimiento de la cepa H10407 en caldo LB en presencia de hierro y dipiridilo.** La cepa se incubó en caldo LB suplementado con 250  $\mu\text{M}$  de  $\text{FeSO}_4$  y 200  $\mu\text{M}$  de dipirilo, por separado, a 37°C por 7h y se obtuvieron las UFC/mL a la 1, 3, 5 y 7h. Los resultados se compararon con el crecimiento bacteriano en ausencia de  $\text{FeSO}_4$  y de dipirilo.

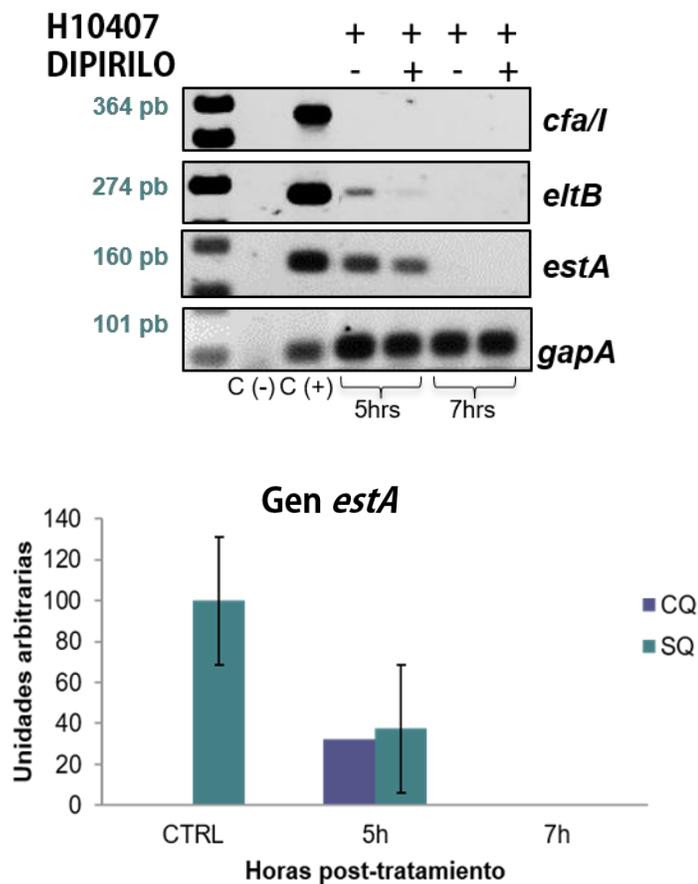
**Análisis a nivel de transcritos de las toxinas LT y ST, y de la fimbria CFA/I a las 3 h de la curva de crecimiento con dipirilo de las cepa H10407.**

Para determinar el efecto del hierro, se evaluó la expresión del transcrito de los factores de virulencia a las 3h de incubación (mitad de la fase logarítmica) con y sin 200  $\mu$ M de dipirilo. Para la cepa H10407, la expresión del gen *estA* fue mayor en presencia del quelante (**figura 9a**), y en ninguna de las dos condiciones se expresaron los transcritos de los genes *elt* y *cfa*; la cepa ATCC 35401, no expresó ninguno de los transcritos de los genes en presencia o ausencia del quelante (**figura 9b**).



**Figura 9. Evaluación por RT-PCR del perfil de expresión a las 3h de los genes *eltB*, *estA*, *cfa/I* y *gapA* en presencia de dipirilo. a) Perfil de expresión de la cepa H10407 en respuesta a dipiridil a las 3 h de la curva de crecimiento. Abreviaturas del gráfico donde CQ: con quelante, SQ: sin quelante. b) ATCC 35401, en respuesta a dipiridil a las 3 h de la curva de crecimiento.**

Este resultado nos dirigió a analizar la fase post-logarítmica (5 h) y estacionaria (7 h) en la cepa H10407 (**figura 10**) donde se observó que la expresión de la toxina LT a las 5 h es mayor en condiciones basales que en presencia de dipirilo, esto debido a que el quelante restringe el hierro que es necesario para estimular a la bacteria a la expresión de esta toxina. Con respecto a la expresión de la toxina ST a las 5h, en condiciones basales la expresión fue mayor que en presencia de dipiridil. A las 7h ambas toxinas dejaban de expresarse, hecho que puede deberse a que la bacteria se encuentra en la fase estacionaria. Por último, la fimbria CFA/I no se expresó en ninguna de las horas evaluadas.



**Figura 10. Evaluación por RT-PCR del perfil de expresión a las 5 y 7h de los genes *elt*, *sta2*, *cfa* y *gapA* en presencia de dipirilo.** La evaluación de la cepa H10407 en respuesta a dipiridil a las 5 y 7h de la curva de crecimiento.



CTAGTTTTCCATACTGATTGCCGCAATTGAATTGGGGTTTTATTCCATACACATAATTTATCAATTTGGTCTCGGTCAGATATGTGATTCTTAATGTGCTTCATCCTTTCAATG  
 GCTTTTTTTGGGAGTCTATATGTTGACTGCCCGGACTTCGACCTGAAATGTTGCGCCGCTCTTAAATGTAATGATAACCATTTCTCTTTTGCCTGCCATCGATTCCGTATATGATAG  
 TATCTTGTCAATTTATCGTATATATTTGTGTTCGATATTCGAAACATAGTTCTGTAATAGACTGGGAGCTCCGATGCACATAGAGAGATAGTAACGCCGTAATAAACATAAC  
 ATTTTACTTTATTCATAATTCATTCCGAATTCGTTATATATGTCAACCTCGACTGATAGTCTGAAAATATCGCCTCTTAACCTTTGATTGATATTTCTGAGATATATTGTGCTCAGAT  
 TCTGGGTCTCCTCATTACAAGTATCACCTGTAATTGTTCTTGATGAATTTCCACAACCTTGTGGTGATGATGAATCCAGGGTTCTTCTCTCCAAGCTTGGTGATCCGGTGGGAAACC  
 TGCTAATCTGTAACCATCCTCTGCCGGAGCTATATTCAGATTTCTGTAATACCGGTCTCTATAATCCCTGTTACGATGTAATCGTTCAATCACACAAAAATTAACAGBATAACCATCC  
 ATATATCTGAGAATATGGTATTCACCTAACGCAAGAACCTCCTGTTTATGATGTTGAGTCTCTATCGAAGTACTCATTATGCCCTCTGGGCATAAGACCTCCGGAACGTTTTATTTTATCTGGGGTCTAGAGTCAACAT  
 ATATATAGTAAGTGAATATCCGATAATATAGACTGTCTGCTAAGTGAGCCTTCTCAAACAAAGAAAGTGAACATATCCGTCATCATATCTGACAAAGCCGGTTTGTGTTCTCT  
 CTCGCGTATCATAAAGATAATATTCAATTTGAGTTCCTCTATCGAAGTACTCATTATGCCCTCTGGGCATAAGACCTCCGGAACGTTTTATTTTATCTGGGGTCTAGAGTCAACAT  
 GGTATAATTTGTCGCCATTTGCATATAATGGCGATGCTAATAAAATAAAAAAATGAAAGTTATATTTTTTCATCGAGGAAAACCTTATATATCATAAAGAAAGCAATCCGAAAAAGATA  
 ACGCCACTGTTTTTTAACCTATATGCAACATGATGCAATCATGTTTTTATAAAACATCCATGCGAGGATAAAAATGTGTAGTGAAGCGATAAAGAAAGAGTGCATCGTTTTTCATG  
 CCGGAGACGAATGTGAGAAAGGTGTACATTGAATCATGGCAACCTGATTATTTTTATTAGTCCGACTTGAACCCACGGCAGCTTGGCGGCTGCAAAATCGGGGGTGGCAGAATATG  
 AGCTTTTCAAGTAACCATCCAGAATGAGTCCCATGTACACAACTGGAGCACCAGAAAGTCCACACCAGAATGGTGAAGAGGTTCTGAAAAGCCGTCGCCAGCAATAATCAC  
 CCTTATCAGTCCGATTTACAGACTTTATCGCTGGTGCATCCCTCCTGCACGGTCTGTTTCTGGGAAACCTTCCACAAAATGTACCCGGATTCACCGCACGAATACGTCCAGTTCTGCC  
 ATACCTGCCGTCGTTTTGATTATACGAAACAGAAAGCGGAGATGAAGCGGATGACCCGAAGTGGTGGTATTTTTCAGTCCCAGCCGCTGAAACGCTGTTCAACAACCAACCAAGT  
 CTGGACATCCTTCTGGATGCGGGCGGTCTGCGCGATATCGAGGTTGAGGCTGTACAAAATGCTGGCCTGCGGCACGCGGATACTGGGAGT

- 10

- 35

**Figura 12. Análisis *in silico* de la región promotora de *eltAB*.** Se indica con flechas negras (←) el inicio de (GTTATATTTTTCAT) y (→) el término (TCATAATTCATTCC) de la región codificante de *eltA* y con flechas rojas (←) el inicio (TATTCAT) y (→) el término (CTAGTTTTCCATA) de la región codificante de *eltB*. Asimismo, se indican los elementos putativos -10 y -35 de la región promotora de los genes.

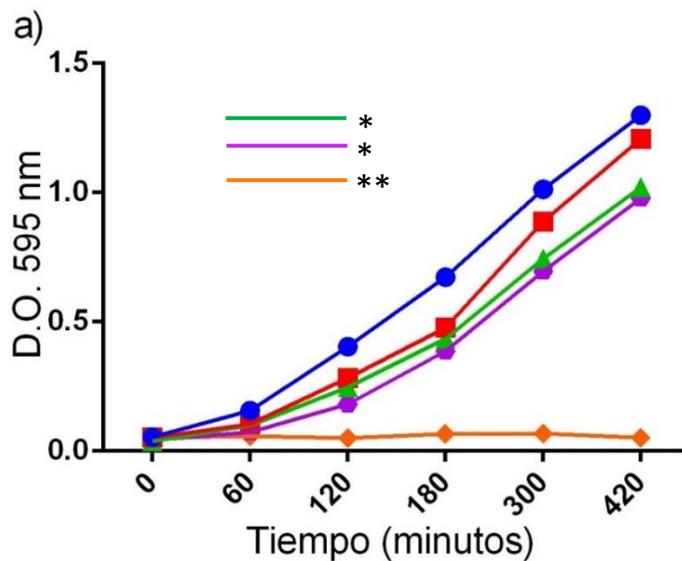
→  
 TCATAATTCATTCCGAATTCTGTTATATATGTCAACCTCTGACTGATAGTCTGAAAATATCTGCCTCTTAACTTTTGATTGATATTTCTGAGATA  
 TATTGTGCTCAGATTCTGGGTCTCCTCATTACAAGTATCACCTGTAATTGTTCTTGATGAATTTCCACAACCTTGTTGGTGCATGATGAATCCA  
 GGGTTCTTCTCTCCAAGCTTGGTGTCCGGTGGGAAACCTGCTAATCTGTAACCATCCTCTGCCGGAGCTATATTCAGATTTCTGTAATACC  
 GGTCTCTATATCCCTGTTACGATGTAATCGTTCATCAATCACACCAAAATTAACACGATACCATCCATATATCTGAGAATATGGTATTCCACCT  
 AACGCAGAAACCTCCTGTTTCATATGGGTGAGGGCTGTATACGCCCTAATACATCATTAAACATATTTGGTGTGCTGCTGCTATAACATATA  
 TATAGTAAGTGGAAATATCCTGATAATATAGACTGTCCTGCTAAGTGAAGTCTCAAACCTAAGAGAAGTGGAAACATATCCGTCATCATATCT  
 GACAAAGCCGGTTTGTGTTCCCTCTCGCGTGATCATAAGATTAATATTCATTTGAGTTCCTCTATCGAAGTACTCATTATGCCCTCTGGGCAT  
 AAGACCTCCGGAACGTTTTATTTTCATCTGGGGTCTAGAGTCAGCACGGTATAATTTGTCGCCATTTGCATATAATGGCGATGCTAATAAAAT  
 AAAAAAATGAAAGTTATATTTTTCATCGAGGAAAACCTTATATATCATAACAAGAACAATCCGGAAAAAGATAACGCCACTTGTGTTTTGTTAA  
 CCTATATGCAACATGATGTCAATCATGTTTTTATAAAACATCCATGCGAGGATAAAATGTGTAGTGAAAGCGATAAAGAAAGAGTGCATCGTT  
 TTCATGCCGGAGACGAATGTGAGAAAGGTGTACATTGAATCATGGCAACCTGATTATTTTATTAGTCGCGACTTGAACCACGGCAGCTTG  
 GCGGCTGCAAATCGGGGGGTGGCAGAATATGAGCTTTCAGAGTAACCATCCAGAATGAGTTCCCATGTCACACAACCTGGAGCACCAGAA  
 AGTCCACACCAGAATGGTAAAGAGGTTCTGAAAGCCGTCGCCAGAGCCAATAATCACCCCTTATCAGTCCGTATTTACAGACTTTATCGCT  
 GGTATCCCTCCTGCACGGTCTGTTTCTGGGAAACCTTCCACAAAATGTACCCGGATTACCCGCACGAATAC

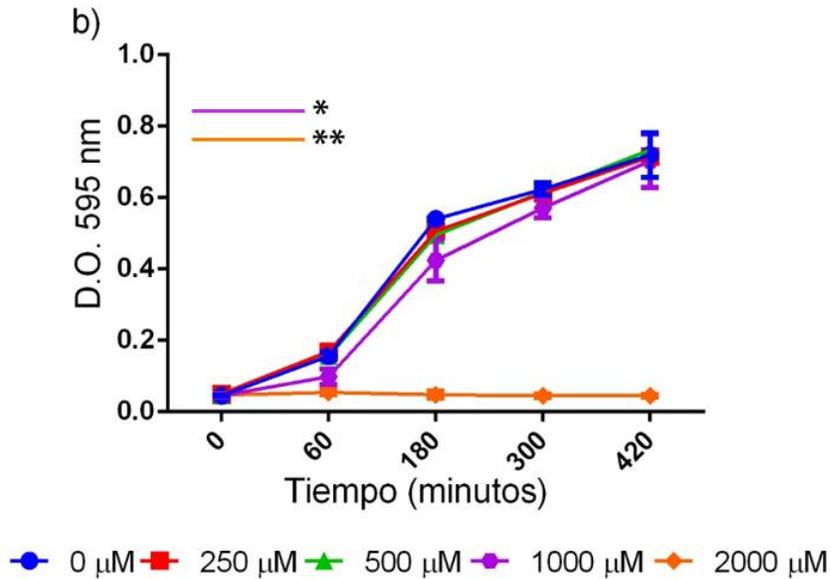
**Figura 13. Análisis *in silico* de la región promotora de *estAB*.** Se indica con flechas negras (←) el inicio de (GTTATATTTTTCAT) y (→) el término (TCATAATTC) de la región codificante de *estA*. Asimismo, se indican los elementos putativos -10 y -35 de la región promotora de los genes.

### **Efecto del Zn<sup>2+</sup> en el crecimiento de las cepas de referencia H10407 y ATCC 35401 de ETEC.**

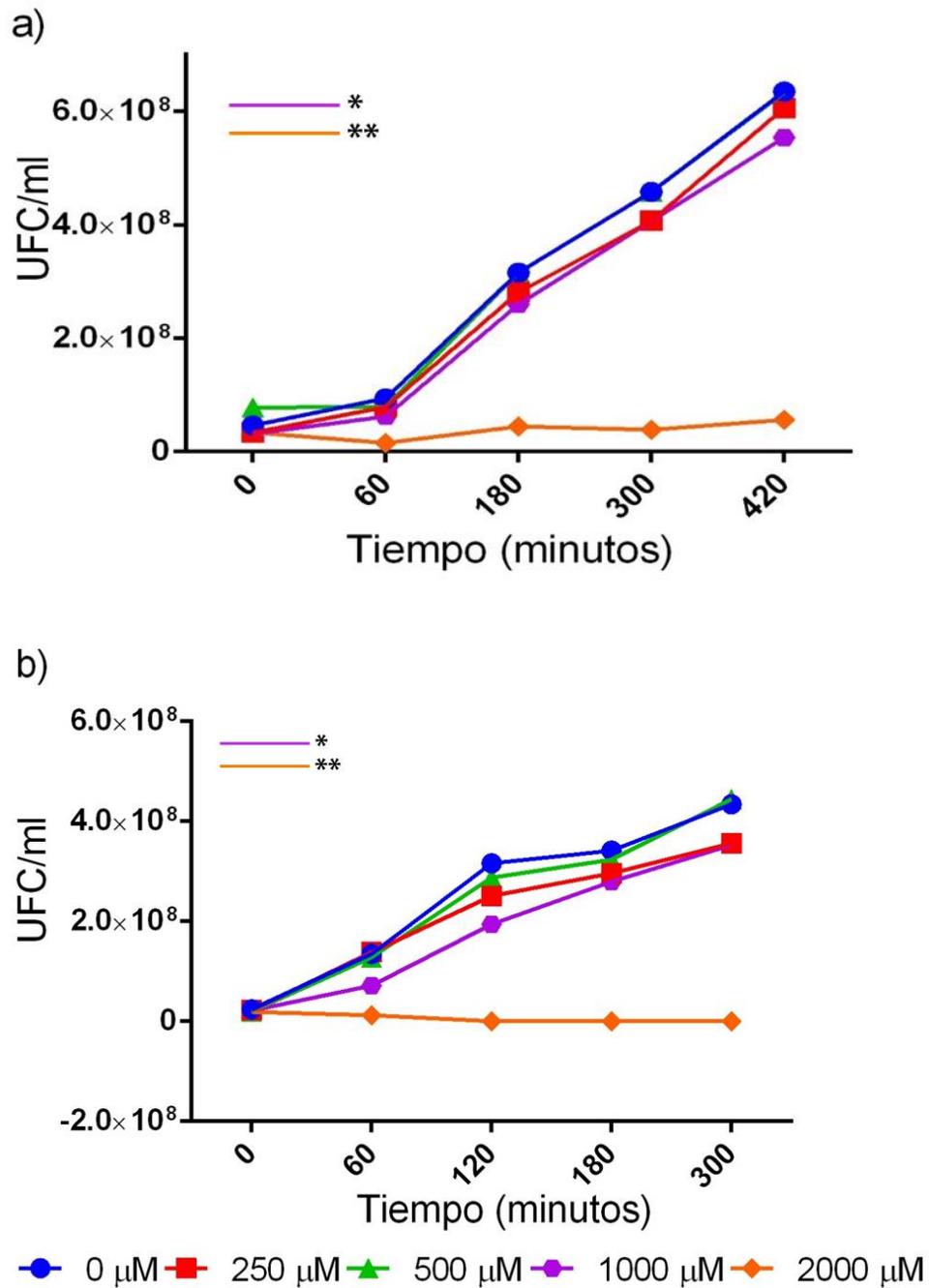
Se evaluó por turbidez tasa de multiplicación bacteriana de las cepas de ETEC a través de una cinética de 7h en caldo LB sin suplementar y suplementado con diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub> (0, 250, 500, 1000 y 2000 μM),

realizando la medición de las densidades ópticas a la 1, 3, 5 y 7 h. Con los datos obtenidos se realizaron las curvas de crecimiento para las cepas H10407 y ATCC 35401 presentadas en la **figura 14**, donde se comparó el crecimiento de las cepas que fueron incubadas con concentraciones crecientes de  $ZnSO_4$  contra el crecimiento del control experimental (bacterias cultivadas en caldo sin suplementar). Se observó que la concentración de  $1000 \mu M$  no inhibe el crecimiento bacteriano pero la concentración de  $2000 \mu M$  ocasiona una inhibición del 100%. Debido a que la turbidez del medio puede ser ocasionada por las bacterias viables y los detritos bacterianos, se determinaron las UFC/mL en cada condición y a los mismos tiempos anteriormente evaluados. Con los datos obtenidos se realizaron las curvas de crecimiento presentadas en la **figura 15**, donde se observó un comportamiento similar al de las curvas de crecimiento obtenidas con los datos de D.O.



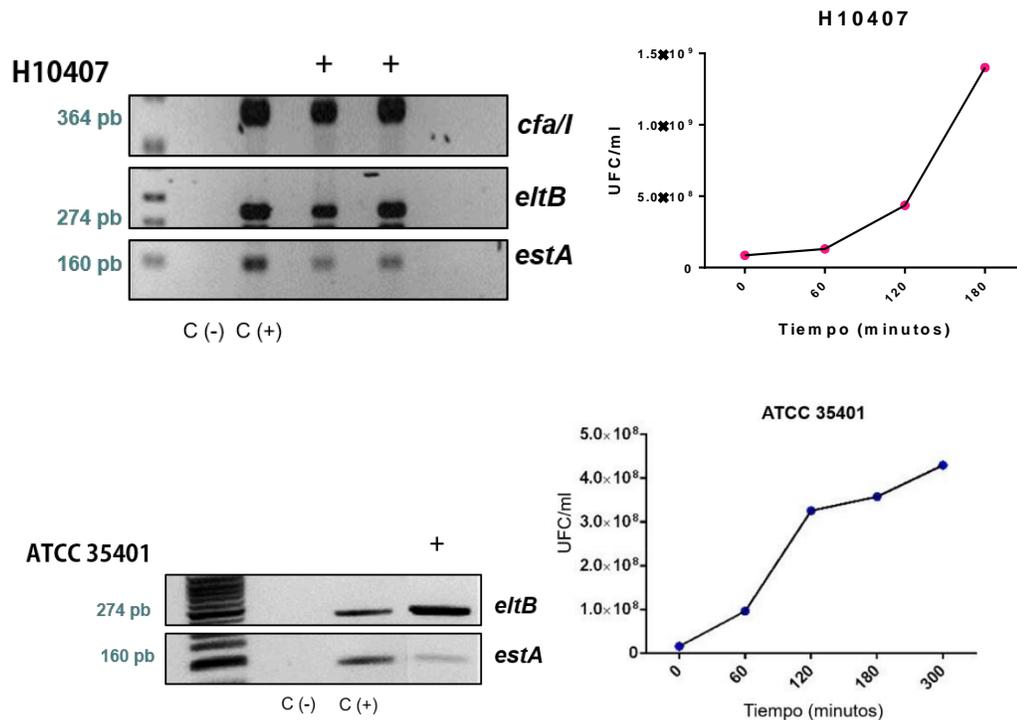


**Figura 14. Crecimiento de las cepas H10407 y ATCC 35401 en presencia de zinc (D.O.= 595 nm).** Las cepas a) cepa H10407: se incubó a 37° C en caldo LB suplementado con concentraciones crecientes de ZnSO<sub>4</sub> y monitoreadas espectrofotométricamente. b) cepa ATCC 35401: se incubó a 37° C en caldo LB suplementado con concentraciones crecientes de ZnSO<sub>4</sub> y monitoreadas espectrofotométricamente. \*  $P < 0.0001$  (ATCC 35401 + 1000  $\mu\text{M}$ ), \*\*  $P < 0.0001$  (ATCC 35401 + 2000  $\mu\text{M}$ ), \*  $P < 0.0001$  (H10407 + 500  $\mu\text{M}$ ), \*  $P < 0.0001$  (H10407 + 1000  $\mu\text{M}$ ), \*\*  $P < 0.0001$  (H10407 + 2000  $\mu\text{M}$ ). Los datos fueron recolectados de tres estudios independientes.



**Figura 15. Crecimiento de las cepas H10407 y ATCC35401 en presencia de zinc (UFC/mL).** Las cepas a) H10407 y b) ATCC 35401, se incubaron a 37° C en medio LB suplementado con concentraciones crecientes de ZnSO<sub>4</sub>. Los datos fueron recolectados de tres estudios independientes. \*  $P < 0.0001$  (ATCC 35401 + 1000 μM), \*\*  $P < 0.0001$  (ATCC 35401 + 2000 μM), \*  $P < 0.0001$  (H10407 + 1000 μM), \*\*  $P < 0.0001$  (H10407 + 2000 μM). Los datos fueron recolectados de tres estudios independientes.

Con los datos obtenidos en las curvas de crecimiento con UFC/mL se corroboró la presencia del número real de bacterias viables en cada condición evaluada. Se realizó un lisado bacteriano del cultivo a las 3h (punto medio de la fase logarítmica) para liberar el DNA que fue utilizado para evaluar la presencia de los genes que codifican para los factores de virulencia LT, ST y CFA/I. Como se observa en la **figura 16**, se confirmó la presencia de los genes en la cepa ATCC 35401 y la cepa prototipo H10407 PCR punto final.

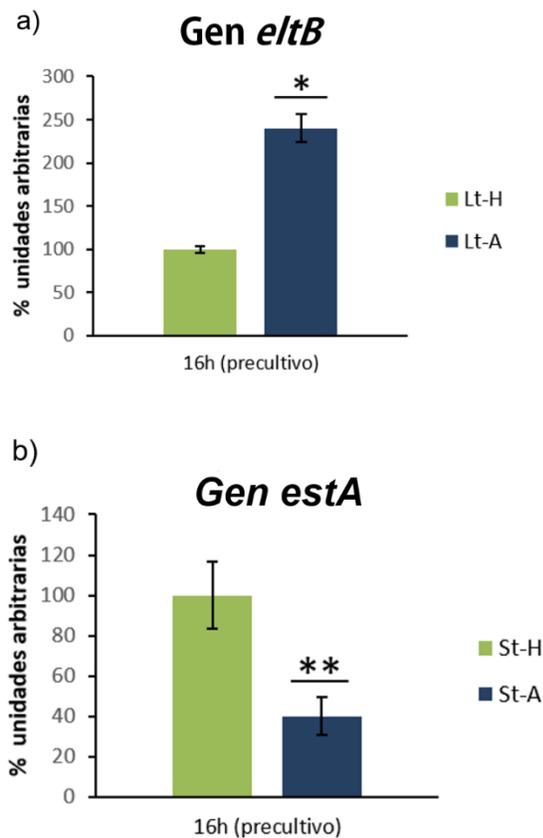


**Figura 16. Evaluación por PCR punto final la presencia de los genes *eltB*, *estA* y *cfa/I*.**

a) DNA total de la cepa H10407, presencia de los genes que codifican para LT, ST y CFA/I evaluados a los 60 y 120 minutos de la curva de crecimiento; gel de agarosa al 2% donde: marcador de tamaño molecular, control negativo, control positivo, lisado de la cepa H10407 a la 1h, lisado de la cepa H10407 a las 3h. b) DNA total de la cepa ATCC 35401, presencia de los genes que codifican LT y ST evaluados a los 120 minutos de la curva de crecimiento; gel de agarosa al 2% donde: marcador de tamaño molecular, control negativo control positivo H10407, lisado de la cepa ATCC 35401 a las 3h.

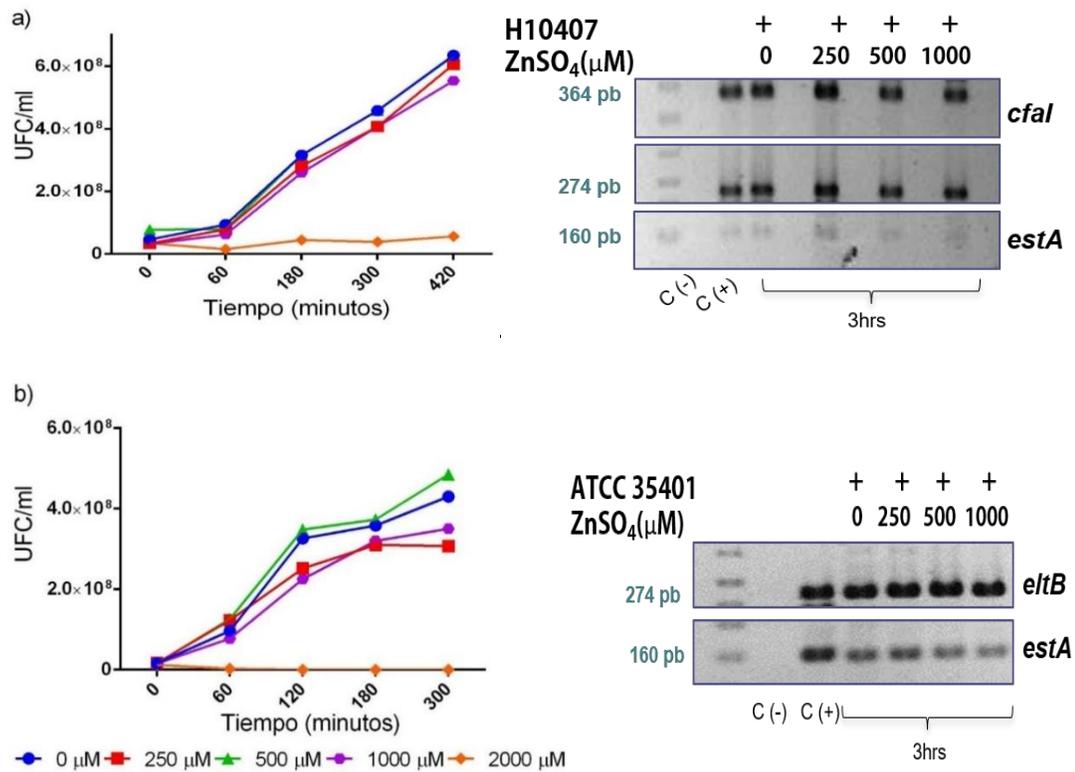
El genoma de la cepa de referencia *E. coli* H10407 (serotipo O78:H11) consta de un cromosoma de 5,153, 435 pb y 4 plásmidos: pETEC948, pETEC666, pETEC58 y pETEC52 (Crossman, L *et al.* 2010). A diferencia, la cepa ATCC

35401 (variante de H10407) presenta secuencias codificantes (cfs) incompletas debido a la delección del operón *cfaABCD* que codifica para la fimbria CFA/I del plásmido pETEC948 (<https://www.atcc.org/>). Se analizó la densidad del amplicón de los genes *eltB* y *estA* de las cepas H10407 y ATCC 35401 para evaluar la expresión de dichos genes en cada cepa. En la **figura 17** se evidencia la diferencia significativa en la cantidad de los genes entre las cepas de referencia.



**Figura 17. Análisis de la densidad del amplicón de los genes *elt* y *sta2* de las cepas H10407 y ATCC 35401.** a) H10407, b) ATCC 35401. La intensidad de las bandas de *elt* y *sta2* de las imágenes escaneadas fue cuantificada usando el ImageJ software y expresada como unidades arbitrarias. Las desviaciones estándar fueron obtenidas de duplicados de 3 ensayos independientes y los valores de \*  $P < 0.005$  (Lt-A), \*\*  $P < 0.005$  (Lt-A) fueron calculados usando el GraphPad Prism 6.00.

Con respecto a la presencia de los genes que codifican para LT, ST y CFA/I en presencia de ZnSO<sub>4</sub>, como se observa en la **figura 18**, el DNA plasmídico que los codifica no está comprometido por el estrés generado en las bacterias. Se confirmó la presencia de los genes en la cepa ATCC 35401 y la cepa prototipo H10407 mediante PCR de punto final.



**Figura 18. Evaluación por PCR punto final la presencia de los genes *eltB*, *estA* y *cfaI* en DNA total.** a) cepa H10407, curva de crecimiento con UFC/mL en caldo suplementado con ZnSO<sub>4</sub>; gel de agarosa al 2% donde: (1) Marcador de tamaño molecular, (2) Control negativo (H<sub>2</sub>O), (3) Control positivo, (4) Tratamiento con 0 μM de ZnSO<sub>4</sub> (5) Tratamiento con 250 μM de ZnSO<sub>4</sub> (6) Tratamiento con 500 μM de ZnSO<sub>4</sub> (7) Tratamiento con 1000 μM de ZnSO<sub>4</sub>. b) cepa ATCC 35401, curva de crecimiento con UFC/mL en caldo suplementado con ZnSO<sub>4</sub>; gel de agarosa al 2% donde: (1) Marcador de tamaño molecular, (2) Control negativo (H<sub>2</sub>O), (3) Control positivo, (4) Tratamiento con 0 μM de ZnSO<sub>4</sub> (5) Tratamiento con 250 μM de ZnSO<sub>4</sub> (6) Tratamiento con 500 μM de ZnSO<sub>4</sub> (7) Tratamiento con 1000 μM de ZnSO<sub>4</sub>.

### **Análisis a nivel transcrito de las toxinas LT, ST y la fimbria CFA/I a las 3 h de la curva de crecimiento con tratamientos de ZnSO<sub>4</sub>.**

Una vez corroborada la presencia de los genes que codifican para LT, ST y CFA/I, se realizó la extracción de RNA bacteriano y la generación de cDNA para analizar el patrón de expresión de los transcritos de estos genes en presencia de zinc. Al suplementar el caldo LB con las diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub>, la cepa H10407 expresó los transcritos de la toxina LT con 250 y 1000 µM de ZnSO<sub>4</sub> y de la fimbria CFA/I con 250 µM mientras que la toxina ST no se expresó (**figura 18a**). Para la cepa ATCC 35401 no hubo expresión de los transcritos de ningún factor de virulencia en ninguna de las diferentes concentraciones (**figura 18b**). Asimismo, se evaluó la expresión del gen constitutivo *gapA* (GAPDH) para asegurarnos que la extracción de RNA y la generación de cDNA fueron adecuadas y que el tratamiento con diferentes concentraciones de zinc afecta la expresión diferencial de los transcritos de los factores de virulencia.



## VIII. DISCUSIONES

Las curvas de crecimiento microbiano evaluadas principalmente en UFC/mL representan el número de células viables presentes en el caldo de cultivo a lo largo del tiempo de estudio. En la curva de crecimiento se diferencian 4 fases: la fase de latencia, la fase de crecimiento exponencial o logarítmico, la fase estacionaria y la fase de muerte. Habitualmente, la fase de crecimiento logarítmica es la que representa mayor interés por ser la fase en la que el incremento del número de microorganismos es máximo. Son muchos los factores involucrados en el crecimiento bacteriano, tales como el pH, la temperatura y los nutrientes en el medio de cultivo, por lo tanto, es importante saber la relación entre la concentración de estos nutrientes y la tasa de crecimiento para correlacionar su efecto en la síntesis de RNA y de proteínas (Blundell & Wild, 1969). El crecimiento en presencia de FeSO<sub>4</sub>, de la cepa ATCC 35401 fue similar con respecto a la condición basal (cepas incubadas en medio sin suplementar), lo cual indica que el crecimiento no está influenciado por FeSO<sub>4</sub>; sin embargo, el crecimiento de la cepa H10407 disminuyó en presencia de 250 µM de FeSO<sub>4</sub> con respecto a la condición basal. Cuando se generó una condición de estrés por ausencia de hierro con dipidilo; se observó que el crecimiento de la cepa H10407 en presencia del agente quelante fue mayor con respecto a la condición basal. El favorecimiento de la tasa de crecimiento en presencia del quelante y sales biliares ha sido observado previamente en *E. coli* O157:H7 (Hamner *et al.* 2013). Se ha demostrado que la inanición de hierro conduce a la regulación negativa de la transcripción de genes que codifican proteínas involucradas en la división celular, reduce la biosíntesis de proteínas y previene que la maquinaria de división celular reconozca su sitio específico (Santos *al.*, 2017). El efecto del hierro en el crecimiento y regulación transcripcional, se ha reportado en otras enterobacterias como *Salmonella* (Jones *et al.*, 1997; Kortman *et al.*, 2012) pero también en parásitos como *Entamoeba histolytica* (vega *et al.*, 1999), *Naegleria fowleri* (Martínez-Castillo *et al.*, 2015), *Trichomonas vaginalis* (Lehker, 1992; Ryu, 2001).

El crecimiento bajo el efecto de zinc, Brocklehurst y Morby en el 2000, reportaron que la MIC de ZnSO<sub>4</sub> en caldo LB para *E. coli* cepa TG1 fue de 2.2 mM; Medeiros *et al.* en el 2007 reportaron que la MIC de ZnO en medio DMEM para *E. coli* enteroagregativa (EAEC) es de 1mM. De acuerdo con los resultados obtenidos en para las cepas de ETEC H10407 y ATCC 35401, la MIC para estas cepas es de 2mM. Con respecto a las demás concentraciones evaluadas, se sugiere que el Zn<sup>2+</sup> podría estar participando como un elemento esencial para su crecimiento y expresión de factores de virulencia necesarios para establecer infección. Las fluctuaciones en la concentración de zinc en forma de sal, ZnSO<sub>4</sub>, en el medio intra- y extracelular afecta tanto a la fisiología celular como a la supervivencia de los microorganismos, por ello, es importante que exista un balance dinámico entre los sistemas de importe y exporte en ETEC (Brocklehurst & Morby 2000, Ma, L., A. Terwilliger & A. W. Maresso, 2015, Medeiros *et al.* 2013). Los sistemas de importe y exporte pueden saturarse con la cantidad de Zn y el metabolismo bacteriano es afectado por el efecto tóxico del metal. Una vez evaluado el crecimiento bacteriano, se analizó la presencia de los genes *elt* y *sta2* que codifican a la toxina LT y la toxina ST, respectivamente; en ambas cepas siendo significativa la diferencia . Esto puede deberse a que la cepa de referencia ATCC 35401 es una variante de la cepa H10407 que presenta secuencias codificantes (*cds*) incompletas. Si un organismo posee productos génicos especializados respecto a su virulencia, puede ser capaz de usarlos siempre que sea necesario, pero no va a gastar su energía metabólica en producirlos sin un objetivo en concreto. Es importante tener en cuenta que la expresión de los factores de virulencia no es dependiente al crecimiento bacteriano, si no también tienen que ver otros factores que permitan la inducción de la expresión de los genes.

Los iones metálicos como el hierro, el zinc y el manganeso son esenciales para la el metabolismo y su ausencia altera la fisiología bacteriana. El hierro, por ejemplo, es cofactor de diversas proteínas que son importantes para el metabolismo central, la biosíntesis del DNA, la fijación de nitrógeno, la

fotosíntesis y la respiración. Una bacteria necesita aproximadamente de  $10^5$ - $10^6$  iones de hierro para cumplir con los requisitos de hierro intracelular. Por ello, ambientes pobres en hierro representan un gran desafío para su supervivencia bacteriana (Braun & Killmann, 1999). Los genes que codifican para los factores de virulencia contienen regiones específicas que son reguladas por factores ambientales como, la rapidez de cambio del perfil transcripcional de la bacteria o por la disponibilidad de nutrientes como glucosa, zinc, hierro o cualquier molécula o ión que se encuentre en el medio extracelular.

En condiciones de estrés con dipirilo a las 3 h, la expresión del transcrito del gen *estA* de la cepa H10407 aumenta con la disminución de la concentración de hierro en el caldo de cultivo, este resultado sugiere que su expresión es afectada por el hierro contenido en el medio. Este comportamiento, de aumento en la expresión del gen *estA* promovido por la acción del quelante, se ha visto también en la expresión del gen que codifica a EspB en EHEC (Tobe *et al.* 2014); con respecto a los genes *eltB* y *cfa/I*, estos no se expresaron en ninguna condición. La cepa ATCC 35401 no expresó los genes *eltB* y *estA*. El resultado obtenido y los reportes en la literatura donde estudian la expresión de los genes que codifican a las toxinas en otras especies bacterianas, tal es el caso de *S. aureus* que produce la enterotoxina A y B indican que en todas las fases de su curva de crecimiento pero con diferencias significativas entre cada una (Shambaugh, 1974), nos dirigió a analizar si en nuestras cepas de ETEC la expresión de los genes de virulencia evaluados se observaba a las 5h y 7h. En estos ensayos, a diferencia de los resultados obtenidos a las 3 h, a las 5 h se observó la expresión del gen *elt*, expresión que disminuye en presencia del quelante; con respecto a la expresión del transcrito del gen *sta2* disminuye hasta dejar de expresarse a las 7h. Estos cambios en la expresión de los genes de virulencia sugieren una dinámica durante las transición de la fase logarítmica a la fase estacionaria que puede deberse en parte a la presencia de sustancias del metabolismo bacteriano y a que a diferencia de los genes constitutivos, los genes evaluados se expresan solamente en

determinadas situaciones y que, por consiguiente, codifican para proteínas que solamente se necesitan en momentos concretos. Haines *et al.* reportan que en respuesta a la inanición de hierro generada con 50  $\mu$ M deferoxamina, la cepa H10407 reduce la secreción de la toxina LT e induce la expresión de los genes que codifican a la fimbria CFA/I (Haines *et al.* 2015). El transcrito del gen *cfa/I* no se expresó bajo las condiciones empleadas en la fase experimental, por lo que se sugiere realizarmodificaciones de as condiciones de análisis para confirmar el resultado obtenido (ausencia de la expresión del dicho gen). Se sabe que la transcripción de cada gen está controlada por regiones reguladoras que contienen uno o más promotores que se localizan río arriba del primer marco de lectura abierto (ORF, por sus siglas en inglés “Open Reading Frame”). En ETEC la producción de la fimbria CFA/I responde tanto a concentraciones de hierro cuando la cepa es crecida *in vitro* (Karjalainen, 1991) como a su restricción (Haines *et al* 2015) mediado ya sea por uno de los siguientes factores de transcripción que actúan en respuesta a hierro, Fur o IscR. Estos han sido reportados responsables de activar genes para la regulación del estrés oxidativo pero también para el control de la expresión de los factores de virulencia. En *Pseudomonas aeruginosa*, el regulador IscR contribuye en la homeostasis de hierro (Romsang *et al.* 2014). La afinidad de Fur a su sitio de unión varía significativamente con la disponibilidad del metal; Karjalainen (1991) propone la presencia de al menos 3 posibles sitios de unión para Fur en el promotor del gen *cfaB* (secuencia 1: TTAATAACAATTTTT, secuencia 2: ATTAATTAAACCAT y secuencia 3: CTAATACAATTTAA); Escolar *et al.* en 2006 identificaron las secuencias consenso para Fur en *E. coli* K12; Brunet *et al.* en 2011 identificaron sitios de unión a Fur (cajas Fur) en la región promotora del gen *scil* T6SS, incluyendo uno que sobrelapa con la caja -10. Los resultados obtenidos en este trabajo empleando el servidor BPROM nos muestran la presencia de varias secuencias de promotores, siendo IscR uno de los principales que actúa en respuesta a la inanición de hierro. La secuencia putativa de este promotor es 5'-TTTTTATCTCATTTTTTTTTGTTTT-3' (Haines *et al.* 2015), sugiriendo que

este regulador esté involucrado en la expresión o inhibición del gen que codifica a la fimbria CFA/I. La secuencia del gen *cfa* contiene secuencias promotoras que reconocen a Crp, rpoD (factores sigma) que interaccionan con la RNAP y en conjunto con los factores de transcripción están involucradas en la regulación de la transcripción de los genes que codifican a los factores de virulencia de ETEC. Asimismo, se sabe que la fimbria CFA/I en la cepa H10407 de ETEC, esta codificada por el operon *cfaABCE*, el cual es positivamente controlado por el regulador transcripcional CfaD (Caron & Scott, 1990). CfaD es miembro de la familia de reguladores transcripcionales AraC y está relacionado íntimamente con otros reguladores involucrados en la virulencia como AggR de *E. coli* enteroagregativa, ToxT de *Vibrio cholerae*, RegA de *Citrobacter rodentium* y VirF de especies de *Shigella*. En la secuencia de *elt* y *est* no se encontraron cajas FUR ni otra región que responda a hierro.

Con respecto a la evaluación de la expresión de los de los genes que codifican para los factores de virulencia en respuesta a zinc, al suplementar el caldo LB con las diferentes concentraciones de ZnSO<sub>4</sub> las cepas presentaron diferente patrón de expresión de estos genes: en la cepa H10407 se expresó el gen que codifica a la toxina LT con 250 y 1000 µM de ZnSO<sub>4</sub> y el gen que codifica a la fimbria CFA/I solo con 250 µM de ZnSO<sub>4</sub> mientras que el gen que codifica para la toxina ST no fue expresado. En la cepa ATCC 35401 no hubo expresión de ninguno de los genes que codifican a las toxinas LT y ST en ninguna de las diferentes concentraciones. Estos resultados fueron validados con la expresión del gen constitutivo para asegurarnos que la extracción de RNA y la generación de cDNA fueron adecuadas y que el tratamiento con diferentes concentraciones de zinc afecta la expresión diferencial de los factores de virulencia. Estas diferencias en la expresión de los genes de virulencia de ETEC también fueron evaluadas por el grupo de Bock en el 2018, donde reportan que, *in vitro*, el zinc regula negativamente la expresión gen *sta2* y positivamente al gen *eltA* en la cepa H10407 (Bolick, *et al.* 2018). Nuestros resultados sugieren que las condiciones de crecimiento con zinc pueden favorecer o inhibir la expresión de ciertos factores de virulencia indispensables

para que ETEC pueda establecer la infección en el hospedero. Medeiros *et al.* en el 2013 evaluaron la expresión de factores de virulencia de EAEC en medio DMEM suplementado con una sal de zinc (ZnO) donde pudieron encontrar la regulación positiva de los genes que codifican para los factores de virulencia característicos de dicha especie (Medeiros *et al.* 2013). Además, los niveles de zinc participan en el control transcripcional mediados por el represor ZUR, el cual en presencia de zinc, se une a secuencias específicas en los promotores de los genes regulados por este ión para inhibir su expresión. Por lo tanto, en ausencia de zinc, ZUR no es capaz de unirse y los genes pueden transcribirse. Sin embargo, al realizar el análisis *in silico* no se encontró ninguna probable caja ZUR en ninguna de las secuencias que codifican a los tres factores de virulencia evaluados, lo cual sugiere que pueden estar participando otros activadores o represores transcripcionales diferentes a ZUR.

## **IX. CONCLUSIÓN**

El crecimiento bacteriano de las cepas de ETEC evaluadas no se ve afectado al emplear concentraciones menores a 1000  $\mu\text{M}$  de  $\text{ZnSO}_4$ , y que las concentraciones de  $\text{FeSO}_4$  tampoco lo inhibe sino que favorecen el crecimiento de las cepas. Por otra parte, el zinc y el hierro están participando en la regulación transcripcional de los genes de virulencia de ETEC -*elt*, *sta2* y *cfa*- ya que tienen un efecto positivo o negativo dependiendo de la concentración empleada del metal.

## X. REFERENCIAS

- Appenzeller, B. M., *et al.* 2005 Advantage provided by iron for *Escherichia coli* growth and cultivability in drinking water. *Appl Environ Microbiol* 71(9):5621-3.
- Baden, L. R., and J. H. Maguire. 2001 Gastrointestinal infections in the immunocompromised host. *Infect Dis Clin North Am* 15(2):639-70, xi.
- Baker, K. K., *et al.* 2009 CfaE tip mutations in enterotoxigenic *Escherichia coli* CFA/I fimbriae define critical human intestinal binding sites. *Cell Microbiol* 11(5):742-54.
- Bekal, S., *et al.* 2003 Rapid identification of *Escherichia coli* pathotypes by virulence gene detection with DNA microarrays. *J Clin Microbiol* 41(5):2113-25.
- Bolick, D. T., *et al.* 2018 The Critical Role of Zinc in a New Murine Model of Enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) Diarrhea. *Infect Immun*.
- Brocklehurst, K. R., and A. P. Morby. 2000 Metal-ion tolerance in *Escherichia coli*: analysis of transcriptional profiles by gene-array technology. *Microbiology* 146 ( Pt 9):2277-82.
- Chao, A. C., *et al.* 1994 Activation of intestinal CFTR Cl<sup>-</sup> channel by heat-stable enterotoxin and guanylin via cAMP-dependent protein kinase. *EMBO J* 13(5):1065-72.
- Chomczynski, P., and N. Sacchi. 1987 Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal Biochem* 162(1):156-9
- Clements, A., *et al.* 2012 Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes* 3(2):71-87.
- Crane, J. K., *et al.* 2007 Effect of zinc in enteropathogenic *Escherichia coli* infection. *Infect Immun* 75(12):5974-84.

Croxen, M. A., and B. B. Finlay. 2010 Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol* 8(1):26-38.

Croxen, M. A., *et al.* 2013 Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 26(4):822-80.

Darbandi, A., *et al.* 2016 Diarrheagenic *Escherichia coli* pathotypes frequency in Khuzestan province of Iran. *Iran J Microbiol* 8(6):352-358.

Farfan-Garcia, A. E., *et al.* 2016 [Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*]. *Rev Chilena Infectol* 33(4):438-450.

Fleckenstein, J. M., *et al.* 2010 Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect* 12(2):89-98.

Ghosal, A., *et al.* 2009 Characterization and studies of the cellular interaction of native colonization factor CS6 purified from a clinical isolate of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 77(5):2125-35.

Ghosal, A., *et al.* 2007 PCR-based identification of common colonization factor antigens of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *J Clin Microbiol* 45(9):3068-71.

Gilston, B. A., *et al.* 2014 Structural and mechanistic basis of zinc regulation across the *E. coli* Zur regulon. *PLoS Biol* 12(11):e1001987.

Grass, G., *et al.* 2002 ZupT is a Zn(II) uptake system in *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 184(3):864-6.

Haines, S., *et al.* 2015 Identification of Novel Components Influencing Colonization Factor Antigen I Expression in Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *PLoS One* 10(10):e0141469.

Hamner, S. *et al.* 2013 Bile Salts Affect Expression of *Escherichia coli* O157:H7 Genes for Virulence and Iron Acquisition, and Promote Growth under Iron Limiting Conditions. *PLOS ONE* 8 (9): E74647.

Hantke, K. 2005 Bacterial zinc uptake and regulators. *Curr Opin Microbiol* 8(2):196-202.

Hodges, K., and R. Gill. 2010 Infectious diarrhea: Cellular and molecular mechanisms. *Gut Microbes* 1(1):4-21.

Horstman, A. L., and M. J. Kuehn. 2000 Enterotoxigenic *Escherichia coli* secretes active heat-labile enterotoxin via outer membrane vesicles. *J Biol Chem* 275(17):12489-96.

Huchin, Claribel, *et al.* 2018 Prevalence and Drug-Resistance Patterns of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Shigella* Species among Children with Diarrhea in Merida City, Mexico. *Journal of Biosciences and Medicines* 06(01):22-33.

Hughes, J. M., *et al.* 1978 Role of cyclic GMP in the action of heat-stable enterotoxin of *Escherichia coli*. *Nature* 271(5647):755-6.

Johnson, T. L., *et al.* 2006 Type II secretion: from structure to function. *FEMS Microbiol Lett* 255(2):175-86.

Kaper, J. B., J. P. Nataro, and H. L. Mobley. 2004 Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol* 2(2):123-40.

Karjalainen, T. K., *et al.* 1991 Iron represses the expression of CFA/I fimbriae of enterotoxigenic *E. coli*. *Microb Pathog* 11(5):317-23.

Kehl-Fie, T. E., and E. P. Skaar. 2010 Nutritional immunity beyond iron: a role for manganese and zinc. *Curr Opin Chem Biol* 14(2):218-24.

Kumari, A., *et al.* 2017 Intracellular zinc flux causes reactive oxygen species mediated mitochondrial dysfunction leading to cell death in *Leishmania donovani*. *PLoS One* 12(6):e0178800.

Lee, L. J., J. A. Barrett, and R. K. Poole 2005 Genome-wide transcriptional response of chemostat-cultured *Escherichia coli* to zinc. *J Bacteriol* 187(3):1124-34.

Li, Y. F., *et al.* 2009 Structure of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106(26):10793-8.

Ludi, S., *et al.* 2006 Assessing the expression of enterotoxigenic *Escherichia coli*-specific surface antigens in recombinant strains by transmission electron microscopy and immunolabeling. *J Histochem Cytochem* 54(4):473-7.

Ma, L., A. Terwilliger, and A. W. Maresso 2015 Iron and zinc exploitation during bacterial pathogenesis. *Metallomics* 7(12):1541-54.

Madhavan, T. P., and H. Sakellaris 2015 Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol* 90:155-97.

Martínez-Castillo, M. *et al.* 2015 Iron-Binding Protein Degradation by Cysteine Proteases for *Naegleria fowleri*. *Biomed Res.* vol. 2015 , Article ID 416712, 8 pages.

Mazariego-Espinosa, K., *et al.* 2010 Longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*, is involved in adherence to intestinal epithelial cells. *J Bacteriol* 192(11):2791-800.

Medeiros, P., *et al.* 2013 The micronutrient zinc inhibits EAEC strain 042 adherence, biofilm formation, virulence gene expression, and epithelial cytokine responses benefiting the infected host. *Virulence* 4(7):624-33.

Merritt, E. A., *et al.* 1994 Structure of partially-activated *E. coli* heat-labile enterotoxin (LT) at 2.6 Å resolution. *FEBS Lett* 337(1):88-92.

Mu, X. Q., S. J. Savarino, and E. Bullitt 2008 The three-dimensional structure of CFA/I adhesion pili: traveler's diarrhea bacteria hang on by a spring. *J Mol Biol* 376(3):614-20.

Mudrak, B., and M. J. Kuehn 2010 Specificity of the type II secretion systems of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* for heat-labile enterotoxin and cholera toxin. *J Bacteriol* 192(7):1902-11.

Nataro, J. P., and J. B. Kaper 1998 Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 11(1):142-201.

Porcheron, G., *et al.* 2013 Iron, copper, zinc, and manganese transport and regulation in pathogenic Enterobacteria: correlations between strains, site of infection and the relative importance of the different metal transport systems for virulence. *Front Cell Infect Microbiol* 3:90.

Qadri, F., *et al.* 2005 Enterotoxigenic *Escherichia coli* in developing countries: epidemiology, microbiology, clinical features, treatment, and prevention. *Clin Microbiol Rev* 18(3):465-83.

Sajoling, A., *et al.* 2006 In vivo expression of the heat stable (*estA*) and heat labile (*eltB*) toxin genes of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Microbes and Infection* 8: 2797-2802.

Schulz, S., *et al.* 1990 Guanylyl cyclase is a heat-stable enterotoxin receptor. *Cell* 63(5):941-8.

Shulman, S. T., H. C. Friedmann, and R. H. Sims 2007 Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician? *Clin Infect Dis* 45(8):1025-9.

Sigdel, T. K., J. A. Easton, and M. W. Crowder 2006 Transcriptional response of *Escherichia coli* to TPEN. *J Bacteriol* 188(18):6709-13.

Sinha, R., *et al.* 2012 Infections and infestations of the gastrointestinal tract. Part 1: bacterial, viral and fungal infections. *Clin Radiol* 67(5):484-94.

Sizemore, D. R., K. L. Roland, and U. S. Ryan 2004 Enterotoxigenic *Escherichia coli* virulence factors and vaccine approaches. *Expert Rev Vaccines* 3(5):585-95.

Skaar, E. P. 2010 The battle for iron between bacterial pathogens and their vertebrate hosts. *PLoS Pathog* 6(8):e1000949.

Spangler, B. D. 1992 Structure and function of cholera toxin and the related Escherichia coli heat-labile enterotoxin. Microbiol Rev 56(4):622-47.

Surjawidjaja, J. E., A. Hidayat, and M. Lesmana. 2004 Growth inhibition of enteric pathogens by zinc sulfate: an in vitro study. Med Princ Pract 13(5):286-9.

Tauschek, M., *et al.* 2002 Identification of a protein secretory pathway for the secretion of heat-labile enterotoxin by an enterotoxigenic strain of Escherichia coli. Proc Natl Acad Sci U S A 99(10):7066-71.

Vega, GB., *et al* 1999 Effect of Zinc on Entamoeba histolytica Pathogenicity. Parasitol Res 85 (6): 487-492.

Vila Estape, J., and Y. Zboromyrska. 2012 [Outbreaks caused by diarrheagenic Escherichia coli. Gastroenterol Hepatol 35(2):89-93.

Whyte, L. A., Jenkins, H. R. 2012 Pediatrics and Child Health. 22 (10): 443-447.

Wilcox, M. H. 2018 Gastrointestinal infections. Curr Opin Gastroenterol 34(1):1-2.

Yamamoto, K., and A. Ishihama. 2005 Transcriptional response of Escherichia coli to external zinc. J Bacteriol 187(18):6333-40.

(2017) Reportes de la Dirección General de Epidemiología (DGE), [https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/276643/EDA\\_2017\\_SE46.pdf](https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/276643/EDA_2017_SE46.pdf) consultado el 06 de diciembre de 2017.