

UNIVERSIDAD AUTONOMA DE NUEVO LEON

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

DIVISION DE ESTUDIOS DE POST-GRADO

63



ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS
MEDICINALES SOBRE EL CRECIMIENTO, LA
PRODUCCION DE VEROTOXINAS Y LA ADHESION
DE E. coli O157:H7 SOBRE CELULAS HeLa

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE MAESTRO EN CIENCIAS
CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGIA

POR

BIOLOGO MARCO ARTURO ESCOBAR AGUILAR

San Nicolás de los Garza, N. L.

Noviembre 2001



TM

QK99

.M6

E8

2001

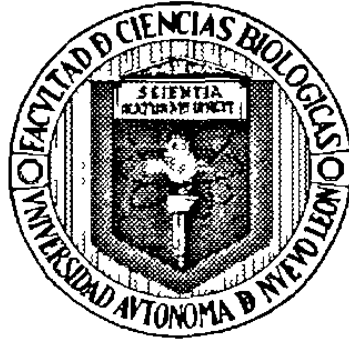
c.1



1080117239

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POST-GRADO



ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES
SOBRE EL CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE VEROTOXINAS
Y LA ADHESIÓN DE *E. coli* O157:H7 SOBRE CÉLULAS HeLa

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA

POR

Biólogo MARCO ARTURO ESCOBAR AGUILAR

TM
QK99
• M2
E8
2001

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POST-GRADO

ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES
SOBRE EL CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE VEROTOXINAS
Y LA ADHESIÓN DE *E. coli* O157:H7 SOBRE CÉLULAS HeLa

TESIS

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO
DE MAESTRO EN CIENCIAS CON ESPECIALIDAD EN MICROBIOLOGÍA
POR

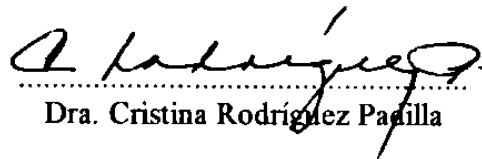
Biólogo MARCO ARTURO ESCOBAR AGUILAR

APROBADA
COMISIÓN DE TESIS



Dra. Norma L. Heredia Rojas

Presidente



Dra. Cristina Rodríguez Padilla

Vocal



Dr. José Santos García-Alvarado
Secretario

San Nicolás de los Garza, N.L.

Noviembre 2001

ACTIVIDAD DE EXTRACTOS DE PLANTAS MEDICINALES SOBRE EL CRECIMIENTO, LA PRODUCCIÓN DE VEROTOXINAS Y LA ADHESIÓN DE *E. coli* O157: H7 SOBRE CÉLULAS HeLa

La presente investigación se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León, en la ciudad de San Nicolás de los Garza, Nuevo León, México, bajo la dirección de la Dra. Norma L. Heredia Rojas y codirección del Dr. José Santos García- Alvarado.

Esta investigación fue financiada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) con el convenio N° 29359- B y por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica (PAICYT) de la UANL N° SA 187- 99. El alumno recibió beca de Rectoría y Escuela de Post- grado de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL para realizar estudios de Maestría en Ciencias con especialidad en Microbiología.

DEDICATORIA

En estas líneas quiero expresar el sentimiento mas lindo que puedo tener por dos personas, mis padres, quienes han estado siempre a mi lado desde que nací. Quiero dedicar esta tesis de maestría a Don Juan Belisario Escobar Talledo y Doña Esperanza Aguilar de Escobar a quienes amo y respeto mucho. Ustedes han sido partícipes de todas mi alegrías, y ahora que nos mantenemos lejos de mis más profundas añoranzas, a pesar que siempre estuve sólo aquí en Monterrey, sentimentalmente estaba con ustedes todo el día en mis pensamientos y acciones y todo lo que hice, hago y haré siempre será en honor a ustedes y espero que estén siempre orgulloso de vuestro hijo.

También dedico este trabajo a mis hermanos María Milagritos, María Esperanza y Juan Martín (Che negro) y sus respectivas parejas Percy, Walter y Gabriela, a mis adorados sobrinos Juan Víctor, Juan Martín, Josué, Ezequiel y mi pequeño ahijado Ian Marco, a mis dulces sobrinas Karen Anthonella, Catherine, Wendy, Jennifer y Jacqueline Massiel mi pequeña ahijada.

A mis compañeros de laboratorio y clases, Moisés, Eduardo, Genoveva, Perla y Berenice.

A mis grandes amigas Natalia Cerutti, Ginebra Alarcón y Sharlli Juárez.

A mis jefes, maestros y amigos Dr. José Santos y Dra. Norma Laura, de quienes aprendí muy buenas cosas, como el respeto y tolerancia a los demás.

AGRADECIMIENTOS

Gracias SEÑOR TODOPODEROSO, a ti debo todo lo que soy, en ti encontré la fuerza que muchas veces me faltaba, cuando estaba solo, que casi siempre ha sido todo estos años, cuando extraño a mi familia y aceptar que las cosas pasan por que TÚ lo quieres así y debo aceptar lo que quieres para mi.

Gracias papá y mamá por ser lo mas importantes para mi, porque de ustedes aprendí todo lo bueno que soy, gracias por haber formado la familia que tenemos, por ser siempre unidos aunque a veces nos toquen vivir momentos difíciles, en estos dos años aprendí a amarlos y respetarlos aún mas de lo que siento por Uds. aprendí que la vida no es fácil y que sembrar amigos cosecharemos amigos, gracias de todo corazón.

Dr. José Santos y Dra. Norma Laura, les agradezco de todo corazón esta gran oportunidad que me brindaron a pertenecer a su laboratorio sin conocerme bien, gracias por sus consejos, aquellas llamadas de atención que forjaron para no ser ese muchachillo iracundo y un poquillo inmaduro, gracias porque por Uds. aprendí muchas cosas, es muy grato haberles conocido y tratado, realmente de todo corazón GRACIAS.

Señor Rector Luis Galán Wong le agradezco haber confiado en mi, por ese apoyo que siempre estaré agradecido, porque por Ud. aprendí que siempre es bueno darle oportunidades a los estudiantes y las personas.....MIL GRACIAS.

Gracias Dra. Graciela, Dr. Alcocer, Sigifredo, maestro Javier Vargas y a todos mis maestros de la facultad por sus enseñanzas en estos dos años.

Natalia Cerutti, che Nata, siempre estuviste a mi lado, eres aquella amiga que todo quisieran tener, francamente eres excepcional, gracias por comprenderme siempre y por entender mis locuras, será porque somos sudamericanos?.....Ginebra (Ginger ale) bueno estimada amiga, gracias por haberme soportado todo este tiempo y espero que siempre me soportes, hemos tenido muchas broncas pero hemos sabido sobreponernos a ello y lo bueno es que te quiero mucho, Cristóbal, gracias por ser mi amigo, y cuida mucho a Ginger..... Sharlli, contigo aprendí a llorar sin miedo ante una mujer, compartimos muchas vivencias, alegrías, anécdotas y tristezas, y comprendiste mucho a ese muchacho iracundo, bromista y muchas veces malhumorado que fui con todos especialmente contigoGeno, ah ... Genoveva fuiste la primera persona que me dio la bienvenida a este laboratorio, gracias por tu amistad, eres muy buena onda.....Eduardo, muchas gracias por ese año y medio que fuimos buenos amigos, tu amistad y consejos fueron fundamentales para mi, aun no dejo de considerarte un amigo, nunca cambies eres un chavo muy especial al igual que tu familia y esposa.....Moisés, Berenice y Perla lo único que puedo decirles es mi eterna gratitud por estos dos años y medio, gracias por comprenderme y pasar buenos momentos.

INDICE

Página de Título	I
Comisión de Tesis	II
Localización	III
Dedicatoria	IV
Agradecimientos	V
Índice	VII
Lista de Tablas y Figuras	X
Lista de abreviaturas y simbología	XI
Resumen	XII
Abstract	XIV
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
2.1 <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 Grupos bacterianos de <i>E. coli</i> patogénicas	3
2.2.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	4
2.2.2 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	5
2.2.3 <i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	5
2.2.4 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	6
2.2.5 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	6
2.3 <i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica	7
2.3.1 Verotoxinas	8

Estructura de las verotoxinas	9
Modo de acción de las verotoxinas	10
Similitud entre la verotoxina tipo I y tipo II	10
2.3.2 Enterohemolisinas	12
2.3.3 Factores de Adhesión	12
2.3.4 Serotipos de EHEC	14
2.3.5 Enfermedades causadas por EHEC y sus complicaciones	14
2.3.6 Dosis infectiva y Alimentos implicados del serotipo O157:H7	16
2.4 Actividad de Extractos de Plantas Medicinales	17
3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	20
3.1 Hipótesis	20
3.2 Objetivo general	20
3.3 Objetivos específicos	20
4. MATERIAL Y MÉTODOS	21
4.1 Bacterias	21
4.2 Plantas utilizadas y Obtención de los extractos	21
4.3 Análisis preliminar de inhibición	22
4.4 Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) del	22
Crecimiento	
4.5. Tolerancia al calor del extracto de palo de Brasil	23
4.6 Cromatografía en capa fina y Ensayo de bioautografía	23
4.7 Actividad sobre la producción de Verotoxinas	24

4.7.1 Obtención de los sobrenadantes con Verotoxinas	24
4.8 Actividad del extracto de palo de Brasil sobre la adhesión de <i>E. coli</i> a la línea celular HeLa	25
4.8.1 Radiomarcaje de <i>E. coli</i>	25
4.8.2 Cultivo de la línea celular HeLa	25
4.8.3 Determinación de la adhesión de <i>E. coli</i> a la célula HeLa	26
a) Pre- exposición de la bacteria al extracto de palo de Brasil	26
b) Pre- exposición de la célula HeLa al extracto de palo de Brasil	27
5. RESULTADOS	28
5.1 Análisis Preliminar de Inhibición y Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Crecimiento.	28
5.2 Determinación de algunas características del extracto de palo de Brasil.	28
5.3 Actividad del extracto alcohólico de Palo de Brasil sobre la Producción de Verotoxinas	31
5.4 Efecto del Extracto de palo de Brasil sobre la Adhesión de <i>E. coli</i> a células HeLa	35
a) <u>Pre- exposición de la bacteria al extracto de palo de Brasil</u>	35
b) <u>Pre- exposición de células HeLa al extracto de palo de Brasil</u>	38
6. DISCUSIÓN	40
7. CONCLUSIONES	46
8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

Lista de Tablas y Figuras

Tabla 1 Halos de Inhibición del crecimiento de extractos etanólicos y acuosos de Plantas Medicinales.	29
Tabla 2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)	29
Tabla 3 Mezcla de solventes utilizados en la separación cromatográfica en capa fina del extracto de palo de Brasil	31
Tabla 4 Efecto de Concentraciones Menores del CMI del extracto etanólico de palo de Brasil sobre el crecimiento de las tres cepas de <i>Escherichia coli</i>	31
Tabla 5 Titulaciones de la Cuantificación de Verotoxinas tipo I y tipo II de las cepas EHEC bajo la Actividad de Diferentes concentraciones de Extracto Etanólico de Palo de Brasil	31
Tabla 6 Efecto del extracto de palo de Brasil sobre la adhesión de <i>E. coli</i> a la célula HeLa. La bacteria y el extracto fueron incubados previamente y luego se realizaron los ensayos de adhesión	36
Tabla 7 Efecto del extracto de palo de Brasil sobre la adhesión de <i>E. coli</i> a la célula HeLa. La célula HeLa y el extracto fueron incubados previamente y luego se realizaron los ensayos de adhesión	38
Fig. 1A Halo de inhibición del extracto esterilizado por filtración	30
1B Halo de inhibición del extracto esterilizado por calor a 121 °C por 15 min	30
Fig. 2A Separación cromatográfica del extracto de palo de Brasil	30
2B Bioautografía de la separación cromatográfica del extracto de palo de Brasil (<i>Haematoxylon brasiletto</i>)	30
Fig. 3 Efecto del Extracto de Palo de Brasil en la Producción de la Verotoxina I y II de <i>E. coli</i> 43894 a diferentes concentraciones menores de la CMI	33
Fig. 4 Efecto del Extracto de Palo de Brasil en la Producción de la Verotoxina I y II de <i>E. coli</i> 43895 a diferentes concentraciones menores de la CMI	33
Fig. 5 Efecto del extracto de palo de Brasil en la Producción de la Vt I por dos cepas de <i>E. coli</i>	34
Fig. 6 Efecto del extracto de palo de Brasil en la Producción de la Vt II por dos cepas de <i>E. coli</i>	35
Fig. 7 Adhesión bacteriana al 75% CMI cuando la bacteria estuvo expuesta por 1 h a 37 °C	38
Fig. 8 Adhesión de <i>Escherichia coli</i> sobre célula HeLa. La bacteria fue incubada con el extracto antes del ensayo de adhesión	38
Fig. 9 Adhesión de <i>Escherichia coli</i> sobre célula HeLa. La célula HeLa fue incubada con el extracto antes del ensayo	39

LISTA DE ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grados Centígrados
Cl	Cloro
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMP	Cuentas por minuto
CO ₂	Dióxido de Carbono
DNA	Ácido desóxido ribonucleico
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemoagica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteronasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatpgenica
Fig.	Figura
g	gramo
g	Gravedad
h	Hora(s)
H	Serotipo flagelar
kDa	Kilo Daltones
MEM	Medio mínimo esencial
mg	Miligramo
min	Minutos
ml	Militro
mM	Mili Moles
Na	Sodio
O	Seotipo somático
PBS	Amortiguador de fosfatos salino
pH	Potencia de hidrógeno
SUH	Síndrome urémico hemolítico
UFC	Unidades formadoras de colonia
UV	Ultra violeta
Vt	Verotoxina
μCi	Micro Courie
μl	Micro litro
μm	Micro metro

RESUMEN

El grupo de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y más frecuentemente el serotipo O157:H7 comprende un grupo de bacterias que han emergido como causa importante de enfermedades gastrointestinales por el consumo de alimentos contaminados tanto en países desarrollados como en los subdesarrollados y eventualmente este grupo de microorganismos poseen factores de virulencia comunes tales como la proteína intimina, que le permite la adhesión a células del epitelio intestinal, células sanguíneas y células nerviosas así como las toxinas tipo shiga, las cuales actúan a nivel de células del epitelio intestinal inhibiendo la síntesis proteica en esas células.

Varios investigadores han demostrado que algunos extractos de plantas poseen efecto sobre el crecimiento de *E. coli*, sin embargo, pocos reportes existen sobre el serotipo enterohemorrágico. En nuestro trabajo analizamos la actividad extractos etanólicos y acuosos de 35 plantas medicinales del noreste mexicano sobre EHEC. Encontramos que de 35 plantas analizadas, sólo el extracto etanólico de palo de Brasil (*Haematoxylon brasiletto*) tuvo efecto sobre el crecimiento, la producción de la verotoxina y la adhesión de *E. coli* sobre células HeLa, obteniendo a una concentración de 4.00 ± 0.1 mg/ml la concentración mínima inhibitoria del crecimiento, también se vio un efecto muy marcado de inhibición sobre la producción de las verotoxinas tipo 1 y tipo 2, inhibiendo la producción hasta un 99% y 98% respectivamente a concentraciones más bajas de su CMI, es decir a 3 mg/ml (75% del CMI); Además la adhesión se vio afectada cuando diferentes concentraciones del

extracto se expusieron tanto a las bacterias como a las células Hela, sugiriendo un bloqueo de los receptores que intervienen en la adhesión bacteriana.

Los resultados aquí mostrados abren nuevas alternativas para combatir bacterias que pueden tener mecanismos alternos para resistir la acción de antibióticos y además poder respaldar el uso de la medicina tradicional en muchos países con tan rica cultura tradicional como México y otros países latinoamericanos.

ABSTRACT

Enterohemorrhagic *E. coli* group (EHEC) and more frequently the O157:H7 serotype are part of a bacteria group which have raised as important agents of gastrointestinal disorders by consumption of contaminated food in developed and undeveloped countries. These microorganisms could have virulence factors such as the intimin protein, which allows adhesion to epithelial intestinal, blood and neuronal cells; and verotoxins which act in epithelial intestinal cells inhibiting protein synthesis.

Several researchers have demonstrated that many plant extracts have activity against growth of *E. coli*, however, there are a few reports on the effect on enterohemorrhagic serotypes of this bacterium. In this work, we studied ethanolic and aqueous extracts of 35 medicinal plants from Northeast Mexico against EHEC. Only one out of 35, the ethanolic extract of *palo de Brasil* (*Haematoxylon brasiletto*) had effect against growth, verotoxin production and adhesion of *E. coli* on HeLa cells. The minimal inhibitory concentration was 4.00 ± 0.1 mg/ml, lower concentrations inhibited verotoxins type I and type II production; at 3 mg/ml (75% MIC) an inhibition of toxin production of 99% and 98% respectively was observed. In addition, adhesion between bacteria and HeLa cells was affected when both were individually exposed to different concentrations of ethanolic extract. This could suggest that the extract could block in some way, both bacterial and cellular receptors.

Our results open new alternatives in the effort to combat bacteria, and help to scientifically validate the use of this plant in the traditional medicine in many countries.

1. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas causadas por patógenos invasivos y toxigénicos constituyen un agudo problema de salud. En el intestino humano el movimiento de iones, agua y macromoléculas entre las células y el lumen intestinal es dependiente de la organización estructural y funcional de éstas células. La alteración de alguno de los estados de organización pudiera resultar en el desarrollo de las enfermedades diarreicas. Usualmente, la causa de la diarrea puede ser debida a la acción de toxinas o por la invasión microbiana dentro de las células intestinales. Las enfermedades infecciosas debidas a organismos enteropatogénicos pudiera, en un principio, ser tratadas por el bloqueo de la fijación de los patógenos y/o sus toxinas a sus lugares de unión en las células blanco hospederas (Coconier, M. H., 1997).

Dentro del grupo bacteriano de *E. coli* existen cinco tipos patogénicos caracterizados por sus factores de virulencia y el tipo de síntomas que causan, éstos son clasificados por sus respectivos serotipos flagelares (H) y somáticos (O) (Griffin, P.M., 1995). Uno de los más importantes patógenos de alimentos hoy en día ha llegado a ser *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) que posee factores de virulencia como la proteína de adhesión, la intimina y las toxinas denominadas verotoxinas (Cézame, P., 1999) que pueden causar náuseas, dolor estomacal, diarrea hemorrágica y complicaciones severas como el síndrome urémico hemolítico y la trombocitopenia púrpura. Los afectados principalmente son los niños, los ancianos y los pacientes inmunocomprometidos (Snyder, P., 1998). La responsable de estos problemas es una

verotoxina producida por esta bacteria. El serotipo más frecuentemente involucrado es el O157:H7.

La resistencia contra los antibióticos por parte de algunos patógenos se ha incrementado en los últimos años, este es un gran problema de salud debido a que las alternativas para combatir algunas bacterias han disminuido. Una alternativa promisoría es el uso de plantas medicinales que puedan presentar sustancias capaces de combatir a las bacterias de interés. Esto no es nuevo ya que desde el tiempo de Luis Pasteur se han investigado las bondades de las plantas medicinales, considerándose una buena alternativa de antimicrobianos. Muchos países latinoamericanos tienen una gran cultura en el ramo de la medicina tradicional o medicina folklórica, en donde las culturas ancestrales usaban las plantas como medicamentos (Cáceres, A., 1990).

Muchos trabajos realizados con extractos de plantas a fin de estudiar sus propiedades antimicrobianas, han dado buenos resultados al encontrar actividad inhibitoria del crecimiento de los patógenos. Sin embargo, no existen muchos trabajos en donde se haya estudiado el efecto de estos extractos contra la producción de factores de virulencia y patogenicidad de los microorganismos. Nosotros en este trabajo abordamos este aspecto. Por lo que el presente trabajo busca demostrar que ciertas plantas usadas en la medicina folklórica del noreste Mexicano tienen actividad contra el crecimiento, la producción de verotoxinas y/o la adhesión a la línea celular HeLa a fin de dar un respaldo científico, así como ofrecer alternativas terapéuticas contra *E. coli* O157:H7 y las enfermedades que esta provoca.

2. ANTECEDENTES

2.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es una bacteria perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, y fue primeramente descrita hace más de 100 años, por Theodore Escherich. Esta bacteria es un bacilo anaerobio facultativo gram-negativo que generalmente coloniza de manera comensal el tracto intestinal de recién nacidos durante la primera semana de vida, por lo que puede residir en cualquier momento en el intestino humano. Sus cientos de serotipos son diferenciados de acuerdo a la presencia de dos de sus principales antígenos, el O (somático) y el H (flagelar) (Griffin, P.M. *et al*, 1995).

E. coli y otros tipos de bacterias dentro del intestino son necesarios para proveer vitaminas esenciales como la vitamina K y complejos vitamínicos del tipo B (Cézame, P., 1999). La mayoría de las cepas no patógenas de esta especie están presentes en la flora normal del intestino, sin embargo, una pequeña minoría son patógenas y pueden causar diferentes cuadros clínicos, tales como infección renal, meningitis o diarrea (Nisa, I., 1998).

2.2 Grupos Bacterianos de *E. coli* Patogénicas

Al menos existen cinco tipos diferentes de *E. coli* patogénicas: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* éteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) y *E. coli* enterohemorrágica (EHEC). Se ha visto que cada tipo patogénico posee un grupo específico de factores de virulencia que

pueden ir desde adhesinas específicas e invasinas hasta diferentes toxinas (Nisa, I., 1998).

2.2.1 *E. coli* enteropatógena (EPEC)

Este grupo tiene una mayor importancia como causa de diarrea endémica en países en desarrollo. Es la principal causa de diarrea infantil en estos países. Este grupo bacteriano produce intimina, una adhesina del tipo no fimbrial, la cual media la adhesión a la mucosa intestinal. Causa diarrea acuosa o sanguinolenta, la cual está asociada a la adhesión (Nisa, I., 1998). Produce una característica histopatológica, al igual que EHEC, conocida como lesión de Fijación y Borramiento, "*Attaching and Effacing Lesion*", la cual es esencial para la completa patogenicidad. Algunos serotipos de este grupo bacteriano fueron relacionadas por primera vez con brotes de diarrea infantil entre los años cuarenta y cincuenta (Frankel, G., 1998 y Hartland, E., 1999).

Uno de los procesos principales para que exista una mejor adhesión es la producción de una proteína que es secretada y transferida a las células huésped donde es fosforilada e insertada en la membrana para crear un epítipo superficial de fijación para la intimina. Esta proteína ha sido llamada receptor translocado para intimina, *Translocated intimin receptor*, Tir. Luego que la bacteria se adhiere a la célula mediante la intimina y Tir, se genera una adhesión íntima y una acumulación de actina polimerizada en pedestal produciendo un rearrreglo de los componentes de la membrana celular afectando el transporte de solutos, iones y agua, provocando de esta manera la diarrea (Hicks, S., 1998).

2.2.2 *E. coli* enteroagregativa (EAEC)

E. coli enteroagregativa es asociada con la diarrea aguda y diarrea persistente en niños. Esta bacteria al igual que EPEC no secreta enterotoxinas; la característica de esta bacteria es la producción de una estructura denominada fimbria de adherencia agregativa, lo que al adherirse a las células intestinales induce un acortamiento de las vellosidades, necrosis hemorrágica y una respuesta inflamatoria, produciendo una estimulación de la secreción mucosa manifestada con diarrea acuosa, con mucho moco y además fiebre (Griffin, P.M., 1995). Otros estudios han detectado que produce una toxina enteroagregativa termo-estable (EAST1), la cual actúa a nivel del sistema intracelular de la guanilato ciclasa. Ha sido implicada como una causa de diarrea persistente en niños quienes tuvieron un inicio agudo de diarrea acuosa asociada con vómito y deshidratación, sobre todo en países en desarrollo. Estos organismos han sido implicados en brotes causados por alimentos como agua contaminada (Griffin, P.M. y R.Tauxe, 1996).

2.2.3 *E. coli* enteroinvasiva (EIEC)

Esta bacteria puede causar la disentería bacilar, cuadro clínico muy similar al causado por *Shigella*, con quien *E. coli* comparte genes de virulencia. EIEC puede invadir y proliferar en las células epiteliales de la mucosa del colon, el sitio de acción y puede llegar a matar las células. Clínicamente da por resultado una disentería bacteriana, y se caracteriza por la presencia de sangre y moco en las heces de personas

infectadas, además de calambres abdominales, vómito, fiebre y malestar general (Griffin, P.M., 1995).

2.2.4 *E. coli* enterotoxigénica (ETEC)

Este grupo bacteriano causa la conocida diarrea producida en viajeros quienes estuvieron en países en desarrollo, así como diarrea en niños. Este organismo produce enterotoxinas, las cuales inducen a la secreción de agua y electrolitos dentro del lumen intestinal, muy similar a los síntomas causados por *V. cholerae*. Estas enterotoxinas son del tipo termo lábil (LT), y termo estable (ST), y colonizan a nivel del intestino delgado mediante adhesinas fimbriales; esta bacteria no es invasiva. El organismo es adquirido por la ingestión de alimentos y aguas contaminadas. La adhesión al epitelio intestinal ha sido correlacionada con la producción de antígenos específicos para el huésped, de los cuales los K88, K99, F41 y 987P son encontrados en las cepas de origen animal y, en las cepas para humanos hay dos importantes factores de colonización, I y II (CFA/I y CFA/II) y también se han encontrados antígenos diferentes producidos para humanos descritas como CFA/III, PCF8775 o CFA/IV y antígeno 2330 (Darfeuille- Michaud, A., 1990).

2.2.5 *E. coli* enterohemorrágica (EHEC)

Esta bacteria causa muchos síntomas como náuseas, dolor abdominal, diarreas, colitis hemorrágica, síndrome urémico hemolítico, y la trombocitopenia púrpura. Las

bacterias de este grupo bacteriano producen verotoxinas las cuales son los factores de virulencia más importantes.

2.3 *E. coli* enterohemorrágica

Escherichia coli O157:H7 inicialmente fue reconocida en 1982 en los Estados Unidos y ahora ha emergido como importante patógeno entérico en Canadá, Estados Unidos y Reino Unido con muchos brotes y muchos casos esporádicos de colitis hemorrágicas, enfermedades diarreicas, síndrome urémico hemolítico (SUH) y trombocitopenia trombótica púrpura (Weeratna, R., 1991), ocurridas en enfermerías, centros de cuidado diario y comunidades (Ratman, S., 1988).

Aunque ya se había reportado su presencia a principios de 1993 este serotipo (O157:H7) recibió considerable atención después de un gran brote causado por el consumo de hamburguesas contaminadas, servidas en un restaurante de comida rápida en los Estados Unidos. Más de 700 personas fueron afectadas en cuatro estados del país. Se reportaron complicaciones graves tales como SUH en 51 pacientes y cuatro de ellos murieron. A partir de entonces, la atención y los estudios de este serotipo han ido aumentando. Se sabe que actualmente en los Estados Unidos entre 10,000 a 20,000 casos son reportados cada año (Palumbo, R., 1995).

Dentro de la especie *E. coli*, este grupo enterohemorrágico posee marcadores bioquímicos distintivos, un 100% de reacción negativa para la β -glucoronidasa y la fermentación de sorbitol y un 100% de reacción positiva para rafinosa y dulcitol, lo que facilita su aislamiento y/o su identificación. Otra característica importante es la

producción de verotoxinas (conocidas como toxinas tipo Shiga) (Ratman, S., 1988 y Feng, P., 1998). Además este serotipo O157:H7 parece ser una nueva cepa, la cual primero obtuvo la habilidad para producir la adhesión de fijación y borramiento, características que comparte con el grupo EPEC, y luego adquirió genes codificados en fagos para la producción de verotoxinas (Palumbo, R., 1995). Este grupo bacteriano también ha sido aislado de pacientes con diarrea no complicadas así como también de personas sanas (Boerlin, P., 1999).

Escherichia coli O157:H7 tiene una alta tolerancia al ácido y crece a pH tan bajos como 4 y 4.5, esta tolerancia ha sido identificada como un determinante de virulencia, desde que este comportamiento mejora la habilidad de las células a sobrevivir a condiciones ácidas de las primeras regiones del tracto gastrointestinal y pasar a colonizar el intestino, además de que también le permiten sobrevivir durante el procesamiento y almacenamiento en carne fermentada y otros alimentos que tienen un pH final de 4.5- 5.5 (Duffy, G., 2000).

2.3.1 Verotoxinas

Las toxinas tipo shiga o verotoxinas son una familia de citotoxinas producidas por algunas cepas de *E. coli*, y es el más importante factor de virulencia de estas bacterias. Las cepas de *E. coli* han sido previamente identificadas las cuales producen una citotoxina similar a la producida por *Shigella dysenteriae* I (Shiga toxina). Esta toxina, referida como toxina tipo *shiga* I fue descrita en 1982 por O'Brien y colaboradores, y parece ser la misma que produjo una cepa O26 H3O citotóxica para células Vero (línea celular de riñón de mono), descrita por Konowalchuk y

colaboradores en 1977 (Weinstein, D., 1988 y MacLeod, D.L., 1989). Se denominó verotoxina porque era capaz de inducir la formación de vacuolas en células Vero. Esta tiene dos variantes: Verotoxina I (Vt I) y Verotoxina II (Vt II) (Proulx, F., 1992). La producción de Vts es reconocida ahora como una importante característica de todas las cepas de EHEC implicadas en el SUH, el cual es una complicación producida por estas bacterias. La mayoría de las cepas de este tipo producen y secretan ambas variedades de la toxina, sin embargo, se han visto que algunas producen sólo una de ellas, Vt I o Vt II (Karmali, M., 1985). La Vt I se encuentra predominantemente en los lisados celulares, mientras que la Vt II es encontrada en los filtrados de los cultivos (Palumbo S., 1995).

Desde que las bacterias pueden estar en cualquier microambiente, es posible que ellas pueden adquirir información genética de otras fuentes como virus bacterianos, plásmidos o sólo pedazos desnudos de DNA. En algunos casos esta información puede ser necesaria para que la bacteria sobreviva en otras condiciones. En el caso de *E. coli* serotipo O157:H7 y los demás serotipos que producen y secretan verotoxinas, las bacterias parecen haber sido afectadas con un virus bacteriano, el cual tuvo la habilidad de insertar su propio DNA dentro del cromosoma bacteriano. Esta secuencia genética contuvo la información para la producción de las verotoxinas (Cézame, P., 1999).

Estructura de las Verotoxinas

Dos categorías de verotoxinas han sido distinguidas. La Vt I es casi idéntica a la toxina shiga producida por *Shigella dysenteriae* en la secuencia de aminoácidos y no puede ser distinguida de ésta toxina, serológicamente hablando. En tanto que la Vt II es menos relacionada a la toxina shiga de *Shigella* y no es neutralizada por los anticuerpos

contra Vt I o la toxina Shiga de *S. dysenteriae* (Boerlin, P., 1999). Tanto la verotoxina I (Vt I) como la verotoxina II están formadas por una subunidad A de casi 33 kDa y de 5 subunidades B de 7.5 kDa cada una. Estructuralmente esta toxina tiene una similitud con la toxina termolábil (LT) producida por ETEC. La subunidad A tiene un fragmento N-terminal (A1) en el cual reside su actividad enzimática, y un fragmento C-terminal (A2). Las subunidades B forman una estructura esférica con un poro en el centro, las cuales reconocen a un receptor, globotriasilceramida (Gb3), el cual está presente en grandes cantidades en células epiteliales intestinales, renales, trombocitos, eritrocitos y probablemente en otras células (Boerlin, P., 1999).

Modo de acción de las verotoxinas

Una vez que ha ocurrido el reconocimiento hay internalización de la toxina. El fragmento A1 interactúa con la subunidad ribosomal 60S y se fija en el RNAr 28S, en donde cataliza la remoción de un residuo de adenina de la molécula de RNAr, el cual es el sitio de unión del factor de elongación 2 (EF-2) durante la síntesis de proteínas (Snyder, P., 1998).

Similitud entre la verotoxina tipo I y tipo II

La verotoxina II (Vt II) es muy similar a la Vt I en su modo de acción, estructura y características bioquímicas generales. Sin embargo, la secuencia de aminoácidos de las dos toxinas difieren substancialmente, hay 57% de homología entre la subunidad A y 60% entre la subunidad B. El receptor para Vt II es también el Gb3, aunque la

afinidad de fijación de Vt II es menor, comparándola con Vt I. Los genes para Vt II son mediados al parecer, por el mismo fago (Snyder, P., 1998).

Existen variantes de la verotoxina II, las cuales se denominan como Vt IIv y son serológicamente relacionadas con Vt II teniendo un 94% de homología en la secuencia de aminoácidos y una neutralización cruzada para su actividad citotóxica, pero es significativamente diferente, debido a que Vt IIv ha sido implicada en la enfermedad de edema de cerdos (ED). Una explicación razonable de la patogénesis de ED es que ciertas cepas de *E. coli* colonizan el intestino delgado de cerditos y producen la Vt IIv, la cual es absorbida y causa daño a nivel del endotelio vascular resultando en edema (MacLeod D.L., 1989). En este caso el receptor es Gb4, el cual da a esta toxina un diferente rango de células afectadas. Los genes para Vt IIe, la cual es una de las Vt IIv, son cromosómicos y no asociados a fagos. Se ha encontrado un 91% de asociación de toda la secuencia nucleotídica entre Vt II y Vt IIe, con una más alta homología en las subunidades A (98%) que en las subunidades B (70.6%). Vt IIe producidas por EHEC están asociadas con la enfermedad de edema en cerdos.

Las toxinas de EHEC juegan un papel importante en la respuesta inflamatoria que causa el HUS. La manera en que Vt podría mediar el HUS no esta claro, se piensa que a través de hematógenos esparcidos, los cuales dirigen el daño a órganos blancos afectando a nivel del endotelio celular, particularmente del glomérulo renal (Snyder, P., 1998)

2.3.2 Enterohemolisinas

Además de las verotoxinas, EHEC también produce otro tipo de toxinas, como las enterohemolisinas, las cuales han demostrado tener una fuerte correlación con la producción de verotoxinas. Estas enterohemolisinas están asociadas a la célula, por lo que parece ser una proteína externa de membrana de 60 kDa y tiende a ser producida sólo en la fase tardía del crecimiento del microorganismo y ha sido sugerido que es también otro factor de virulencia adicional de este serotipo (Barnett, D., 1997)

2.3.3 Factores de Adhesión

Originalmente, para la mayoría de los enteropatógenos, se ha descrito que se requiere la adhesión del microorganismo o sus toxinas a las células del huésped para desarrollar la enfermedad utilizando los receptores ya existentes. La adhesión a células intestinales es el primer paso de la patogenicidad bacteriana, esto requiere factores especializados codificados por la bacteria, los cuales directamente se fijan a los receptores de las células huéspedes. La fijación de las bacterias patogénicas a las superficies de las células epiteliales intestinales puede tener muchos resultados incluyendo la colonización, daño celular, internalización, disturbios de los mecanismos celulares regulatorios y proliferación intracelular. Como consecuencia, la superficie es reducida y es caracterizada por un alto número de enterocitos inmaduros, la mucosa dañada tiene una mínima capacidad para el transporte activo de Na y Cl, el estado de la secreción de base lineal de aniones y las funciones absortivas-digestivas son pobremente desarrolladas (Coconnier, M., 1993).

En el caso de EHEC se tiene un novedoso modelo de adherencia, se ha establecido que el microorganismo manufactura e inyecta sus propios receptores dentro de las células huéspedes, para poder fijarse, este compartimento es similar al de las bacterias del grupo EPEC. Esto es mediado por una proteína bacteriana de 78 kDa llamada Tir, la cual es exportada e inyectada a las células huéspedes y es modificada por un receptor descrito como Hp90 (Bell, B., 1994). Hay datos obtenidos por Hartland y colaboradores, donde se da evidencia de que la intimina puede fijarse independientemente a las células huéspedes aún en la ausencia de la proteína Tir. Esta interacción independiente de Tir y la habilidad de EPEC y EHEC a inducir lesiones de fijación y borramiento, requiere de un módulo tipo lectina intacto que reside en la terminación carboxi del polipéptido intimina (Hartland, E., 1999 y Hicks, S., 1998).

Esta proteína de superficie de 94 kDa llamada Intimina (EaeA), es codificada por el gen *eaeA* (Frankel, G., 1998). La fijación de EHEC y EPEC es mediada por glicoesfingolípidos y fosfolípidos específicos de la membrana celular. Muchas cepas EHEC de serotipo O157:H7 se fijan a gangliosilceramida (Gb4) y fosfatidiletanolamina (PE) y débilmente a gangliotriasilceramida (Gb3). La fijación a PE es dependiente de la temperatura y es sensible a cationes divalentes (Barnet, D., 1997).

En trabajos realizados previamente se ha demostrado que la adhesión de *E. coli* a células HeLa (células de cáncer cérvico uterino) y células del epitelio colónico de humano fue mayor durante la fase de crecimiento exponencial. Además, se ha reportado que bajas concentraciones de hierro disminuyeron la adhesión, mientras que las células

bacterianas cultivadas bajo condiciones anaerobias mostraron un incremento marcado en la fijación a células HeLa.

Los autores concluyeron que esta adhesión es medida por adhesinas específicas (Urabi, 2001, <http://web.bham.ac.uk/bcm4gth6/vtec/issue3/vtec202.html>).

2.3.4 Serotipos de EHEC

Este grupo patogénico está formado por cepas de *E. coli* que contienen los siguientes serotipos: O2:H5, H6; O48:H21; O112:H2; O145:H25; O4:H10; O50:H7; O113:H2, H21; O146:H8; O5:H-; O55:H6, H7, H10; O114:H4; O153:H25; O6:H2; O86:H40; O115:H10, O157:H7; O18:H70, O91:H10, H21; O117:H4; O163:H19; O22:H8; O98:H-; O118:H12; O165:H25; O26:H11; O103:H2, O119:H6; O168:H-; O38:H21; O121:h19; O?:H2, H7, H19, H21; O45:H2; O105:H18; O125:H-; O46:H31; O111:H2, H8, H-; O128:H2, H25 (Snyder, P., 1998). De todos ellos, el serotipo O157:H7 ha emergido como el más frecuentemente implicado en brotes importantes de enfermedades gastrointestinales en países desarrollados.

2.3.5 Enfermedades causadas por EHEC y sus complicaciones

Dentro de las principales complicaciones provocadas por este microorganismo, está la colitis hemorrágica la cual usualmente comienza con calambres abdominales y diarrea, seguida por diarrea sanguinolenta y en algunas ocasiones (5%) el SUH, el cual afecta principalmente a niños menores de 10 años. Este se caracteriza por la destrucción de los glóbulos rojos, el daño de las células de las paredes de los vasos sanguíneos y, en

muchos casos, deficiencias renales. Los pacientes con HUS presentan una aguda falla renal, trombocitopenia y anemia hemolítica microangiopática y con frecuencia seguida de una diarrea prodromal (Boerlin, P.,1999). La colitis hemorrágica y el síndrome urémico hemolítico son enfermedades severas las cuales frecuentemente requieren hospitalización y HUS puede ser fatal en un 5% de los casos (Boerlin, P.,1999). Se ha observado que la mayoría de los casos de HUS ocurre después de una infección intestinal con *E. coli* O157:H7. Durante las primeras etapas del HUS se presentan frecuentemente síntomas gastrointestinales, tales como dolor abdominal, vómito y diarrea sanguinolenta; esta etapa dura de 1 a 15 días. Muchos problemas severos se dan en el intestino y el colon. Para la mayoría de los niños con HUS, el vómito y la diarrea cesan después de 2 o 3 días. Cuando la gastroenteritis ha cesado, los niños no recobran su salud, permaneciendo pálidos, cansados e irritables. Durante este periodo, las bacterias se alojan principalmente en el sistema digestivo produciendo verotoxinas que entran al torrente sanguíneo y destruyen los glóbulos rojos y las plaquetas. El daño provocado por esto puede obstruir los vasos sanguíneos de los riñones y por lo tanto causar lesiones renales dando como resultado una producción disminuida de orina. La sangre fluye al riñón y otros órganos vitales tales como el cerebro, páncreas e hígado, los cuales son comprometidos desencadenando a una falla en la función de estos órganos. Estos problemas extra- renales pueden manifestarse como un desarrollo repentino de diabetes e hiperglicemia, hepatitis y fallas cardiovasculares. Una vez que el HUS se desencadena no hay tratamiento conocido que pueda detener el progreso del síndrome. Los tratamientos son dirigidos para mantener los niveles específicos de fluidos y sales. Otra causa de HUS es el consumo de un medicamento denominado

ciclosporina. Hay raros casos familiares de HUS que pueden reflejar una única susceptibilidad heredada de niños en particular contra agentes infecciosos o drogas. Éstos niños son especialmente propensos a recurrencias de la enfermedad o más ligeramente a desarrollar fallas renales crónicas (Lois Joy Galler Foundation, 2001, <http://www.loisjoygaller.org/questions.html>).

2.3.6 Dosis Infecciosa y Alimentos Implicados del serotipo O157:H7

EHEC son comúnmente encontrados en el intestino de ganado, y las infecciones humanas son usualmente una consecuencia del consumo de carne contaminada y productos lácteos, los cuales han sido no apropiadamente cocinados y/o procesados. Muchos estudios sugieren que al menos para algunas cepas de EHEC la dosis infecciosa para humanos puede ser muy baja (10- 1000 UFC) (Paton, A.W., 1998).

Todo esto favorece la ocurrencia de brotes y la dispersión de la bacteria de persona a persona. Solo en los Estados Unidos se estima que *E. coli* O157:H7 causa mas de 20 mil infecciones y 250 muertes cada año (Boyce, T., 1994). Sin embargo, la carne no es el único vehículo que puede transmitir éste microorganismo, algunos brotes también han implicado otros productos como vegetales, bebidas, cidras, etc (Besser, R., 1993; Pickering, L., 1994 y Urabi, 2001, <http://web.bham.ac.uk/bcm4gth6/vtec/issue3/vtec202.html>). Peter Feng en 1995, sugirió que la alta ocurrencia de O157:H7 también era causada por alimentos ácidos, frutas, ensaladas vegetales, yogur y agua.

2.4 Actividad de Extractos de Plantas Medicinales

Desde tiempos inmemoriales los productos vegetales han sido utilizados con la finalidad de poder curar las enfermedades. Se tienen datos donde se ha señalado que desde la época de Luis Pasteur se comenzó a determinar la naturaleza química de los compuestos existentes en las plantas y que eran responsables de sus actividades antimicrobianas. En 1969 Johnson y Vaughin observaron que los extractos de ajo y cebolla eran antimicrobianos contra *S. enteritidis* var. Typhimurium y *E. coli*.

Se han realizado una gran cantidad de estudios para determinar el efecto de plantas sobre diferentes microorganismo. En 1984 se realizó un trabajo donde se analizó el efecto de 84 plantas medicinales de Guatemala contra *E. coli*, *S. enteritidis* var. Typhi, *S. enteritidis* var. Dysenteriae y *S. enteritidis* var. Flexneri y se encontró que todas las plantas producían inhibición del crecimiento contra estas enterobacterias (Cáceres, A., 1990).

Tuncel y colaboradores (1993) probaron compuestos fenólicos extraídos de frutos del olivo contra bacterias enteropatógenas y se encontró que éstos tuvieron actividad inhibitoria del crecimiento contra *E. coli* O157: H7. Siguiendo con lo mismo Tanira y colaboradores (1994) probaron plantas nativas de los Emiratos Árabes Unidos para determinar su actividad inhibitoria contra diferentes microorganismos. Ellos encontraron que algunos de los extractos inhibieron a *K. pneumoniae* y *C. albicans*, sin embargo, ninguna de las plantas probadas tuvo actividad contra *E. coli* y otras enterobacterias.

Otros extractos que se han sido probados son los de la raíz de *Cryptolepis sanguinolenta* (extracto etanólico) en donde se mostró actividad inhibitoria del crecimiento de *E. coli* ATTC 25922, no patogénica (Paulo, A.,1994). Un efecto similar fue reportado por Irobi y colaboradores en 1994, utilizando extractos de *Mitracarpus villosus*, por Kandil y colaboradores (1994) cuando utilizaron extractos de *Thymus capitus*, por Babic y colaboradores (1994) al utilizar extractos de zanahoria y por Bratner y colaboradores (1994), al usar 20 extractos de diferentes plantas tuvieron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *E. coli*. Guevara y colaboradores (1994) probaron los efectos *in vitro* de infusiones de plantas del Perú contra *V. cholerae*. Se reportó que la infusión de *Malus sativa* y *Cydenia oblonga* mostraron efecto bactericida, mientras que la de *Persea ratissima* tuvo un efecto tardío sobre la inhibición del crecimiento. La infusión y la decocción de *Punica granatum* mostró el mejor efecto bactericida contra *V. cholerae* (Guevara, J., 1994).

Un equipo de investigadores de Rutgers, Nueva Jersey (USA) aislaron componentes llamados taninos condensados o proantocianidinas a partir del fruto de arándano, los cuales fueron capaces de prevenir la fijación de *E. coli* a células del tracto urinario (Karmali, M., 1985).

Muchas investigaciones han sido enfocadas a *berberine* (alcaloide de muchas plantas medicinales), debido a sus características antidiarreicas, y se ha observado que posee actividad contra *V. cholerae* O1, *E. coli*, y también tiene un efecto inhibitorio sobre la respuesta secretoria causada por la enterotoxina termoestable de *E. coli* y la toxina del cólera (Shetty, M., 1994).

Los extractos de té negro, té verde japonés, té chino y café inhibieron el crecimiento de varias bacterias que causaban enfermedades diarreicas. El té y el café mostraron actividad bactericida contra *V. cholerae*, *S. enteritidis* var. Typhimurium y *S. enteritidis* var. Typhi (Shetty, M., 1994).

Aunque existe una gran cantidad de estudios sobre el efecto de los extractos de plantas sobre *E. coli*, casi no existen reportes que nos indiquen sobre el serotipo enterohemorrágico O157:H7 ni sobre la adhesión del microorganismo y/o la producción de verotoxinas.

Este estudio pretende analizar plantas utilizadas en la medicina tradicional del noreste de México con la finalidad de darles un respaldo científico, así como ofrecer alternativas terapéuticas contra las enfermedades producidas por *E. coli* O157:H7.

3. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

3.1 HIPÓTESIS

Algunos extractos de plantas del noreste Mexicano poseen actividad sobre *E. coli* O157:H7 inhibiendo su crecimiento, la producción de sus toxinas o la adhesión del microorganismo a líneas celulares.

3.2 OBJETIVO GENERAL

Determinar el efecto de extractos de plantas usadas en la medicina tradicional del noreste Mexicano, sobre el crecimiento, la producción de toxinas y/o la adhesión de *E. coli* O157:H7 a líneas celulares.

3.3 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1.- Determinar el efecto de los extractos etanólicos y acuosos de 50 plantas medicinales sobre el crecimiento de *E. coli* O157:H7.
- 2.- Establecer el efecto de las concentraciones menores al CMI de los extractos que inhiban el crecimiento de la bacteria, sobre la producción de las verotoxinas.
- 3.- Establecer el efecto de los extractos sobre la adhesión de los microorganismos a líneas celulares HeLa a concentraciones menores que concentración mínima inhibitoria del crecimiento.

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1 Bacterias

Las cepas utilizadas fueron *E. coli* enterohemorrágica ATCC 43894 y ATCC 43895 y *E. coli* ATCC 25922 (no enterohemorrágica). Éstas fueron proporcionadas por la Dra. Lynne A. McLandsborough del Departamento de Ciencias de los Alimentos de la Universidad de Massachusetts, Amherst, MA, E.U. Éstas se mantuvieron a 4 °C en Agar Soya Trypticase (AST, DIFCO) y se realizaron resiembras periódicas cada 15 días.

4.2 Plantas utilizadas y obtención de los extractos

Se analizaron 35 plantas utilizadas en la medicina del noreste Mexicano para aliviar problemas gastrointestinales.

Para la obtención de los extractos se pesaron 20 g de la planta seca y se colocaron en una licuadora a la cual se le adicionaron 100 ml de amortiguador de fosfatos 50 mM pH 7.2, para el caso de extractos acuosos o etanol a 96% para extractos etanólicos. Después de moler, se dejó macerar por 24 h a temperatura ambiente para el caso de extractos etanólicos y a 4 °C para los extractos acuosos. La suspensión se filtró con papel ^Wwhatman N° 1 y el sobrenadante se concentró por evaporación en un rotavapor R 3000 BU^GSHI a 60 °C y se secaron totalmente a temperatura ambiente. Posteriormente, los extractos fueron resuspendidos en amortiguador de fosfatos y esterilizados por filtración en membranas con poro de 0.45 µm y se hicieron alícuotas

de 1 ml para conocer el peso seco del extracto y se almacenaron a 4 °C hasta su uso, por un tiempo no mayor de 15 días.

4.3 Análisis Preliminar de Inhibición

Para determinar la actividad de los extractos sobre el crecimiento de los microorganismos se utilizó la técnica del pozo, la cual consistió en adicionar los extractos estériles (volumen aproximado de 100 µl) en pozos hechos sobre placas con AST, las cuales fueron previamente inoculadas por extensión con 100 µl de las cepas de *E. coli*. Los cultivos se incubaron a 37 °C por 24 h. El efecto del extracto se detectó mediante la presencia de un halo de inhibición de crecimiento alrededor del pozo (Ríos, J.L., 1988, Brantner, A., 1994 y Kandil, O., 1994).

4.4 Determinación de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) del Crecimiento

Debido a que sólo el palo de Brasil ^{palito de Brasil} mostró efecto sobre el crecimiento en los ensayos preliminares, se le determinó su CMI. Esto se llevó a cabo a diferentes concentraciones en tubos con caldo soya tripticasa (CASOY) y posteriormente inoculando al 1% (3×10^8 bacterias) las cepas de *E. coli* y se agregaron diferentes volúmenes de agua estéril a fin de alcanzar un volumen final de 3 ml en cada tubo. Después de incubar por 24 h a 37°C se analizó la presencia o ausencia de crecimiento, sembrando 100 µl del cultivo sobre una placa de Petri y luego se agregó agar soya

tripticosa y se incubó por 24 h a 37°C. La CMI se definió como la concentración mínima del extracto que inhibió el crecimiento de las diferentes cepas de *E. coli* (Verástegui, M.A, 1996). Cada prueba se realizó por duplicado y con tres repeticiones.

4.5 Tolerancia al calor del Extracto de Palo de Brasil

El extracto etanólico de palo de Brasil fue esterilizado por filtración y luego sometido a 121 °C por 15 min a fin tener una idea de la naturaleza de nuestra sustancia activa inhibitoria.

4.6 Cromatografía en Capa Fina y Ensayo de Bioautografía

Se trató de aislar y detectar el (los) compuesto(s) activo(s) presente(s) en el extracto de palo de Brasil mediante cromatografía en capa fina. Para este ensayo se usaron tres mezclas de solventes como fase móvil, la primera constó de metanol: éter de petróleo: benceno en diferentes concentraciones, la segunda fue cloroformo: metanol y la tercera de etanol: metanol (ver mezclas y proporciones en tabla 2). Las placas de 20 x 20 cm para la fase estacionaria fueron llenadas con sílica gel tipo G, tamaño 10-40 μ y fijador CaSO₄ (Sigma, Alemania). Después que las placas secaron fueron activadas a 120 °C por 1 h.

Para el ensayo de bioautografía se utilizó la mezcla de solventes que logró una mejor separación de los compuestos bajo la luz UV (cloroformo: metanol, 8:2) sobre la placa cromatográfica. Se dejó evaporar el solvente y posteriormente se agregó agar soya

tripticosa, después que solidificó, se sembró 5×10^8 UFC *E. coli* por extensión sobre el agar y se incubaron a 37 °C por 24 h en cámara húmeda, al cabo de la cual se determinaron zonas de inhibición de crecimiento.

4.7 Actividad sobre la Producción de Verotoxinas

4.7.1 Obtención de Sobrenadantes con Verotoxinas

Antes de realizar este ensayo se llevó a ~~l~~ cabo un conteo de los microorganismos después de 24 h de incubación con concentraciones menores a su CMI (25, 50, y 75%) a fin de detectar si en estas condiciones había una disminución considerable de la población microbiana, lo cual pudiera también provocar una disminución de la cantidad de verotoxina tipo I y tipo II a ser detectada.

Para los ensayos de detección de toxinas se inocularon 50 µl de cultivo de 24 h de *E. coli* en tubos con caldo de soya tripticosa, a los cuales previamente se le adicionaron diferentes concentraciones del extracto de palo de Brasil (75, 50 y 25% de la CMI) y agua destilada estéril a fin de alcanzar un volumen final de 5 ml. Después de incubar los tubos por 18 h, las bacterias fueron lisadas por sonicación, posteriormente los tubos fueron centrifugados a 1140 g (rotor JA21) por 15 min a 2°C y se obtuvieron los sobrenadantes, los cuales fueron distribuidos en alícuotas de 4 ml y liofilizados. Para la cuantificación de las verotoxinas se utilizó el sistema comercial VTEC-RPLA “Seiken” (Oxoid, United Kingdom) (Beutin, L., 1996).

4.8 Actividad del extracto de palo de Brasil sobre la adhesión de *E. coli* a la línea celular HeLa

Estos ensayos se llevaron a cabo siguiendo la metodología descrita por Darfeuille- Michaud, (1990) y que consistió en varios pasos como siguen:

4.8.1 Radiomarcaje de *E. coli*

Antes de realizar el marcaje de la cepa se realizó una curva de asimilación del radionucleótido por *E. coli*. Para esto se adicionaron 5 y 10 $\mu\text{Ci/ml}$ a cultivos de *E. coli*. Se realizaron cuentas cada h. Encontramos que la mejor incorporación del radionucleótido fue a las 3 h de incubación agregando 10 $\mu\text{Ci/ml}$. Con estos datos se realizó el radiomarcaje de las cepas, se inocularon tubos de 3 ml con 1% de cultivo fresco de la cepa (3×10^8 UFC/ml) y con 10 $\mu\text{Ci/ml}$ de metil- 1- 2- ^3H timidina (Amersham Pharmacia Biotech, UK), se incubaron a 37°C por 3 h, luego estas bacterias fueron utilizadas para las pruebas de adhesión.

4.8.2 Cultivo de línea celular HeLa

La línea celular HeLa fue gentilmente donada por el Dr. Juan Manuel Alcocer del Laboratorio de Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la UANL. Las células fueron rutinariamente crecidas en medio mínimo esencial (MEM, Gibco BRL, Canadá) suplementado con 10% de suero bovino fetal (Gibco BRL, Canadá). Estas células fueron crecidas hasta confluencia a 37°C y 5% de CO_2 . Posteriormente

fueron disgregadas con 4 ml de tripsina- EDTA (25% Tripsina, Gibco BRL, Canadá), contadas y resuspendidas en medio nuevo para los ensayos de adhesión.

4.8.3 Determinación de la adhesión de *E. coli* a células HeLa

a) Pre- exposición de bacterias al extracto de palo de Brasil

A cultivos de *E. coli* marcadas radioactivamente (1×10^8 bact/ ml) se le agregó extracto de palo de Brasil a concentraciones mas bajas del CMI (25, 50 y 75%) y se ajustaron con agua destilada estéril a un volumen final de 3 ml. Estas suspensiones fueron incubadas a 37°C por 1 h. Posteriormente los cultivos fueron centrifugados a 1030 g por 10 min a temperatura ambiente y se lavaron con PBS en dos ocasiones. Las células posteriormente fueron resuspendidas en 3 ml de medio mínimo esencial (MEM, Gibco BRL, Canadá). Se tomaron alícuotas de 0.5 ml (5×10^7 UFC) de la suspensión anterior y se agregaron 0.5 ml de una suspensión de células HeLa (5×10^4 cél) se incubaron por una hora 37 °C y 5% CO₂. Luego de este tiempo los tratamientos fueron centrifugados a 114 g por 10 min, y se lavaron con PBS 50 mM (pH 7.2) en dos ocasiones. Finalmente se resuspendieron en 0.5 ml de PBS. Se tomaron alícuotas de 50 µl y se colocaron en el centro de un pedazo de papel *whatman* N° 1 y se dejaron secar a 80 °C, luego se colocaron en viales de centelleo y se agregaron 5 ml de solución de centelleo (Tolueno + PPO 0.06% en 100 ml de tolueno y POPO 0.006% en 100 ml de tolueno).

b) Pre- exposición de la célula HeLa al extracto de palo de Brasil

Se tomaron 0.5 ml de una suspensión con células HeLa (5×10^4 cél.) y se lavaron en dos ocasiones con PBS. Finalmente se resuspendieron en 0.5 ml de MEM que contenían diferentes concentraciones del extracto de palo de Brasil (25, 50 y 75% del CMI). Se incubaron por una hora a 37°C y 5% de CO₂. Posteriormente la suspensión fue centrifugada a 114 g por 10 min y fue lavada con PBS en dos ocasiones. Finalmente las células fueron resuspendidas en 0.5 ml de MEM al cual se le adicionaron 0.5 ml de la suspensión bacteriana (5×10^7 UFC). Los tratamientos se incubaron por 1 h a 37°C y 5% CO₂. Después de centrifugar y lavar en dos ocasiones, se resuspendió en 0.5 ml de PBS y se siguió el procedimiento especificado anteriormente para determinar las cuentas por minuto de nuestros ensayos.

Análisis Estadístico

En todos los estudios realizados se analizaron estadísticamente media, desviación estándar y comparación de medias en el paquete *statistical win* y, las gráficas fueron realizadas en el paquete *Microsoft office 2000*.

5. RESULTADOS

5.1 Análisis Preliminar de Inhibición y Determinación de la CMI del Crecimiento.

Se colectaron *comparar* 35 plantas en hierberías utilizadas por la medicina tradicional para tratar problemas gastrointestinales (Tabla 1). De estas se realizaron los extractos etanólicos y acuosos. Al realizar los ensayos preliminares, sólo el extracto etanólico de palo de Brasil fue la única que mostró efecto inhibitorio del crecimiento sobre las tres cepas analizadas. De este se realizó la determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual fue de 4.0 mg/ml para las tres cepas probadas (tabla 2). *¿identificación por taxonomía?*

5.2 Determinación de algunas características del extracto de palo de Brasil.

El extracto de palo de Brasil esterilizado por calor tuvo el mismo efecto de inhibición del crecimiento que el extracto esterilizado en frío por filtración (Fig.1 A). Cuando tratamos de separar los compuestos activos presentes en el extracto, la mezcla de solventes que permitió una mayor cantidad bandas fue cloroformo: metanol (8: 2) (tabla 3). Al separar el extracto con estos solventes obtuvimos 14 bandas visibles bajo la luz UV (Fig.2 A). Al realizar la bioautografía no obtuvimos inhibición del crecimiento con ninguno de los compuestos separados (Fig. 2 B)

Tabla 1 Halos de Inhibición del crecimiento de extractos etanólicos y acuosos de Plantas medicinales

Nombre Científico ^a	Nombre común	Parte utilizada de la Planta	Extracto	
			Etanólico	Acuoso
<i>Toxodium mucronatum</i>	Ahuehuate	Corteza	-	-
<i>Artemisa lasimata</i>	Ajenjo	Ramas	-	-
<i>Ocimum basilicum</i>	Albahaca	Hojas	-	-
<i>Ocimum micranthum</i>	Albacar	Corteza	-	-
<i>Vaccinium geminiflora</i>	Arándano	Ramas	-	-
<i>Helietta parvifolia</i>	Barreta	Ramas	-	-
<i>Peumus boldus</i>	Boldo	Hojas	-	-
<i>Atriplex canescens</i>	Cenizo	Corteza	-	-
<i>Krameria secundiflora</i>	Clameria	Corteza	-	-
<i>Juliana adstringens</i>	Cuachalalate	Corteza	-	-
<i>Artemisa mexicana</i>	Estafiate	Corteza	-	-
<i>Citrus aurantium</i>	Naranja agria	Flor	-	-
<i>Larrea tridentata</i>	Gobernadora	Hojas	-	-
<i>Euphorbia prostata</i>	Hierba golondrina	Hojas	-	-
<i>Psidium guayaba</i>	Guayaba	Hojas	-	-
<i>Flourensia cernua</i>	Hoja sé	Corteza	-	-
<i>Lippia dulcis</i>	Hierba buena	Hojas	-	-
<i>Hiptis verticilata</i>	Hierba del Negro	Hojas	-	-
<i>Acacia farneciusa</i>	Huizache	Corteza	-	-
<i>Solanum nigrum</i>	Hierba Mora	Hoja	-	-
<i>Bacchari glutinosa</i>	Jarilla	Ramas	-	-
<i>Malva parviflora</i>	Malva	Ramas	-	-
<i>Rhizophora mangle</i>	Mangle rojo	Corteza	-	-
<i>Prosopis juliflora</i>	Mezquite	Fruto	-	-
<i>Salvia coccinea</i>	Mirto	Rama	-	-
<i>Morus alba</i>	Mora	Fruto y Hojas	-	-
<i>Cnidospolus urens</i>	Ortiga	Ramas	-	-
<i>Lantana trifolia</i>	Orosus	Ramas	-	-
<i>Haematoxylon brasiletto</i>	Palo de Brasil	Corteza	1.2 ± 1 cm ^b	-
<i>Rosmarina officialis</i>	Rosa de Castilla	Ramas	-	-
<i>Rosamarina officialis</i>	Romero	Corteza	-	-
<i>Lippia alba</i>	Salvia Real	Hojas	-	-
<i>Jatropha cordata</i>	Sapo	Hojas	-	-
<i>Salix taxipholia</i>	Sauce	Corteza	-	-
<i>Walteria americana</i>	Tapacola	Rama	-	-

(-): extracto no activo sobre el crecimiento; ^a: nombres específicos (Martínez M. 1979), ^b: halo de inhibición

Tabla 2 Concentración Mínima Inhibitoria (CMI)

Cepas de <i>Escherichia coli</i>	Extracto de Palo de Brasil (<i>Haematoxylon brasiletto</i>)	
	Etanólico mg/ ml	Acuoso mg/ ml
ATCC 43894	4.0 ± 0.1	-
ATCC 43895	4.0 ± 0.1	-
ATCC 25922	4.0 ± 0.1	-

(-) Extracto negativo en la inhibición del crecimiento

Tabla 3. Mezcla de solventes utilizados en la separación cromatográfica en capa fina del extracto etanólico de palo de Brasil

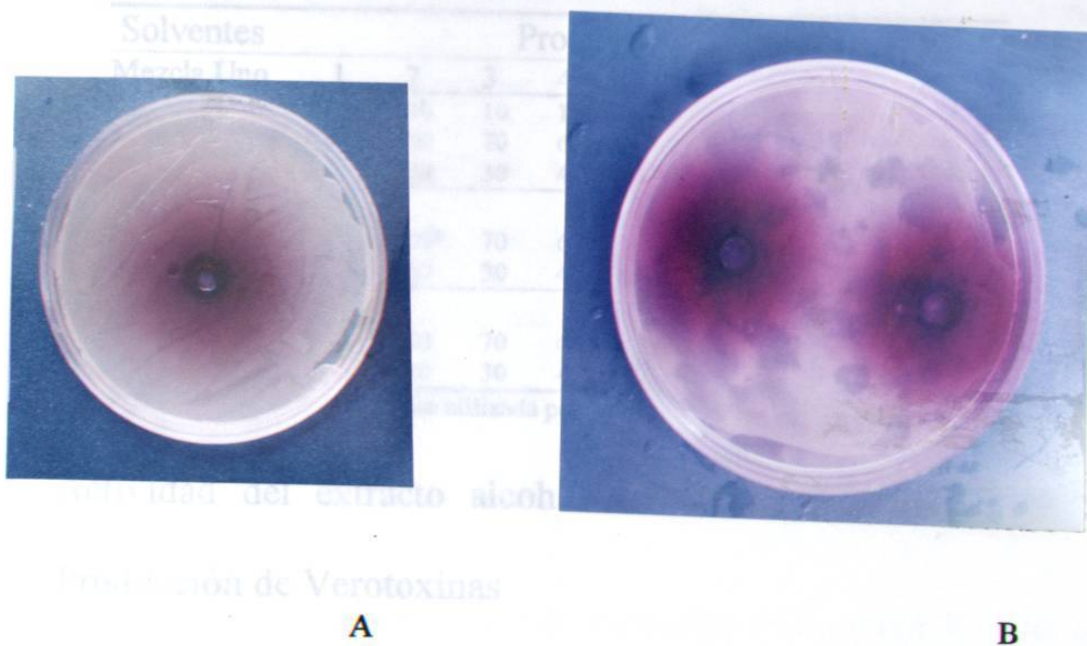


Fig. 1A Halo de inhibición del extracto esterilizado por filtración
 1B Halo de inhibición del extracto esterilizado por calor a 121 °C por 15 min.

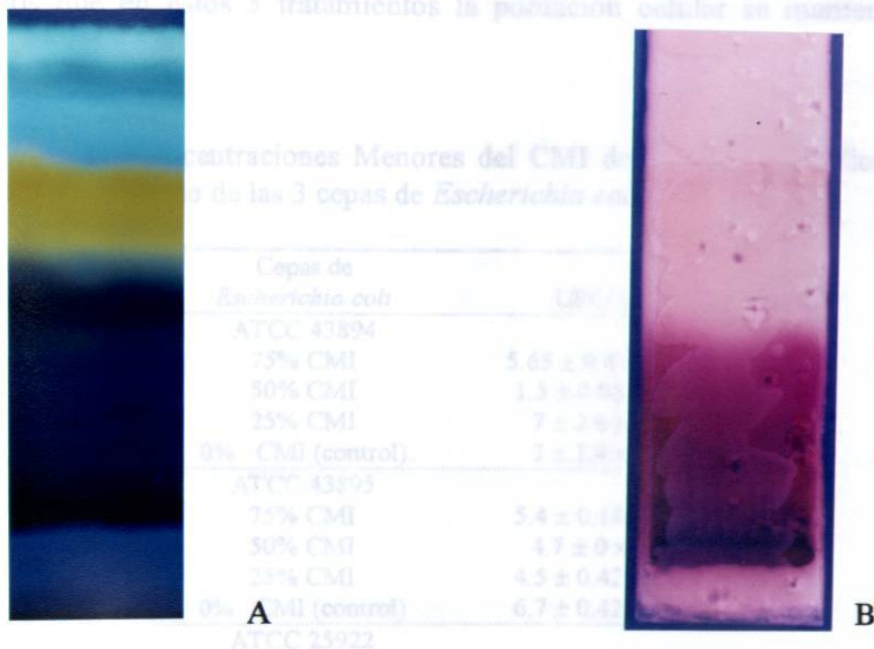


Fig. 2A Separación cromatográfica del extracto de palo de Brasil
 2B Bioautografía de la separación cromatográfica del extracto de palo de Brasil
 (*Haematoxylon brasiletto*)

Tabla 3. Mezcla de solventes utilizados en la separación cromatográfica en capa fina del extracto etanólico de palo de Brasil

Solventes	Proporción de Solventes (ml)								
	1	2	3	4	5	6	7	8	9
Mezcla Uno									
Metanol	10	10	10	10	10	10	10	10	10
Éter de Petróleo	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Benceno	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Mezcla Dos									
Cloroformo	90	80*	70	60	50	40	30	20	10
Metanol	10	20	30	40	50	60	70	80	90
Mezcla tres									
Etanol	90	80	70	60	50	40	30	20	10
Metanol	10	20	30	40	50	60	70	80	90

* Esta mezcla de solventes fue utilizada por su mejor separación cromatográfica.

5.3 Actividad del extracto alcohólico de Palo de Brasil sobre la Producción de Verotoxinas

Para este ensayo previamente se realizó la determinación de la población microbiana al agregar 25, 50 y 75% del CMI (1, 2 y 3 mg/ml) del extracto. Encontramos que en estos 3 tratamientos la población celular se mantenía constante (Tabla 4).

Tabla 4. Efecto de Concentraciones Menores del CMI del extracto etanólico de Palo de Brasil sobre el crecimiento de las 3 cepas de *Escherichia coli*.

Cepas de <i>Escherichia coli</i>	UFC/ ml
ATCC 43894	
75% CMI	$5.65 \pm 0.4 \times 10^7$ *
50% CMI	$1.5 \pm 0.03 \times 10^8$
25% CMI	$7 \pm 2.8 \times 10^8$
0% CMI (control)	$7 \pm 1.4 \times 10^8$
ATCC 43895	
75% CMI	$5.4 \pm 0.14 \times 10^7$
50% CMI	$4.7 \pm 0 \times 10^8$
25% CMI	$4.5 \pm 0.42 \times 10^8$
0% CMI (control)	$6.7 \pm 0.42 \times 10^8$
ATCC 25922	
75% CMI	$5.4 \pm 1.1 \times 10^7$
50% CMI	$7.4 \pm 0.98 \times 10^7$
25% CMI	$4.5 \pm 0.28 \times 10^8$
0% CMI (control)	$7 \pm 0.28 \times 10^8$

* Promedio \pm Desviación estándar

Para la semicuantificación de las verotoxinas I y II se utilizó el ensayo de hemaglutinación pasiva en reversa (VTEC- RPLA) de la compañía comercial *Denka Seiken*. Los resultados obtenidos se muestran en la tabla 5 en donde observamos que el extracto de palo de Brasil sí afectó la producción de las toxinas, incluso a concentraciones muy bajas (1 y 2 mg/ml, 25 y 50% CMI, respectivamente). Al agregar el 50% del CMI la cantidad de verotoxinas se redujeron desde un 50% hasta un 87% y en el caso del 75% del CMI la reducción fue mayor del 75% (tabla 5).

Tabla 5. Titulaciones de la Cuantificación de Verotoxinas tipo I y tipo II de las cepas EHEC bajo la Actividad de Diferentes concentraciones de Extracto Etanólico de Palo de Brasil.

Cepas	75% CMI (3 mg/ml)		50% CMI (2 mg/ml)		25% CMI (1 mg/ml)		0% CMI (Control)	
	Verotoxinas							
	Vt I	Vt II	Vt I	Vt II	Vt I	Vt II	Vt I	Vt II
43894	1: 8 <u>98.44%</u>	1:32 <u>99.2%</u>	1:256 <u>50%</u>	1:512 <u>87.5%</u>	1:256 <u>50%</u>	1:2048 <u>50%*</u>	1:512 <u>100%</u>	1:4096 <u>100%</u>
43895	1:128 <u>75%</u>	1:256 <u>93.5%</u>	1:128 <u>75%</u>	1:2048 <u>50%</u>	1:512 <u>100%</u>	1:4096 <u>100%</u>		
25922	0	0	ND	ND	ND	ND	0	0
Medio + Extracto								

ND: no determinado, *: porcentaje de inhibición de la producción de verotoxinas

En general podemos decir que la cepa ATCC 43894 (Fig. 3) fue la más afectada en la producción de la verotoxinas por el extracto de palo de Brasil con respecto a la cepa ATCC 43895 (Fig. 4).

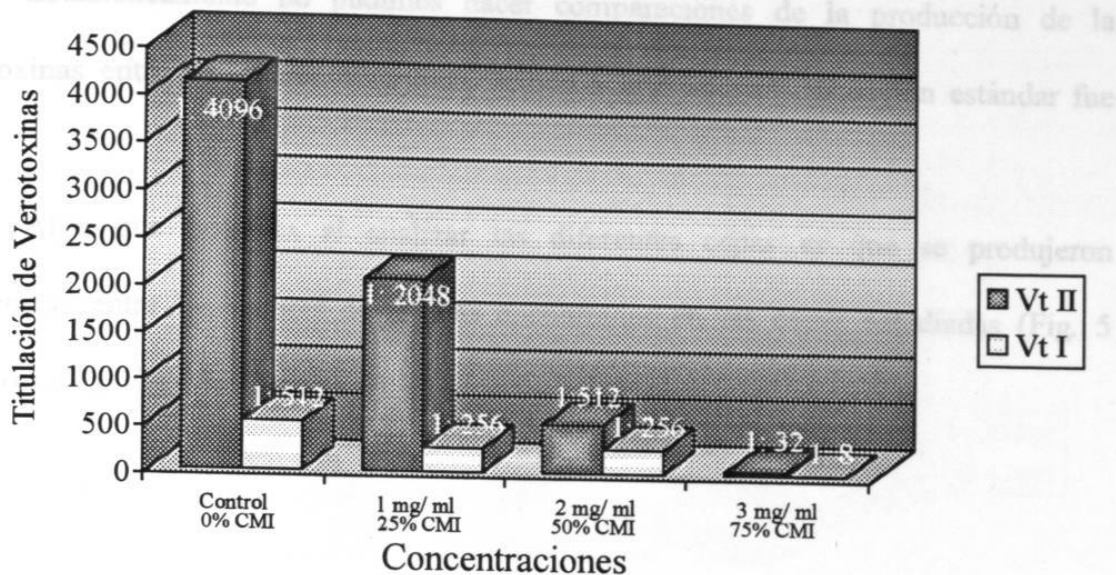


Fig. 3 Efecto del Extracto de Palo de Brasil en la Producción de la Verotoxina I y II de *E. coli* 43894 a diferentes concentraciones menores de la CMI

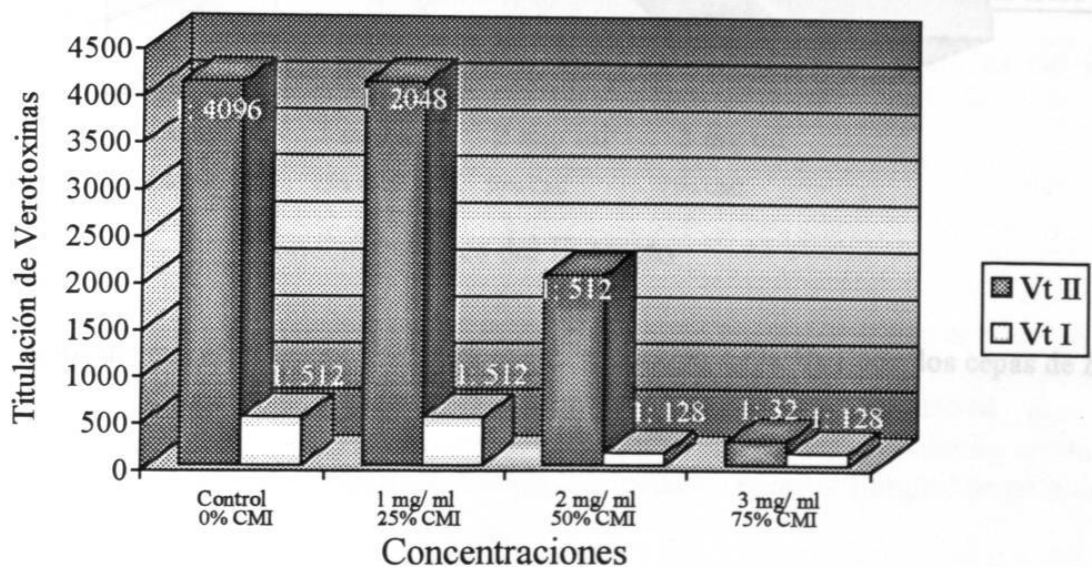


Fig. 4 Efecto del Extracto de Palo de Brasil en la Producción de la Verotoxina I y II de *E. coli* 43895 a diferentes concentraciones menores de la CMI

Estadísticamente no pudimos hacer comparaciones de la producción de la verotoxinas entre los diferentes grupos, debido a que nuestra desviación estándar fue cero.

Algo que notamos al analizar las diferentes cepas es que se produjeron diferencias entre los valores de toxinas encontradas en las cepas estudiadas (Fig. 5 verotoxina I y Fig. 6 verotoxina II)

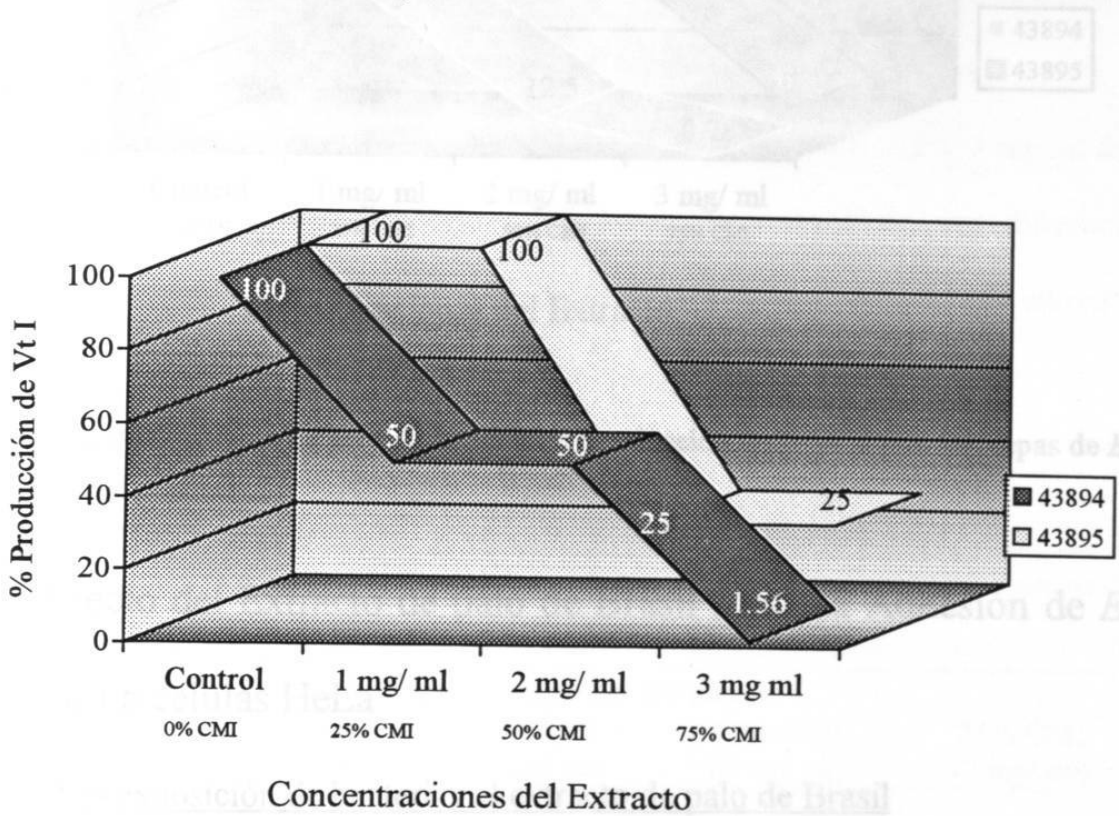


Fig. 5 Efecto del extracto de palo de Brasil en la Producción de la Vt I por dos cepas de *E. coli*.

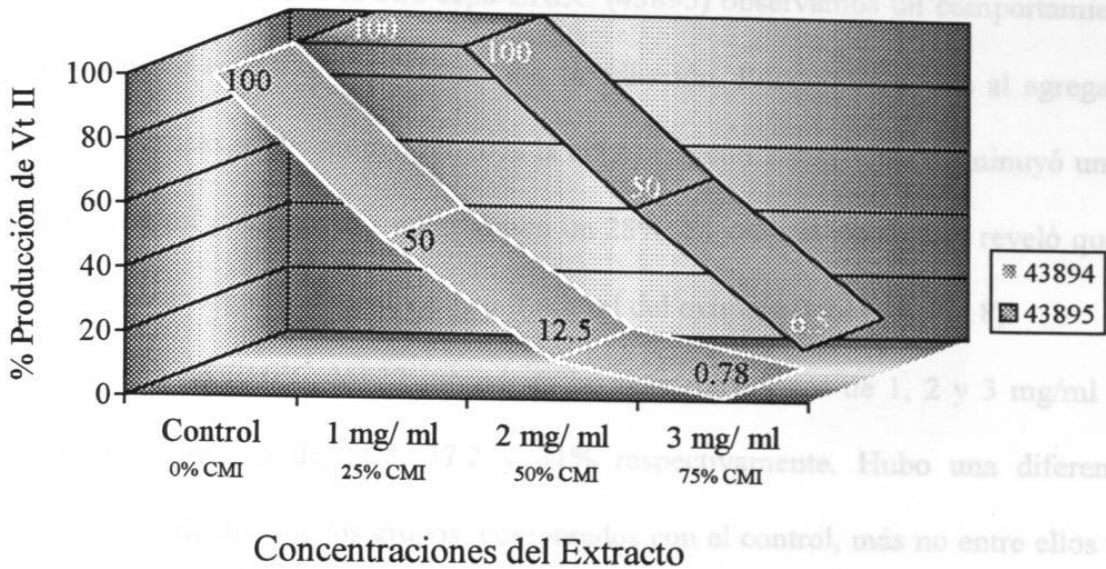


Fig. 6 Efecto del extracto de palo de Brasil en la Producción de la Vt II por dos cepas de *E. coli*

5.4 Efecto del Extracto de palo de Brasil sobre la Adhesión de *E. coli* a células HeLa

a) Pre- exposición de bacterias al extracto de palo de Brasil

Este procedimiento consistió en la incubación previa de la bacteria con varias concentraciones del extracto (3, 2 y 1 mg/ml, que representaba el 75, 50 y 25% del CMI, respectivamente). Nuestros resultados indicaron para la cepa 43894, que al agregar 1 y 2 mg/ml del extracto la adhesión casi no se vio afectada; habiendo un 96 y 92 % de adhesión respectivamente, sin embargo, cuando agregamos 3 mg/ml de palo de

Concentración de Palo de Brasil	25% CMI (1 mg/ml)	50% CMI (2 mg/ml)	75% CMI (3 mg/ml)
Adhesión (Células)	1618375 ± 476	1450 ± 136	1237.5 ± 164
Adhesión (%)	41.5 %	37.2 %	31.7 %

Brasil, la adhesión disminuyó en un 88% (Fig. 7). Sin embargo, aún con estas diferencias visibles no encontramos diferencia estadística entre nuestros tratamientos.

Cuando analizamos la otra cepa EHEC (43895) observamos un comportamiento diferente ya que se vio que se afectó más la adhesión. Encontramos que al agregar 1 mg/ml del extracto se disminuyó un 10% la adhesión, con 2 mg/ml se disminuyó un 12 % y con 3 mg/ml disminuyó la adhesión en un 28%. El análisis estadístico reveló que sí existía diferencia significativa al agregar 3 mg/ml del extracto (tabla 6 y Fig.8).

La cepa no EHEC 25922 mostró en las concentraciones de 1, 2 y 3 mg/ml del extracto una adhesión de 41.5, 37.2 y 31% respectivamente. Hubo una diferencia estadística significativa de los grupos comparados con el control, más no entre ellos 25, 50 y 75% CMI (tabla 6 y Fig. 8).

Tabla 6 Efecto del extracto de palo de Brasil sobre la adhesión de *E. coli* a la célula HeLa. La bacteria y el extracto fueron incubados previamente y luego se realizaron los ensayos de adhesión.

Cepa	Concentración de Palo de Brasil			
	0% CMI (Control)	25% CMI (1 mg/ ml)	50% CMI (2 mg/ ml)	75% CMI (3 mg/ ml)
43894				
CMP	11697.5 ± 1722	11244.25 ± 2653	10776.25 ± 2461	10278 ± 2066
% Adhesión	100 %	96.1 %	92.1 %	87.8 %
43895				
CMP	7436.25 ± 882.7	6720 ± 791	6598.75 ± 239.2	5340 ± 642
% Adhesión	100 %	90 %	88.7 %	71.89 %
25922				
CMP %	3900 ± 451	1618375 ± 476	1450 ± 136	1237.5 ± 164
Adhesión	100 %	41.5 %	37.2 %	31.7 %

Pre-exposición de células HeLa al extracto de palo de Brasil

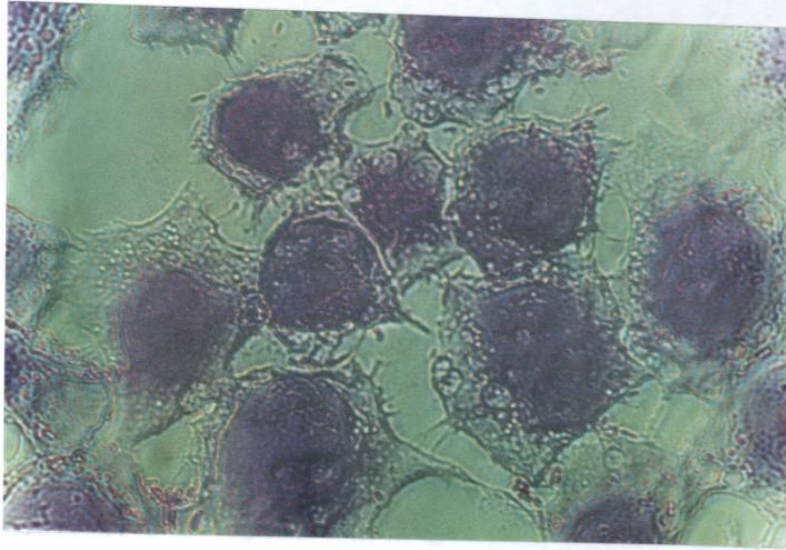


Fig. 7 Adhesión bacteriana al 75% CMI cuando la bacteria estuvo expuesta por 1 h a 37 °C con el extracto de palo de Brasil.

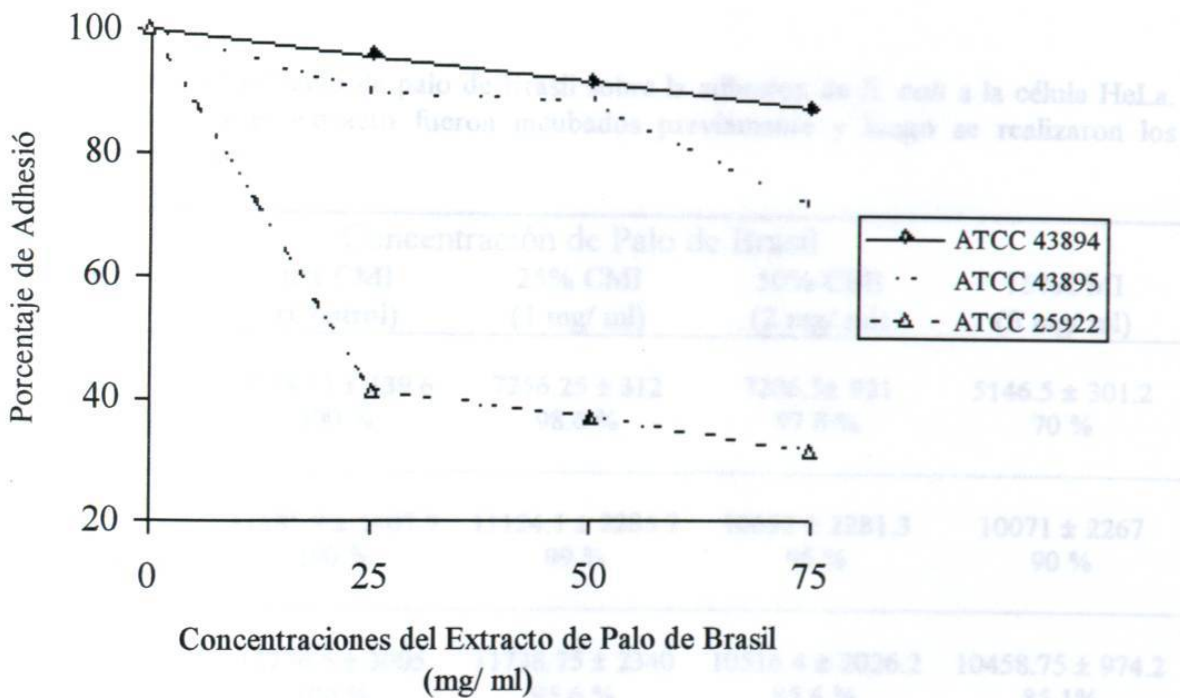


Fig. 8 Adhesión de *Escherichia coli* sobre célula HeLa. La bacteria fue incubada con el extracto antes del ensayo de adhesión

b) Pre- exposición de células HeLa al extracto de palo de Brasil

En este caso el extracto fue puesto en contacto primeramente con la línea celular, después de incubar se centrifugo y se agregó medio nuevo y la cepa bacteriana. Bajo estas circunstancias encontramos que al agregar 1 o 2 mg/ml (25 y 50% de CMI) a la cepa EHEC 43894 no se observó disminución de la adhesión bacteriana. Sin embargo, al agregar 3 mg/ml (75% CMI) el porcentaje de adhesión disminuyó a un 70%. Este mismo comportamiento se observó con la otra cepa EHEC 43895 ya que con 1 o 2 mg/ml no se observó disminución de la adhesión, en tanto que a 3 mg/ml (75% CMI) sólo disminuyó un 10%. La cepa no EHEC 25922 mostró un 86 y 85 % de adhesión con las concentraciones de 2 y 3 mg/ml del extracto, mientras que a 1 mg/ml no hubo casi inhibición de la adhesión (tabla 7 y Fig. 9)

Tabla 7 Efecto del extracto de palo de Brasil sobre la adhesión de *E. coli* a la célula HeLa. La célula HeLa y el extracto fueron incubados previamente y luego se realizaron los ensayos de adhesión.

Cepa	Concentración de Palo de Brasil			
	0% CMI (Control)	25% CMI (1 mg/ ml)	50% CMI (2 mg/ ml)	75% CMI (3 mg/ ml)
43894				
CMP	7354.75 ± 439.6	7256.25 ± 312	7206.5 ± 921	5146.5 ± 301.2
% Adhesión	100 %	98.6 %	97.8 %	70 %
43895				
CMP	11185.9 ± 1407.9	11124.1 ± 2285.7	10652 ± 2281.3	10071 ± 2267
% Adhesión	100 %	99 %	95 %	90 %
25922				
CMP	12276.5 ± 3005	11738.75 ± 2340	10516.4 ± 2026.2	10458.75 ± 974.2
% Adhesión	100 %	95.6 %	85.6 %	85.1%

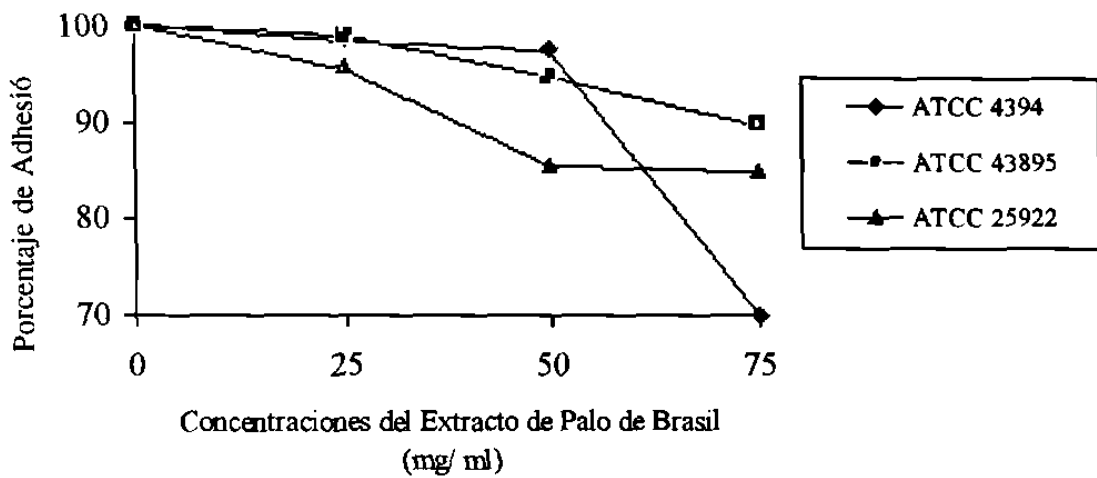


Fig. 9 Adhesión de *Escherichia coli* sobre HeLa. La célula HeLa fue incubada con el extracto antes del ensayo.

6. DISCUSIÓN

Los antibióticos son algunas veces asociados con efectos adversos en pacientes entre los que se incluyen hipersensibilidad, disminución de microorganismos benéficos del intestino, inmunosupresión y reacciones alérgicas; esta es una de las razones por las que el estudio de búsqueda de sustancias antimicrobianas a partir de fuentes naturales es necesario. (Kandil, O., 1994).

En nuestros ensayos sólo el extracto etanólico de *Haematoxylon brasiletto* (palo de Brasil) mostró actividad contra las cepas de *E. coli* analizadas. En estudios realizados en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas, UANL con esta misma planta, al analizar su actividad contra *Clostridium perfringens* y *Vibrio cholerae*, se demostró ser también sumamente eficaz, teniendo CMI's más bajos que los encontrados por nosotros, especialmente para *C. perfringens*. Estos estudios concuerdan con el patrón de inhibición encontrado por otros autores, ya que Grosvenor (1995) estableció que las bacterias gram-positivas eran más susceptibles contra extractos de plantas medicinales en comparación con las gram-negativas. Se ha establecido que esta susceptibilidad se debía a características morfológicas, ya que las bacterias gram-negativas poseen una membrana externa compuesta principalmente de lipopolisacáridos, la cual las hace más impermeables a moléculas lipofílicas, tales como antibióticos hidrofóbicos (macrólidos, rifamicinas y actinomicina D), detergentes (sodio dodecil sulfato), sales biliares y triton X- 100 y a tintes hidrofóbicos (eosina, azul metileno y verde brillante). Sin embargo, también esta membrana externa también actúa como una barrera selectiva a moléculas hidrofílicas.

Un reporte similar fue publicado por Vlietinck (1995), cuando estudió más de 100 plantas procedentes de Rwanda siendo también más activos los extractos contra gram-positivos y donde sólo el 10% de los extractos fueron activos contra *E. coli*.

El extracto etanólico de palo de Brasil tuvo un efecto antimicrobiano similar sobre las 3 cepas analizadas en este estudio. Cuando nuestro extracto fue calentado por 15 min a 121 °C se mostró la misma actividad antimicrobiana. Esto nos hace suponer que el principio activo de este extracto no es una proteína, y que pudiera ser de cualquier otro origen químico. Al analizar nuestro extracto en cromatografía de capa fina y realizar el método de bioautografía para tratar de aislar el principio activo, no pudimos encontrar actividad en ninguna de las fracciones separadas, por lo que podemos sospechar que 2 o más sustancias químicas que se encuentran en el extracto pudieran actuar sinérgicamente. Por lo que consideramos que sería de gran interés seguir trabajando en este aspecto.

Las referencias encontradas sobre la actividad antimicrobiana de extractos contra *E. coli* principalmente se han centrado en el estudio de los tipos patogénicos no EHEC, solamente se tiene un dato del efecto sobre EHEC de metabolitos de plantas agregados a la dieta de animales de corral. En este caso el efecto antimicrobiano fue mediado por metabolitos obtenidos de la degradación bacteriana de cumarinas, las cuales se encuentran en plantas. Por lo tanto en este estudio el efecto antimicrobiano no se debió a la planta en sí (Brantner. A., 1994)

Existen muchos factores que afectan la producción de la verotoxinas por EHEC *In vitro*. Dentro de los factores más importantes reportados esta la temperatura, la aireación, y anaerobiosis, así como factores químicos tales como la presencia de hierro,

el pH, el medio de cultivo, fuentes de carbono, aminoácidos, antibióticos y mitomicina C. Según Weinstein (1988) la producción de verotoxina por *E. coli* fue significativamente inhibida cuando se adicionó el Fe^{+3} y este resultado fue marcadamente aumentado cuando se conjuntó con bajas temperaturas (30°C).

Según MacLeod en 1989 la producción de la verotoxina fue mayor a un pH inicial de 8, comparada con un pH de 9.0. De acuerdo a la presencia de O_2 (aerobiosis) los resultados han demostrado que la cantidad de toxina fue mayor que en su ausencia (anaerobiosis).

En 1995 Palumbo y colaboradores llegaron a la conclusión que la temperatura de incubación tenía influencia sobre la producción de la verotoxina, teniendo su mayor producción a los 37 °C y la menor entre 12° y 10 °C. Según estos autores, la producción de la toxina parece estar en función tanto de la temperatura así como del tiempo de crecimiento.

En nuestra investigación consideramos todos estos factores que pudieran influir en la producción de las verotoxinas utilizando condiciones adecuadas de pH, temperatura, aerobiosis estática y tiempo de incubación. Cuando analizamos el efecto de diferentes concentraciones del extracto sobre estas toxinas encontramos que a 3 mg/ml (75% de CMI) se disminuyó significativamente la producción de ambas toxinas en ambas cepas, sin embargo, el comportamiento de las cepas fue diferente, teniendo en una de ellas mejor efecto inhibitorio que en otra.

Se han realizado algunos estudios sobre la inhibición de la adhesión de *Escherichia coli* enteroinvasivas, enterotoxigénicas, enteropatogénicas y enteroagregativas, por bacterias acidolácticas (*Lactobacillus*, *Bifidobacterium*,

Enterococcus) y otras bacterias gastrointestinales o los productos de su metabolismo. Se han encontrado que las bacterias lácticas tienen un mejor efecto bloqueador de la adhesión y esto es debido a que dichas bacterias poseen factores bien definidos que incrementan su adhesión inhibiendo dicho proceso en microorganismos virulentos evitando de esta manera la colonización.

El sistema de adhesión de las cepas de EHEC y EPEC es semejante y esta basado en provocar las lesiones de fijación y borramiento (*attaching and effacing*). Esta lesión se debe a la acción de dos proteínas expresadas por la bacteria, la intimina, la cual ejerce la función principal de adhesión, así como la proteína *Tir*, la cual es expresada, secretada y fijada a las células epiteliales blanco por la misma bacteria, mejorando la adhesión mediada por la intimina, aunque algunos reportes han concluido que la acción de *Tir* solo es coadyuvante, llevándose a cabo la adhesión de las bacteria EPEC y EHEC en la ausencia de la expresión de esta (Knutton S, 1987, Hicks S., 1998 y Frankel G., 1998).

Darfeuille- Michaud (1990) estudiaron la manera de inhibir la adhesión de bacterias ETEC a líneas celulares y a enterocitos. Ellos utilizaron anticuerpos contra los factores de adhesión conocidos como CFA, y obtuvieron una disminución de la adhesión.

En 1992 Chauvière y colaboradores estudiaron la interferencia de la adhesión de cepas de ETEC mediante el uso de *L. acidophilus* vivos y muertos al calor. Ellos encontraron que los lactobacilos vivos inhibieron la adhesión de ETEC, y que existía una competencia en la adhesión al utilizar los lactobacilos muertos, aunque no se ha

establecido como ocurre esto último y se cree que es por competencia de los receptores de membrana para la adhesión.

Coconier y colaboradores (1993) realizaron un trabajo muy similar utilizando patógenos enteroinvasivos (*L. monocytogenes*, *Y. pseudotuberculosis*, *S. enteritidis* var. Typhimurium y EPEC) y *L. acidophilus*, encontrando que los lactobacilos inhibieron eficientemente las asociaciones de invasión de los patógenos. Sin embargo, el mecanismo de inhibición no está claro, ya que los resultados no explicaron si la exclusión de patógenos fue debida a la competencia por los receptores específicos o por la formación de una biopelícula de bacterias que evitó el acceso a la superficie de las células.

En 1996 Ouwehand y colaboradores realizaron la purificación y caracterización de un componente producido por *L. fermentum* que inhibía la adhesión de *E. coli* que expresaba adhesinas K88 en la mucosa ileal de cerdos. El componente encontrado fue una N- acetilglucosamina, la cual se estableció que actuaba sobre la mucosa y no sobre las fimbrias. Este mismo grupo de investigadores en 1997 estudió la efectividad de la β - lactoglobulina aislada del calostro de bovino para inhibir la adhesión de *E. coli* sobre glicoproteínas del ileon humano. Se encontró que este componente del calostro ejercía una acción inhibitoria de la adhesión bacteriana por competencia de los receptores.

En nuestro trabajo investigamos el efecto del extracto etanólico del palo de Brasil sobre la adhesión de la línea celular HeLa. Realizamos dos ensayos a fin de poder sugerir sobre que receptores está actuando el extracto, en el primero incubamos a las bacterias con concentraciones del extracto y, en el segundo incubamos la línea celular con nuestro extracto antes de ponerla en contacto con las cepas.

En el primer procedimiento obtuvimos que el comportamiento adhesivo de las EHEC y la cepa no EHEC variaron grandemente. En una EHEC y la no EHEC el extracto inhibió la adhesión a las células. Sin embargo, en la otra cepa EHEC no se observó diferencia significativa, lo que nos puede sugerir que el efecto del extracto varía de cepa a cepa, por lo que la búsqueda del mecanismo molecular de acción de este extracto resultaría sumamente interesante.

En el segundo procedimiento, cuando se incubó el extracto con la línea celular los resultados en la adhesión también fueron distintos entre las cepas utilizadas. Sin embargo, en las tres cepas se obtuvo una mayor disminución de la adhesión en comparación con el primer procedimiento probado. Estos resultado nos pudieron sugerir que el extracto puede actuar en ambos receptores (bacterianos y celulares), pero los celulares tendrían mayor facilidad para bloquearse por el extracto. Sin embargo, para sostener esta sospecha hacen falta mas estudios al respecto.

En síntesis, los resultados encontrados en este trabajo de investigación revelan que sola una de 35 plantas usadas en este estudio tuvo efecto sobre algunos procesos metabólicos de EHEC tales como el crecimiento, la producción de verotoxinas y la adhesión a línea celular HeLa, por lo que se acepta la hipótesis propuesta inicialmente.

7. CONCLUSIONES

El extracto etanólico de palo de Brasil (*Haematoxylon brasiletto*) tuvo efecto sobre *Escherichia coli* O157:H7 tanto en el crecimiento, producción de verotoxinas y adhesión a la línea celular HeLa.

La concentración mínima inhibitoria del extracto etanólico de palo de Brasil fue de 4 mg/ml para las tres cepas, ATCC 43894, 43895 y 25922.

La actividad antibacteriana de palo de Brasil no fue afectada cuando se trató a 121 °C por 15 min.

De la separación cromatográfica se obtuvieron 14 fracciones, las cuales en forma individual no mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de EHEC.

En las concentraciones usadas la producción de las verotoxinas se vio afectada al agregar concentraciones mas bajas del CMI de Palo de Brasil.

La adhesión de EHEC a células HeLa se vio afectada a concentraciones menores de CMI, aunque en bajos niveles, sugiriéndose una posibilidad de un bloqueo de los receptores bacterianos y celulares, teniendo mayor efecto sobre los receptores celulares que sobre los receptores bacterianos.

8. REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

- 1.- American Gastroenterological Association: Consensus Conference Statement. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 Infections: An Emerging National Health Crisis, July 11-13, 1994. *Gastroenterol.* 108: 1923-1934.
- 2.- Babic I., C. Nguyen-the, M.J. Amoit and S. Aubert. 1994. Antimicrobial Activity of Shredded Carrot Extracts on Food-Borne Bacteria and Yeast. *J Appl. Bacteriol.* 76: 135-141.
- 3.- Barnett D., D. Philpott, P. Sherman and C. Lingwood. 1997. Comparison of Enterohemorrhagic *E. coli* and Enteropathogenic *E. coli* Binding to Glycolipid/ Lipid Receptor. [Internet: [www](http://www.sun1.bham.ac.uk/bcm4gth6/vtec/issue3/vtecv91.htm)] Address: <http://www.sun1.bham.ac.uk/bcm4gth6/vtec/issue3/vtecv91.htm>
- 4.- Bell B.P., M. Goldoft and P.M. Griffin. 1994. A Multistate Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Associated Bloody Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome from Hamburgers. *JAMA* 272: 1349-1353.
- 5.- Bell B.P., P.M. Griffin and P. Lozano. 1997. Predictors of Hemolytic Uremic Syndrome in Children During a Large Outbreak of *Escherichia coli* O157:H7 Infection *Pediatrics.* 100:312
- 6.- Benitez A., R. Spelbrink, A. Silva, T. Phillips, C. Stanley, M. Boesman-Finkelstein and R. Finkelstein. 1997. Adherence of *Vibrio cholerae* to Culture Differentiated Human Intestinal Cells: An In Vitro Colonization Model. *Infect Immun.* 3474-3477.

- 7.- Besser R.E., S. M. Lett and J.T. Webber. 1993. An Outbreak of Diarrhea and Hemolytic Uremic Syndrome from *Escherichia coli* O157:H7 in Fresh-Pressed Apple Cider. *JAMA* 269: 2217-2220.
- 8.- Beutin Lothar, S. Zimmermann and K. Gleier. 1996. Rapid Detection and Isolation of Shiga- Like Toxin (Verotoxin)- Producing *Escherichia coli* by Direct Testing of Individual Enterohemolytic Colonies from Washed Sheep Blood Agar Plates in the VTEC- RPLA Assay. *J. Clin. Microbiol.* Vol 34 (11): 2812- 2814.
- 9.- Boerlin Patrick, S.A. McEwen, F. Boerlin- Petzold, J.B. Wilson, R.P. Johnson and C.L. Gyles. 1999. Associations Between Virulence Factors of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* and Disease in Humans. *J. Clin. Microbiol.* 37 (3): 497-503.
- 10.- Boyce T.G., D.L Swedlow and P.M. Griffin. 1994. *Escherichia coli* O157:H7 and the Hemolytic Uremic Syndrome. *N. Engl. J. Med.* 333: 364-368.
- 11.- Brantner A. and E. Grein. 1994. Antibacterial Activity of Plant Extracts Used Externally in Traditional Medicine. *J Ethnopharmacol.* 44: 335-40.
- 12.- Cáceres A., O. Cano, B. Samayoa and L. Aguilar. 1990. Plants Used in Guatemala for the Treatment of Gastrointestinal Disorders. Screening of 84 Plants Against Enterobacteria. *J. Ethnopharmacol.* 30: 55-73.
- 13.- Cézame, Paul. June 14 1999, Paul Cézame: What the Heck is an *Escherichia coli*? (University of Kansas), [Internet www], Address: <http://www.falcon.cc.ukans.edu/~jbrown/ecoli.html>.
- 14.- Cimolai N., J.E. Carter and B.J. Morrison. 1990. Risk Factors for the Progression of *Escherichia coli* O157:H7 Enteritidis to Hemolytic- Uremic Syndrome. *J. Pediat.* 116: 589- 592.

- 15.- Coconier Marie- Helene, M. F. Bernet, G. Chauviere and A. Servin. 1993. Adhering Heat- killed Human *Lactobacillus acidophilus*, Strain LB Inhibits the Process of Pathogenicity of Diarrhoeagenic Bacteria in Cultures Human Intestinal Cells. J. Diarrhoeal Dis. Res. Dec; 11(4):235- 242
- 16.- Coconnier M. F., Bernet, S. Kernéis, G. Chauviere, J. Fourniat and A. Servin. 1993. Inhibition of Adhesion of Enteroinvasive Pathogens to Human Intestinal Caco-2 Cells by *Lactobacillus acidophilus* strain LB Decreases Bacterial Invasion. FEMS Microbiol. Letters. 110; 299- 306.
- 17.- Darfeuille- Michaud Arlette, D. Aubel, G. Chauviere, C. Rich, M. Bourgues, A. Servi and B. Joly. 1990. Adhesion of Enterotoxigenic *Escherichia coli* to the Human Colon Carcinoma Cell Line Caco- 2 in Culture. Inf. Immun. 58: 893-902.
- 18.- Duffy G., D.C.R. Riordan, J.J. Sherindan, J.E. Call, R.C. Whiting, I.S. Blair and D.A. McDowell. 2000. Effect of pH on Survival, Thermotolerance and Verotoxin Production de *Escherichia coli* O157:H7 During Simulated Fermentation and Storage. J. Food Protect. Vol 63 (1): 12- 18.
- 19.- Feng P. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 Novel Vehicles of Infection and Emergence of Phenotypic Variants. Emerg. Infect. Dis. Vol 1(2): 47-52.
- 20.- Feng P., K.A. Lampel, H. Karch and T.S. Whittman. 1998. Genotypic and Phenotypic Changes in the Emergence of *Escherichia coli* O157:H7. J Infect. Dis. 177: 1750-1753.
- 21.- Finlay B. 1998. Finlay B.: Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) and Enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 (EHEC). [Internet www], Address: <http://www.biotech.ubc.ca/faculty/finlay/epec.htm>.

- 22.- Frankel G., A. D. Phillips, I. Rosenshine, G. Dougan, J. B. Kaper and Stuart. 1998. Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*: More Subversive Elements. *Mol. Microbiol.* 30 (5), 011- 921.
- 23.- Griffin P.M., M.J. Blaser, P.D. Smith and J.I. Ravdin. 1995. *Escherichia coli* O157:H7 and other Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect. Gastr. Tract.* New York, Raven Press. 739-761.
- 24.- Griffin P.M. and R.V. Tauxe. 1996. The Epidemiology of Infections Caused by *Escherichia coli* O157:H7 and the Associated Hemolytic Uremic Syndrome. *Epidemiol. Rev.* 13: 60- 98
- 25.- Grosvenor P. W., A. supriyono and D. O. Gray. 1995. Medicinal Plants from Riau Province, Sumatra, Indonesia. Part 2: Antibacterial and Antifungal Activity. *J. Ethnopham.* Vol 45: 95- 111
- 26.- Guevara J. M., J. Chumpitaz and E. Valencia 1994. The in vitro action of plants on *Vibrio cholerae*. *Rev. Gastroenterol Perú.* 14(1):27-31. [Internet www], Address: <http://chili.rt66.com/hrbmoore/Abstracts/Lippia-AB.txt>
- 27.- Hartland Elizabeth L., M. Batchelor, R.M. Delahay, C. Hale, S. Matthews, G. Dougan, S Knutton, I. Connerton y G. Frankel. 1999. Binding of Intimin from Enteropatogenic *Escherichia coli* to Tir and to Host Cells. *Mol. Microbiol.* 32 (1), 151- 158.
- 28.- Hicks Susan, G. Frankel, J.B. Kaper, G. Dougan and A. D. Phillips. 1998. Role of Intimin and Bundle- Forming Pili in Enteropathogenic *Escherichia coli* Adhesion to Pedriatic Intestinal Tissue *In Vitro*. *Infect. Immun.* 66: 1570- 1578

- 29.- Huilan S., L.G. Zhen and M.M. Mathan. 1991. Etiology of Acute Diarrhoea Among Children in Developing Countries: a Multicentre Study in Five Countries. Bull World Health Organ. 69: 549-555
- 30.- Irobi O. and S. Daramola. 1994. Bacterial Properties of Crude Extracts of *Mitracarpus villosus*. J. Ethnopharmacol. 42: 39-43.
- 31.- Kandil O., N. Radwan, A. Hassan, A. Amer, H. El-Banna and W. Amer. 1994. Extracts and Fractions of *Thymus capitatus* Exhibit Antimicrobial Activities. J. Ethnopharmacol. 44: 19-24.
- 32.- Karmali M., M. Petric and C. Lim. 1985. The Association Between Idiopathic Hemolytic Uremic Syndrome and Infection by Verotoxin- Producing *E. coli*. J. Infect. Dis. 151:775-782.
- 33.- Karmali M. A. and G. Arbus. 1998. Petric M. Hospital- Acquired *Escherichia coli* O157:H7 Associated Haemolytic Uremic Syndrome in a Nurse. Lancet. 1:526
- 34.- Knutton S. 1997. Down Regulation of Intimin Expression During Attaching & Effacing Adhesion. Institute of Child Health, University of Birmingham, Department of Pediatric Gastroenterology, Royal Free Hospital, London and Department of Biochemistry, Imperial College, London, U.K. [Internet www], Address: <http://web.bham.ac.uk/bcm4ght6/vtec/issue3/vtecv18.htm>
- 35.- Lois Joy Galler Foundation. Fact Sheet and Description of HUS. [Internet www], Address: <http://www.loisjoygaller.org/questions.html>
- 36.- March C., I. Sanz and E. Primo. 1991. Antimicrobial Activities on Mediterranean Plants. Zentral. Microbiol. 146: 291-295.

- 37.- MacLeod D.L. y C.L. Gyles. 1989. Effects of Culture Conditions on Yield of Shiga-Like Toxin- IIv from *Escherichia coli*. *Can. J. Microbiol.* Vol. 35, 623-629
- 38.- Marrit E. A., T. K. Sixma, K. H. Kalk, B. A. M Van Zanten and W. G. Hol. 1994. Galactose- Binding Site in *Escherichia coli* Heat-Labile Enterotoxin (LT) and Cholera Toxin (CT). *Mol. Microbiol.* 13(4): 745-753.
- 39.- Neil M. A., P. I. Tarr and C. R. Clausen. 1987. *Escherichia coli* O157:H7 as the Predominant Pathogen associated with the Hemolytic Uremic Syndrome: A Prospective Study in the Pacific Northwest. *Pediatrics.* 80: 37-40.
- 40.- Nisa I., C. Wolf, E. Hanski and Y. Rosenshine. 1998. Interaction of *Escherichia coli* with Host Epithelial Cells. *Folia Microbiol.* 43 (3): 247-252.
- 41.- Palumbo Samuel, J. E. Call, F. J. Schultz and A. C. Williams. 1995. Minimum and Maximun Temperature for Growth and Verotoxin Production by Hemorrhagic Strains of *Escherichia coli*. *J. Food Prot.* 58: 352- 356.
- 42.- Paulo A., A. Duarte and E. Gomes. 1994. In Vitro Antibacterial Screening of *Cryptolepis sanguinolenta* Alkaloids. *J Ethnopharmacol.* 44: 127-130.
- 43.- Paton A.W., E. Voss, P. Manning y J.C. Paton. 1998. Antibodies to Lipopolysaccharide Block Adherence of Shiga Toxin- Producing *Escherichia coli* to Human Intestinal Epithelial (Henle 407) Cells. *Microbial Pathog.* 24: 57- 63.
- 44.- Pickering L. K., T. G. Obring and F. B. Stapleton. 1994. Haemolytic Uremic Syndrome and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 13: 459-476.
- 45.- Proulx F., J. P. Turgeon and G. Delage. 1992. Randomized, Controlled Trial of Antibiotic Therapy for *Escherchia coli* O157:H7 Enteritidis. *J. Pediatr.* 121:299-303.

- 46.- O'Brien A. D., G. D. La Veck and M. R. Thompson. 1982. Production of *Shigella dysenteriae* Type I Like Cytotoxin by *Escherichia coli*. J. Infect. Dis. 146: 763-769.
- 47.- Ratman Samuel, S. B. March, R. Ahmed, G. S. Benzanson and S. Kasatiya. 1988. Characterization of *Escherichia coli* Serotype O157:H7. J Clin. Microbiol. Vol 26 (10): 2006- 2012.
- 48.- Riley L. W., R. S. Remis and S. D. Helgerson. 1983. Hemorrhagic Colitis Associated with a Rare *Escherichia coli* serotype. N. Engl. J. Med. 308: 681-685.
- 49.- Ríos J.L., M.C. Recio and A. Villar. 1988. Screening Methods for Natural Products with Antimicrobial Activity: A Review of the Literature. J. Ethnopharmacol. 23: 127- 149.
- 50.- Shetty M., K. Subbannayya and P. G. Shivananda. 1994. Antibacterial Activity of Tea (*Camellia sinensis*) and Coffee (*Coffea arabica*) with special reference to *Salmonella enteritidis* var. Typhimurium. J. Commun. Dis. 26 (3): 147-50. [Internet www], Address: <http://nccam.nih.gov/cam/diseases/Gastroenteritis.html>
- 51.- Siegler R.L. 1995. The Hemolytic Uremic Síndrome. Pediatr. Clin. North Am. 42: 1505-1529.
- 52.- Snyder P., 1998. Peter Snyder: *Escherichia coli* O157:H7 and other Pathogenic Strains of *E. coli*. [Internet www], Address: <http://www.hitm.com/Documents/Ecoli98.html>
- 53.- Tarr P.I., M.A. Neill and D.L. Christie. 1998. *Escherichia coli* O157:H7 Hemorrhagic Colitis. N. Engl. J. Med. 318:1697

- 54.- Tanira M., A. Bashir, R. Dib, C. Goodwin, I. Wasfi and N. Banna. 1994. Antimicrobial and Phytochemical Screening of Medical Plants of United Arab Emirates. *J. Ethnopharmacol.* 41: 201-205.
- 55.- Tuncel G. and Nergiz C. 1993. Antimicrobial Effect of Some Olive Phenols in a Laboratory Medium. *Lett. Appl. Microbiol.* 17: 300-302
- 56.- Urabi I. and D. Crawford. Biologiccal Sciences, University of Warwick, Coventry, U.K. Adherence of *Escherichia coli* O157:H7 to Eukaryotic cells. [Internet www], Address: <http://web.bham.ac.uk/bcm4gth6/vtec/issue3/vtec202.html>.
- 57.- Verástegui M. A., C. A. Sánchez, N.L. Heredia and J. S. García-Alvarado. 1996. Antimicrobial Activity of Extracts of Three Major Plants from the Chihuahuan Desert. *J. Ethnopharmacol.* 52:175-177.
- 58.- Vlietinck A. J., L. Van Hoof, J. Totté, A. Lasure, D. Vanden Berghe, P. C. Rwangabo and J. Mvukiyumwami. 1995. Screening of Hundred Rwandese Medicinal Plants for Antimicrobial and Antiviral Propoerties. *J. Ethnopharm.* Vol 46: 31-47.
- 59.- Weinstein Debra S., R. K. Holmes and A. O'Brien. 1988. Effects of Iron and Temperature on Shiga-Like Toxin I Production by *Escherichia coli*. *Infec. & Immun.* Vol 56 (1): 106- 11.
- 60.- Weeratna Risini D. and M. P. Doyle. 1991. Detection and Production of Verotoxin I of *Escherichia coli* O157:H7 in Food. *Applied and Enviromental Microbiol.* Vol 57 (10): 2951- 2955



