



## **Componentes alimentarios de potencial aplicación en la dietoterapia de enfermedades provocadas por cepas de escherichia coli productoras de toxina tipo shiga**

**María Gabriela Pellarín.**

Tesis - Doctor en Ciencias de la Salud c/mención en Nutrición - Universidad Nacional de Córdoba.  
Facultad de Ciencias Médicas. Secretaría de Graduados, 2014

Aprobada: 2013

---

Este documento está disponible para su consulta y descarga en RDU (Repositorio Digital de la Universidad Nacional de Córdoba). El mismo almacena, organiza, preserva, provee acceso libre y da visibilidad a nivel nacional e internacional a la producción científica, académica y cultural en formato digital, generada por los miembros de la Universidad Nacional de Córdoba. Para más información, visite el sitio <https://rdu.unc.edu.ar/>  
Esta iniciativa está a cargo de la OCA (Oficina de Conocimiento Abierto), conjuntamente con la colaboración de la Prosecretaría de Informática de la Universidad Nacional de Córdoba y los Nodos OCA. Para más información, visite el sitio <http://oca.unc.edu.ar/>

---



Componentes alimentarios de potencial aplicación en la dietoterapia de enfermedades provocadas por cepas de escherichia coli productoras de toxina tipo shiga por María Gabriela Pellarín se distribuye bajo una Licencia Creative Commons Atribución – No Comercial – Sin Obra Derivada 4.0 Internacional.



**UNIVERSIDAD NACIONAL DE CÓRDOBA**  
**FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS**



**COMPONENTES ALIMENTARIOS DE POTENCIAL APLICACIÓN EN LA  
DIETOTERAPIA DE ENFERMEDADES PROVOCADAS POR CEPAS DE  
*Escherichia coli* PRODUCTORAS DE TOXINA TIPO SHIGA**

Trabajo de Tesis para optar al Título de Doctor  
en Ciencias de la Salud con mención en Nutrición

**Lic. PELLARÍN MARÍA GABRIELA**

CÓRDOBA  
REPÚBLICA ARGENTINA  
2013

## COMISIÓN DE SEGUIMIENTO DE TESIS DOCTORAL

**Director:**

Dr. Prof. Eraso Alberto Jorge

**Co-director:**

Dra. Prof. Paraje María Gabriela

**Integrantes:**

Dra. Prof. García Beatriz

Dr. Prof. Paván Jorge

Artículo 43° del Reglamento de la Carrera de Doctorado en Ciencias de la Salud:

“LA FACULTAD DE CIENCIAS MÉDICAS NO SE HACE SOLIDARIA

CON LAS OPINIONES DE ESTA TESIS”

## INDICE

<b>PRINCIPALES ABREVIATURAS.....</b>	<b>8</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>10</b>
<b>SUMARY.....</b>	<b>12</b>
<b>CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN.....</b>	<b>14</b>
Síndrome Urémico Hemolítico.....	15
Epidemiología.....	16
Etiología.....	17
<i>Escherichia coli</i> O157:H7.....	18
Verotoxina o Toxina tipo Shiga.....	20
Reservorios y vías de transmisión de <i>E. coli</i> verotoxigénica.....	23
Mecanismo de infección de <i>E. coli</i> verotoxigénica.....	25
Tratamiento de infección por <i>E. coli</i> verotoxigénica.....	28
Dietoterapia del Síndrome Urémico Hemolítico.....	29
Algarroba ( <i>Prosopis alba</i> Griseb).....	30
Mistol ( <i>Ziziphus mistol</i> Griseb).....	33
Kéfir y leche fermentada kefirada.....	34
HIPÓTESIS.....	40
OBJETIVOS GENERAL Y ESPECÍFICOS.....	40
<b>CAPÍTULO 2: MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>41</b>
Lugar de trabajo.....	42
Equipamiento.....	42
Reactivos.....	43
Metodología Sección A: Obtención y caracterización de componentes.....	44
Obtención de extractos de origen vegetal.....	44
Determinación y cuantificación química.....	45
a. Marcha analítica fitoquímica.....	45
b. Espectrofotometría.....	46
c. Cromatografía en Capa Delgada. TLC (Thin Layer Chromatography).....	47
Obtención de componentes de origen microbiano.....	47
Cultivo de leche kefirada.....	47
a. Obtención de péptidos catiónicos.....	48
b. Obtención de Exopolisacáridos (EPSK).....	49

Determinación y cuantificación química.....	50
Metodología Sección B: Actividad antimicrobiana in vitro contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	51
Medios y condiciones generales de cultivo de <i>E. coli</i> .....	51
Determinación de la curva patrón de crecimiento de <i>E. coli</i> .....	52
Actividad antimicrobiana in vitro.....	52
a. Difusión en agar.....	53
b. Concentración Inhibitoria Mínima.....	54
c. Turbidometría.....	55
Metodología Sección C: Inhibición in vitro de citotoxicidad de Verotoxina de <i>E. coli</i> O157:H7sobre células Vero.....	55
Obtención y purificación de Verotoxina(VT) de <i>E. coli</i> O157:H7.....	55
Cultivo de células Vero.....	56
Ensayos de citotoxicidad.....	57
Determinación Concentración Citotóxica 50% (CC <sub>50</sub> ) para VT y Cicloheximida.....	58
Ensayos de Inhibición de citotoxicidad.....	59
a. Pre-incubación VT con extracto.....	59
b. Pre-incubación extracto con células Vero.....	59
c. Co-incubación VT con extracto en células Vero.....	59
Metodología Sección D: Inhibición in vitro de adhesión de <i>E. coli</i> O157:H7 a células Caco-2.	60
Medios y condiciones generales de cultivo de <i>E. coli</i> .....	60
Cultivo de células Caco-2.....	60
Ensayos de adhesión de <i>E. coli</i> a células Caco-2.....	61
Ensayos de Inhibición de adhesión de <i>E. coli</i> a células Caco-2.....	61
a. Co-incubación EPSK con <i>E. coli</i> .....	61
b. Pre-incubación EPSK con células Caco-2.....	61
c. Pos-incubación <i>E. coli</i> con células Caco-2.....	62
Evaluación de la adhesión de <i>E. coli</i> a células Caco-2por microscopía de fluorescencia.....	62
ANÁLISIS ESTADÍSTICO.....	63
<b>CAPÍTULO 3: RESULTADOS</b> .....	64
Resultados Sección A: Obtención y caracterización de componentes.....	65
Obtención de extractos de origen vegetal.....	65
Determinación y cuantificación química.....	66
d. Marcha analítica fitoquímica.....	66
e. Espectrofotometría.....	66

f. Cromatografía en Capa Delgada. TLC (Thin Layer Chromatography).....	66
Obtención de componentes de origen microbiano.....	68
Determinación y cuantificación química.....	68
a. Péptidos catiónicos.....	68
b. Exopolisacáridos.....	69
Evaluación de citotoxicidad de extractos de origen vegetal y componentes de origen microbiano.....	70
Resultados Sección B: Actividad antimicrobiana in vitro contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	71
Determinación de la curva patrón de crecimiento de <i>E. coli</i> .....	71
<i>E. coli</i> EDL 933.....	71
<i>E. coli</i> ATCC 25922.....	71
Actividad antimicrobiana in vitro.....	72
a. Difusión en agar.....	72
b. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM).....	73
b.1. CIM con extractos de origen vegetal.....	73
b.2. CIM con componentes de origen microbiano.....	75
c. Turbidimetría.....	76
c.1. Turbidimetría con extractos de origen vegetal.....	76
c.2. Turbidimetría con componentes de origen microbiano.....	77
c.2.1. Componentes obtenidos de leche kefirada.....	77
c.2.2. Componentes obtenidos de leche entera comercial.....	79
Resultados Sección C: Inhibición in vitro de citotoxicidad de Verotoxina de <i>E. coli</i> O157:H7 sobre células Vero.....	81
Obtención y purificación de VT de <i>E. coli</i> O157:H7.....	81
Determinación Concentración Citotóxica 50% (CC <sub>50</sub> ) para VT y Cicloheximida.....	82
Ensayos de Inhibición de citotoxicidad.....	83
Inhibición de citotoxicidad con extractos vegetales.....	83
a. Pre-incubación VT con extracto.....	83
b. Pre-incubación extracto con células Vero.....	87
c. Co-incubación VT con extracto en células Vero.....	88
Cinética de adhesión de VT a células Vero.....	89
Inhibición de citotoxicidad con componentes de origen microbiano.....	89
a. Pre-incubación VT con EPSK.....	89
b. Pre-incubación EPSK con células Vero.....	90
c. Co-incubación VT con EPSK en células Vero.....	91

Resultados Sección D: Inhibición in vitro de adhesión de <i>E. coli</i> O157:H7 a células Caco-2....	92
Ensayos de adhesión de <i>E. coli</i> a células Caco-2.....	92
Ensayos de Inhibición de adhesión de <i>E. coli</i> a células Caco-2.....	92
Inhibición de adhesión de <i>E. coli</i> EDL 933 a células Caco-2.....	93
a. Co-incubación EPSK con <i>E. coli</i> EDL 933.....	93
b. Pre-incubación EPSK con células Caco-2.....	93
c. Pos-incubación <i>E. coli</i> EDL 933 con células Caco-2.....	96
Inhibición de adhesión de <i>E. coli</i> ATCC 25922 a células Caco-2.....	97
Evaluación de la adhesión de <i>E. coli</i> a células Caco-2 por microscopía de fluorescencia.....	98
<b>CAPÍTULO 4: DISCUSIÓN, CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS.....</b>	<b>101</b>
<b>CAPÍTULO 5: BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>117</b>
<b>INDICE DE TABLAS.....</b>	<b>135</b>
<b>INDICE DE FIGURAS.....</b>	<b>137</b>



## PRINCIPALES ABREVIATURAS

SUH: Síndrome Urémico Hemolítico

HTA: Hipertensión Arterial

ECEH: *Escherichia coli* enterohemorrágica

STEC: Shiga toxin *Escherichia coli*

ECVT: *Escherichia coli* verotoxigénica

CH: Colitis Hemorrágica

VT: Verotoxina

Stx: Toxina tipo Shiga

EPS: Exopolisacáridos

EPSK: Exopolisacáridos de kéfir

EPSKG: Exopolisacáridos de kéfir de Grano

EPSKL: Exopolisacáridos de kéfir Libre o de sobrenadante

SD: Sólidos Disueltos

CIM: Concentración Inhibitoria Mínima

TLC: Thin Layer Chromatography

PBS: Buffer Fosfato Salino

CTS: Caldo Tripticasa Soya

DO: Densidad Óptica

MEM: Medio Esencial Mínimo

SFB: Suero Fetal Bovino

EQ: Equivalentes de Quercetina

EG: Equivalentes de Glucosa

EAG: Equivalentes de Ácido Gálico

CC<sub>50</sub>: Concentración Citotóxica 50%

ml o mL: mililitro

μl: microlitro

mg: miligramo

μg: microgramo

mm: milímetro

μm: micrómetro

nm: nanómetro

M: molar

mM: milimolar

N: normal

min: minuto/s

h/hs: hora/horas

rpm: revoluciones por minuto

Da: Daltons

kDa: kilodaltons

ufc: unidades formadoras de colonias

°D: grados Dornic

°C: grados Centígrados

## RESUMEN

En Argentina, *Escherichia coli* O157:H7 es el serotipo prevalente asociado a grandes brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH), siendo el país con mayor tasa de incidencia en el mundo con alrededor de 500 nuevos casos por año. El SUH representa la principal causa de falla renal aguda en la infancia, la segunda causa de falla renal crónica y el 20% de los casos de trasplante renal durante la infancia y la adolescencia. Se ha demostrado que la habilidad de la cepa para causar la enfermedad está relacionada a la acción de factores de virulencia implicados en el proceso de colonización del epitelio intestinal con posterior reacción inflamatoria y por la capacidad de secretar toxinas VT1 y VT2 responsables del daño del endotelio vascular con el consecuente desarrollo de SUH.

En la presente tesis doctoral se investigó desde la dietoterapia, extractos de origen vegetal y componentes de cepas probióticas potencialmente útiles en la inhibición de la colonización de *E. coli* O157:H7 a nivel intestinal como medida preventiva, e inhibición de la acción citotóxica de VT sobre células eucariotas.

Se determinaron componentes fenólicos obtenidos a partir de la maceración de harina de algarroba (*Prosopis alba*) y café de mistol (*Ziziphus mistol*) en distintos solventes (alcohol, agua destilada, acetona y hexano). Los mismos fueron analizados mediante marcha analítica fitoquímica, cromatografía en capa delgada y cuantificados por espectrofotometría. Por otro lado se obtuvieron componentes de leche fermentada con granos de kéfir. Se determinaron péptidos catiónicos de sobrenadante de leche kefirada con y sin precipitación con sulfato de amonio, y exopolisacáridos (EPSK) obtenidos por precipitación alcohólica, tanto del grano de kéfir (EPSG) como del sobrenadante de leche kefirada (EPSKL). De los componentes obtenidos se realizaron ensayos de citotoxicidad sobre monocapas confluentes de células eucariotas, a fin de determinar concentraciones no tóxicas de los mismos.

Mediante turbidometría y microscopia fluorescente, se determinó que los EPS obtenidos de leche kefirada fueron efectivos para inhibir la adhesión de *E. coli* O157:H7 a línea celular Caco-2. En ensayos de co-incubación de EPSK con la cepa bacteriana, se demostró que los EPSKL inhibieron hasta un 99% la adhesión, mientras que la pre-incubación EPSKL y EPSKG sobre la línea celular, inhibió la adhesión un 92%

y 47% respectivamente. Cabe destacar que en ensayos con *E. coli* ATCC 25922, se determinó que la adhesión de esta cepa bacteriana saprófita para el hombre, no fue afectada por la incubación de EPSK tanto de sobrenadante como de grano.

Se determinó además la capacidad de *P. alba*, *Z. mistol* y péptidos catiónicos de inhibir el crecimiento de la cepa bacteriana en estudio. Por los métodos de difusión en agar y Concentración Inhibitoria Mínima, no se detectó actividad antimicrobiana de los componentes aislados, sin embargo por turbidometría los extractos alcohólico de *P. alba*, acuoso y alcohólico de *Z. mistol* inhibieron el crecimiento de la cepa bacteriana en porcentajes inferiores al 25%. Los péptidos catiónicos obtenidos de sobrenadante de leche kefirada y precipitados con sulfato de amonio presentaron mayor actividad antimicrobiana que los extractos vegetales, inhibiendo el crecimiento de *E. coli* O157:H7 hasta un 96%. Se determinó que la actividad antimicrobiana encontrada, no solo correspondió a péptidos catiónicos sino también al contenido de ácido láctico, ambos presentes en leche kefirada como productos metabólicos originados durante la fermentación de la flora microbiana de los granos de kéfir.

Se utilizó la técnica de coloración vital Rojo Neutro para el estudio de la capacidad de los extractos vegetales y EPSK de inhibir la acción citotóxica de VT sobre células Vero. Los ensayos realizados con EPS obtenidos de leche kefirada, demostraron que si bien fueron efectivos, los porcentajes de inhibición de citotoxicidad de VT fueron inferiores al 30%. Por otro lado, se demostró que la pre-incubación del extracto alcohólico de *P. alba* inhibió la citotoxicidad de VT un 95%, mientras que el extracto acetónico de *Z. mistol* inhibió un 68%, siendo los demás extractos también efectivos. Se determinó que esta capacidad de inhibición puede estar mediada por la interacción extracto-VT que produciría degradación de la molécula proteica de la toxina con la consecuente pérdida de actividad de la misma.

En base a los resultados obtenidos, la presente tesis doctoral representa un avance en el conocimiento de nuevas y potenciales alternativas para la prevención y tratamiento del SUH. Desde el enfoque de la Dietoterapia, se destaca la utilización de compuestos obtenidos de plantas autóctonas en nuestro país, como *P. alba* y *Z. mistol*, además de componentes de origen microbiano a partir de leche fermentada con granos de kéfir.

## SUMMARY

In Argentina, *Escherichia coli* O157:H7 is prevalent serotype associated with large outbreaks and sporadic cases of hemorrhagic colitis and hemolytic uremic syndrome (HUS), being the country with the highest incidence rate in the world with about 500 new cases per year. HUS is the leading cause of acute renal failure in infancy, the second leading cause of chronic renal failure and 20% of cases of renal transplantation during childhood and adolescence. It has been shown that the ability of the strain to cause disease is linked by the action of virulence factors required in the colonization of intestinal epithelium and subsequent inflammatory response and their ability to secrete toxins, VT1 and VT2 responsible for damage to the vascular endothelium with the subsequent development of HUS.

In this thesis we investigated plant extracts and components of probiotic strains potentially useful in diet therapy to inhibit the colonization of *E. coli* O157:H7 in the intestine as a preventive measure, able to interfere the cytotoxic action of VT on eukaryotic cells.

Phenolic compounds were identified, they were obtained from plant extracts of *P. alba* and *Z. mistol* macerated in different solvents (alcohol, distilled water, acetone and hexane). They were analyzed using phytochemical methods, thin layer chromatography and quantified by spectrophotometry. Furthermore components were obtained from fermented milk kefir grains. Cationic peptides were determined in supernatant kefirated milk with and without precipitation with ammonium sulfate, and exopolysaccharide (EPSK) obtained by alcoholic precipitation, from kefir grain (EPSKG) or from kefirated milk supernatant (EPSKL). Cytotoxicity assays were performed on confluent monolayers of eukaryotic cells, to determine non-toxic concentrations of milk component obtained.

We determined by turbidimetry and fluorescence microscopy, that the kefirated EPS were effective in inhibiting the adhesion of *E. coli* O157:H7 to Caco-2 cell line. In tests EPSK co-incubation with the bacterial strain, it was demonstrated that EPSKL inhibited up to 99% the adhesion of *E. coli* to Caco-2 cells, whereas pre-incubation of EPSKG and EPSKL on the cell line inhibited adhesion by 92% and 47% respectively. Contrarily, in tests with *E. coli* ATCC 25922 was determined that the adhesion of this

strain saprophytic for man, was not affected by incubation of EPSK with supernatant or grain.

The ability of *P. alba*, *Z. mistol* and cationic peptides to inhibit the growth of bacterial strain studied was investigated by agar diffusion method and Minimum Inhibitory Concentration determination; these assays not detected antimicrobial activity of the individual components. However by turbidimetry alcoholic extracts of *P. alba*, and aqueous or alcoholic extracts of *Z. mistol* inhibited the growth of bacterial strain rates still 25%. Cationic peptides derived from milk kefirated supernatant and precipitated with ammonium sulfate showed higher antimicrobial activity than plant extracts, inhibiting still 96 % the growth of *E. coli* O157:H7. It was determined that the antimicrobial activity not only corresponded to cationic peptides but also to the content of lactic acid, both present in milk kefirated as metabolic products generated during the fermentation of the microbial flora of kefir grains.

Neutral Red vital staining was used to study the ability of vegetable extracts and EPSK to inhibit the cytotoxic action of VT on Vero cells. Studies with EPS obtained from kefirated milk showed that they were effective to inhibit still 30% the cytotoxicity of VT. Furthermore, it was shown that pre-incubation with alcoholic extract of *P. alba* inhibited 95% the cytotoxicity of VT, while the acetone extract of *Z. mistol* inhibited 68%, and the other extracts were also effective. Finally, it was determined that this inhibitory ability could be associated with the interaction of extracts with VT, which produced degradation of toxin with a consequent loss of activity.

Based on the results, this thesis represents an advance in the knowledge of potential Diet Therapy alternatives for the prevention and treatment of HUS by means of the use of compounds obtained from plant native in our country, as *P. alba* and *Z. mistol*, as well as microbial components coming from milk fermented with kefir grains.

**CAPÍTULO 1**  
**INTRODUCCIÓN**

## **Síndrome Urémico Hemolítico**

El Síndrome Urémico Hemolítico (SUH) tónico o post-entérico, descrito por primera vez en 1955 por Gasser et al, es una entidad clínica y anatomopatológica de comienzo agudo, caracterizada por anemia hemolítica microangiopática, trombocitopenia y daño renal agudo. Las manifestaciones más comunes en los pacientes son: palidez, petequias, hematomas, oliguria, edema, hipertensión arterial (HTA) y cambios neurológicos, afectando a órganos como intestino, páncreas, corazón y sistema nervioso central (Page y Liles, 2013). En el período agudo de la enfermedad, el 20% de los pacientes presentan síntomas neurológicos que incluyen: letargia, cefaleas, convulsiones y coma, el 25-30% presentan HTA y el 8-10% insuficiencia pancreática y/o complicaciones gastrointestinales como afectación colónica grave y prolapso rectal (Ibarra et al, 2008). Un alto porcentaje de los pacientes presentan secuelas a mediano y largo plazo, fundamentalmente a nivel renal y en menor grado se presentan secuelas neurológicas, pancreáticas y excepcionalmente alteraciones de la visión (Fernandez-Brando et al, 2011 b). Aproximadamente el 50% de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% requiere transfusión sanguínea (Rivas et al, 2011). En niños con SUH, el 5% desarrolla insuficiencia renal crónica, requiriendo procedimientos dialíticos o trasplante renal y un 20% continúa con microhematuria y grados variables de proteinuria, pudiendo desarrollar insuficiencia renal crónica terminal (Ibarra et al, 2008).

Gianantonio et al (1964), publicaron en nuestro país la descripción completa de los aspectos clínicos y evolución de 64 casos de SUH. En su trabajo propuso la instauración temprana de la diálisis peritoneal en los casos con oliguria grave o anuria como tratamiento para el período agudo de la enfermedad. Esta innovación terapéutica sumado al diagnóstico precoz y manejo de la anemia hemolítica, redujo la mortalidad del 50 al 5%, siendo actualmente del 2 al 3% (Fernandez-Brando et al, 2011 b).



## *Epidemiología*

El SUH está ampliamente distribuido en el mundo y frecuentemente se lo describe como una enfermedad epidémica con baja tasa de incidencia en países industrializados como EE.UU., Canadá y Japón con registros de 1-3 casos/100.000 niños menores de 5 años (Salvadori y Bertoni, 2013). Sin embargo, en América del Sur es endémico y epidémico con una tasa de incidencia significativamente mayor. En Chile se producen 4-5 casos/100.000 niños menores de 5 años (Ibarra et al, 2008).

Argentina presenta la tasa más alta de incidencia mundial de casos de SUH en la población infantil (Fernandez-Brando et al, 2011 b). Un estudio realizado por Rivas et al (2006 a), determinó que la tasa de incidencia para el año 2005 fue de 13,9 casos por cada 100.000 niños menores de 5 años, valor 10 veces superior al notificado por los países industrializados. En este estudio, de los 464 casos notificados el 52% correspondió al sexo femenino y el 62% a niños menores de 2 años, con una edad promedio de  $29,0 \pm 26,3$  meses (rango 1-180 meses). El 55% de los casos ocurrió durante los meses cálidos y la tasa de letalidad en la fase aguda fue del 3,4%. En el año 2007 se notificaron más de 500 nuevos casos anuales, una tasa de letalidad de alrededor de 3% y una tasa de notificación hospitalaria del 15,0 por 100.000 niños menores de 5 años (Instituto de Enfermedades Infecciosas de Buenos Aires, 2007). Según el Departamento de Epidemiología dependiente del Ministerio de Salud del Gobierno de la Provincia de Buenos Aires, en el año 2010 se notificaron un total de 215 casos de SUH: el 38% de los casos ocurrieron en residentes de la Ciudad, el 51% procedían de la provincia de Buenos Aires y el 11% restante de Provincias del Interior del país (Argentina. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos, 2011).

Los registros oficiales en la Argentina muestran que la enfermedad está distribuida en todo el país con más de 7.000 casos notificados desde 1965 hasta el presente (Bustamante et al, 2012). Estos valores son cinco veces mayores a los ocurridos en el resto del mundo, incluso en países con características geográficas y sociales similares como Chile y Uruguay (Fernandez-Brando et al, 2011 b). La frecuencia de aparición de SUH es mayor en las provincias del centro y sur durante los meses cálidos, aunque se registran casos durante todo el año. Los niños afectados son fundamentalmente menores de 5 años, de ambos sexos, eutróficos, con buenas condiciones higiénico-

sanitarias. En nuestro país, esta enfermedad infantil constituye la primera causa de insuficiencia renal aguda en la edad pediátrica, la segunda causa de insuficiencia renal crónica y es responsable del 20% de los trasplantes renales en niños y adolescentes (Rivas et al, 2011).

En el año 2000, el Ministerio de Salud de la Nación (Resolución N° 346/00), estableció la notificación obligatoria al Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica (SI.NA.V.E.), con modalidad semanal e individualizada. En el 2005, 22 Unidades Centinela para la vigilancia del SUH comenzaron a funcionar en las jurisdicciones con las tasas de incidencia más elevadas (Rivas et al, 2006 b).

### *Etiología*

La etiología del SUH es multifactorial, involucrando complejas interacciones entre factores bacterianos y el huésped. Según la clasificación de Kaplan et al (1978) y Neil et al (1987), el SUH puede clasificarse como:

- Idiopático
- Secundario, por asociación a diferentes factores tales como:
  - Infecciones bacterianas producidas por *Escherichia coli* 0157:H7, *Shigella dysenteriae* tipo I y *Streptococcus pneumoniae*
  - Infecciones microbianas circunstanciales por *Salmonella tify*, *Campylobacter fetus jejuni*, *Yersinia pseudotuberculosis*, Bacterioides, virus Portillo, *Cocksackie* virus, ECHO virus, influenza, Epstein Barr, rotavirus, VIH, *Entamoeba histolítica*, etc.
  - Herencia autosómica recesiva y formas dominantes (forma genética)
  - Tratamiento con ciertas drogas como anticonceptivos orales, ciclosporina A, mitomicina, metronidazol, penicilina, cisplatino, daunorubicina, arabinósido de citosina, deoxycoformicina, ticlopidina y quinina
  - Situaciones de embarazo, pos-trasplante de médula y riñón asociado con glomerulopatías y procesos malignos.

Además se ha descrito una variedad de este síndrome consecuente con errores congénitos del metabolismo de la cianocobalamina y a la inhalación de crack-cocaína, dado la vasoconstricción que produce esta sustancia junto al daño endotelial que establece y a sus efectos pro-coagulantes.

## ***Escherichia coli* O157:H7**

*Escherichia coli* fue descrita por primera vez en 1885 por el científico bacteriólogo alemán Theodor Escherich, quien lo denominó inicialmente *Bacterium coli*. *E. coli* pertenece a la familia Enterobacteriaceae, forma parte de un grupo genéticamente heterogéneo de bacterias cocobacilos gram negativas aerobias anaerobias facultativas que forman parte de la microflora normal del tracto gastrointestinal de humanos y animales homeostáticos, siendo una de las primeras especies bacterianas que colonizan el intestino del mamífero recién nacido. A los pocos días de nacimiento, constituye la mayoría de la flora comensal anaerobia facultativa y funciona simbióticamente sintetizando vitaminas B<sub>2</sub> y K, compitiendo con gérmenes ajenos a la flora normal (Blanco et al, 2001; Torres et al, 2010).

El contenido de *E. coli* del intestino humano y de animales de sangre caliente es de aproximadamente 10<sup>12</sup> bacterias por gramo, de las cuales el 0,3% pertenece a tres o cuatro serotipos diferentes de *E. coli*, que se reproducen rápidamente en la parte superior del intestino delgado (Torres et al, 2010).

Kauffmann (1947), propuso una forma de diferenciar las cepas de *E. coli* virulentas de las saprófitas para el hombre en base a una clasificación serológica que resultó útil en estudios epidemiológicos y de patogénesis de enfermedades producidas por esta bacteria. Se determinaron los antígenos superficiales O (somáticos, lipopolisacáridos termoestables), K (capsulares) y H (flagelares proteicos, termolábiles), siendo los antígenos somático y flagelar (O:H) los que indican el serotipo y en ocasiones se asocian con un cuadro clínico en particular. Actualmente en cepas de *E. coli* se han identificado 176 antígenos O, 112 H y 60 K (Pennington, 2010).

Si bien *E. coli* forma parte de la microflora normal del hombre y animales, existen cepas capaces de producir un amplio espectro de enfermedades, entre ellas, infección urinaria, septicemia, meningitis o enfermedad diarreica. Las cepas enteropatógenas causantes de diarrea han sido agrupadas según sus factores de virulencia y mecanismos por los cuales causan enfermedad. Éstas se clasifican en: *E. coli* enterotoxigénica (ECET), *E. coli* enteropatógena (ECEP), *E. coli* enteroinvasiva (ECEI), *E. coli* enteroagregativa (ECEAgg), *E. coli* de adherencia difusa (ECAD) y *E. coli* enterohemorrágica (ECEH) o *E. coli* verotoxigénica (ECVT) productora de toxina tipo

Shiga (STEC por sus siglas en inglés *Shiga like toxin producing Escherichia coli* o VTEC *Vero cytotoxin producing Escherichia coli*) (Karmali et al, 2010).

ECVT fue reconocida por primera vez a finales de 1970 por Konowalchuk et al (1977) en Canadá, quienes observaron que cultivos de ciertas cepas de *E. coli* aisladas de materia fecal, producían daño citopático irreversible sobre células eucariotas epiteliales de riñón de mono verde africano (células Vero) debido a la presencia de una citotoxina. A partir de estos resultados se pudo comprobar que las cepas que producían este daño pertenecían a muestras de niños con diarrea, por lo que pudo establecerse que la toxina tenía un rol importante en la génesis de la misma. O'Brien y LaVeck (1983), siguiendo los estudios realizados por Konowalchuk, demostraron en células HeLa que la toxina era estructural y antigénicamente similar a la toxina producida por *Shigella dysenteriae* tipo 1 y la describió como una toxina similar a Shiga.

La importancia clínica de ECVT en la enfermedad humana permaneció incierta hasta principios de 1980 donde se vincularon estas bacterias con dos enfermedades de etiología desconocida hasta ese momento, Colitis Hemorrágica (CH) y SUH. Riley et al (1983) describieron y relacionaron a ECVT con brotes caracterizados por dolor abdominal, diarrea acuosa con sangre y en algunos casos fiebre, cuadro al que denominó CH y asoció a la ingesta de carne cruda o mal cocida. La bacteria aislada de todos los casos fue *E. coli* del serotipo O157:H7. Por otro lado, en 1983 Karmali et al. establecieron un vínculo entre SUH y la infección por varios serotipos de ECVT, incluyendo O157:H7.

En ambas investigaciones se postuló que una citotoxina producida por esta bacteria era responsable del daño a los capilares de glomérulos y otros órganos, probablemente a través del efecto directo sobre las células endoteliales, produciendo lesiones microangiopáticas características del SUH. Este hecho representó un avance significativo en el conocimiento del agente causal y los mecanismos patogénicos y permitió diferenciar al SUH de otras microangiopatías trombóticas.

Más recientemente, Karmali et al (2003), clasificaron a las cepas ECVT en cinco serotipos (A-E) teniendo en cuenta su potencial patogénico y epidémico, su asociación a enfermedades severas en el hombre y su capacidad para producir brotes. Las cepas de *E. coli* O157:H7 y O157:NM son consideradas como las más virulentas y pertenecen

al sero-patotipo A. Los serotipos O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, y O145:NM pertenecen al sero-patotipo B y son similares a O157 por la capacidad de producir enfermedad en el hombre y brotes esporádicos de SUH. Dentro del sero-patotipo C se encuentran los serotipos O91:H21 y O113:H21, con menor implicancia de brotes de SUH. El sero-patotipo D está formado por numerosos serotipos que han sido implicados en casos esporádicos de diarrea, y el sero-patotipo E está formado por serotipos ECVT que no están relacionados con enfermedad en humanos (Pennington, 2010).

En Argentina ECVT es el agente etiológico más comúnmente asociado al SUH, siendo el serotipo más frecuentemente aislado O157:H7. Otros serotipos han sido asociados a CH y SUH, en particular: O26:H11, O103:H2, O111:NM, O121:H19, O145:NM, O8:H19 y O145:H2 (Fernandez-Brando et al, 2011 b). En el 2005, el Servicio Fisiopatogenia, como Laboratorio Nacional de Referencia en nuestro país, recibió muestras de 344 pacientes con diagnóstico de SUH, estableciéndose la infección por ECEH en el 32,8% de los mismos por uno o más de los tres criterios diagnósticos utilizados. Se caracterizaron 87 cepas de ECEH, de las cuales 66 (75.8%) fueron serotipificadas como O157:H7 y 21 (24.1%) como ECEH no-O157 (Rivas et al, 2006 a).

### **Verotoxina o Toxina tipo Shiga**

La habilidad de las cepas ECVT para causar enfermedad está relacionada con su capacidad para secretar toxinas denominadas Verotoxina (VT) o Shiga liketoxin (Stx) ya que pertenece a una familia de proteínas estructural y funcionalmente relacionadas con la toxina Shiga sintetizada por *S. dysenteriae*. Estas toxinas se encuentran codificadas en un bacteriófago lisogénico incorporado al ADN bacteriano y son el factor de virulencia central e indispensable de las ECVT para desarrollar SUH. La producción de VT o Stx depende del ciclo replicativo del fago *stx* y de su liberación tras la lisis bacteriana (Mayer et al, 2012).

Hasta el presente se han descrito ocho tipos de toxinas (VT1, VT2, VT2c, VT2d, VT2e, VT2f, VT2g, y VT2h) que incluyen 25 variantes de genotipos de *stx* (Bergan et al, 2012). Aunque todas las variantes han sido aisladas de pacientes con diarrea, no todas tienen el mismo grado de asociación con el desarrollo de las formas clínicas más

severas. Efectivamente, estudios epidemiológicos han demostrado que las bacterias que expresan variantes de la familia de VT2 (por ej. VT2, VT2c, VT2d) se asocian más comúnmente a CH o SUH, mientras que las que expresan VT1 y sus variantes se aíslan de pacientes con diarreas sin complicaciones o infecciones asintomáticas (Ibarra et al, 2008). Estudios han comprobado que VT2 es cerca de 1.000 veces más tóxica para células endoteliales microvasculares renales humanas que VT1 (Gyles, 2007).

En nuestro país la mayoría de las cepas ECVT caracterizadas y aisladas de pacientes, son productoras de VT2 y VT2c, siendo ésta una de las razones probables de la alta incidencia de SUH (Fernandez-Brando et al, 2011 b).

Stx o VT pertenece a la familia de toxinas AB<sub>5</sub> de ~70 kilodaltons (kDa). Consiste en una subunidad A (~32 kDa) unida en forma no covalente a un pentámero de subunidades B (~7,7 kDa cada una). Este pentámero se une al receptor globotriaosilceramida Gb<sub>3</sub> (Gal $\alpha$ [1-4]Gal $\beta$ [1-4]Glc $\beta$ 1-ceramida) y globotetraosilceramida Gb<sub>4</sub> (Gal $\alpha$ [1-4]Gal $\beta$ [1-4]Glc $\beta$ 4-ceramida) que están presentes en la superficie de las células blanco (Bergan et al, 2012). La toxina se internaliza a los endosomas tempranos y sigue un transporte retrógrado vía complejo de Golgi, retículo endoplásmico y membrana nuclear. La subunidad A se cliva en el aparato de Golgi en dos fragmentos A1 y A2. El fragmento A1 activo se trasloca al citoplasma donde actúa como una N-glicosidasa que remueve un residuo específico de adenina de la unidad ribosomal 28S, lo que resulta en una inhibición irreversible de la síntesis de proteínas e inducción de apoptosis (Pacheco et al, 2012). En dosis subletales y en células endoteliales, VT tiene marcados efectos sobre la regulación genética, induciendo la expresión de genes asociados a fenómenos de adhesión, trombosis e inflamación (Fernandez-Brando et al, 2011 b). En ausencia de la subunidad A, se han descrito otros efectos biológicos relacionados con las subunidades B de VT2 (VT2B). La unión de VT2B al receptor Gb<sub>3</sub> dispara señales intracelulares que inducen apoptosis en células epiteliales y no epiteliales (Ibarra et al, 2008).

Recientemente, se ha demostrado *in vitro* que VT2B inhibe la absorción de agua en colon humano y produce acumulación de fluido acuoso en fragmentos de colon ligado de rata, lo cual indicaría una contribución directa de VT2B a la diarrea acuosa observada en los primeros días de la infección por ECVT (Ibarra et al, 2008). Los mismos efectos fueron observados en células epiteliales tubulares renales humanas y

podrían estar relacionados con la alteración en la función de los transportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  y canales de agua presentes en la membrana apical de las células del túbulo proximal renal. Además se demostró que la unión de VT2B al receptor  $\text{Gb}_3$  induce reorganización lipídica que favorece la formación de invaginaciones tubulares de membrana para la traslocación de la toxina. Este fenómeno podría deslocalizar los transportadores y canales de membrana responsables de la reabsorción proximal de fluido y explicar la poliuria que se describe en algunos pacientes con SUH al comienzo de la insuficiencia renal aguda (Ibarra et al, 2008).

Si bien la citotoxicidad de VT está ligada a la expresión del receptor  $\text{Gb}_3$  en la superficie de las células blanco, la sensibilidad se correlaciona también con la estructura del receptor. Análisis estructurales de la interacción entre VT2B y los residuos globotriosa del receptor  $\text{Gb}_3$  indicaron que cada subunidad B se une al menos a 3 sitios de trisacáridos generando un total de 15 sitios por molécula de toxina (Bauwens et al, 2013). Estudios de mutagénesis dirigida revelan que la interacción múltiple es esencial para la unión de VT al receptor y sugiere que el enlace multivalente estabiliza cooperativamente el complejo receptor-holotoxina (Ibarra et al, 2008).

Por otro lado estudios realizados en células de carcinoma renal, revelaron que la unión de la subunidad B de VT1 a  $\text{Gb}_3$  resultó en un aumento de la transducción de señales que llevó a reorganización del citoesqueleto y cambios morfológicos en las células (Gyles, 2007).

El riñón expresa niveles relativamente altos de  $\text{Gb}_3$  comparados con otros órganos, razón por la cual resulta uno de los órganos blanco fundamentales en el desarrollo del SUH. Una apreciación sobre la alta sensibilidad a VT de las células endoteliales de la microvasculatura sanguínea que expresa  $\text{Gb}_3$  resultó en la hipótesis de que la toxina inicia directamente las lesiones clásicas del SUH en el riñón como la tumefacción de las células endoteliales glomerulares, el desprendimiento de la membrana basal y subsecuente depósito de trombos plaquetarios y fibrina en la microvasculatura renal (Ibarra et al, 2008). Sin embargo estudios recientes sugieren que el daño tubular renal observado en pacientes con SUH no es sólo secundario a la lesión glomerular y arteriolar inducida por la toxina, sino también a su acción directa sobre las células epiteliales tubulares renales (Bergan et al, 2012).

En estudios de tejidos obtenidos de pacientes con SUH y en modelos *in vitro* se demostró la estimulación de la apoptosis en células de la corteza renal humana que comprueba que la toxina puede iniciar la muerte celular programada por diferentes mecanismos (Mayer et al, 2012).

Estudios seroepidemiológicos demostraron que la presencia de anticuerpos inmunoglobulina G contra VT1 y VT2 están inversamente relacionadas con la edad de los pacientes con SUH, lo que sugiere que la presencia de tales anticuerpos se asocia a la inmunidad contra las toxinas (Karmali et al, 2010).

El daño neurológico observado en estudios de cerebros provenientes de autopsias de niños fallecidos por SUH se observaron trombos en la microvasculatura, edema endotelial e infartos, que sugerían que el episodio inicial de la encefalopatía asociado al SUH era la lesión endotelial. En modelos animales el daño neurológico estaba asociado a la destrucción de la microvasculatura y de células neurogliales de la corteza cerebral (Ibarra et al, 2008). También se observó un daño selectivo de neuronas en las capas profundas de la corteza cerebelosa y cerebral, cerebro medio y médula espinal, donde se detectó toxina en la pared de los vasos sanguíneos de las zonas involucradas. Estas evidencias coinciden con las halladas en las encefalopatías desarrolladas en pacientes con SUH y sugiere que la toxina produce un daño directo en las células del parénquima del sistema nervioso central (Bauwens et al, 2013).

### **Reservorios y vías de transmisión de *E. coli* verotoxigénica**

Numerosos estudios realizados en diferentes países, incluyendo a Argentina, permitieron confirmar el rol del ganado vacuno como principal reservorio de ECVT, siendo las ovejas y las cabras también descritas como reservorios importantes (Parma et al, 2000; Caprioli et al, 2005; Ferens y Hovde, 2011). A diferencia de la especie humana, la ausencia de receptores Gb<sub>3</sub> o Gb<sub>4</sub> para VT en células endoteliales de la mucosa intestinal determina que el ganado bovino es portador asintomático de ECVT. Los terneros pueden adquirir ECVT de sus madres en el nacimiento, a partir de otros animales y del ambiente (Pruimboom-Brees et al, 2000; Chekabab et al, 2013).

Se han realizado diversos estudios sobre la prevalencia de ECVT en ganado bovino y ovino, la mayoría de ellos centrados en el serotipo O157:H7, demostrando que la



excreción de ECVT por materia fecal puede estar influenciada por factores como la edad, dieta, estrés y alojamiento de los animales (Chekabab et al, 2013). ECVT O157:H7 ha sido detectada en heces de animales en concentraciones de 4 a  $10^7$  ufc/g y puede permanecer viables en materia fecal por períodos que van desde semanas a meses (Ferens et al, 2011). Por otra parte, no se han detectado diferencias entre las concentraciones encontradas en materia fecal de animales con sistema de engorde en pasturas y animales feedlots (Pennington et al, 2010).

En un estudio realizado en nuestro país por Meichtri et al (2004), demostraron que la frecuencia de detección de ECVT en terneros a nivel de playa de faena de un frigorífico para consumo interno fue del 38,5% de no-O157 y del 0,5% de O157:H7. Otro estudio demostró que el 50,8% de los rumiantes silvestres del Jardín Zoológico y Botánico de La Plata portaban ECVT, incluyendo el aislamiento de O146:H25 de un roedor autóctono, lo cual sugiere que los roedores podrían ser portadores y eventuales transmisores de este patógeno (Rivas et al, 2006 a).

La contaminación de los alimentos se debe principalmente al contacto con las heces del ganado bovino. En Argentina la principal vía de transmisión de ECVT O157 y no-O157 son los alimentos contaminados, como por ejemplo carne molida, productos cárnicos crudos o insuficientemente cocidos, hamburguesas, embutidos fermentados, morcilla, leche no pasteurizada, yogur, quesos, mayonesa, papas, lechuga, brotes de soja y alfalfa, jugos de manzana no pasteurizados y agua, entre otros (Rivas et al, 2003; Oteiza et al, 2006; Chinen et al, 2009). Otro estudio detectó ECVT no-O157 en el 8,4% de hamburguesa supercongeladas y ECVT O157 en el 3,9% de productos cárnicos a nivel de boca de expendio (Rivas et al, 2006 a).

Otras formas de transmisión incluyen el contacto directo del hombre con los animales, la contaminación cruzada durante la preparación de alimentos y la transmisión persona a persona por la ruta fecal-oral (Rivas et al, 2008).

La contaminación fecal del agua puede deberse a la descarga de materia fecal en aguas de recreación o en aguas de pozo que son consumidas sin previo tratamiento de purificación. En Argentina se aisló *E. coli* O157:H7 en el Río de La Plata, en áreas cercanas a las tomas de agua de los centros de purificación para el consumo humano (Rivas et al, 2006 a).

En jardines maternos de Entre Ríos y Santa Fe se notificaron 2 brotes de SUH y diarrea sanguinolenta asociados a infección por ECVT que estuvieron vinculados epidemiológicamente al uso de piletas o piletines comunitarios. En particular en estos brotes, se hipotetizó la posibilidad de ocurrencia de “accidentes fecales” por parte de algunos niños pequeños que aún no controlaban adecuadamente los esfínteres. A pesar de que *E. coli* O157:H7 es susceptible al agua clorada, cuando el mantenimiento desinfectante de las piletas de natación es inadecuado, pueden llegar a ocurrir brotes debido a un ineficiente sistema de control de las mismas (Miliwebsky et al, 2007).

Se ha comprobado además que cepas con patrones genéticos idénticos fueron aisladas en diferentes localidades y en distintas semanas epidemiológicas, lo que demuestra que se encuentran altamente diseminadas en nuestro país. Las cepas son capaces de sobrevivir y persistir a través del tiempo en diferentes nichos y diseminarse en diferentes reservorios aumentando la probabilidad de transmisión a la población humana (Rivas et al, 2008).

Dada la alta tasa de SUH, la carencia de un tratamiento específico y la alta morbilidad, la prevención primaria de las infecciones por ECVT es fundamental para disminuir su impacto sanitario.

### **Mecanismo de infección de *E. coli* verotoxigénica**

La infección por ECVT puede resultar en la portación asintomática del microorganismo, casos esporádicos o brotes de diarrea, CH o SUH, aunque se debe tener en cuenta que no todas las infecciones con ECVT resultan en SUH (Fernandez-Brando et al, 2011 a). La infección bacteriana y el desarrollo de la enfermedad pueden ocurrir luego de la ingesta de 10 a 100 unidades formadoras de colonias por gramo de alimento (ufc/g) (Rivas et al, 2006 a) o una ingesta de 100 a 500 organismos son suficientes para producir enfermedad (Fernandez-Brando et al, 2011 b).

Las bacterias ECVT presentan resistencia a la acidez, lo que facilita su supervivencia en el estómago (Torres et al, 2010). Se ha demostrado que la exposición de cepas ECVT a ambientes débilmente ácidos induce una respuesta de tolerancia, lo que mejora aun más resistencia a pH ácido (Gyles, 2007).

El proceso de colonización de cepas ECVT en células mucosas de intestino grueso, requiere complejos mecanismos genéticos codificados en la isla de patogenicidad cromosomal *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE). Este locus está asociado con la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial, la iniciación de las señales de transducción y la desorganización de las microvellosidades con la formación de la lesión *Attaching and Effacing* (AE). La presencia de LEE le confiere a las cepas ECVT una mayor virulencia, debido a que los serotipos LEE positivos aparecen más comúnmente asociados a brotes y casos de SUH que los serotipos LEE negativos (Rivas et al, 2006 a; Karmali et al, 2010). Sin embargo, la presencia de LEE no es esencial para la patogénesis, se han notificado casos de enfermedad humana severa, incluyendo casos esporádicos de SUH y brotes asociados a cepas ECVT LEE negativas (Gouali y Weill, 2013). El patrón de adherencia e interacción con células epiteliales es notablemente diferente entre las cepas ECVT LEE-positivas y LEE-negativas. En las cepas LEE-positivas, la adherencia inicial es mediada por la fimbria polar larga (Lpf, *Long polar fimbriae*), seguida por la producción de la lesión AE. Por el contrario, la adherencia de las cepas LEE-negativas no ha sido ampliamente investigada y sólo se realizaron trabajos puntuales para ciertos serotipos de ECVT en los que no se observa la típica lesión AE producida por las cepas LEE-positivas (Gouali y Weill, 2013).

La isla de patogenicidad LEE codifica los genes *eae*, *esp*, *tir* y *esc*. Específicamente los genes *eae* han sido asociados a la secreción de una proteína de 94 a 97 kDa llamada intimina, responsable de la adherencia íntima de la bacteria al epitelio intestinal. Se ha demostrado experimentalmente que la intimina estimula la inflamación e hiperplasia del intestino, favoreciendo la colonización de estas células. Los genes *esp* son los responsables de la secreción de proteínas necesarias para activar las señales de transducción a través del epitelio. *EspB* es la señal de transducción que es exportada por el sistema de secreción tipo III y penetra al citoplasma de la célula intestinal donde destruye el citoesqueleto. La regulación del operón *esp* depende de que *E. coli* se encuentre en fase logarítmica de crecimiento, del contacto con la célula intestinal y de la concentración de  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mn}^{2+}$  (Gyles, 2007). Recientemente se propuso la existencia de una proteína producida y exportada que después de ser fosforilada es insertada en la membrana del epitelio intestinal del humano y sirve como receptor de la intimina. Esta proteína llamada *tir* (*translocated intimin receptor*) activa una serie de cascadas

de señalización que resultan en la reordenación de la estructura de la célula epitelial, cambios en la fisiología celular que involucra pérdida de microvellosidades y formación de un pedestal por polimerización de la actina y proteínas del citoesqueleto celular (Karmali et al, 2010).

Se ha demostrado que el gen que codifica para tir, al igual que el gen *eae*, presentan una marcada heterogeneidad en sus secuencias genéticas y se sugiere que la covariación de estas dos proteínas ayuda a evadir a la respuesta inmune del huésped sin comprometer la interacción adhesina-receptor (Karmali et al, 2010). Finalmente, el grupo de genes *esc* pertenece a un sistema de secreción de tipo III que codifica para las proteínas responsables de la exportación de factores de virulencia y que es dependiente del contacto de la bacteria con la célula del huésped. Las proteínas secretadas o proteínas efectoras tienen un efecto directo sobre la célula intestinal y la modifican para beneficio del patógeno (Gyles, 2007).

El período de incubación promedio de la infección por ECVT es de 3 días (con un rango de 1-8 días). Luego de ese período, un alto porcentaje de pacientes presenta diarrea acuosa y aproximadamente el 30% (80% en Argentina) evoluciona a diarrea sanguinolenta o CH en los días 5-6, presentando evidencia de edema de la mucosa colónica y dolores abdominales severos (frecuente en niños mayores). En algunos casos pueden presentarse vómitos, irritabilidad y fiebre (Fernandez-Brando et al, 2011 a). El 60% de los pacientes supera la fase aguda y se recupera sin secuelas después de dos o tres semanas de hospitalización (Ibarra et al, 2008).

Aunque en la mayoría de los casos la diarrea por ECVT es autolimitada, aproximadamente del 5 al 10% de los niños infectados evolucionan a SUH (Fernandez-Brando et al, 2011 a), para el cual no existe un tratamiento específico, sino de sostén (Rivas et al, 2011).

En algunos pacientes, los síntomas de SUH aparecen 6-8 días después del inicio de la diarrea e incluyen anemia hemolítica microangiopática (hematocrito <30%), trombocitopenia (<150.000 plaquetas/mm<sup>3</sup>), e insuficiencia renal aguda. En otros pacientes, puede observarse un período de silenciamiento entre la diarrea y la aparición de SUH, mientras que en otros pacientes el SUH aparece conjuntamente con el período de diarrea. En una proporción muy baja de casos de SUH no existe diarrea prodrómica (Tarr et al, 2005; Rivas et al, 2011).

Si bien las toxinas Stx o VT son consideradas el principal factor de virulencia de ECVT, no son las únicas responsables de la patogenicidad bacteriana completa. Se describieron factores de virulencia adicionales, incluyendo adhesinas, proteasas, sistemas de captura de hierro, lipopolisacáridos, flagelos y otras toxinas como enterohemolisinas, que podrían contribuir en la patogénesis de las mismas (Rahal et al, 2012).

### **Tratamiento de infección por *E. coli* verotoxigénica**

Los pacientes con infección confirmada por *E. coli* verotoxigénica y con diarrea sanguinolenta deben ser hospitalizados para evaluar la existencia de signos de progresión a SUH y limitar la propagación de la infección en la comunidad (Tarr et al, 2005).

La mayoría de los pacientes con infección por ECVT sin complicaciones pueden recuperarse por completo con medidas de soporte general. Actualmente el tratamiento comprende medidas terapéuticas destinadas a corregir las alteraciones hidroelectrolíticas, hematológicas, neurológicas o de HTA durante el período agudo, y otras dirigidas a modificar la etiopatología de la enfermedad (Karmali et al, 2010).

Los estudios realizados para evaluar la relación del riesgo de evolución a SUH luego de la infección con cepas de *E. coli* productoras de verotoxina y el uso de antibióticos para el tratamiento son aún controversiales (Wong et al, 2000; Rahal et al, 2012).

Los efectos de los antibióticos son dependientes de la cepa ECVT, el tipo de antibiótico (bacteriostático o bactericida) y la administración de los mismos. Dado que el SUH se desarrolla principalmente en los días 5-7, la administración de antibióticos como terapia temprana de la infección suele ser tardía. Un estudio demostró que no existe diferencia en el riesgo de desarrollar SUH con el uso de antibióticos si la administración de los mismos se realiza dentro de los 3 días de infección con *E. coli* (Keir et al, 2012).

Panos et al (2006), describieron que si bien *E. coli* O157:H7 es susceptible a la mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados comúnmente, no se confirma que la antibioticoterapia aporte algún beneficio para el paciente o que sean eficaces en la reducción de la infección de *E. coli* O157:H7 o la duración de diarrea con o sin sangre.

Además demostraron que el tratamiento antibiótico incrementa 17 veces el riesgo de SUH como consecuencia de la injuria a la membrana bacteriana inducida por el antibiótico, que podría favorecer la liberación de grandes cantidades de toxina preformada, aumentando así las tasas de mortalidad por SUH.

Por otra parte Karmali et al (2010), evaluaron la capacidad de resistencia de *E. coli* O157 frente a antimicrobianos y demostraron que la cepa y otros serotipos ECVT son resistentes a drogas como estreptomina, sulfisoxazol y tetraciclina. Además hay evidencia de que esta resistencia puede estar aumentando en el tiempo.

Estudios realizados por Zhang et al (2000) e Ichinohe et al (2009) demostraron que ciertos antibióticos de la familia de quinolonas, en particular, flurazolidone y trimetopin, son potentes inductores de la expresión de genes de VT2, aumentando el nivel de toxinas en el intestino, y reportaron que la administración de la quinolona ciprofloxacina a ratones infectados con ECVT provocó un notable incremento de VT2 en materia fecal y aumento de la tasa de mortalidad. Los resultados de estos estudios sugieren que el riesgo de secuelas asociadas con la terapia con antibióticos para la infección por ECVT está estrechamente relacionado con el mecanismo antibacteriano de cada agente y sus efectos sobre los genes *stx*.

Estudios retrospectivos señalan un aumento del riesgo de evolución a SUH al administrarse drogas que disminuyen la motilidad intestinal, opiáceos y anti-inflamatorios no esteroides (Tarr et al, 2005; Karmali et al, 2010).

En nuestro país en el año 2005, el informe de la Sociedad Argentina de Pediatría recomendó que los lactantes y niños con sospecha de diarrea bacteriana no reciban tratamiento con antibiótico, especialmente si se trata de pacientes con sospecha o confirmación de gastroenteritis por *E. coli* (Ruiz, 2005).

### **Dietoterapia del Síndrome Urémico Hemolítico**

Se encuentra ampliamente descripto en la literatura científica, las acciones de distintos extractos de plantas que van desde la actividad antimicrobiana directa, a la modulación de la infección y traslocación del agente patógeno (Adeniyi et al, 2010; Hernandez et al, 2007).

Se ha demostrado que numerosas plantas contienen compuestos con actividad antibiótica que podrían ser efectivos para el tratamiento de la diarrea (Szabo et al, 2010) o para ser utilizados en la industria de los alimentos como aditivos antimicrobianos (Egly Feresin et al, 2001), específicamente se ha demostrado actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 (Kim et al, 2008; Piyaman et al, 2008; Doughari et al, 2009; Yossa et al, 2013).

Se ha determinado que la interacción de las bacterias y sus toxinas con el epitelio intestinal puede ser regulada por factores nutricionales (Gibson et al, 2003), como el uso de probióticos reconocidos por su capacidad para estimular el sistema inmune del organismo (Ushah et al, 2000). En los últimos años, han sido investigadas cepas específicas de probióticos por sus efectos benéficos en el tratamiento y modulación de la microflora intestinal (Ceapa et al, 2013), regulación inmunológica (Gill et al, 2008), tratamiento de enfermedades alérgicas, gastroenteritis aguda (D'Souza et al, 2002), colon irritable (Dai et al, 2013), cáncer de colon y constipación, entre otros (Sienzen et al, 2002; Servin et al, 2003; Myers, 2007, Singh et al, 2013).

Específicamente se ha comprobado que los probióticos tienen capacidad anti-adherentes de patógenos y sus toxinas por un mecanismo de competencia con receptores de la pared intestinal (Douglas y Sanders, 2008).

### **Algarroba (*Prosopis alba* Griseb)**

*Prosopis alba* Griseb (algarrobo blanco) pertenece a la familia Fabaceae (Mimosoideae). Del género *Prosopis* se conocen 44 especies en todo el mundo, distribuidas por América, sudoeste de Asia, y África. *Prosopis alba* Griseb es una leguminosa arbórea con una amplia distribución geográfica, crece naturalmente en zonas áridas, semiáridas y subhúmedas de Argentina, Uruguay, Paraguay, Perú, Bolivia y Chile. En Argentina se encuentran 28 especies de *Prosopis*, de las cuales 16 son arbóreas y el resto arbustivas. La mayor concentración de árboles se encuentra en el norte y centro del país, principalmente en Chaco y Córdoba (Prokopiuk et al, 2000; Alzate Tamayo et al, 2008).

*Prosopis alba* Griseb se conoce como algarrobo, ibopé-morotí, ibopé-pará o igopé-pará (en guaraní) que significa “árbol puesto en el camino para comer”, yurak-tacú,

yaná-tacú, takku, taco juraj (en quechua) que significa “el árbol”, patá (en diaguita), maapik y joayuc (en toba), fwayuk (en wichí), malumpé (en vilela), roak (en abipón) y tiwis (en lengua maskoy) (Prokopiuk, 2004).

Las especies del género *Prosopis* presentan gran resistencia a la sequía y a la salinidad y tienen alta capacidad de fijar nitrógeno. Es el árbol por antonomasia para los pobladores del Chaco argentino, a los que proporciona sombra, alimento, bebida, combustible y madera. De hasta 12 m de altura y 0,7 m de diámetro, produce de 5 a 40 kg de frutos por año (Felker et al, 2003). Florece en los meses de septiembre a noviembre y fructifica de diciembre a febrero. Su fruto, la algarroba, es una legumbre con altos contenidos de proteínas e hidratos de carbono que varía en tamaño, color y características químicas según la especie. El fruto de *Prosopis alba* Griseb son vainas lineares, arqueadas o anulares de color amarillo paja, muy comprimidas, de bordes paralelos, con semillas que se identifican en las caras laterales con pulpa dulce. Las semillas (15 a 30 por vaina) son de forma ovoidal, de color castaño (Prokopiuk et al, 2000; Felker et al, 2003).

Los frutos se consumen directamente o permiten la elaboración del patay (una pasta dulce preparada con harina de los mismos) y bebidas como la añapa (dulce, no alcohólica) y la aloja (fermentada, alcohólica). Constituyen además un buen forraje para el ganado (Prokopiuk, 2004).

La pulpa de las algarrobas contiene abundante hidratos de carbono (45%), principalmente sacarosa y pectina. También contiene almidón, proteínas, celulosa y taninos. Posee un bajo tenor graso (2%), destacándose en su composición los ácidos grasos insaturados, como el oleico y linoleico. Su valor calórico aproximado es de 313 kcal cada 100 g de producto. Con respecto a sus micronutrientes, los principales minerales que la componen son el calcio, hierro y fósforo, y las vitaminas A, D, tiamina y riboflavina. Las hojas de *P. alba* poseen además importantes componentes activos como los flavonoides (Quercetina, Luteolina, Quercetina-3-methyl ether, Vitexina, Isovitexina y Quercetina-7-glucósido) (Roig, 1993).

Su cultivo es recomendado con una doble finalidad, detener el avance de la desertificación y erosión del suelo en zonas áridas y semiáridas y utilizar sus frutos para alimentación humana y animal en países en desarrollo (Felker et al, 2003).



Tradicionalmente el uso de algarroba está muy difundido como tratamiento para gastroenteritis principalmente en lactantes. Desde 1989, estudios realizados por Loeb et al, demostraron que las algarrobas frescas pueden utilizarse como laxantes, mientras que la harina seca es antidiarreica. Además posee la propiedad de adsorber toxinas del conducto digestivo. Estas propiedades para el tratamiento de diarrea aguda de origen bacteriano o viral se deben a la presencia de taninos en el fruto.

Las semillas, llamadas Garrofín son ricas en mucílagos. A partir de ellas se obtiene la “goma de algarroba” que en estómago forma un gel viscoso y aumenta el volumen del contenido gástrico por adsorción de líquidos, incrementando la sensación de saciedad además de interferir con el reflujo de ácido en el esófago (Greally et al, 1992). En el intestino, la goma tiene efecto laxante, distiende las paredes intestinales y estimula un correcto peristaltismo. Por consumo de preparaciones a base de algarroba, se ha descrito un efecto hipocolesterolemizante sin modificaciones de colesterol de alta densidad (HDL) debido al contenido de fibra dietética y polifenoles (Zunft et al, 2001; Ruiz-Roso et al, 2010).

Desde hace varias décadas se estudian distintos aspectos silvícolas del algarrobo blanco, precisamente por su gran variedad de usos y su importancia económica por la provisión de materia prima para el consumo humano y del ganado. Las excelentes propiedades tecnológicas de su madera generaron la intensa tala de las poblaciones naturales y en consecuencia una fuerte degradación de los recursos genéticos existentes. Desde el año 1999, el Instituto de Investigaciones Forestales y Agropecuarias del Gobierno de la Provincia del Chaco (Subsecretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente) está ejecutando un programa de reforestación de *Prosopis alba* con fines maderables. También el Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), posee un Proyecto Nacional de Mejoramiento para revertir el proceso de la pérdida de recursos naturales, denominado “Domesticación de especies forestales nativas del Parque Chaqueño (Algarrobo)”, cuyo principal objetivo es que las futuras plantaciones de algarrobo provengan de orígenes conocidos y confiables y con cierto grado de mejora respecto de su uniformidad y pureza específica. Por otra parte, el Banco Nacional de Germoplasma de *Prosopis*, ubicado en la provincia de Córdoba, tiene por objeto conservar la variabilidad genética existente en especies del género *Prosopis* consideradas prioritarias (Alzate Tamayo et al, 2008).

## **Mistol (*Ziziphus mistol* Griseb)**

*Ziziphus mistol* Griseb pertenece a la familia Rhamnaceae, en la que se han descrito 52 géneros con 925 especies. En la Argentina se encuentran 14 géneros con 29 especies, entre ellas 4 endémicas. *Ziziphus mistol* Griseb es una de las especies nativas del centro-norte de la Argentina que incluye a las provincias de Catamarca, Corrientes, Salta, Entre Ríos, Formosa, Jujuy, Santiago del Estero y principalmente en el Distrito Chaqueño Occidental donde forma parte del estrato arbóreo de los bosques de quebracho colorado y quebracho blanco, área que está sufriendo el avance de los desmontes sometiendo a esta especie al peligro de desaparición (Colares y Arambarri, 2008).

*Z. mistol* es un árbol leñoso y espinoso de 4 a 15 mts de altura con fuste corto y tortuoso, flores pequeñas y fruto drupáceo de 1,5 cm diámetro de pardo rojizo a la madurez con pulpa pastosa y dulce. Florece durante la primavera meridional (entre octubre y diciembre) y fructifica en el verano meridional (entre diciembre y marzo) (Juarez de Galindez et al, 2006).

*Ziziphus mistol* Griseb es conocido popularmente bajo los nombres “azufaito”, “baié”, “juasy’y”, “mistol”, “mistol cuaresmilla”, “naalá”, “nahalá”, “nausá”, “sacha mistol” y “yuyuvi” (De la Peña y Pensiero, 2004; Alonso y Desmarchelier, 2005).

Desde el punto de vista químico y nutricional, en el género *Ziziphus* se han identificado alcaloides, saponinas, triterpenos, antraquinonas y esteroides. En los análisis químicos realizados en la raíz de mistol se ha determinado la presencia de saponinas, taninos, peroxidasas, almidón y proteínas; en la corteza se detectaron saponinas; en las ramas hojosas antraquinonas y vestigios de saponinas; en las hojas flavonoides y en los frutos almidón y azúcar (Demaio et al, 2002; Colares y Arambarri, 2008).

Desde tiempos remotos se han utilizado la raíz y la corteza como sucedáneo del jabón y para extraer un colorante que proporciona un color castaño oscuro. En Formosa se lo conoce como “jabón de palo” y además se obtiene un colorante rosado del cocimiento de las hojas y amarillento de la madera. Si bien es considerada una especie de importancia industrial secundaria, posee aplicación en la elaboración de carbón vegetal y leña para combustible (Prokopiuk, 2004).

En la actualidad, además de los usos tradicionales de las especies nativas, cobra importancia la fijación de carbono que las mismas pueden realizar y en consecuencia su contribución al mejoramiento del ambiente. En este sentido, los bosques juegan un importante papel no solo como productores de materia prima sino también por su reconocimiento como sumideros de carbono (Juarez de Galindez et al, 2006; Toledo et al, 2009).

La corteza en maceración y también las ramas foliosas han sido empleadas para el tratamiento de la caspa. Con las cenizas del incinerado de los tallos se prepara una infusión con propiedades eméticas y con la decocción de las hojas mezcladas con las de *Capparis tweediana* Eichler y *C. speciosa* Griseb se prepara un té antidisentérico que se ha usado para combatir el “empacho”. Los tobas, comen los frutos y un “pan” semejante al bolanchao santiagueño (golosina) y cuando hay escasez de yerba mate, le agregan hojas de mistol desecadas y molidas sin modificar el sabor. Los frutos son consumidos frescos, secos al sol (pasa de mistol) o hervidos; la infusión de los mismos tiene propiedades como hepático, en especial para el tratamiento de cólicos biliares. También se utiliza como antídoto contra las mordeduras de serpientes y picaduras de insectos venenosos. Los Tobas y Wichis beben el jugo liberado por la pulpa de los frutos remojados (añapear) para combatir la constipación y para reducir su efecto laxante lo mezclan con la harina de los frutos del género *Prosopis* o *Acacia*. Con los frutos molidos se elabora “patay” y fermentados con la adición de agua se elabora “aloja”. A partir del destilado de aloja se obtiene el aguardiente de mistol. Con los frutos también se elabora un tipo de dulce casero denominado “arope” (Colares y Arambarri, 2008; Toledo et al, 2009).

### **Kéfir y leche fermentada kefirada**

Elie Metchnikoff, Premio Nobel de Medicina en 1908, fue pionero en la investigación sobre las propiedades benéficas de leches fermentadas y fue quien definiría por primera vez a un probiótico como un alimento que contiene bacterias vivas beneficiosas para la salud (Schmalstieg y Goldman, 2008). Lilley y Stillwell (1965) se refirieron al concepto como cualquier sustancia u organismo que contribuye al equilibrio microbiano intestinal, sobretodo en animales de granja. Otros autores lo

definen como un alimento con microorganismos vivos que afecta benéficamente al animal huésped debido a que mejora el equilibrio microbiano y se pueden utilizar en productos lácteos fermentados (Schaafsma, 1996). Más recientemente, los probióticos se definen como organismos vivos, que tras la ingesta de cierta cantidad, ejercen beneficios para la salud más allá de los beneficios nutricionales (Guzel-Seydim et al, 2011).

Numerosos estudios han indicado que los productos lácteos fermentados tienen efectos benéficos como probióticos, en especial para el mejoramiento de la salud del sistema digestivo, la reducción del colesterol sérico, mejoramiento de la tolerancia a la lactosa, el mejoramiento de la función inmune, el control de los síntomas de intestino irritable y propiedades anticancerígenas y antimutagénicas (Ebringer et al, 2008; István, 2008; Guzel-Seydim et al, 2011).

Ebringer et al (2008), informaron que los microorganismos probióticos se consumen más comúnmente como productos lácteos fermentados. Los péptidos bioactivos y proteínas de productos lácteos fermentados proporcionan beneficios para la salud tales como la estimulación sobre la proliferación de linfocitos y producción de inmunoglobulinas, reducción de HTA y aumento de la absorción de intestinal de calcio.

Algunos de los microorganismos más frecuentemente aislados como probióticos han sido identificados como especies de bifidobacterias, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus salivarius* y *Saccharomyces boulardii* (Guzel-Seydim et al, 2011).

El kéfir es una bebida de leche fermentada refrescante auto-carbonatada que tiene propiedades sensoriales únicas debido a una mezcla de ácido láctico, acetaldehído, acetoína, etanol y otros subproductos de fermentación obtenidos a partir de una amplia gama de microorganismos inherentes a los granos de kéfir (Otes y Cagindi, 2003; Kök-Tas et al, 2013).

De acuerdo a la definición del Código Alimentario Argentino (Cap. VIII, Art. 576, Res. 295), se entiende por kéfir a la leche fermentada elaborada con granos de kéfir, cuya fermentación se realiza con cultivos ácido lácticos *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium* spp y *Streptococcus salivarius* subsp. *termophilus*, especies de los géneros *Leuconostoc*, *Lactococcus* y *Acetobacter*, con producción de ácido láctico, etanol y dióxido de carbono. Los granos de kéfir están constituidos por levaduras

fermentadoras de la lactosa (*Kluyveromyces marxianus*) y levaduras no fermentadoras de la lactosa (*Saccharomyces omnisporus*, *Saccharomyces cerevicie* y *Saccharomyces exiguus*).

La leche kefirada se originó en las tribus en el norte de la Región montañosa del Cáucaso en Rusia. Tradicionalmente el kéfir ha sido y es, una bebida muy popular en este país y países limítrofes, así como en Hungría y Polonia, los cuales reportaron en 1998 producciones de más de 3 millones de litros anuales. La antigua Unión Soviética cuenta con el 70% del consumo mundial de esta leche fermentada. Actualmente este cultivo es bastante conocido en muchos países como Suiza, Francia, Finlandia, Alemania, Grecia, Australia, Brasil, España e Israel y recientemente está disponible en los EE.UU. y Japón como una bebida étnica. En otros países, apenas está siendo descubierto (Farnworth, 2006).

El kéfir es fabricado bajo una variedad de nombres incluyendo kephir, kiaphur, kefer, knapon, kepi y kippi. Aunque no se tiene referencia etimológicas exactas del vocablo Kéfir, se cree que proviene del Kief, voz turca que significa “agradable sensación”, ésta definición es a causa de la sensación de bienestar que se experimenta tras ingerir esta leche fermentada (Farnworth, 2006).

El kéfir o leche kefirada es elaborado a partir de granos de kéfir, gránulos gelatinosos blancos o amarillos de 2 a 30 mm de diámetro parecidos a pequeños corales o coliflor. Estos granos son utilizados como cultivos iniciadores puros de la leche kefirada, aunque también puede ser producida a partir de cultivos sucesivos de granos iniciadores de la leche fermentada (Guzel-Seydim et al, 2011).

Originalmente la producción y preparación de la leche kefirada era realizada en sacos o bolsas de piel de cabra u otro animal relleno con leche pasteurizada inoculada con la flora intestinal (Otes y Cagindi, 2003). Actualmente, los granos de kéfir en proporción 2 al 10% (p/v) se fermentan en leche pasteurizada a 20 a 25 °C durante aproximadamente 18 a 24 hs. Los microorganismos de los granos proliferan aumentando su biomasa aproximadamente un 25% durante el proceso y se recuperan luego de la fermentación para ser reutilizados. El líquido fermentado resultante se almacena en condiciones de asepsia a 4 °C (Guzel-Seydim et al, 2011; Kök-Tas et al, 2013).

Durante la fermentación del kéfir las bacterias lácticas convierten la lactosa en ácido láctico y las heterofermentativas, como *Lactobacillus kefir* y algunas especies de *Leuconostoc* producen etanol. Los compuestos de sabor son producidos por *Streptococcus lactis* (diacetilo y acetaldehído), *Lactobacillus brevis* (diacetilo), *Leuconostoc* (diacetilo) y las levaduras también contribuyen en la producción de compuestos volátiles a partir de la lactosa que imparten sabor a esta bebida. El CO<sub>2</sub> proviene del metabolismo de las levaduras y de las bacterias lácticas heterofermentativas (Bensmira et al, 2010; Guzel-Seydim et al, 2011).

Los estreptococos homofermentativos ácido lácticos crecen rápidamente, inicialmente provocando una disminución en el pH. Este bajo pH favorece el crecimiento de Lactobacilos, pero causa el descenso en el número de Streptococos. La presencia de levaduras en la mezcla, junto con la temperatura de fermentación (21-23 °C), fomenta la intensidad del aroma que producen los Estreptococos heterofermentativos. A medida que avanza la fermentación, el crecimiento de bacterias ácido lácticas se ve favorecido por el crecimiento de las levaduras y las bacterias del ácido acético (García Garibay et al, 2004; Guzel-Seydim et al, 2011). El kéfir es una simbiosis de microorganismos unidos en una matriz proteica (13%) y Exopolisacáridos (EPS) (24%). Estos EPS producidos por microorganismos del kéfir se conocen comúnmente como kefiran, un glucogalactano ramificado que consiste en cantidades iguales de D-glucosa y D-galactosa. El kefiran está presente en el material capsular de algunas bacterias, especialmente Lactobacilos. *Lactobacillus kefir*, *Lactobacillus parakefir* y *Lactobacillus kefiranofaciens* son las principales bacterias productoras de EPS presentes en la microflora del grano kéfir (García Garibay et al, 2004).

En los últimos años, se ha incrementado el uso de kefiran en la industria de alimentos como espesante, estabilizante, emulsionante, sustituto de grasa o agente gelificante, mejorando la calidad, textura y sabor de los productos y ha sido empleado en el desarrollo de nuevos materiales de envasado (Kök-Tas et al, 2013).

Además numerosas investigaciones han determinado distintas propiedades del kefiran en la salud como inmunoestimulante, antimutagénicos, antialérgico y antiulceroso, además de poder actuar como un compuesto prebiótico (De Moreno de

LeBlanc et al, 2006; Farnworth, 2006; Kwon, 2006; Medrano et al, 2008; Bensmira et al, 2010).

La composición del kéfir varía dependiendo de diversos factores incluyendo el origen de la leche (vaca, oveja, yegua, cabra) y su contenido graso (entero, semidescremado y descremado), la composición microbiológica de los granos, el tamaño de los mismos o de los cultivos iniciadores y las condiciones tecnológicas de la producción (la aparición de cualquier agitación durante la fermentación y la velocidad, la temperatura y la duración de la refrigeración y las etapas de maduración después del fermentado), afectando así el perfil de pH, viscosidad y microbiología del producto final (Kök-Tas et al, 2013).

La leche kefirada es un producto con 0,7-1,0% de ácido láctico y un contenido de etanol de 1%, contiene además 3ppm de diacetilo, 1 a 2ppm de acetaldehído y acetoina, los cuales son muy importantes para el sabor (García Garibay et al, 2004). Nutricionalmente, el kéfir contiene vitaminas B1, B12, biotina, vitamina K, ácido fólico, minerales como calcio, magnesio, fósforo y aminoácidos esenciales como triptófano (Otes y Cagindi, 2003).

Numerosas investigaciones han estudiado los beneficios del consumo de kéfir. Más aún, cientos de años de consumo de este producto han demostrado que los microorganismos del kéfir no son patógenos en el hombre. El kéfir ha sido utilizado en personas con desórdenes metabólicos y enfermedades alérgicas como la intolerancia a la lactosa. Se ha demostrado que el consumo regular de kéfir alivia desórdenes intestinales, promueve el peristaltismo intestinal y reduce la flatulencia (Otes y Cagindi, 2003; Guzel-Seydim et al, 2011). Recientes estudios han investigado propiedades antibacterianas in vitro contra bacterias gram positivas, gram negativas e incluso contra hongos (Medrano et al, 2008).

El consumo, el manejo y la valoración de las plantas silvestres y cepas probióticas son aspectos centrales que forman parte de los conocimientos tradicionales en muchas poblaciones. Entre los posibles usos de las plantas, aquellos relacionados con la medicina y la alimentación tienen gran importancia, ya que son esenciales para la supervivencia humana. Por lo tanto, la recolección de plantas, la difusión y conservación del conocimiento dentro de la comunidad son las prácticas tradicionales

que han contribuido a la subsistencia de muchas culturas. El conocimiento de la utilización de las plantas medicinales y bebidas fermentadas con cepas probióticas sigue siendo muy difundido en todo el mundo. En casi todas las sociedades, el sistema médico occidental coexiste con distintos sistemas médicos tradicionales. Estos sistemas médicos tradicionales generalmente se basan en el uso de productos naturales y locales, que son comúnmente relacionados con la perspectiva de las personas sobre el mundo y la vida (Toledo et al, 2009).

De esta manera resulta de gran importancia estudiar la acción protectora de componentes de extractos alimentarios y probióticos en el hombre, teniendo en cuenta que la infección por ECVT en nuestro país tiene una creciente incidencia y sus manifestaciones clínicas y secuelas son de considerable gravedad. La originalidad del estudio radica en tratar de vincular con la medicina actual, la medicina popular y los hábitos alimentarios culturales de la población, para así avanzar en el estudio de los tratamientos de las infecciones por esta bacteria, especialmente en el SUH.

La importancia alcanza a varios niveles, en lo local, puede significar el aprovechamiento de productos o subproductos agrarios de escaso a nulo uso industrial. En la actualidad y a corto plazo, podrá tener una implicancia social en la población, brindando la posibilidad de fomentar la producción de leches fermentadas a nivel familiar, como tratamiento de las infecciones por *E. coli* productoras de verotoxina, previniendo el desarrollo de SUH y limitando de esta manera la enfermedad.



## **HIPÓTESIS**

Los componentes obtenidos de alimentos vegetales y fermentados lácteos, serían potencialmente útiles en la dietoterapia de enfermedades provocadas por cepas de *E. coli* O157:H7.

## **OBJETIVOS**

### **OBJETIVO GENERAL**

Obtener de alimentos vegetales y/o fermentados lácteos, componentes capaces de impedir la colonización de cepas de *E. coli* O157:H7 y/o la acción de sus factores de virulencia sobre las células huésped.

### **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Obtener componentes de alimentos vegetales capaces de impedir la colonización de cepas *E. coli* O157:H7 y/o la interacción de sus factores de virulencia sobre las células huésped.
2. Efectuar la caracterización funcional y química de los componentes activos obtenidos de alimentos vegetales.
3. Obtener componentes de fermentados lácteos capaces de impedir la colonización de cepas *E. coli* O157:H7 y/o la interacción de sus factores de virulencia sobre las células huésped.
4. Efectuar la caracterización funcional y química o biológica (según corresponda) de los componentes activos obtenidos de fermentados lácteos.

**CAPÍTULO 2**  
**MATERIALES Y MÉTODOS**

## Lugar de trabajo

El trabajo de investigación fue realizado en tres laboratorios pertenecientes a la Universidad Nacional de Córdoba, teniendo acceso a la infraestructura y equipamiento necesario. Los ensayos fueron realizados en el Laboratorio perteneciente a la Cátedra de Bioquímica y Biología Molecular disponible para la Cátedra de Técnicas de Investigación y Control de Alimentos de la Escuela de Nutrición, ambas de la Facultad de Ciencias Médicas. Se trabajó en conjunto con la Cátedra de Higiene y Microbiología que cuenta con dos laboratorios independientes ubicados dentro del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas. Para los ensayos con líneas celulares se contó con el apoyo e infraestructura del Laboratorio del Instituto de Virología Dr. José María Vanella dependiente de la Facultad de Ciencias Médicas.

## Equipamiento

- Espectrofotómetro Beckam Coulter Inc OV-VIS 2400
- Lector ELISA: lector de microplacas autónomo ELx800 TM Bio-tek
- Campana de flujo laminar de seguridad biológica Sterild Gard Hood.
- Estufas de cultivo Garmut (Temp. máx. 50 °C y 200 °C)
- Centrífugas de laboratorio de altas revoluciones con y sin refrigeración: Presvac DSC 16, Presvac - EPF-12 CFE-16, Cavour VT-3216, Rolco CM 2036.
- Autoclave tipo Chamberland Faeta MCIS 2000 con esterilizador IS2000.
- Freezer-20 °C-80 °C: PletLab Freezer UBR 120, Telstar Freezer Igloo.
- Heladera Angelantoni Ekobasic
- Balanza analítica Ohaus Parsippany
- Evaporador Rotatorio Cientec Rotavapor
- Baños termostatizados Grant OLS200/GLS400
- Microscopios ópticos: Hardwell L3000, Leading Edger
- Mecheros de Bunsen, material volumétrico y de laboratorio, entre otros.

## Reactivos

**Sales:** Bicarbonato de Sodio  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ (Anedra), Cloruro de sodio  $\text{NaCl}$  (Anedra), Hidrógeno de sodio ortofosfato  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  (British DrugHouses LTD), Carbonato de sodio  $\text{NaHCO}_3$  (Sigma Aldrich), Hidróxido de sodio  $\text{NaOH}$  (Cicarelli), Sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (British DrugHouses LTD), Cloruro de potasio  $\text{KCl}$  (Anedra), Fosfato de potasio  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (British DrugHouses LTD), Sulfato de magnesio  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Anedra) Cloruro de calcio  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Sigma Aldrich), Sulfato de cobre  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  (Cicarelli).

**Drogas:** Cicloheximida 3-[2-(3,5-Dimethyl-2-oxocyclohexyl)-2-hydroxyethyl] (Sigma Aldrich), Sulfato de polimixina(Sigma Aldrich), Ciprofloxacina (Merk) Gentamicina (Sigma Aldrich). **Enzimas:** Tripsina (Sigma Aldrich), Quimiotripsina (Sigma Aldrich).

**Estándares:**Ácido Gálico Anhidro (Anedra), Quercetina, Luteolina, Quercitrina, Vitexina e Isovitexina (Sigma Aldrich), Albúmina bovina (Anedra), Folin Ciocalteu (Anedra).

**Solventes:** Acetona grado analítico (Dorwil), Hexano grado analítico (Dorwil), Alcohol etílico 96 ° (Porta), Alcohol etílico pro-análisis (Merck), Dimetilsulfóxido DMSO (Anedra), Ácido Clorhídrico (Biopur), Ácido Acético glacial pro-análisis(Cicarelli), Ácido Tricloroacético TCA (Anedra), Ácido Sulfúrico  $\text{H}_2\text{SO}_4$ pro-análisis (Merck). **Medios de cultivo:** Caldo Tripticadasoya (Britania), Extracto de levadura (Britania), Agar- Agar (Britania), Chromoagar ECC (CHROMagar), MacConkeyagar (Britania), MedioEsencial Mínimo (Gibco), Suero Fetal Bovino (Natocor). **Colorantes:** Rojo Neutro (Sigma Aldrich), May-GrünwaldGiemsa (Sigma Aldrich), Fucsina (Sigma Aldrich), Cristal violeta (Sigma Aldrich).**Materiales:** Placas de Sílica gel 60 para UV 254 con indicador de fluorescencia. 0.20 mm. (Kit: DC-Fortigfolien Alugram SIL G/UV 245. Macharey-Nagel), papel Watman N° 1, Filtros de acetato de celulosa de 0.22  $\mu\text{m}$  (Millipore- membrana GV-Durapore), Kit BioStar OIA Shigatoxin, Placas para cultivo 96 well 24 y 48 well (GreinerBio-One), entre otros.

## **Metodología Sección A: Obtención y caracterización de componentes potencialmente útiles.**

### Obtención de extractos de origen vegetal

Se realizó la extracción de componentes de harina de algarroba (*Prosopis alba* Griseb) y café de mistol (*Zizhipus mistol* Griseb), ambos productos comercializados y adquiridos en la ciudad de Córdoba. Lo mismos fueron fraccionados y almacenados a -18 °C hasta su utilización.

Para la extracción de componentes de distinta polaridad, se utilizaron los solventes: agua destilada, alcohol etílico 96°, acetona y hexano. El procedimiento consistió en la maceración del material vegetal con cada solvente durante 24 hs, en una proporción 1:10 respectivamente. Para solventes alcohol, acetona y hexano se realizó a temperatura ambiente y para el solvente agua destilada se realizó a 4 °C. Luego de la maceración, se centrifugaron las muestras a 10.000 rpm en centrífuga refrigerada a 4 °C, se filtraron en papel de filtro Whatman N° 1 descartando el material sólido. El líquido recuperado se concentró en evaporador rotatorio con baño a 50 °C a presión reducida. El material se colocó en estufa a 50 °C hasta completar el proceso de evaporación de solventes.

Los sólidos resultantes fueron redisueltos en agua destilada estéril para los extractos alcohólicos, acetónicos y acuosos, en el caso del extracto hexánico el material se redisolvió en agua destilada estéril y dimetil sulfóxido (DMSO) en una proporción 10:1 respectivamente.

Los extractos obtenidos fueron esterilizados en jeringa con filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm en condiciones de esterilidad y almacenados a -20 °C hasta su utilización.

## Determinación y cuantificación de grupos químicos

Se determinó el contenido de sólidos disueltos (SD) en mg/ml por método directo, comparando el peso en balanza analítica del extracto con respecto al peso del disolvente utilizado (agua destilada para los extractos alcohólicos, acetónicos y acuosos, agua destilada:DMSO para los extractos hexánicos).

Los extractos alcohólicos, acetónicos, hexánicos y acuosos de *P. alba* y *Z. mistol* fueron estudiados mediante 3 métodos para la determinación de compuestos fenólicos.

### **a. Marcha analítica fitoquímica**

Se evaluaron los extractos para la identificación de metabolitos secundarios por pruebas cualitativas. En todos los ensayos se utilizó 0,5 ml de extractos vegetales.

**a.1.Taninos:** a cada muestra de extracto se le agregó 5 gotas de  $\text{FeCl}_3$  al 1% en etanol. La reacción se consideró positiva cuando se evidenció coloración verde, azul o marrón (Naczka y Shahidib, 2004).

**a.2.Proantocianidinas:** a cada muestra de extracto se ajustó el pH a 2 con una solución de HCl y se calentó directo en llama. La reacción fue considerada positiva al cambiar la coloración a rojiza. Se verifica que con el agregado de n-butanol esta coloración pasa a la fracción alcohólica (Naczka y Shahidib, 2004).

### **a.3.Antocianinas y Betacianinas:**

Las muestras se calentaron a 100 °C durante 5 minutos con una solución de HCl 2M. El color rojo de antocianinas fue purificado con alcohol amilíco. Se agregó  $\text{NH}_4\text{OH}$  en gotas y se comprobó el cambio de color rojo a azul o verde.

Para la determinación de betacianinas, se realizó el mismo procedimiento y se comprobó la variación de color rojo a amarillo (Naczka y Shahidib, 2004).

### **a.4. Flavonoides: Ensayo de Shinoda (Pinto Vitorino et al, 2004).**

**a.4.1.Glicósidos:** a cada muestra de extracto se les añadió 4 gotas de HCl y limaduras de Mg. La reacción se consideró positiva cuando surge una coloración roja que pasa al butanol cuando es agregado.

**a.4.2.** Aglicones: cada muestra de extracto se concentra a sequedad y se redissuelve en 2 ml de agua destilada. Se procede como se describió anteriormente.

**a.4.3.** Flavonoides sulfatados: a cada muestra de extracto se agregó 4 gotas de HCl, se calentaron a baño maría durante 30 min, se dejó enfriar y se adicionó 0,1 ml de una solución acuosa de BaCl<sub>2</sub> (1,3 mg/ml de agua destilada). Se consideró positiva al aparecer un precipitado blanco.

**b.** Espectrofotometría

**b.1.** Determinación del contenido de Polifenoles totales (Dewanto et al, 2002).

Se colocó en tubo 0,2ml de cada extracto vegetal según el solvente de extracción y en distintas concentraciones, se adicionó 1 ml de una solución de reactivo de Folin-Ciocalteu diluido 1/10 en agua destilada, se homogeneizaron durante 2 min y se adicionó 0,8 ml de una solución de carbonato de sodio al 7,5%. Después de 60 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras fueron leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 765 nm. Las lecturas obtenidas se compararon con una curva de calibración estándar realizada con 1,6 a 50 µg de ácido gálico. Los resultados fueron expresados como µg de equivalentes de ácido gálico/ml de extracto.

**b.2.** Determinación del contenido de Flavonoides (Salamanca Grosso et al, 2007).

Se colocó en tubo 0,5 ml de cada extracto según el solvente de extracción y en distintas concentraciones, se adicionó 1,5 ml de etanol 96°, 0,1 ml de cloruro de aluminio al 10% y 0,1 ml de acetato de potasio 1M, se homogeneizó y se llevó a volumen final de 5 ml con agua destilada. Luego de 30 min de incubación a temperatura ambiente, las muestras fueron leídas en espectrofotómetro a una longitud de onda de 415nm. Las lecturas obtenidas fueron comparadas con una curva de calibración utilizando de 3,9 a 250 µg de Quercetina como patrón. Los resultados fueron expresados como µg de Equivalentes de Quercetina/ml de extracto.

c. Cromatografía en Capa Delgada. TLC (Thin Layer Chromatography) (Ying et al, 2009).

Para confirmar la presencia de grupos funcionales se efectuaron cromatografías en capa delgada y en papel. Para ello se utilizó:

**c.1.** Fase estacionaria:

**c.1.1.** Flavonoides aglicones, glicósidos y perfil químico general de los extractos: Silica gel 60 para UV 254 con indicador de fluorescencia. 0,20 mm. (Kit: DC-Fortigfolien ALUGRAM SIL G/UV 245. Macharey-Nagel).

**c.1.2.** Flavonoides sulfatados: papel Watman N° 1.

**c.2.** Fase móvil:

**c.2.1.** Flavonoides aglicones: cloroformo:acetona:ácido fórmico (7.5:1.65:0.85).

**c.2.2.** Flavonoides glicósidos: alcohol etílico:ácido fórmico:ácido acético glacial:agua (6.71:0.74:0.74:1.81).

**c.2.3.** Flavonoides sulfatados: Agua.

**c.3.** Perfil químico general: butanol:ácido acético:agua (5:10:40). Se utiliza la fase superior.

Se utilizaron reveladores UV-Fluorescencia. Se preparó la cámara cromatográfica, saturándola con las diferentes fases móviles y se sembraron los diferentes extractos en las placas cromatográficas con la ayuda de un capilar.

Los testigos para flavonoides aglicones fueron Luteolina y Quercetina; y para flavonoides glicósidos: Quercitrina, Vitexina e Isovitexina.

### Obtención de componentes de origen microbiano

#### Cultivo de leche kefirada

Para la obtención de componentes potencialmente útiles de origen microbiano, se realizaron cultivos artesanales y periódicos de leche kefirada.

Se partió de granos de kéfir artesanales. Los granos se mantuvieron en cultivo en frasco de vidrio con leche pasteurizada entera comercial en una proporción 1:10 durante 24 a 48 hs a temperatura ambiente (20 a 26 °C) en condiciones aeróbicas.



Periódicamente los granos se lavaron con agua destilada y se continuó el cultivo en leche entera comercial. Para la conservación de los mismos se enjuagaron con agua destilada, se colocaron en viales plásticos con tapa hermética y llevaron a -20°C por un período no superior a los 30 días. Luego de este período se reinició el cultivo dejando los granos en leche 2 o 3 días a temperatura ambiente para la activación de las cepas.

a. Obtención de péptidos catiónicos (Scopes, 1987; Casla et al, 1996; De Vuyst y Leroy, 2007).

Para la obtención de péptidos catiónicos se realizó precipitación salina con concentraciones de 40% y 60% de saturación con sulfato de amonio  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ .

La leche kefirada colada, se filtró en papel Whatman N° 1 para eliminar la materia grasa proveniente de la leche y restos de granos de kéfir. Se centrifugó en cámara fría a 4 °C a 10.000 rpm durante 10 min.

El sobrenadante se calentó en baño maría a 80 °C durante 5 min con el fin de coagular las proteínas lácteas y eliminar el peróxido de hidrógeno producido por la fermentación bacteriana. Se centrifugó en cámara fría a 4 °C a 10.000 rpm durante 10 min y se ajustó el pH del sobrenadante de 4-4,5 a 6-6,5 con una solución de hidróxido de sodio (NaOH) 2N.

A una parte del sobrenadante de leche kefirada a pH 6-6,5, libre de materia de grasa y proteínas lácteas, se agregó una concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 40% de saturación, se dejó 18 hs a 4 °C, se centrifugó en cámara fría a 4 °C a 10.000 rpm durante 10 min, el precipitado se resuspendió en Buffer Fosfato Salino (PBS) 20mM pH 7 estéril en una proporción 10:1 con respecto al volumen inicial y se dializó con membrana de acetato de celulosa (peso molecular 10.000 Da) contra PBS 150 mM pH 7 estéril, durante 72 hs a 4 °C con 3 cambios diarios.

Al sobrenadante del precipitado al 40% se adicionó una concentración de  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  al 60% de saturación y se realizó el mismo procedimiento.

Se obtienen péptidos catiónicos precipitados al 40 y 60% de saturación con solución salina y sobrenadante sin precipitar.

Todas las muestras fueron esterilizadas en jeringa con filtros de acetato de celulosa de 0,22  $\mu\text{m}$  en condiciones de esterilidad y almacenados a -20 °C hasta su utilización.

**b.** Obtención de Exopolisacáridos (EPS) (Toba et al, 1991; Gorret et al, 2001; Kim et al, 2006; Younghoon et al, 2009).

Para la obtención de Exopolisacáridos de kéfir (EPSK) se realizó precipitación alcohólica de granos y sobrenadante de leche kefirada.

**b.1.** Obtención de EPSK del grano de kefir (EPSKG)

Para la obtención de EPSKG se utilizaron los granos de kefir. Los granos se lavaron con agua destilada, se colocaron en frasco de vidrio estéril con una solución de NaOH 2N en una proporción 1:3 granos:NaOH respectivamente durante 24 hs a 4 °C.

Se corrigió el pH de 14 a 6,5-7 con una solución de ácido acético y se centrifugó la muestra en cámara fría a 4 °C a 10.000 rpm durante 15 min. Al sobrenadante se realizó la precipitación alcohólica en una proporción de 1:3 sobrenadante:alcohol absoluto frío respectivamente y se dejó macerar a 4 °C durante 24 hs. Se centrifugó en cámara fría a 4 °C a 10.000 rpm durante 15 min y el precipitado se resuspendió en PBS 20mM pH 7 estéril en una proporción 10:1 con respecto al volumen inicial y dializó con membrana de acetato de celulosa (peso molecular 10.000 Da) contra agua destilada estéril pH 7 estéril, durante 72 hs a 4 °C con 3 cambios diarios.

El EPSKG resuspendido y dializado se llevó a sequedad a estufa a 50 °C hasta peso constante, se molió en mortero hasta pulverizar y se almacenó en frasco estéril a -20 °C hasta su utilización.

**b.2.** Obtención de EPSK Libre (EPSKL)

Para la obtención de EPSKL se utiliza el sobrenadante de la leche kefirada. Al sobrenadante filtrado y centrifugado se agregó una solución de Tricloro acético (TCA) al 10% para precipitar las proteínas lácteas, se dejó 18 hs a 4 °C y se centrifugó en cámara fría a 4 °C a 10.000 rpm durante 10 min. Se ajustó el pH de 1 a 6,5-7 con una solución de hidróxido de sodio NaOH 2N. Al sobrenadante de leche kefirada a pH 6,5-7 libre de materia de grasa y proteínas lácteas, se realizó la precipitación alcohólica en una proporción de 1:3 sobrenadante:alcohol absoluto frío respectivamente y se dejó macerar a 4 °C durante 24 hs. Se centrifugó en cámara fría a 4 °C a 10.000 rpm durante 15 min y el precipitado se resuspendió en PBS 20mM pH 7 estéril en una proporción

10:1 con respecto al volumen inicial y dializó con membrana de acetato de celulosa (peso molecular 10.000 Da) contra agua destilada estéril pH 7 estéril durante 72 hs a 4 °C con 3 cambios diarios.

El EPSKL resuspendido y dializado se llevó a sequedad a estufa a 50 °C hasta peso constante, se molió en mortero hasta pulverizar y se almacenó en frasco estéril a -20 °C hasta su utilización.

### Determinación y cuantificación química

#### **a. Péptidos catiónicos**

El contenido de péptidos catiónicos fue determinado y cuantificado por método colorimétrico de Lowry por espectrofotometría (Lowry et al, 1951).

Para ello se trabajó con los siguientes reactivos:

- Reactivo A:  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  al 2% en agua destilada, NaOH 0,1M
- Reactivo B:  $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$  al 1%
- Reactivo C: tartrato sódico-potásico al 2%
- Reactivo D: Se preparó en el momento de iniciar el ensayo, mezclando A, B y C en proporciones 50:0,5:0,5 (v/v).
- Reactivo FolinCiocalteu: reactivo comercial diluido a 1:2 en agua destilada

Se colocó 1 ml de reactivo D en todos los tubos de reacción, se agregó 0,1 ml de muestra (agua destilada en el caso de los blancos de reacción y de control), se dejó reposar 10 minutos y se agregó 0,1 ml de Folin Ciocalteu. Se homogenizó y se dejó reposar al abrigo de la luz durante 30 min.

Las muestras se leyeron en espectrofotómetro a una longitud de onda de 580 nm. Las lecturas obtenidas fueron comparadas con una curva de calibración utilizando de 0,1975 a 1,2 mg de albúmina bovina como patrón. Los resultados fueron expresados como mg de proteína/ml de muestra.

#### **b. EPSK**

El contenido de EPSK fue determinado y cuantificado por método colorimétrico fenol-sulfúrico de Dubois por espectrofotometría (Dubois et al, 1956).

Se pesó 1 mg de las muestras obtenidas por precipitación alcohólica y se colocaron en tubos sumergidos en baño de agua-hielo, se agregó 0,5 ml de agua destilada, 0,5 ml de fenol 5% p/v en agua destilada y 2,5 ml de ácido sulfúrico  $\text{SO}_4\text{H}_2$  concentrado. Se dejó reposar la reacción durante 15 minutos y se leyó la absorbancia en espectrofotómetro a una longitud de onda de 490 nm. Las lecturas obtenidas fueron comparadas con una curva de calibración utilizando de 2,23 a 89,25  $\mu\text{g}$  de glucosa como patrón. Los resultados fueron expresados como  $\mu\text{g}$  de Equivalentes de glucosa/mg de muestra.

### **Metodología Sección B: Actividad antimicrobiana in vitro contra *E. coli* O157:H7.**

#### Medios y condiciones generales de cultivo de *E. coli*

Para realizar los ensayos se trabajó con cepas de referencia de *E. coli* O157:H7 EDL 933 tipificadas positivas para los factores de virulencia en estudio y cepas de referencia de *E. coli* ATCC 25922 como control negativo de patogenicidad, ambas provistas por la Cátedra de Higiene y Microbiología del Departamento de Farmacia de la Facultad de Ciencias Químicas, Universidad Nacional de Córdoba. La identidad de las cepas fue confirmada por la Administración Nacional de Laboratorios e Instituto de Salud (ANLIS).

Las cepas fueron cultivadas en caldo estéril Trypticase Soya (CTS) suplementado con 0,3% de extracto de levadura y para algunos ensayos con 3% de sales biliares. La incubación se realizó en estufa a 37 °C en condiciones aeróbicas durante 24 a 48 hs.

Los pellet de cultivos de 24 hs de incubación, se conservaron por deshidratación en lecho de bentonita estéril y en cultivo de agar blando 0,2% de CTS suplementado, mantenidos a temperatura ambiente.

Periódicamente se verificó la pureza de la cepa EDL 933 por estriado en medio Mac Conkey agar sorbitol y ATCC 25922 en medio Chromo agar ECC.

## Determinación de la curva patrón de crecimiento de *E. coli* O157:H7 EDL933 y ATCC 25922

Se determinó la curva de crecimiento de las cepas a partir de un cultivo de *E. coli* de 24 hs de incubación en CTS suplementado con 0,3% de extracto de levadura. Se utilizó la técnica de dilución seriada al décimo en tubo y recuento de colonias en placa, cuantificando la turbidez de las diluciones por espectrofotometría a 620 nm. Los resultados se expresaron como unidades formadoras de colonia por ml (ufc/ml).

Para realizar los ensayos con *E. coli* se prepararon cultivos de 24 hs de incubación en CTS suplementado en estufa a 37 °C en condiciones de aerofilia. Los cultivos se centrifugaron en centrífuga a temperatura ambiente a 13.000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se redisolvió en 30 ml de PBS estéril pH 7, se lavó y centrifugó al menos 2 veces para eliminar los metabolitos secundarios del desarrollo bacteriano y componentes del medio de cultivo.

Para determinar las concentraciones de trabajo de *E. coli*, se realizaron las diluciones correspondientes en PBS estéril y se cuantificó la turbidez por espectrofotometría a 620 nm. Las lecturas se compararon con la curva patrón y se expresan como ufc/ml.

### Actividad antimicrobiana in vitro

La actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 fue evaluada mediante tres métodos *in vitro*: Difusión en agar, Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) y Turbidometría.

Se determinó actividad antimicrobiana de extractos de origen vegetal *P. alba* y *Z. mistol* en los diferentes solventes de extracción (Tabla 1) y de péptidos catiónicos de origen microbiano de sobrenadante y precipitados con sulfato de amonio (Tabla 2). Para todos los ensayos se evaluaron tres concentraciones no citotóxicas para línea celular eucariota (células Vero).

Para los péptidos obtenidos de sobrenadante de leche kefirada con pH 4-4,5 se utilizó una concentración de solución alcalina de NaOH 2N para llevar a pH 6,5-7 y para péptidos precipitados con solución salina se acidificó de pH 6,5-7 a pH 4-4,5 con una

solución de ácido láctico equivalente a 11 °D. Se determinó además la actividad antimicrobiana de los mismos con y sin tratamiento enzimático con tripsina y pepsina para evaluar la naturaleza proteica de los componentes. Para ello se siguió la metodología de Line et al (2008), incubando los péptidos obtenidos con distintas concentraciones de enzimas durante 1 hora y evaluando la posterior actividad antimicrobiana.

Tabla 1. Concentraciones de extractos de origen vegetal expresados en mg de SD por ml, ensayados para evaluar la actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7.

<b>Solventes de extracción</b>	<b>Extractos <i>P. alba</i> (SD mg/ml)</b>	<b>Extractos <i>Z. mistol</i> (SD mg/ml)</b>
Alcohol	2,45 ± 0,55	3,75 ± 0,23
Acetona	3,075 ± 0,36	3,77 ± 0,16
Hexano	3,45 ± 0,21	3,32 ± 0,35
Agua destilada	19,46 ± 0,95	11,90 ± 0,85

Tabla 2. Concentraciones de péptidos catiónicos de origen microbiano expresados en mg de proteína por ml, ensayados para evaluar la actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7.

<b>Péptidos catiónicos</b>	<b>pH 4-4,5 (mg/ml)</b>	<b>pH 6,5-7 (mg/ml)</b>
Sobrenadante	1,5 - 0,75 - 0,30	1,5 - 0,75 - 0,30
Precipitado 40%	1,6 - 0,80 - 0,32	1,6 - 0,80 - 0,32
Precipitado 60%	1,7 - 0,85 - 0,35	1,7 - 0,85 - 0,35

#### **a. Difusión en agar**

En condiciones de esterilidad se prepararon placas con medio de cultivo y pocillos para la determinación del halo de inhibición como actividad antimicrobiana, según Heredia et al (2005) y Klancnik et al (2009).

A cada placa de Petri de vidrio de 19 cm de diámetro se colocó una base de 10 ml de agar Trypticasa Soya estéril suplementado y fundido a 50 °C. Una vez solidificado se colocaron 7 microtubos estériles de 5 mm de diámetro separados por 1 cm de distancia, se agregó 10 ml del medio fundido y una vez solidificado se sacaron los

microtubos con pinza estéril quedando 7 pocillos para volumen final de 200 µl cada uno.

En las placas preparadas se sembró 100 µl de una concentración [ $5 \times 10^6$  ufc/ml] de un cultivo de 24 hs de *E. coli* EDL 933 en CTS suplementado y se homogeneizó la muestra con espátula de Drigalsky estéril (siembra en superficie). Se inoculó 150 µl de extractos vegetales y péptidos catiónicos microbianos en cada pocillo y se dejó incubar en estufa a 37 °C durante 24 hs.

Se utilizó 150 µl de Ciprofloxacina [1 µg/ml] y 150 µl de Sulfato de Polimixina [100 µg/ml] como controles positivos de actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7.

Se realizó la observación visual directa de halos de inhibición (zonas claras) y medición del mismo con regla milimetrada. Los ensayos fueron realizados por duplicado y se repitieron 2 veces.

#### **b. Concentración Inhibitoria Mínima**

Se realizó la técnica de diluciones seriadas al duplo de acuerdo a la metodología de Klancnik et al (2009). En condiciones de esterilidad se utilizó una batería de 6 tubos estériles de vidrio de 9 mm de diámetro con tapa plástica por cada muestra. A cada tubo se colocó 0,5 ml de CTS suplementado, 0,5 ml de la muestra en las distintas concentraciones y 0,5 ml de un cultivo de 24 hs de incubación de *E. coli* EDL 933 en CTS suplementado a una concentración final de [ $5 \times 10^5$  ufc/ml]. Se homogeneizó y se dejó incubar en estufa a 37 °C durante 24 hs.

Por cada ensayo se realizaron controles positivo de actividad antimicrobiana: Ciprofloxacina [1 µg/ml] y Sulfato de Polimixina [100 µg/ml], control de crecimiento de *E. coli* EDL 933 a una concentración final de [ $5 \times 10^5$  ufc/ml] y control de esterilidad de las muestras.

Luego del período de incubación se realizó la observación visual directa de la turbidez de los tubos. La actividad antimicrobiana y determinación de la CIM se consideró positiva cuando no se observó visualmente turbidez en los tubos de las muestras ensayadas. Los ensayos fueron realizados por duplicado y se repitieron 2 veces.

### c. Turbidimetría

Teniendo en cuenta que la observación directa visual no es un método cuantitativo per se, se realizaron ensayos por el método de turbidimetría siguiendo la metodología de Casla et al (1996). Para ello, en condiciones de esterilidad se tomó 1 ml de las muestras de CIM. Las muestras fueron centrifugadas en eppendorf estériles a 13.000 rpm durante 15 min y el pellet redissuelto en 1 ml de PBS estéril pH 7. Se homogeneizaron las muestras y se leyeron en espectrofotómetro a 620 nm dentro de los 30 minutos.

Los lecturas de Densidad Óptica (DO) fueron comparadas con la curva de crecimiento de *E. coli* y se calculó las ufc/ml de las muestras. Se tomó como 100% el control de crecimiento de la cepa bacteriana y se calculó el porcentaje de inhibición como actividad antimicrobiana de las muestras. Los ensayos fueron realizados por duplicado y se repitieron 2 veces.

### **Metodología Sección C: Inhibición in vitro de citotoxicidad de Verotoxina de *E. coli* O157:H7 sobre células Vero.**

Para determinar la capacidad de los extractos de origen vegetal y componentes de origen microbiano de inhibir la acción de VT de *E. coli* O157:H7 sobre línea celular eucariota sensible a la toxina, se evaluó y cuantificó el daño citotóxico por la técnica de captación de colorante vital Rojo Neutro en lector de ELISA a 540 nm (Borenfreund y Puerner, 1985; Bouzari et al, 2009).

### Obtención y purificación de VT de *E. coli* O157:H7

Se partió de un cultivo de 48 hs de *E. coli* O157:H7 EDL 933 en CTS suplementado con 0,3% de extracto de levadura en estufa a 37 °C en condiciones de aerobias. El cultivo se centrifugó en cámara fría a 4 °C a 13.000 rpm durante 15 min. El sobrenadante libre de células se precipitó con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a 60% de saturación durante 18 hs a 4 °C. El precipitado centrifugado se resuspendió en PBS estéril pH 7 en una proporción 10:1 con respecto al volumen inicial y se dializó con membrana de acetato



de celulosa (peso molecular 10.000 Da) contra PBS 0,1 M pH 7 estéril durante 72 hs a 4 °C con 3 cambios diarios (Nakajima et al, 2001). La VT obtenida se esterilizó en jeringa con filtros de acetato de celulosa de 0,22 µm en condiciones de esterilidad y almacenó a -20 y -80 °C hasta su utilización.

La purificación de VT se realizó por cromatografía de afinidad utilizando una columna con Gb3 (Albrecht et al, 2010). Brevemente, 1 ml de los precipitados y sobrenadantes de cultivo de *E. coli* se pasaron a través de una columna de OctylSepharose CL-4B-Gb3 cinco veces. La columna se lavó con 10 volúmenes de PBS para eliminar las proteínas no absorbidas. Las VT retenidas se eluyeron con 4,5 M de MgCl<sub>2</sub> en PBS estéril pH 7 y se dializaron con membrana de acetato de celulosa (peso molecular 10.000 Da) contra PBS 0,1 M pH 7 estéril durante 72 hs a 4 °C con 3 cambios diarios.

La confirmación de VT se realizó mediante inmunoensayo óptico (Shiga toxina biostart kit) por reacción antígeno anticuerpo y observación directa del halo de color azul que indica la presencia de VT 1 y 2 de *E. coli* O157:H7 (Teel et al, 2007).

La VT se cuantificó por la técnica colorimétrica de Lowry con Folin Ciocalteu (Lowry et al, 1951). Los resultados se expresan como mg de proteína de VT por ml de muestra.

### Cultivo de células Vero

Se utilizaron células eucariotas epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*, Vero 76 ATCC CRL-587) provistas por el Departamento de Virología, Cultivo de tejidos del Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina y mantenidas en el Instituto de Virología Dr. José María Vanella de la Facultad de Ciencias Médicas, Universidad Nacional de Córdoba.

Las células Vero en suspensión [ $2,5 \pm 0,6 \times 10^5$  células/ml] fueron cultivadas en placas de 96 pocillos 48 a 72 hs hasta la confluencia en Medio Esencial Mínimo (MEM) suplementado con 10% de Suero Fetal Bovino (SFB) y 1% de Gentamicina a 37 °C en atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>).

## Ensayos de citotoxicidad

Para determinar el daño citotóxico, se incubaron 100 µl de las muestras en estudio por pocillo sobre monocapa confluyente de células Vero. Después de 72 hs de incubación a 37 °C en atmósfera controlada se evaluó el daño celular por observación al microscopio óptico inverso a 40x (Pistone Creydt et al, 2005) y se cuantificó la viabilidad celular por medio de la absorción de colorante vital Rojo Neutro de acuerdo con la metodología descrita por Borenfreund y Puerner (1985). Para ello se descartaron los 100 µl de muestras estudiadas por pocillo, se agregó una solución de 200 µl de [50 mg/ml] de Rojo Neutro y se dejó en incubación durante 3 horas a 37 °C en atmósfera controlada. Se descartó el colorante y se colocó en 100 µl/pocillo de una solución decolorante (agua, alcohol y ácido acético en una proporción 100:99:1 respectivamente). Se dejó en agitación durante 15 min y se leyó en lector de ELISA a una longitud de onda de 540 nm. Se tomó como 100% de viabilidad la lectura de DO del control de células sin tratamiento, y se calculó el porcentaje de citotoxicidad e inhibición de citotoxicidad de las muestras estudiadas.

Se evaluó la capacidad de los extractos de origen vegetal y componentes de origen microbiano de producir daño citotóxico en células Vero. Se ensayaron 5 diluciones de las muestras en MEM suplementado. (Tablas 3, 4 y 5)

Tabla 3. Concentraciones de extractos de origen vegetal expresadas en mg de SD por ml, ensayados para evaluar citotoxicidad en células Vero.

<b>Solventes de extracción</b>	<b>Extractos <i>P. alba</i> (SD mg/ml)</b>	<b>Extractos <i>Z. mistol</i> (SD mg/ml)</b>
Alcohol	24,5 / 2,45	37,5 / 3,75
Acetona	12,3 / 1,23	15,1 / 1,51
Hexano	13,8 / 1,38	14,5 / 1,45
Agua destilada	194,6 / 19,4	119,0 / 11,9

Tabla 4. Concentraciones de péptidos catiónicos de origen microbiano expresadas en mg de proteína por ml, ensayados para evaluar citotoxicidad en células Vero.

Péptidos	pH 4-4,5 (mg/ml)	pH 6,5-7 (mg/ml)
Sobrenadante	2,50 / 0,30	2,50 / 0,30
Precipitado 40%	2,59 / 0,32	2,59 / 0,32
Precipitado 60%	2,45 / 0,35	2,45 / 0,35

Tabla 5. Concentraciones de EPSK de origen microbiano expresadas como Equivalentes de Glucosa por mg, ensayados para evaluar citotoxicidad en células Vero.

EPSK	pH 6,5-7 (EG/mg)
EPSKL	600 / 6
EPSKG	800 / 8

Ref.: EG Equivalentes de Glucosa

#### Determinación Concentración Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) para VT y Cicloheximida

Se evaluaron distintas concentraciones de VT y Cicloheximida (como control positivo de daño celular) a fin de determinar en ambas muestras la CC<sub>50</sub>, entendida como la concentración del compuesto de producir el 50% de daño citotóxico sobre la línea celular (Goldstein et al, 2007). Para esta determinación se siguió la metodología de Borenfreund y Puerner (1985) de cuantificación de viabilidad celular por medio de la absorción de colorante vital Rojo Neutro.

Tabla 6. Concentraciones de VT expresadas en mg de proteína por ml, y Cicloheximida expresadas en mg de droga por ml, ensayadas para determinar una CC<sub>50</sub> en células Vero.

MUESTRAS	pH 6,5-7 (mg/ml)
VT	0,018 / 0,000055
Cicloheximida	0,16 / 0,0012

## Ensayos de inhibición de citotoxicidad

La acción protectora de extractos vegetales y EPSK sobre citotoxicidad de VT sobre células Vero, se llevó a cabo mediante 3 ensayos de incubación siguiendo la metodología de Kim et al (2001):

**a.** Pre-incubación VT con extracto:

Consistió en la incubación durante 1 h a temperatura ambiente de 1CC<sub>50</sub> de VT con diferentes concentraciones no citotóxicas de extractos vegetales y EPSK. Se incubó durante 72 hs a 37 °C (5% de CO<sub>2</sub>) 100 µl de las muestras VT con extractos en monocapa confluyente de células Vero. La viabilidad celular se cuantificó mediante la técnica de captación de Rojo Neutro.

**b.** Pre-incubación extracto con células Vero:

Consistió en la incubación de 50 µl durante 1 h a temperatura ambiente de concentraciones no citotóxicas de extractos vegetales y EPSK sobre monocapa confluyente de células Vero. Se inoculó 50 µl de 1CC<sub>50</sub> de VT por pocillo y se incubó durante 72 hs a 37 °C (5% de CO<sub>2</sub>). La viabilidad celular se cuantificó mediante la técnica de captación de Rojo Neutro.

**c.** Co-incubación VT con extractos en células Vero:

Consistió en la incubación simultánea durante 72 hs a 37 °C (5% de CO<sub>2</sub>) de 100 µl de 1CC<sub>50</sub> de VT con diferentes concentraciones no citotóxicas de extractos vegetales y EPSK en monocapa confluyente de células Vero. La viabilidad celular se cuantificó mediante la técnica de captación de Rojo Neutro.

En todos los ensayos se realizaron los siguientes controles:

- Control de viabilidad celular: células Vero con MEM suplementado sin tratamiento.
- Control negativo de citotoxicidad: células Vero con sobrenadante de cultivo de 24 hs de incubación *E. coli* ATCC 25922 VT (-)
- Control Positivo de daño citotóxico: células vero con 1CC<sub>50</sub> de VT y Cicloheximida.

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se repitieron 3 veces.

## **Metodología Sección D: Inhibición in vitro de adhesión de *E. coli* O157:H7 sobre células Caco-2.**

Se determinó la capacidad de EPSK de origen microbiano de inhibir la adhesión de *E. coli* O157:H7 sobre línea celular eucariota. Se utilizó la técnica de turbidimetría, se cuantificó en espectrofotómetro y evaluó la adhesión mediante microscopia de fluorescencia (Todoriki et al, 2001).

### Medios y condiciones generales de cultivo de *E. coli*

Para realizar los ensayos se trabajó con cepas de referencia de *E. coli* O157:H7 EDL 933 *E. coli* ATCC 25922 como control negativo de patogenicidad. Las cepas fueron cultivadas en CTS estéril suplementado con 0,3% de extracto de levadura en estufa a 37 °C en condiciones aeróbicas durante 24 hs.

Para determinar la concentración inicial de *E. coli* utilizada en cada ensayo, el cultivo se centrifugó en centrífuga a temperatura ambiente a 13.000 rpm durante 15 min, se descartó el sobrenadante y el pellet se redisolvió en 30 ml de PBS estéril pH 7, se lavó y centrifugó al menos 2 veces para eliminar los metabolitos secundarios del desarrollo bacteriano y componentes del medio de cultivo. Se realizaron las diluciones correspondientes en PBS estéril y se cuantificó la turbidez por espectrofotometría a 620 nm. Las lecturas se compararon con la curva patrón y se expresan como ufc/ml.

### Cultivo de células Caco-2

Se utilizaron células eucariotas epiteliales de adenocarcinoma colorectal humano (Caco-2) provistas por el Departamento de Virología, Cultivo de tejidos del Instituto Malbrán, Buenos Aires, Argentina y mantenidas en el Instituto de Virología Dr. José María Vanella de la Facultad de Ciencias Médicas, UNC.

Las células Caco-2 en suspensión [ $2,5 \pm 0,6 \times 10^5$  células/ml] fueron cultivadas en placas de 24 pocillos durante 3 a 4 semanas hasta la confluencia, diferenciación y formación de pseudo-epitelio, en MEM suplementado con 10% de SFB, 1% de Gentamicina y 1% de piruvato a 37 °C en atmósfera controlada (5% CO<sub>2</sub>).

### Ensayos de adhesión de *E. coli* a células Caco-2

La monocapa de células Caco-2 de 3 semanas de incubación en placa de 24 pocillos, se lavó 3 veces con PBS estéril pH 7, descartando por pipeteo restos de medio de cultivo y metabolitos de crecimiento celular. La placa se colocó en agitación constante durante 30 min con 0,5 ml de una solución de buffer Hanks pH 7, se descartó el buffer y se inoculó 1 ml por pocillo de distintas concentraciones bacteriana [ $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  ufc/ml] a distintos pH. Se dejó en incubación a 4 °C, temperatura ambiente y 37 °C durante 30, 60, 90, 120, 180 y 240 minutos en agitación constante.

Se tomó 1 ml de cada pocillo y se leyó en espectrofotómetro a 620 nm antes de la hora. Las lecturas de DO se compararon con la curva de crecimiento de *E. coli* y se calculó el porcentaje de adhesión (Todoriki et al, 2001).

### Ensayos de inhibición de adhesión de *E. coli* a células Caco-2

Se estudiaron 3 concentraciones de EPSKL y EPSKG [1, 5 y 10 mg/ml] mediante 3 ensayos de incubación siguiendo la metodología de Kim et al (2008).

#### **a. Co-incubación EPSK con *E. coli*:**

Consistió en la incubación de *E. coli* con diferentes concentraciones no citotóxicas de EPSK en agitación constante a temperatura ambiente durante 30 min. Se incubó durante 1 h a 37 °C (5% de CO<sub>2</sub>) 1 ml de la muestra *E. coli* con EPSK en monocapa confluyente de células Caco-2. Se tomó 1 ml de cada pocillo y se leyó en espectrofotómetro a 620 nm antes de la hora. Las lecturas de DO se compararon con la curva de crecimiento bacteriano y se calculó el porcentaje de inhibición de adhesión tomando como 100% la adhesión de [ $6 \times 10^8$ ] de *E. coli*.

#### **b. Pre-incubación EPSK con células Caco-2:**

Consistió en la incubación de diferentes concentraciones no citotóxicas de EPSK en monocapa confluyente de células Caco-2 en agitación constante a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavó con PBS pH 7 y se incubó durante 1 hora a 37 °C (5% de CO<sub>2</sub>) 1 ml de *E. coli* [ $6 \times 10^8$ ]. Se tomó 1 ml de cada pocillo y se leyó en

espectrofotómetro a 620 nm antes de la hora. Las lecturas de DO se compararon con la curva de crecimiento bacteriano y se calculó el porcentaje de inhibición de adhesión tomando como 100% la adhesión de  $[6 \times 10^8]$  de *E. coli*.

c. Pos-incubación *E. coli* con células Caco-2:

Consistió en la incubación de *E. coli*  $[6 \times 10^8]$  en monocapa confluyente de células Caco-2 en agitación constante a temperatura ambiente durante 30 min. Se lavó con PBS pH 7 y se incubó durante 1 hora a 37 °C (5% de CO<sub>2</sub>) 1 ml de diferentes concentraciones no citotóxicas de EPSK. Se tomó 1 ml de cada pocillo y se leyó en espectrofotómetro a 620 nm antes de la hora. Las lecturas de DO se compararon con la curva de crecimiento bacteriano y se calculó el porcentaje de inhibición de adhesión tomando como 100% la adhesión de  $[6 \times 10^8]$  de *E. coli*.

En todos los ensayos se realizaron los siguientes controles:

- Control celular: células Caco-2 con MEM suplementado sin tratamiento.
- Control Positivo de adhesión: células Caco-2 con *E. coli*  $[6 \times 10^8]$ .

Todos los ensayos fueron realizados por triplicado y se repitieron 3 veces.

#### Evaluación microscópica de la adhesión de *E. coli* a células Caco-2

Además de cuantificar la adhesión e inhibición de la adhesión con distintas concentraciones de EPSK en los distintos períodos de incubación con *E. coli* EDL 933 y ATCC 25922, se evaluó por microscopia de fluorescencia las monocapas de células Caco-2 con *E. coli* y EPSK, siguiendo la metodología de Breusegem et al (2002). Se lavó cada pocillo 3 veces con PBS pH 7, se fijó con etanol 96° durante 15 min a temperatura ambiente para permitir la permeabilización de membranas, se extrajo el etanol y se lavó tres veces con PBS. Luego se añadió una dilución 1:10.000 de (2'-[4-ethoxyphenyl]-5-[4-methyl-1-piperazinyl]-2,5'-bi-1H-benzimidazole trihydrochloride trihydrate (reactivo Hoechst) en agua destilada para una concentración final es de 0,12 mg/ml. Se dejó incubar 15 min a temperatura ambiente y se enjuagó cinco veces con PBS. Las monocapas de células Caco-2 con *E. coli* se observaron y evaluaron por microscopía de fluorescencia a 465 nm.

## ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Los datos de todos los ensayos fueron sometidos a análisis de significación estadística mediante ANOVA. Se aplicó el test de Bonferroni como prueba de hipótesis nula de igualdad entre los promedios de las diferentes determinaciones con valor de  $p \leq 0,005$ , y análisis de Prueba T. En todos los análisis se utilizó el software estadístico InfoStat.



**CAPÍTULO 3**  
**RESULTADOS**

## Resultados Sección A: Obtención y caracterización de componentes potencialmente útiles.

### Obtención de extractos de origen vegetal

El procedimiento de maceración de harina de algarroba (*Prosopis alba*) y café de mistol (*Ziziphus mistol*) en los distintos solventes (alcohol, acetona, hexano y agua) y redisueltos en agua destilada y agua destilada/DMSO, permitió la extracción de sólidos disueltos (SD) expresados en mg/ml.

El análisis de los componentes obtenidos en los extractos de fruto de ambas especies arbóreas, indicó que el contenido de SD varía dependiendo del solvente de extracción utilizado. Por diferencia de densidad, los extractos acuosos mostraron mayor cantidad de SD por ml de extracto (*P. alba*  $194,6 \pm 0,95$  mg/ml y *Z. mistol*  $119,0 \pm 0,85$  mg/ml), seguido de los extractosalcohólicos (*P. alba*  $24,5 \pm 0,55$  mg/ml y *Z. mistol*  $37,5 \pm 0,23$  mg/ml), siendo ambos solventes más efectivos que las extracciones con acetona y hexano (Tabla 7).

Tabla 7. Contenido de SD de extractos vegetales según el solvente de extracción.

Solventes de extracción	Extractos <i>P. alba</i> (SD mg/ml) $\pm$ DE	Extractos <i>Z. mistol</i> (SD mg/ml) $\pm$ DE
Alcohol 96°	$24,5 \pm 0,55$	$37,5 \pm 0,23$
Acetona	$12,3 \pm 0,36$	$15,1 \pm 0,16$
Hexano	$13,8 \pm 0,21$	$14,5 \pm 0,35$
Agua destilada	$194,6 \pm 0,95$	$119,0 \pm 0,85$

Los SD obtenidos de cada extracto vegetal, fueron estudiados según el contenido de compuestos fenólicos. El estudio preliminar efectuado mediante marcha analítica fitoquímica, como método cualitativo de cambios de coloración en las muestras, indicó que los extractos alcohólicos y acuosos de *P. alba* y *Z. mistol* poseen: taninos, proantocianidinas, antocianinas y flavonoides aglicones y glicósidos.

La evaluación de compuestos fenólicos efectuado por espectrofotometría permitió determinar y cuantificar el contenido de polifenoles totales y flavonoides de los extractos vegetales, expresados como  $\mu\text{g}$  de equivalentes de ácido gálico (EAG) y  $\mu\text{g}$  de equivalentes de quercetina (EQ) por mg extractorespectivamente (Tabla 8).

Tabla 8. Contenido de polifenoles totales y flavonoides de extractos vegetales según el solvente de extracción.

Extractos vegetales	$\mu\text{g}$ EAG/mg extracto $\pm$ DE	$\mu\text{g}$ EQ/mg extracto $\pm$ DE
<i>P. alba</i> alcohólico	11,33 $\pm$ 0,29	1,07 $\pm$ 0,03
<i>P. alba</i> acetónico	5,91 $\pm$ 0,26	ND
<i>P. alba</i> hexánico	ND	ND
<i>P. alba</i> acuoso	7,82 $\pm$ 0,05	0,11 $\pm$ 0,005
<i>Z. mistol</i> alcohólico	20,71 $\pm$ 0,44	0,56 $\pm$ 0,02
<i>Z. mistol</i> acetónico	1,32 $\pm$ 0,31	ND
<i>Z. mistol</i> hexánico	ND	ND
<i>Z. mistol</i> acuoso	30,48 $\pm$ 0,41	0,12 $\pm$ 0,01

Ref.: EAG Equivalentes de Ácido Gálico, EQ Equivalentes de Quercetina, ND No Detectable.

Tal como se muestra en la tabla, el contenido de polifenoles totales fue mayor que el contenido de flavonoides en todas las muestras estudiadas, siendo los extractos de *Z. mistol* acuoso y alcohólico (30,48  $\pm$  0,41 y 20,71  $\pm$  0,44 respectivamente) los que presentaron mayor cantidad de polifenoles, seguido del extracto alcohólico de *P. alba* (11,33  $\pm$  0,29), que además presentó mayor contenido de flavonoides (1,07  $\pm$  0,03). Por esta técnica empleada no se detectó contenido de polifenoles y flavonoides en los extractos hexánicos, y flavonoides en los extractos acetónicos de ambos frutos.

La cromatografía por TLC y papel, confirmó en ambos productos vegetales la presencia de flavonoides aglicones, glicósidos, pero no sulfatados. Para flavonoides aglicones, los extractos de *P. alba* revelaron en cromatograma, 4 manchas (una grande y 3 más pequeñas y tenues) en el extracto alcohólico, 3 manchas en el acetónico, 1 mancha tenue en hexánico y 2 manchas muy tenues en el extracto acuoso. En los extractos de *Z. mistol*, el alcohol fue más efectivo para extraer flavonoides aglicones (3 manchas), la extracción fue muy similar con acetona (presentan igual perfil ambos

extractos, pero los acetónicos poseen menor intensidad). El extracto hexánico presentó 1 mancha tenue y el acuoso presentó 2 manchas. A excepción del extracto hexánico de *Z. mistol*, las manchas grandes encontradas en este fruto coincidieron con los estándares Quercetina y Luteolina (Fig. 1).

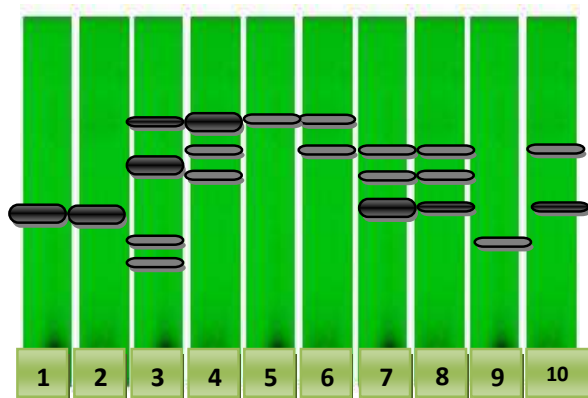


Fig. 1. Representación gráfica de Cromatografía en capa delgada (TLC) para flavonoides aglicones de extractos de *P. alba* y *Z. mistol*. **Ref.:**1. Testigo: Luteolina, 2. Testigo: Quercetina, 3. Extracto alcohólico de *P. alba*, 4. Extracto acetónico de *P. alba*, 5. Extracto hexánico de *P. alba*, 6. Extracto acuoso de *P. alba*, 7. Extracto alcohólico de *Z. mistol*, 8. Extracto acetónico de *Z. mistol*, 9. Extracto hexánico de *Z. mistol*, 10. Extracto acuoso de *Z. mistol*.

Al efectuarse la determinación de flavonoides glicósidos mediante TLC se observó que los extractos presentaron arrastre con la fase móvil utilizada (no se logró mejorar modificando las proporciones de solventes), sin embargo puede distinguirse la presencia de flavonoides glicósidos que coincidieron principalmente con el testigo Quercitrina, para el caso de los extractos de algarroba. Los extractos de mistol no presentaron manchas visibles (Fig. 2).

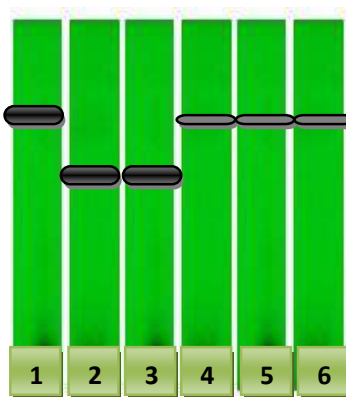


Fig. 2. Representación gráfica de Cromatografía en capa delgada (TLC) para flavonoides glicósidos de extractos de *P. alba*. **Ref.:**1. Testigo: Quercitrina, 2. Testigo: Vitexina, 3. Testigo: Isovitexina, 4. Extracto alcohólico de *P. alba*, 5. Extracto acetónico de *P. alba*, 6. Extracto acuoso de *P. alba*.

Se constató además, la presencia de compuestos mas solubles (taninos) que quedaron en el lugar de siembra aun con diversos solventes utilizados, por lo que se efectuó un ensayo para determinar metabolitos secundarios con solventes mas polares que logren separar los diferentes grupos funcionales (Fig. 3).

El cromatograma reveló manchas para los extractos alcohólicos y acetónicos tanto de *P. alba* como en *Z. mistol*, observándose que se obtuvo mayor cantidad de metabolitos en las extracciones alcohólicas.

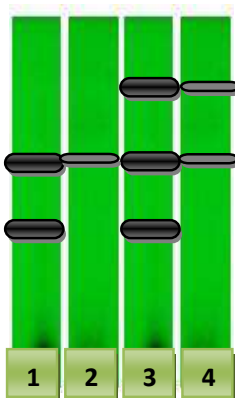


Fig. 3. Representación gráfica de Cromatografía en capa delgada (TLC) para taninos de extractos de *P. alba* y *Z. mistol*. **Ref.:**1. Extracto alcohólico de *P. alba*, 2. Extracto acetónico de *P. alba*, 3. Extracto alcohólico de *Z. mistol*, 4. Extracto acetónico de *Z. mistol*.

### Obtención de componentes de origen microbiano

Del procesamiento de leche fermentada con granos de kéfir se obtuvieron péptidos catiónicos de sobrenadante y por precipitación salina con concentraciones de 40% y 60% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ , y Exopolisacáridos (EPSK) por precipitación alcohólica de granos y sobrenadante de leche kéfirada.

#### a. Péptidos catiónicos

El contenido proteico de péptidos catiónicos fue determinado y cuantificado por método colorimétrico de Lowry por espectrofotometría. A partir de la curva de calibración estándar con albúmina bovina como proteína patrón (Fig. 4), se compararon las lecturas obtenidas de las muestras y se calculó el contenido proteico mediante la siguiente ecuación:  $x = (y + 0,0075) / 0,8304$   $R^2 = 0,9998$ . Los resultados son expresados como mg de proteína/ml de muestra (Tabla 9).

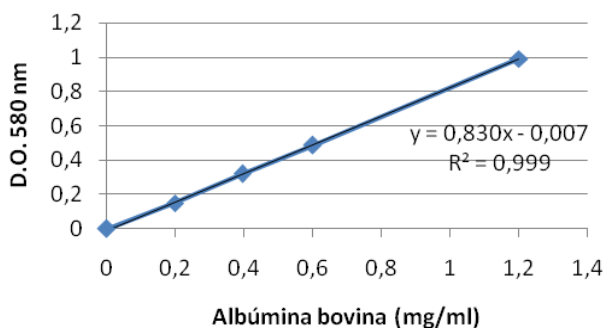


Fig. 4. Curva de calibración con albúmina bovina.

Tabla 9. Contenido proteico de péptidos catiónicos obtenidos de leche kefirada.

Péptidos catiónicos	mg/ml ± DE
Péptidos de sobrenadante	2,50 ± 0,03
Péptidos precipitados 40%	2,59 ± 0,04
Péptidos precipitados 60%	2,45 ± 0,03

Según los resultados de la tabla, el contenido de péptidos catiónicos obtenido no varía significativamente teniendo en cuenta el procedimiento de extracción. Por ml de muestra, el sobrenadante de leche kefirada contiene  $2,50 \pm 0,03$  mg de proteínas, y los precipitados con sulfato de amonio al 40% y 60% de saturación, mostraron concentraciones proteicas similares ( $2,59 \pm 0,04$ ,  $2,45 \pm 0,03$  respectivamente).

#### b. EPSK

El contenido de EPSK fue determinado y cuantificado por método colorimétrico fenol-sulfúrico de Dubois por espectrofotometría. A partir de la curva de calibración estándar con glucosa como carbohidrato patrón (Fig. 5), se compararon las lecturas obtenidas de las muestras y se calculó el contenido de EPSK mediante la siguiente ecuación  $x = (y - 0,0150) / 0,0402$   $R^2 = 0,9991$ . Los resultados son expresados como  $\mu\text{g}$  de Equivalentes de glucosa/mg de muestra (Tabla 10).

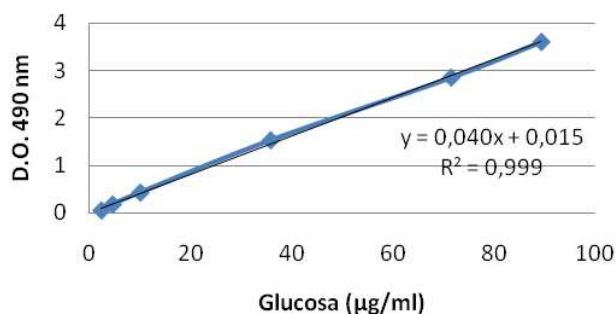


Fig. 5. Curva de calibración con glucosa.

Tabla 10. Contenido de Equivalentes de glucosa de EPSK obtenidos de leche kefirada.

EPSK	$\mu\text{g EG/mg}$ ± DE
EPSKL	60,0 ± 0,01
EPSKG	80,0 ± 0,03

Ref.: EG Equivalentes de Glucosa

En cuanto a la obtención de exopolisacáridos, el contenido si dependió del proceso de extracción utilizado. Se obtuvo una mayor proporción de los mismos por precipitación alcohólica de los granos de kéfir (EPSKG), en comparación con el contenido de EPS libres presentes en el sobrenadante de leche kefirada (EPSKL).

Evaluación de citotoxicidad de extractos vegetales y componentes de origen microbiano

Los extractos vegetales y componentes microbianos obtenidos fueron sometidos a evaluación de citotoxicidad sobre células eucariotas. Para esta determinación, se incubó sobre monocapa confluyente de células Vero distintas concentraciones de las muestras y se cuantificó la viabilidad celular por la técnica de captación de Rojo Neutro. En la Tabla 11 se detallan las concentraciones de extractos vegetales, EPSK y péptidos catiónicos que no presentaron daño citotóxico sobre células Vero.

Tabla 11. Concentraciones no citotóxicas de extractos de origen vegetal y componentes de origen microbiano.

<b>Extractos de origen vegetal</b>	<b>Concentración no citotóxica</b>
<i>P. alba</i> alcohólico	2,44 mg/ml
<i>P. alba</i> acetónico	3,07 mg/ml
<i>P. alba</i> hexánico	3,45 mg/ml
<i>P. alba</i> acuoso	19,46 mg/ml
<i>Z. mistol</i> alcohólico	3,75 mg/ml
<i>Z. mistol</i> acetónico	3,77 mg/ml
<i>Z. mistol</i> hexánico	3,62 mg/ml
<i>Z. mistol</i> acuoso	11,90 mg/ml
<b>Componentes de origen microbiano</b>	<b>Concentración no citotóxica</b>
EPSKL	600 µg EG/mg
EPSKG	800 µg EG/mg
Péptidos catiónicos de sobren.	2 mg/ml
Péptidos catiónicos precip. 40%	2 mg/ml
Péptidos catiónicos precip. 60%	2 mg/ml

A partir de estos valores obtenidos de extractos vegetales y componentes microbianos, se realizaron los ensayos contra *E. coli* O157:H7 y VT, asegurando que estas concentraciones no producen toxicidad sobre línea celular eucariota.

## Resultados Sección B: Actividad antimicrobiana in vitro contra *E. coli* O157:H7.

### Determinación de la curva patrón de crecimiento de *E. coli*

Se determinaron las curvas patrón de crecimiento de las cepas utilizando la técnica de dilución seriada en tubo y recuento de colonias en placa, cuantificando la turbidez de las diluciones por espectrofotometría a 620 nm (Fig. 6 y 7). A partir de estos resultados, se calcularon las ufc/ml para cada nuevo cultivo bacteriano.

#### *E. coli* EDL 933

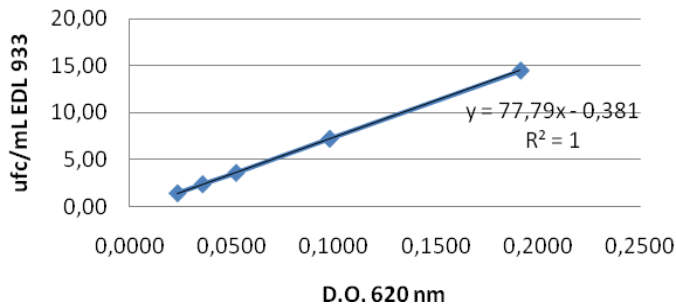


Fig. 6. Curva patrón de crecimiento de *E. coli* EDL 933

#### *E. coli* ATCC 25922

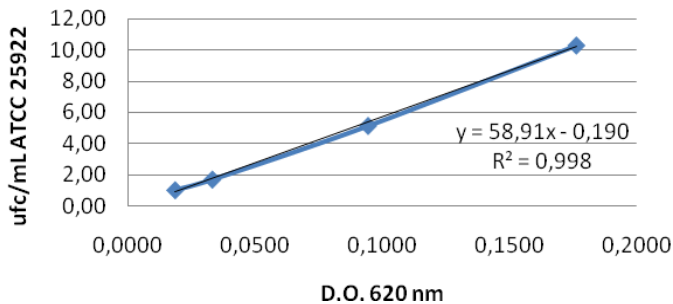


Fig. 7. Curva patrón de crecimiento de *E. coli* ATCC 25922



## Actividad antimicrobiana in vitro

La actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 fue evaluada mediante tres métodos in vitro. Se determinó la capacidad antimicrobiana tanto de extractos de origen vegetal en los diferentes solventes de extracción, como de péptidos catiónicos de origen microbiano de sobrenadante y precipitados con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  a diferentes pH. Todas las muestras se ensayaron en tres concentraciones no citotóxicas para línea celular eucariota.

### a. Difusión en agar

Por el método de difusión en agar, los extractos vegetales en las distintas concentraciones, no tuvieron efecto positivo sobre la actividad antimicrobiana de la cepa bacteriana en estudio, ya que no se visualizó halos de inhibición alrededor de las muestras. Se observa en las fotografías el efecto antimicrobiano de los antibióticos utilizados como control positivo de actividad, con un halo de inhibición de 3 mm de diámetro para Ciprofloxacina y 2,5 mm para sulfato de Polimixina (Fig. 8).

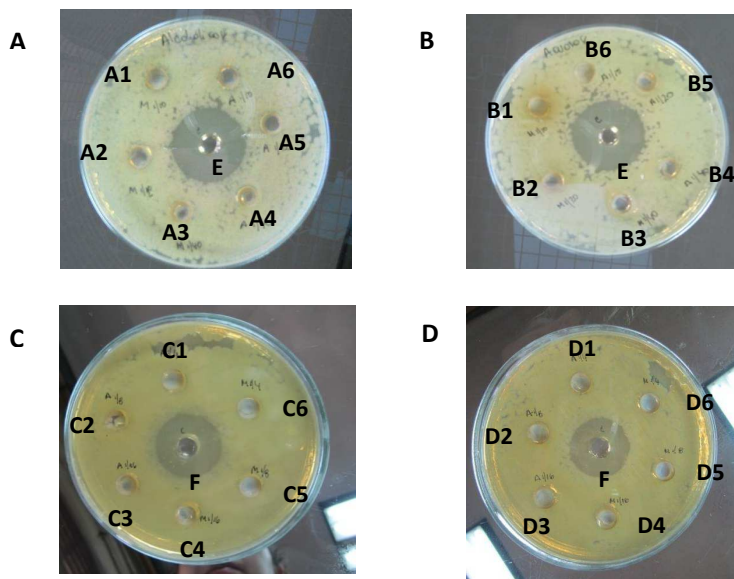


Fig. 8. Método de Difusión en agar representativo con extractos vegetales. **Ref.:** **A.** Extractos alcohólicos de *P. alba* (**A1.** 2,44 mg/ml, **A2.** 1,22 mg/ml, **A3.** 0,61 mg/ml) y *Z. mistol* (**A4.** 3,75 mg/ml, **A5.** 1,88 mg/ml, **A6.** 0,94 mg/ml) **B.** Extractos acuosos de *P. alba* (**B1.** 19,46 mg/ml, **B2.** 9,73 mg/ml, **B3.** 4,87 mg/ml) y *Z. mistol* (**B4.** 11,90 mg/ml, **B5.** 5,95 mg/ml, **B6.** 2,98 mg/ml) **C.** Extractos acetónicos de *P. alba* (**C1.** 3,07 mg/ml, **C2.** 1,53 mg/ml, **C3.** 0,76 mg/ml) y *Z. mistol* (**C4.** 3,77 mg/ml, **C5.** 1,88 mg/ml, **C6.** 0,94 mg/ml) **D.** Extractos hexánicos de *P. alba* (**D1.** 3,45 mg/ml, **D2.** 1,72 mg/ml, **D3.** 0,86 mg/ml) y *Z. mistol* (**D4.** 3,62 mg/ml, **D5.** 1,81 mg/ml, **D6.** 0,90 mg/ml) **E.** Control Ciprofloxacina [1  $\mu\text{g/ml}$ ], **F.** Control sulfato de Polimixina [100  $\mu\text{g/ml}$ ].

En cuanto a los péptidos catiónicos obtenidos de sobrenadante de leche kefirada y precipitados al 40% y 60% de saturación, en las distintas concentraciones y pH, no se visualizaron halos de inhibición alrededor de las muestras, por lo que no mostraron efecto antimicrobiano contra *E. coli* O157:H7 por el método de difusión en agar. Se observa en las fotografías el efecto antimicrobiano de los antibióticos utilizados como control positivo de actividad, con halos de inhibición de 3 mm de diámetro para Ciprofloxacina y 2,5 mm para sulfato de Polimixina (Fig. 9).

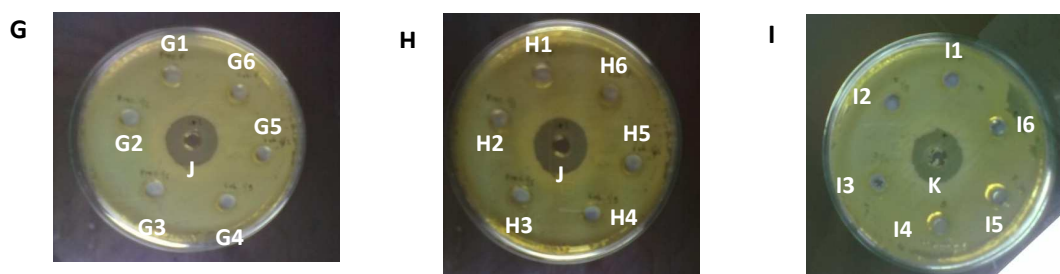


Fig. 9. Método de Difusión en agar representativo con péptidos catiónicos de origen microbiano. **Ref.: G.** Péptidos catiónicos de sobrenadante pH 4-4,5 (**G1.** 1,50 mg/ml, **G2.** 0,75 mg/ml, **G3.** 0,30 mg/ml) y sobrenadante pH 6,5-7 (**G4.** 1,50 mg/ml, **G5.** 0,75 mg/ml, **G6.** 0,30 mg/ml) **H.** Péptidos catiónicos precipitados 40% pH 4-4,5 (**H1.** 1,60 mg/ml, **H2.** 0,80 mg/ml, **H3.** 0,32 mg/ml) y precipitados 40% pH 6,5-7 (**H4.** 1,60 mg/ml, **H5.** 0,80 mg/ml, **H6.** 0,32 mg/ml) **I.** Péptidos catiónicos precipitados 60% pH 4-4,5 (**I1.** 1,70 mg/ml, **I2.** 0,85 mg/ml, **I3.** 0,35 mg/ml) y precipitados 60% pH 6,5-7 (**I4.** 1,70 mg/ml, **I5.** 0,85 mg/ml, **I6.** 0,35 mg/ml) **J.** Control Ciprofloxacina [1 µg/ml], **K.** Control sulfato de Polimixina [100 µg/ml].

#### b. Concentración Inhibitoria Mínima (CIM)

La actividad antimicrobiana se evaluó por observación visual directa de turbidez en los tubos. El valor CIM se determinó como la concentración en mg/ml de muestra que no presenta turbidez visible.

##### b.1 CIM extractos de origen vegetal

Para los extractos vegetales de *P. alba* y *Z. mistol* en los distintos solventes y concentraciones ensayadas, no se observó diferencia de turbidez entre el tubo control de crecimiento de *E. coli* EDL 933 y los tubos de cada extracto, tal como muestra en las figuras 10 y 11. Por lo tanto, por este método, los extractos no presentaron actividad antimicrobiana contra la cepa bacteriana en estudio.

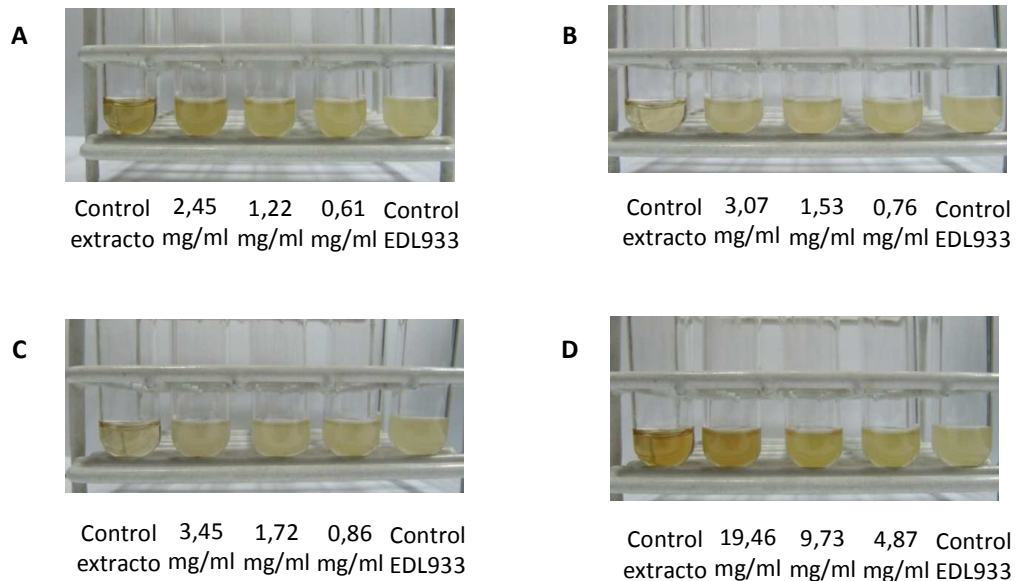


Fig. 10. Método CIM representativo con extractos vegetales *P. alba*. Ref.: **A.** Extracto alcohólico, **B.** Extracto acetónico, **C.** Extracto hexánico, **D.** Extracto acuoso.

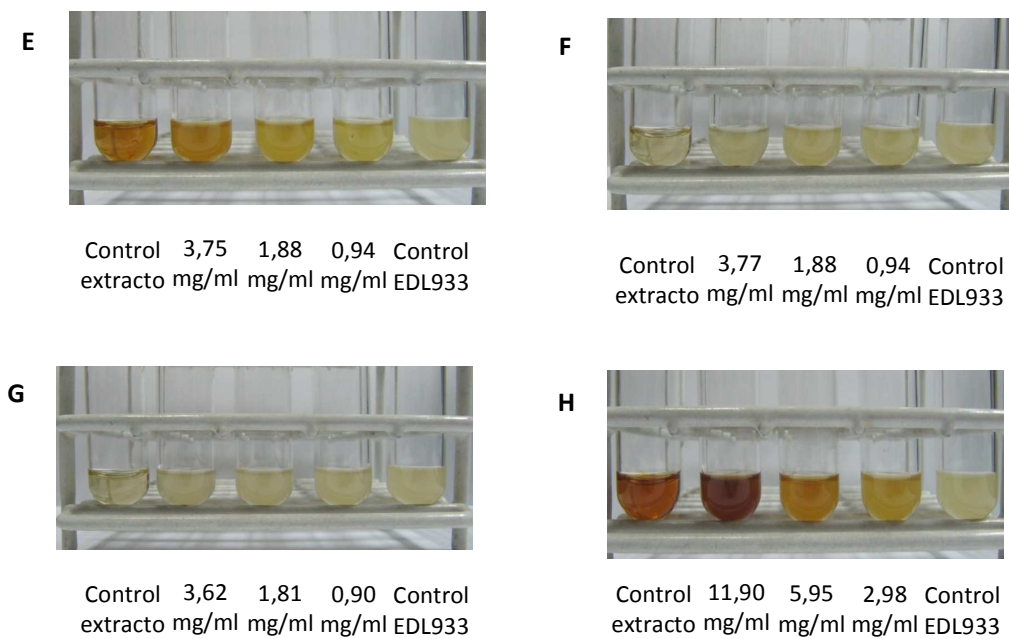


Fig. 11. Método CIM representativo con extractos vegetales *Z. mistol*. Ref.: **E.** Extracto alcohólico, **F.** Extracto acetónico, **G.** Extracto hexánico, **H.** Extracto acuoso.

## b.2. CIM componentes de origen microbiano

En cuanto a componentes obtenidos de origen microbiano, se estableció una CIM de 1,5 mg/ml para péptidos catiónicos de sobrenadante de leche kefirada a pH 4-4,5, (Fig. 12 A). Al modificar el pH a 6,5-7, no se observó diferencia de turbidez entre el tubo control de crecimiento de la bacteria y los tubos con las muestras, por lo que a este pH los péptidos no presentaron actividad antimicrobiana (Fig. 12 B). Los péptidos precipitados al 40% y 60% de saturación con sulfato de amonio a pH 6,5-7 no presentaron actividad antimicrobiana por este método (Fig. 12 C y D respectivamente). Sin embargo al acidificarse el medio a 4-4,5, se estableció una CIM de 1,6 mg/ml para péptidos precipitados al 40% (Fig. 12 E) y 1,7 mg/ml para péptidos al precipitados al 60% (Fig. 12 F).

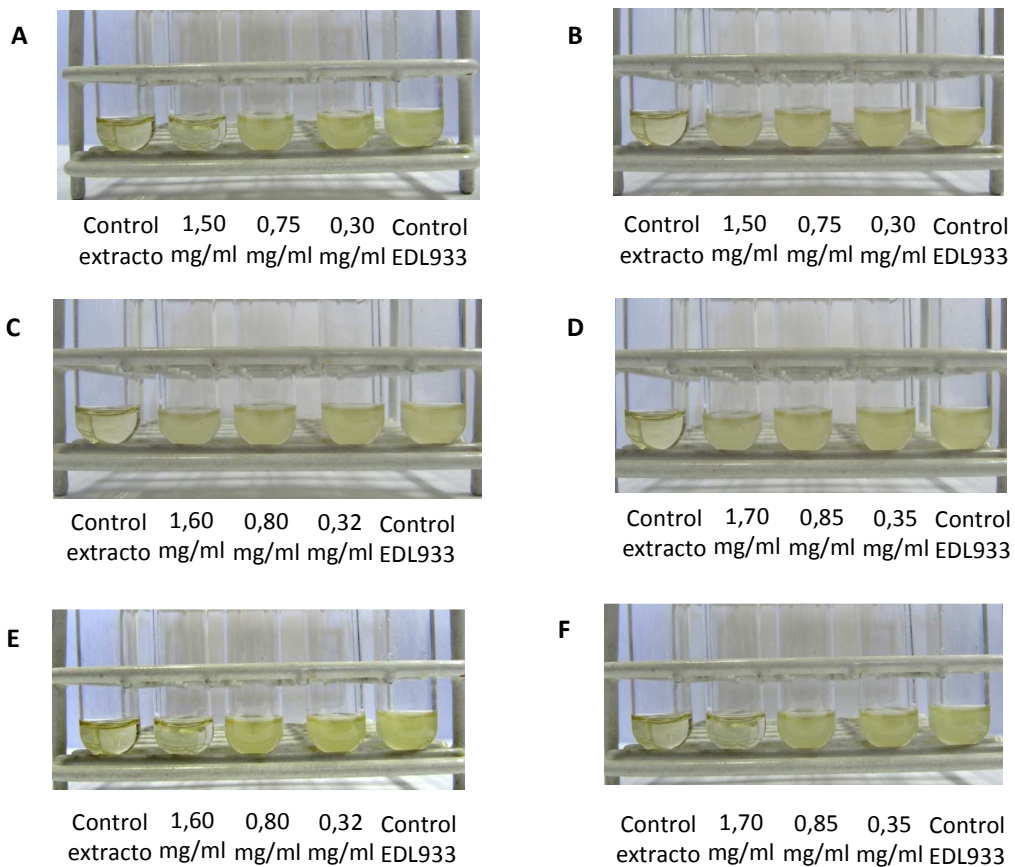


Fig. 12. Método CIM representativo con componentes de origen microbiano. **Ref.:** **A.** Péptidos catiónicos de sobrenadante pH 4-4,5, **B.** Péptidos catiónicos de sobrenadante pH 6,5-7, **C.** Péptidos catiónicos precipitados al 40% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 6,5-7, **D.** Péptidos catiónicos precipitados al 60% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 6,5-7, **E.** Péptidos catiónicos precipitados al 40% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 4-4,5, **F.** Péptidos catiónicos precipitados al 60% de saturación con  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$  pH 4-4,5.

### c. Turbidimetría

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos por los métodos de difusión en agar y CIM, se evaluó la actividad antimicrobiana por el método de turbidimetría en espectrofotómetro a 620 nm.

#### c.1. Turbidimetría con extractos de origen vegetal

Por este método de medición de actividad antimicrobiana, se determinó que altas concentraciones de extractos vegetales inhibieron el crecimiento de *E. coli* EDL 933 dependiendo del solvente de extracción. Teniendo en cuenta los valores de mediciones de la turbidez expresados como DO (Tabla 12), los extractos que presentaron actividad antimicrobiana estadísticamente significativa con valor de  $p \leq 0,05$ , fueron: extracto alcohólico de *P. alba*, en la concentración de 2,45 mg/ml, inhibiendo un 25% el crecimiento de la bacteria y el extracto acuoso de *Z. mistol* en la concentración de 11,90 mg/ml tuvo un 22% de inhibición, mientras que su extracto alcohólico a 3,75 mg/ml inhibió un 21%. Los extractos acetónicos y hexánicos de ambos frutos, si bien mostraron un porcentaje de inhibición, no resultaron estadísticamente significativos.

Tabla 12. Inhibición de crecimiento de *E. coli* EDL 933 con extractos de origen vegetal.

MUESTRA	DO a 620 nm ±DE	ufc/ml	% de Inhibición
<i>P. alba</i> alcohólico 2,45 mg/ml	0,1096 ± 0,0027	7,6x10 <sup>8</sup>	25 <sup>(*)</sup>
<i>P. alba</i> acetónico 3,075 mg/ml	0,1191 ± 0,0073	8,3x10 <sup>8</sup>	18
<i>P. alba</i> hexánico 3,45 mg/ml	0,1297 ± 0,0185	9,0x10 <sup>8</sup>	11
<i>P. alba</i> acuoso 19,46 mg/ml	0,1197 ± 0,0011	8,3x10 <sup>8</sup>	18
<i>Z. mistol</i> alcohólico 3,75 mg/ml	0,1158 ± 0,0061	8,0x10 <sup>8</sup>	21 <sup>(*)</sup>
<i>Z. mistol</i> acetónico 3,77 mg/ml	0,1182 ± 0,0035	8,2x10 <sup>8</sup>	19
<i>Z. mistol</i> hexánico 3,62 mg/ml	0,1292 ± 0,0012	9,0x10 <sup>8</sup>	12
<i>Z. mistol</i> acuoso 11,90 mg/ml	0,1135 ± 0,0017	7,9x10 <sup>8</sup>	22 <sup>(*)</sup>
<i>E. coli</i> EDL 933 [5x10 <sup>5</sup> ]	0,1460 ± 0,0007	1,0x10 <sup>9</sup>	-
Ciprofloxacina [1µg/ml]	0,0027 ± 0,0002	-	100

(\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

## c.2. Turbidimetría con componentes de origen microbiano

### c.2.1. Componentes obtenidos de leche kefirada

De la comparación de las lecturas de DO entre las muestras ensayadas con respecto al tubo control de crecimiento de *E. coli* tomado como 100%, se puede demostrar que los péptidos catiónicos de leche kefirada tienen efecto antimicrobiano contra la bacteria en estudio (Tabla 13).

Los péptidos catiónicos de sobrenadante de leche kefirada a pH 4-4,5 presentaron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* en las 3 concentraciones ensayadas, con 96, 90 y 41% de actividad antimicrobiana a concentraciones de 1,5, 0,75 y 0,32 mg/ml, respectivamente. Sin embargo, al agregarse una solución alcalina al sobrenadante de pH 4-4,5 para obtener un pH de 6,5-7, se observó que este porcentaje de inhibición disminuye, siendo solo del 38% a una concentración de 1,5 mg/ml (Fig. 13).

Los péptidos precipitados con sulfato de amonio al 40% presentaron actividad antimicrobiana del 73 y 37% a una concentración de 1,6 y 0,8 mg/ml, respectivamente, mientras que al 60% de saturación solo se obtuvo un 22% de disminución de DO a una concentración proteica de 1,7 mg/ml. Se observó que al agregarse una solución de ácido láctico equivalente a 11 °D, el porcentaje de inhibición aumentó considerablemente en los péptidos obtenidos por precipitación salina. Al comparar los porcentajes de inhibición de crecimiento de la bacteria se determinó que los péptidos precipitados al 40% y 60% de saturación a pH 4-4,5, alcanzaron un 93% y 96% de actividad antimicrobiana respectivamente (Fig. 13).

Teniendo en cuenta estos resultados, se evaluó el posible efecto del ácido láctico en la inhibición del crecimiento de *E. coli*, incubando con la cepa bacteriana durante 24 hs una solución de este compuesto equivalente a 11 °D. Según las DO obtenidas se observó que el ácido láctico inhibe entre un 73 y 78% el crecimiento de *E. coli*, por lo tanto, la actividad antimicrobiana encontrada está mediada no solo por los péptidos catiónicos sino también por el contenido de ácido láctico, ambos presentes en la leche fermentada con granos de kéfir (Fig. 13).

Tabla 13. Inhibición de crecimiento de *E. coli* EDL 933 con péptidos catiónicos de leche kefirada.

Muestras	D.O. a 620 nm ±DE	ufc/ml	% de Inhibición
<b>Péptidos de sobren. a pH 4-4,5</b>			
1,5 mg/ml	0,0051 ± 0,0021	-	96 <sup>(*)</sup>
0,75 mg/ml	0,0135 ± 0,0017	-	90 <sup>(*)</sup>
0,30 mg/ml	0,0788 ± 0,0036	5,5x10 <sup>8</sup>	41 <sup>(*)</sup>
<b>Péptidos de sobren. a pH 6,5-7</b>			
1,5 mg/ml	0,0823 ± 0,0084	5,7 x10 <sup>8</sup>	38 <sup>(*)</sup>
0,75 mg/ml	0,1125 ± 0,0045	7,8 x10 <sup>8</sup>	16
0,30 mg/ml	0,1282 ± 0,0041	8,9 x10 <sup>8</sup>	4
<b>Péptidos precip. 40% pH 6,5-7</b>			
1,6 mg/ml	0,0354 ± 0,0075	2,4 x10 <sup>8</sup>	73 <sup>(*)</sup>
0,8 mg/ml	0,0836 ± 0,0025	5,8 x10 <sup>8</sup>	37 <sup>(*)</sup>
0,32 mg/ml	0,1235 ± 0,0056	8,6 x10 <sup>8</sup>	7
<b>Péptidos precip. 60% pH 6,5-7</b>			
1,7 mg/ml	0,1046 ± 0,0042	7,3 x10 <sup>8</sup>	22 <sup>(*)</sup>
0,85 mg/ml	0,1212 ± 0,0053	8,4 x10 <sup>8</sup>	9
0,35 mg/ml	0,1318 ± 0,0058	9,2 x10 <sup>8</sup>	1
<b>Péptidos precip. 40% pH 4-4,5</b>			
1,6 mg/ml	0,0095 ± 0,0011	-	93 <sup>(*)</sup>
0,8 mg/ml	0,0335 ± 0,0005	2,3 x10 <sup>8</sup>	75 <sup>(*)</sup>
0,32 mg/ml	0,0697 ± 0,0014	4,8 x10 <sup>8</sup>	48 <sup>(*)</sup>
<b>Péptidos precip. 60% pH 4-4,5</b>			
1,7 mg/ml	0,0059 ± 0,0019	-	96 <sup>(*)</sup>
0,85 mg/ml	0,0468 ± 0,0022	3,2 x10 <sup>8</sup>	65 <sup>(*)</sup>
0,35 mg/ml	0,0721 ± 0,0021	5,0 x10 <sup>8</sup>	46 <sup>(*)</sup>
<i>E. coli</i> EDL 933 [5x10 <sup>5</sup> ]	0,1334 ± 0,0097	9,3 x10 <sup>8</sup>	-
Ciprofloxacina [1µg/ml]	0,0024 ± 0,0005	-	98 <sup>(*)</sup>

<sup>(\*)</sup> Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

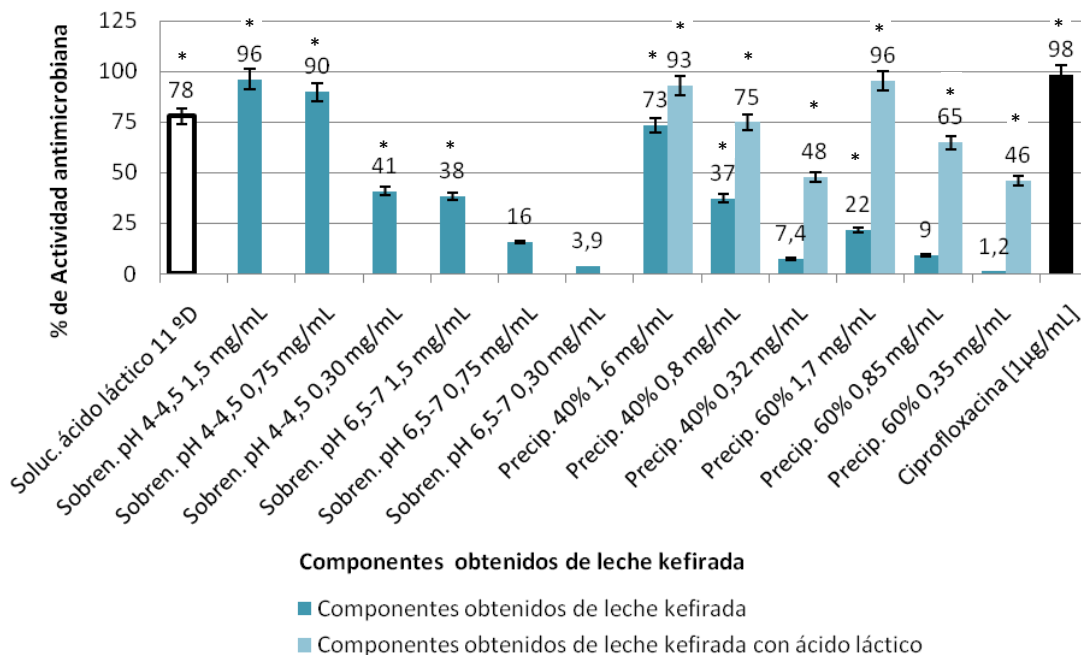


Fig. 13. Actividad antimicrobiana contra *E. coli* EDL 933 con péptidos catiónicos obtenidos de leche kefirada. Ref.: Barras azules: péptidos catiónicos de leche kefirada, Barras celestes: péptidos catiónicos de leche kefirada con ácido láctico, Barra blanca: control con solución de ácido láctico 11 °D, Barra negra: control Ciprofloxacina 1µg/ml. (\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

### c.2.2. Componentes obtenidos de leche entera comercial

Para comparar la acción antimicrobiana de péptidos catiónicos obtenidos de leche kefirada, se realizó el mismo procedimiento de obtención de los péptidos en leche entera comercial (sin fermentación con granos de kéfir) y se ensayaron contra *E. coli* EDL 933, evaluando de esta manera el posible efecto que pueden tener compuestos que provienen naturalmente de la leche comercial.

Según las DO de las muestras, los péptidos obtenidos de sobrenadante de leche comercial inhibieron el crecimiento de *E. coli* en un porcentaje similar a los péptidos de leche kefirada a pH 4-4,5; sin embargo, al alcalinizarse el sobrenadante no se observa el efecto antimicrobiano (Tabla 14).

Los péptidos precipitados al 40% de saturación presentaron una inhibición del 32% a una concentración de 1,5 mg/ml, mientras que al 60% de saturación no presentaron actividad antimicrobiana en ninguna de las concentraciones ensayadas. Se observó que al agregarse una solución de ácido láctico, este porcentaje de inhibición de crecimiento



de la bacteria aumentó considerablemente, reforzando los resultados obtenidos con péptidos de leche kefirada (Fig. 14).

En base a estos resultados, los péptidos catiónicos provenientes naturalmente de leche entera comercial tienen efecto antimicrobiano contra la bacteria en estudio, pero por la actividad de cepas probióticas en leche fermentada con granos de kéfir, se obtienen péptidos catiónicos y ácido láctico que aumentan esta actividad antimicrobiana contra *E. coli* EDL 933.

Tabla 14. Inhibición de crecimiento de *E. coli* EDL 933 con péptidos catiónicos de leche entera comercial.

Muestras	D.O. a 620 nm ±DE	ufc/ml	% de Inhibición
<b>Péptidos de sobren. a pH 4-4,5</b>			
1,8 mg/ml	0,0081 ± 0,0021	-	93 (*)
0,90 mg/ml	0,0156 ± 0,0017	1,0x10 <sup>8</sup>	87 (*)
0,36 mg/ml	0,0828 ± 0,0036	5,7 x10 <sup>8</sup>	30 (*)
<b>Péptidos de sobren. a pH 6,5-7</b>			
1,8 mg/ml	0,1171 ± 0,0084	8,1 x10 <sup>8</sup>	0,7
0,90 mg/ml	0,1147 ± 0,0045	7,9 x10 <sup>8</sup>	2,6
0,36 mg/ml	0,1185 ± 0,0041	8,2 x10 <sup>8</sup>	0,0
<b>Péptidos precip. 40% pH 6,5-7</b>			
1,5 mg/ml	0,0799 ± 0,0075	5,5 x10 <sup>8</sup>	32 (*)
0,75 mg/ml	0,1040 ± 0,0025	7,2 x10 <sup>8</sup>	12
0,30 mg/ml	0,1173 ± 0,0056	8,1 x10 <sup>8</sup>	0,3
<b>Péptidos precip. 60% pH 6,5-7</b>			
1,6 mg/ml	0,1034 ± 0,0042	7,1 x10 <sup>8</sup>	12,6
0,80 mg/ml	0,1185 ± 0,0053	8,2 x10 <sup>8</sup>	0,0
0,32 mg/ml	0,1179 ± 0,0058	8,1 x10 <sup>8</sup>	0,1
<b>Péptidos precip. 40% pH 4-4,5</b>			
1,5 mg/ml	0,0092 ± 0,0011	-	92 (*)
0,75 mg/ml	0,0241 ± 0,0005	1,6 x10 <sup>8</sup>	79 (*)
0,30 mg/ml	0,0763 ± 0,0014	5,3 x10 <sup>8</sup>	35 (*)
<b>Péptidos precip. 60% pH 4-4,5</b>			
1,6 mg/ml	0,0112 ± 0,0019	-	90 (*)
0,80 mg/ml	0,0219 ± 0,0022	1,5 x10 <sup>8</sup>	81 (*)
0,32 mg/ml	0,0749 ± 0,0021	5,2 x10 <sup>8</sup>	36 (*)
<i>E. coli</i> EDL 933 [5x10 <sup>5</sup> ]	0,1173 ± 0,0097	8,1 x10 <sup>8</sup>	
Ciprofloxacina [1µg/ml]	0,0036 ± 0,0025		

(\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

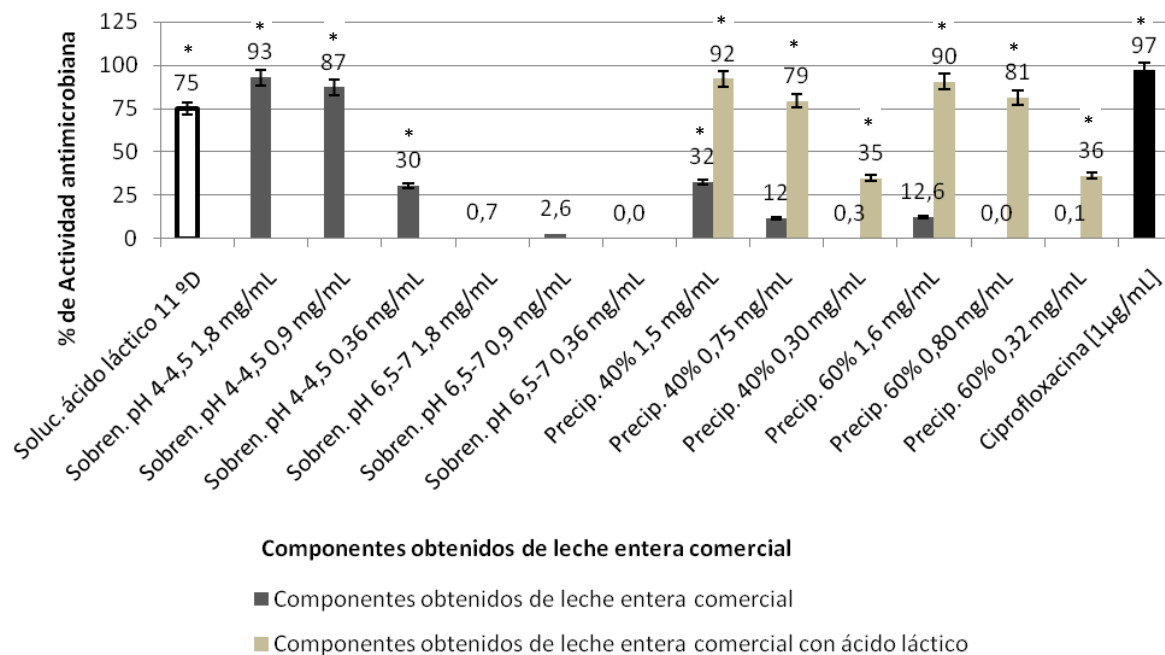


Fig. 14. Actividad antimicrobiana contra *E. coli* EDL 933 con péptidos catiónicos obtenidos de leche entera comercial. **Ref.:** Barras grises: péptidos catiónicos de leche entera comercial, Barras marrones: péptidos catiónicos de leche entera comercial con ácido láctico, Barra blanca: control con solución de ácido láctico 11 °D, Barra negra: control Ciprofloxacina 1µg/ml. (\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

### Resultados Sección C: Inhibición in vitro de citotoxicidad de Verotoxina (VT) de *E. coli* O157:H7 sobre células Vero.

La capacidad de extractos de origen vegetal y componentes de origen microbiano de inhibir la citotoxicidad de VT de *E. coli* EDL 933, fue evaluada sobre células eucariotas epiteliales de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*, Vero 76 ATCC CRL-587) sensibles a la acción de la toxina por presentar a nivel de membrana receptores específicos para la misma (Gb<sub>3</sub> y Gb<sub>4</sub>). El daño citotóxico se cuantificó por la técnica de captación de colorante vital Rojo Neutro.

#### Obtención y purificación de VT de *E. coli* EDL 933

Se evaluaron distintos medios de cultivo para el crecimiento de *E. coli* (caldo cerebro corazón, caldo Mueller Hinton, CTSy componentes de CTS suplementado con aminoácidos) y se determinaron las condiciones de incubación que permitieran

obtener VT (tiempos y temperaturas de incubación). Se decidió trabajar con CTS suplementado con 0,3% de extracto de levadura, 48 hs de incubación en estufa a 37 °C y en condiciones de aerobiosis. En cada obtención se cuantificó el contenido de VT por la técnica colorimétrica de Lowry con Folin Ciocalteu, obteniéndose concentraciones entre 0,25 y 5,5 mg/ml de toxina. La presencia de VT en los purificados obtenidos del precipitado con solución salina del sobrenadante de cultivo de la bacteria se confirmó por cromatografía de afinidad utilizando una columna con Gb<sub>3</sub> y se determinó además mediante inmunoensayo óptico (Shiga toxina biostart kit) por reacción antígeno-anticuerpo y observación directa del halo de color azul que indicó la presencia de VT 1 y 2 de *E. coli* O157:H7 (Fig. 15).

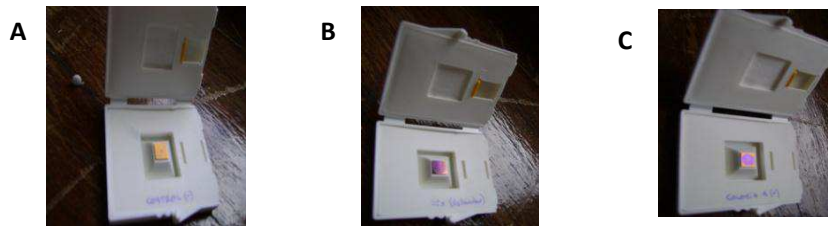


Fig. 15. Resultado de reacción antígeno-anticuerpo en kit comercial (BioStar OIA Shigatoxin). **Ref.:** **A.** Control negativo, **B.** Control positivo con estándar de VT 1 y 2, **C.** VT purificada de cultivo de *E. coli* EDL 933.

### Determinación Concentración Citotóxica 50% (CC<sub>50</sub>) para VT y Cicloheximida

De acuerdo a la evaluación y cuantificación de viabilidad celular mediante captación de colorante vital rojo neutro, se estableció una 1CC<sub>50</sub> de 3,9 µg/ml para VT (Fig. 16) y 10 µg/ml para Cicloheximida (Fig. 17). A partir de estos resultados obtenidos, se realizaron los ensayos con estas concentraciones de VT y Cicloheximida.

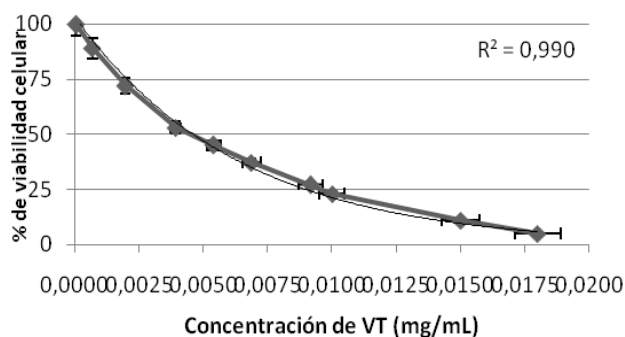


Fig. 16. Determinación de CC<sub>50</sub> de VT sobre células Vero.

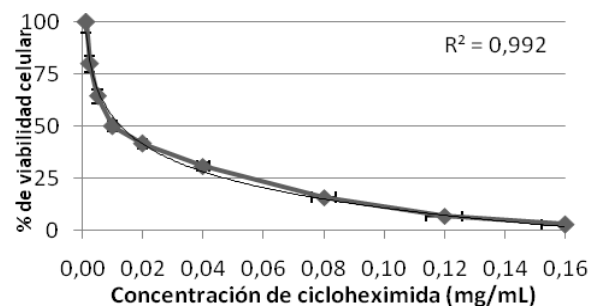


Fig. 17. Determinación de CC<sub>50</sub> de Cicloheximida sobre células Vero.

## Ensayos de inhibición de citotoxicidad de VT

La acción de extractos vegetales y EPSK sobre la inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero se analizó mediante 3 ensayos de incubación. Teniendo en cuenta el daño citotóxico producido por VT ( $1CC_{50}$ ), se determinó el porcentaje de inhibición de citotoxicidad de cada muestra ensayada.

### Ensayos de inhibición de citotoxicidad con extractos de origen vegetal

#### a. Pre-incubación VT con extracto

En los ensayos de pre-incubación de extractos vegetales con  $1CC_{50}$  de VT para evaluar el efecto de los mismos sobre la toxina, se demostró que tanto los extractos de *P. alba* como *Z. mistol* inhibieron la citotoxicidad de VT sobre células Vero dependiendo del solvente de extracción y la concentración utilizada de cada extracto.

Del análisis de viabilidad celular se demostró que el extracto alcohólico de *P. alba* a una concentración de 2,45 mg/ml inhibió un 95% la citotoxicidad de VT, siendo el extracto con mayor porcentaje de reducción de daño celular (Tabla 15). Pre-incubando con extractos alcohólico (1,22 mg/ml), acetónico (3,075 mg/ml) y hexánico (3,45 mg/ml), se inhibió la citotoxicidad un 55, 50 y 45% respectivamente. El extracto acuoso fue el que presentó menor porcentaje de inhibición (38%) a pesar de contener mayor cantidad de sólidos disueltos (19,46 mg/ml) (Fig. 18). Teniendo en cuenta las lecturas de DO, los extractos alcohólicos, acetónicos, hexánicos en concentraciones inferiores a 0,86 mg/ml y 4,87 mg/ml para el extracto acuoso, no presentaron diferencias estadísticamente significativas con  $p \leq 0,05$  con respecto a la DO de  $1CC_{50}$  de VT.

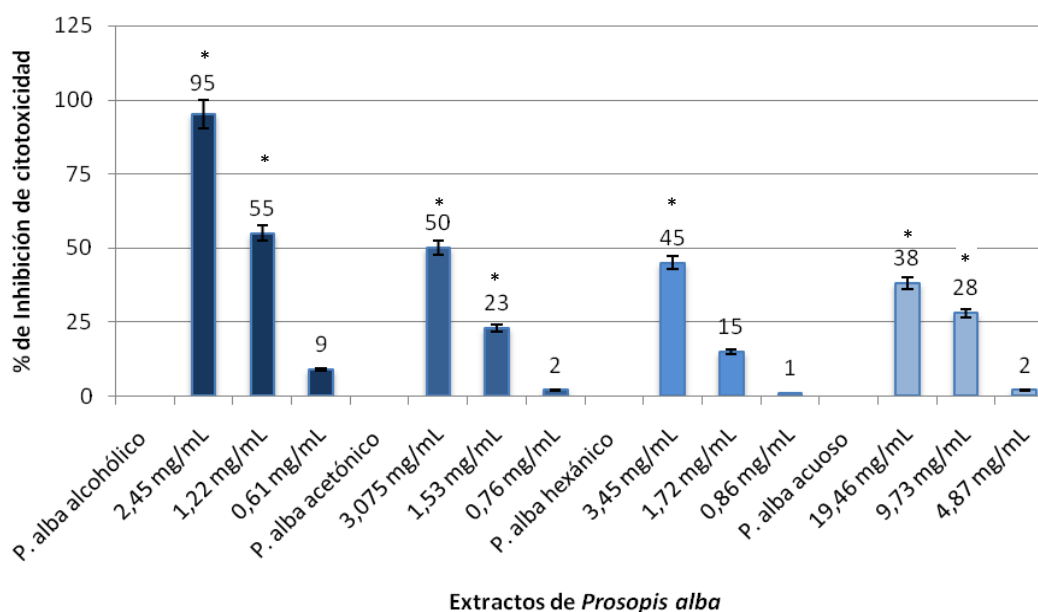


Fig. 18. Inhibición de citotoxicidad de VT de *E. coli* EDL 933 sobre células Vero con extractos de *Prosopis alba*. Pre-incubación VT con extracto. (\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

Tabla 15. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con extractos de *P. alba*. Pre-incubación VT con extracto.

Muestras	DO $\pm$ DE	% de Inhibición
Células Vero	1,630 $\pm$ 0,039	
<b><i>P. alba</i> alcohólico</b>		
2,45 mg/ml	1,579 $\pm$ 0,047	95 (*)
1,22 mg/ml	0,919 $\pm$ 0,048	55 (*)
0,61 mg/ml	0,755 $\pm$ 0,031	9
<b><i>P. alba</i> acetónico</b>		
3,075 mg/ml	0,906 $\pm$ 0,018	50 (*)
1,53 mg/ml	0,835 $\pm$ 0,031	23 (*)
0,76 mg/ml	0,727 $\pm$ 0,028	2
<b><i>P. alba</i> hexánico</b>		
3,45 mg/ml	0,894 $\pm$ 0,052	45 (*)
1,72 mg/ml	0,816 $\pm$ 0,023	15
0,86 mg/ml	0,710 $\pm$ 0,014	1
<b><i>P. alba</i> acuoso</b>		
19,46 mg/ml	0,862 $\pm$ 0,021	38 (*)
9,73 mg/ml	0,823 $\pm$ 0,063	28 (*)
4,87 mg/ml	0,726 $\pm$ 0,048	2
<b>VT 1CC<sub>50</sub></b>	0,705 $\pm$ 0,077	
Cicloheximida 1CC <sub>50</sub>	0,748 $\pm$ 0,076	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,580 $\pm$ 0,021	

(\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

Según la composición química y concentración de compuestos fenólicos, en el extracto alcohólico que presentó mejor efecto protector del daño celular por VT, se determinó mayor contenido de polifenoles totales y flavonoides glicósidos y aglicones, además de compuestos más solubles como taninos. A pesar de determinarse menor contenido de sólidos disueltos en los extractos acetónicos y hexánicos, los mismos fueron eficientes para neutralizar el efecto citotóxico de VT. El extracto acetónico contiene  $5,91 \pm 0,26$   $\mu\text{g}$  EAG/mg para polifenoles totales y por cromatografía se determinaron no solo flavonoides glicósidos sino también aglicones y taninos en menor cantidad. Si bien en el extracto hexánico no se determinó por espectrofotometría contenido de polifenoles totales y por cromatografía se detectó poco contenido de flavonoides, el efecto protector podría deberse a la presencia de otros compuestos fenólicos no determinados por las técnicas empleadas.

En cuanto a los extractos de *Z. mistol*, al comparar las DO de viabilidad, se observó que el extracto acetónico a una concentración de 3,77 mg/ml inhibió un 68% la citotoxicidad de VT (Tabla 16), mientras que el extracto acuoso (11,90 y 5,95 mg/ml) y hexánico (3,62 mg/ml) disminuyeron el daño celular un 56, 51 y 52%, respectivamente. El extracto alcohólico presentó menor efecto protector frente a VT, inhibiendo un 30% la citotoxicidad a una concentración de 3,75 mg/ml, a pesar de contener polifenoles totales y flavonoides principalmente aglicones y taninos. Teniendo en cuenta las lecturas de DO, los extractos alcohólicos, acetónicos, hexánicos en concentraciones inferiores a 0,94 mg/ml y 2,98 mg/ml para el extracto acuoso, no presentaron diferencias estadísticamente significativas con  $p \leq 0,05$  con respecto a la DO de  $1\text{CC}_{50}$  de VT.

Del análisis de compuestos fenólicos, a diferencia de los extractos de *P. alba*, los extractos de *Z. mistol* presentaron mayor variabilidad entre el efecto protector y el contenido de polifenoles y presencia de flavonoides según cada solvente de extracción. Se pudo determinar por cromatografía flavonoides aglicones en el extracto acetónico que presentó mayor porcentaje de inhibición de citotoxicidad de VT, por lo que este efecto protector de daño celular podría estar mediado por otros compuestos no determinados por las técnicas empleadas.

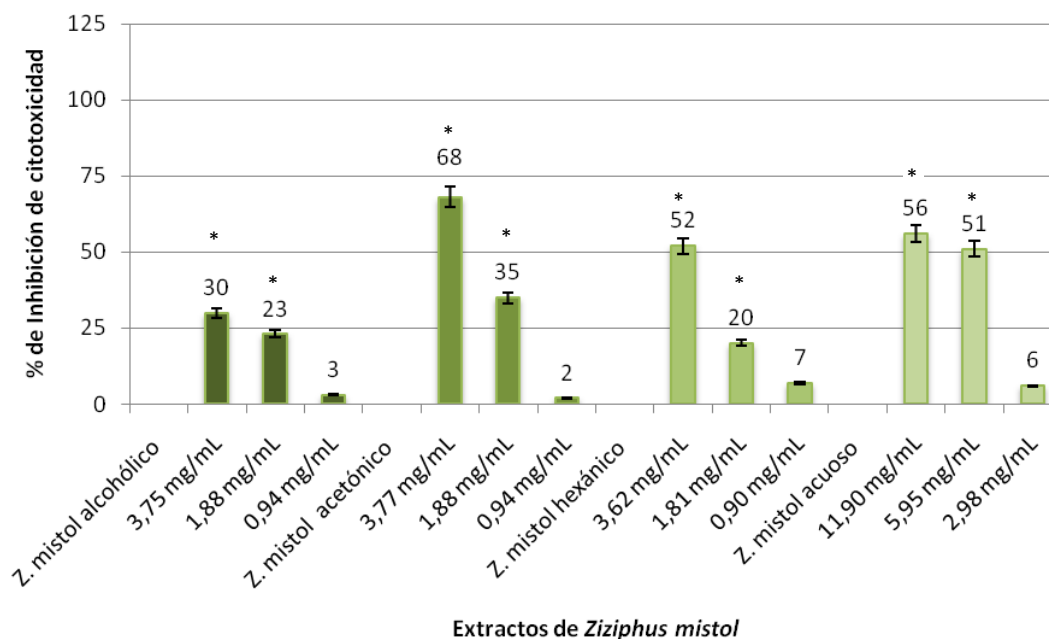


Fig. 19. Inhibición de citotoxicidad de VT de *E. coli* EDL 933 sobre células Vero con extractos de *Ziziphus mistol*. Pre-incubación VT con extracto. (\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

Tabla 16. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con extractos de *Z. mistol*. Pre-incubación VT con extracto.

Muestras	DO $\pm$ DE	% de Inhibición
Células Vero	1,540 $\pm$ 0,039	
<b>Z. mistol alcohólico</b>		
3,75 mg/ml	0,945 $\pm$ 0,032	30 (*)
1,88 mg/ml	0,886 $\pm$ 0,015	23 (*)
0,94 mg/ml	0,719 $\pm$ 0,025	3
<b>Z. mistol acetónico</b>		
3,77 mg/ml	1,275 $\pm$ 0,017	68 (*)
1,88 mg/ml	0,991 $\pm$ 0,074	35 (*)
0,94 mg/ml	0,714 $\pm$ 0,025	2
<b>Z. mistol hexánico</b>		
3,62 mg/ml	1,133 $\pm$ 0,062	52 (*)
1,81 mg/ml	0,860 $\pm$ 0,019	20 (*)
0,90 mg/ml	0,751 $\pm$ 0,026	7
<b>Z. mistol acuoso</b>		
11,90 mg/ml	1,178 $\pm$ 0,024	56 (*)
5,95 mg/ml	1,125 $\pm$ 0,078	51 (*)
2,98 mg/ml	0,747 $\pm$ 0,048	6
<b>VT 1CC<sub>50</sub></b>	0,698 $\pm$ 0,077	
Cicloheximida 1CC <sub>50</sub>	0,702 $\pm$ 0,076	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,510 $\pm$ 0,021	

(\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

**b. Pre-incubación extracto con células Vero**

En la pre-incubación de extractos vegetales con células Vero durante 1 hora antes de la incubación con 1CC<sub>50</sub> de VT para evaluar el posible efecto protector de los extractos a nivel celular, solo el extracto acetónico de mistol presentó efecto inhibitorio de citotoxicidad con un 19% de inhibición. Si bien los extractos acetónicos de *P. alba*, alcohólico y hexánico de *Z. mistol* inhibieron un 11, 10 y 12% respectivamente, no presentaron diferencias estadísticamente significativas con  $p \leq 0,05$  con respecto a la DO de 1CC<sub>50</sub> de VT (Tabla 17).

Tabla 17. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con extractos vegetales. Pre-incubación extracto con células Vero.

Muestras	DO ± DE	% de Inhibición
Células Vero	1,218 ± 0,061	
<i>P. alba</i> alcohólico 2,45 mg/ml	0,591 ± 0,030	2
<i>P. alba</i> acetónico 3,075 mg/ml	0,646 ± 0,032	11
<i>P. alba</i> hexánico 3,45 mg/ml	0,623 ± 0,031	7
<i>P. alba</i> acuoso 19,46 mg/ml	0,626 ± 0,031	8
<i>Z. mistol</i> alcohólico 3,75 mg/ml	0,637 ± 0,032	10
<i>Z. mistol</i> acetónico 3,77 mg/ml	0,700 ± 0,035	19 <sup>(*)</sup>
<i>Z. mistol</i> hexánico 3,62 mg/ml	0,650 ± 0,033	12
<i>Z. mistol</i> acuoso 11,90 mg/ml	0,538 ± 0,027	0
VT 1CC <sub>50</sub>	1,189 ± 0,059	
Cicloheximida 1CC <sub>50</sub>	0,554 ± 0,028	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	0,576 ± 0,029	

<sup>(\*)</sup> Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .



c. Co-incubación VT con extractos en células Vero

En los ensayos de incubación simultánea de extractos con 1CC<sub>50</sub> de VT sobre células Vero para evaluar la posible competencia por los receptores de membrana celular Gb<sub>3</sub> y Gb<sub>4</sub>, ninguno de los extractos ensayados en las distintas concentraciones tuvieron inhibición del efecto citotóxico de VT estadísticamente significativa (Tabla 18).

Tabla 18. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con extractos vegetales. Co-incubación VT con extractos en células Vero.

Muestras	DO ± DE	% de Inhibición
Células Vero	1,418 ± 0,070	
<i>P. alba</i> alcohólico 2,45 mg/ml	0,706 ± 0,015	4
<i>P. alba</i> acetónico 3,075 mg/ml	0,698 ± 0,024	3
<i>P. alba</i> hexánico 3,45 mg/ml	0,726 ± 0,036	7
<i>P. alba</i> acuoso 19,46 mg/ml	0,689 ± 0,014	2
<i>Z. mistol</i> alcohólico 3,75 mg/ml	0,684 ± 0,014	1
<i>Z. mistol</i> acetónico 3,77 mg/ml	0,678 ± 0,023	0
<i>Z. mistol</i> hexánico 3,62 mg/ml	0,718 ± 0,040	6
<i>Z. mistol</i> acuoso 11,90 mg/ml	0,710 ± 0,036	7
VT 1CC <sub>50</sub>	0,676 ± 0,033	
Cicloheximida 1CC <sub>50</sub>	0,654 ± 0,032	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,389 ± 0,069	

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos sobre inhibición de citotoxicidad de VT de *E. coli* O157:H7 sobre línea celular Vero, los extractos de origen vegetal estudiados son potencialmente útiles dependiendo de las concentraciones utilizadas, los solventes de extracción y los períodos de incubación ensayados. La incubación previa del extracto con VT durante 1 hora y posterior incubación en las células Vero, presentó mayor efecto protector frente al daño celular. Esto podría deberse a que los extractos vegetales ejercerían acción directa sobre la toxina.

Además de los estudios de pre y co-incubación, se evaluó la capacidad de los extractos de revertir la adhesión y/o efecto citotóxico de VT en células Vero (pos-incubación). Para ello se determinó la cinética de adhesión de la toxina, incubando a distintos períodos de tiempo 1CC<sub>50</sub> de la misma sobre la línea celular. Según el análisis

de citotoxicidad de VT y teniendo en cuenta el período de incubación de la misma en las células Vero, se corroboró que la toxina necesita un minuto o menos para poder adherirse a los receptores presentes en la membrana celular (Gb<sub>3</sub> y/o Gb<sub>4</sub>) y en consecuencia producir daño citotóxico y muerte de celular (Fig. 20).

Al ensayar con extractos vegetales incubando los mismos 1 hora después de la exposición de VT en células Vero, se observó que los porcentajes de citotoxicidad permanecían sin modificaciones, por lo que se concluyó que los extractos vegetales en las concentraciones y solventes ensayados no tienen la capacidad de revertir la adhesión de VT a receptores de membrana y posterior efecto citotóxico de la misma sobre las células.

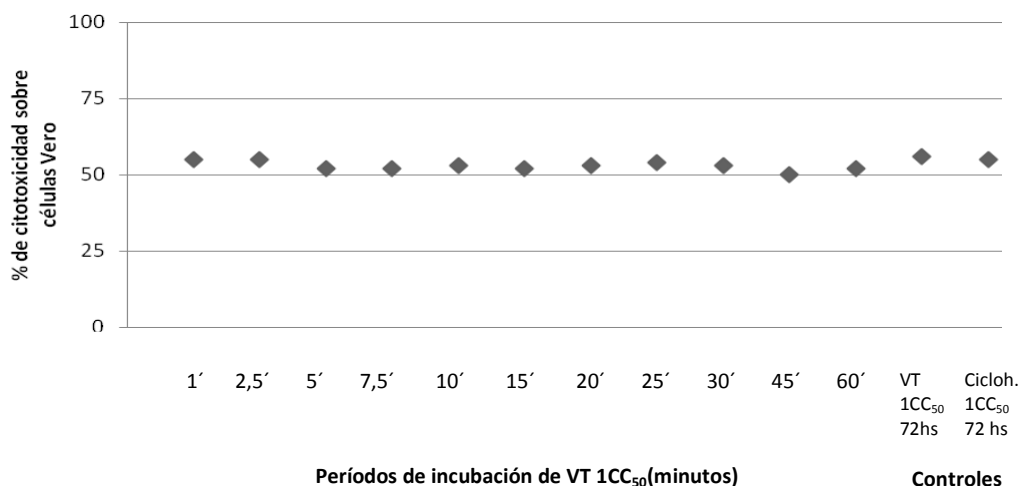


Fig. 20. Cinética de adhesión de VT a receptores celular y posterior efecto citotóxico en células Vero en diferentes períodos de incubación.

### Ensayos de inhibición de citotoxicidad con componentes de origen microbiano

#### a. Pre-incubación VT con EPSK

En los ensayos de pre-incubación de EPSK con 1CC<sub>50</sub> de VT para evaluar el efecto de los mismos sobre la toxina, se demostró que si bien los EPSK del grano (EPSKG) y libres (EPSKL) inhibieron la citotoxicidad de VT sobre células Vero, no presentaron diferencias estadísticamente significativas con  $p \leq 0,05$  con respecto a la DO de 1CC<sub>50</sub> de VT, a excepción de EPSKG a una concentración de 10 mg/ml que presentó un efecto inhibitorio del 21% (Tabla 19).

Tabla 19. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con EPSK. Pre-incubación VT con EPSK.

Muestras	DO ± DE	% de Inhibición
Células Vero	1,292 ± 0,064	
EPSKG 1 mg/ml	0,684 ± 0,034	6
EPSKG 5 mg/ml	0,708 ± 0,029	10
EPSKG 10 mg/ml	0,782 ± 0,039	21 <sup>(*)</sup>
EPSKL 1 mg/ml	0,665 ± 0,029	3
EPSKL 5 mg/ml	0,678 ± 0,031	5
EPSKL 10 mg/ml	0,692 ± 0,028	7
VT 1CC <sub>50</sub>	0,645 ± 0,032	
Cicloheximida 1CC <sub>50</sub>	0,654 ± 0,032	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,250 ± 0,059	

<sup>(\*)</sup> Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

**b. Pre-incubación EPSK con células Vero**

La incubación de EPSK durante 1 hora sobre las células Vero y posterior incubación con 1CC<sub>50</sub>, no tuvo efecto significativo sobre la inhibición del daño citotóxico producido por la toxina. No hubo diferencia estadísticamente significativa entre las lecturas de DO de viabilidad celular de las muestras de EPSK tanto de grano como libre y el control de citotoxicidad de VT (Tabla 20).

Tabla 20. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con EPSK. Pre-incubación EPSK con células Vero.

Muestras	DO ± DE	% de Inhibición
Células Vero	1,119 ± 0,056	
EPSKG 1 mg/ml	0,554 ± 0,027	2
EPSKG 5 mg/ml	0,578 ± 0,028	6
EPSKG 10 mg/ml	0,592 ± 0,029	8
EPSKL 1 mg/ml	0,564 ± 0,031	3
EPSKL 5 mg/ml	0,588 ± 0,024	7
EPSKL 10 mg/ml	0,592 ± 0,033	8
VT 1CC <sub>50</sub>	0,545 ± 0,027	
Cicloheximida 1CC <sub>50</sub>	0,525 ± 0,019	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,104 ± 0,055	

c. Co-incubación VT con EPSK en células vero

En la incubación simultánea de EPSK en células Vero con 1CC<sub>50</sub> de VT, el EPSKL a una concentración de 10 mg/ml tuvo efecto protector del 26% de inhibición de la citotoxicidad de la toxina (Tabla 21). Si bien incubando 10 mg/ml de EPSKG y 5 mg/ml de ambos EPS se obtuvieron un 18, 11 y 13% de inhibición, respectivamente, no hubo diferencia estadísticamente significativa entre las DO de viabilidad.

Tabla 21. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con EPSK. Co-incubación VT con EPSK en células Vero.

Muestras	DO ± DE	% de Inhibición
Células Vero	1,269 ± 0,063	
EPSKG 1 mg/ml	0,740 ± 0,037	7
EPSKG 5 mg/ml	0,696 ± 0,034	11
EPSKG 10 mg/ml	0,670 ± 0,033	18
EPSKL 1 mg/ml	0,793 ± 0,039	9
EPSKL 5 mg/ml	0,710 ± 0,035	13
EPSKL 10 mg/ml	0,682 ± 0,034	26 <sup>(*)</sup>
VT 1CC <sub>50</sub>	0,626 ± 0,031	
Cicloheximida 1CC <sub>50</sub>	0,592 ± 0,029	
<i>E. coli</i> ATCC 25922	1,229 ± 0,061	

<sup>(\*)</sup> Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

Según los resultados obtenidos, los EPS de leche kefirada estudiados para evaluar la inhibición del efecto citotóxico de VT de *E. coli* O157:H7 sobre línea celular Vero, solo la pre-incubación de EPSKG con VT inhibió un 21% y la co-incubación de EPSKL con VT disminuye el daño celular en un 26%, ambos en concentraciones de 10 mg/ml.

## **Resultados Sección D: Inhibición in vitro de adhesión de *E. coli* O157:H7 sobre células Caco-2.**

### Ensayos de adhesión de *E. coli* a células Caco-2

Con el fin de estudiar la capacidad de adhesión de *E. coli* a líneas celulares eucariotas, se trabajó con células de anclaje de adenocarcinoma de colon humano (HCT-8), células epiteliales de carcinoma nasofaríngeo humano (HEp-2) y células epiteliales de adenocarcinoma colorectal humano (Caco-2), siendo estas últimas útiles para realizar todos los ensayos.

Para evaluar la adhesión de *E. coli* en células Caco-2 se tuvieron en cuenta distintos parámetros de incubación con el fin de evitar el crecimiento exponencial de la bacteria y el posible daño celular. Para ello se ensayaron 4 concentraciones bacterianas [ $1 \times 10^6$ ,  $1 \times 10^7$ ,  $1 \times 10^8$ ,  $1 \times 10^9$  ufc/ml] diluidas en buffer Hanks a pH 4 y 7, incubando a 4 °C, temperatura ambiente y 37 °C durante 30, 60, 90, 120, 180 y 240 min en agitación constante. Según los resultados de lecturas de DO se calculó el porcentaje de adhesión y se trabajó para todos los ensayos con concentraciones de la bacteria de  $5,5$  a  $6,5 \times 10^8$  ufc/ml, a pH 7, a 37 °C en estufa con atmósfera controlada, durante un período de incubación de 60 min. La dilución de la bacteria en buffer Hanks pH 4 y la incubación a 4 °C, producían pérdida de viabilidad celular con desprendimiento de la monocapa. Las incubaciones durante periodos posteriores a 60 minutos no mostraron diferencia estadísticamente significativa de adhesión.

### Ensayos de inhibición de adhesión de *E. coli* a células Caco-2

Se estudiaron 3 concentraciones de EPSKL y EPSKG [1, 5 y 10 mg/ml] mediante 3 ensayos de incubación. Se evaluó la capacidad de los EPSK para inhibir la adhesión tanto de *E. coli* EDL 933 como *E. coli* ATCC 25922.

## Inhibición de adhesión de *E. coli* EDL 933 a células Caco-2

### a. Co-incubación EPSK con *E. coli*

Teniendo en cuenta el porcentaje de adhesión de *E. coli* EDL 933 a la línea celular (40% Fig. 21), los EPSKL lograron reducir la adhesión bacteriana hasta un 99% en concentraciones de 10 mg/ml y un 61% co-incubando 5 mg/ml. En el caso de los ensayos realizados con EPSKG, los resultados demostraron que los mismos también fueron efectivos, aunque en menor porcentaje, siendo la concentración de 10 mg/ml la que presentó mayor efecto, con una inhibición del 24%. A concentraciones de 5 mg/ml de EPSKG y 1mg/ml de EPSKL se redujo la adhesión en igual porcentaje (17%), no siendo estadísticamente significativa la diferencia con respecto al control de adhesión bacteriana (Tabla 22).

Tabla 22. *E. coli* EDL 933 no adheridas a células Caco-2. Inhibición de adhesión co-incubando con EPSKL y EPSKG.

Muestras	DO Bacterias no adheridas $\pm$ DE	% de Inhibición de Adhesión
<i>E. coli</i> EDL 933	0,056 $\pm$ 0,002	
EPSKL 1 mg/ml	0,062 $\pm$ 0,003	17
EPSKL 5 mg/ml	0,079 $\pm$ 0,004	61 <sup>(*)</sup>
EPSKL 10 mg/ml	0,094 $\pm$ 0,004	99 <sup>(*)</sup>
EPSKG 1 mg/ml	0,059 $\pm$ 0,003	8
EPSKG 5 mg/ml	0,063 $\pm$ 0,003	17
EPSKG 10 mg/ml	0,065 $\pm$ 0,003	24 <sup>(*)</sup>

<sup>(\*)</sup>Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

Del análisis de los resultados obtenidos, se pudo determinar que la co-incubación de *E. coli* con EPSK fue efectiva y que los mismos disminuyeron la adhesión bacteriana a células Caco-2 dependiendo de las concentraciones ensayadas y el tipo de EPSK ya sea Libre o de Grano, logrando reducir la adhesión hasta un 99% co-incubando 10 mg/ml de EPSKL (Fig. 21).

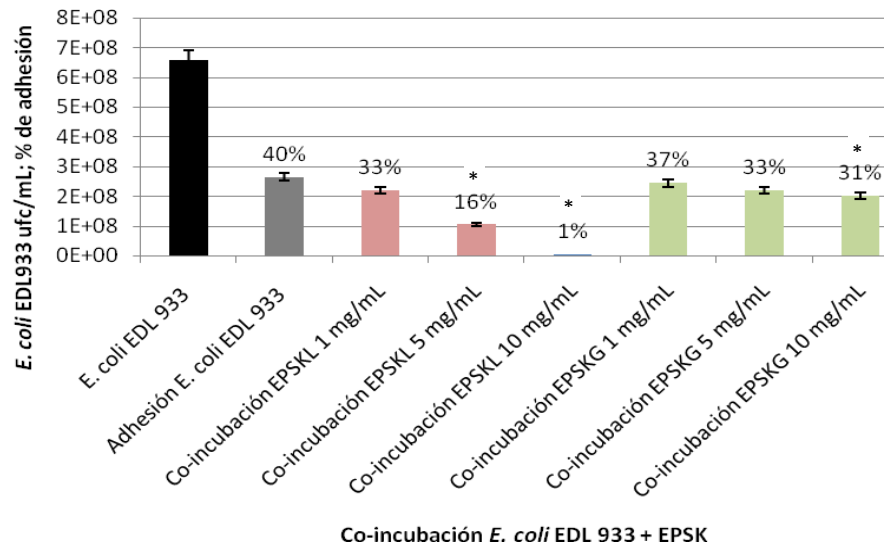


Fig. 21. Co-incubación *E. coli* EDL 933 + EPSK. Ufc/ml y porcentaje de *E. coli* adherida a células Caco-2. **Ref.:** ■ Inóculo de *E. coli*; ■ Adhesión *E. coli*; ■ Co-incubación EPSKL; ■ Co-incubación EPSKG. (\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

#### b. Pre-incubación EPSK con células Caco-2

Pre-incubando EPSK en células Caco-2 tiene efecto protector contra la adhesión de *E. coli* EDL 933. Tanto los EPSKL como EPSKG fueron efectivos dependiendo de las concentraciones utilizadas. A una concentración de 10 mg/ml de EPSKL se inhibió la adhesión un 92%, siendo también efectiva concentraciones de 5 mg/ml con porcentajes de inhibición de 41%. En cuanto a EPSKG también mostraron efecto protector de las células frente a *E. coli* inhibiendo su adhesión un 47 y 23% con concentraciones de 10 mg/ml y 5 mg/ml, respectivamente. Aunque se observó un 13% y 5% utilizando 1 mg/ml de EPSKL y EPSKG, respectivamente, estos porcentajes no fueron estadísticamente significativos a valor de  $p \leq 0,05$  (Tabla 23).

Tabla 23. *E. coli* EDL 933 no adheridas a células Caco-2. Porcentajes de inhibición de adhesión pre-incubando con EPSKL y EPSKG.

Muestras	DO Bacterias no adheridas $\pm$ DE	% de Inhibición de Adhesión
<i>E. coli</i> EDL 933	0,054 $\pm$ 0,002	
EPSKL 1 mg/ml	0,059 $\pm$ 0,003	13
EPSKL 5 mg/ml	0,070 $\pm$ 0,003	41 (*)
EPSKL 10 mg/ml	0,091 $\pm$ 0,004	92 (*)
EPSKG 1 mg/ml	0,055 $\pm$ 0,002	5
EPSKG 5 mg/ml	0,063 $\pm$ 0,003	23 (*)
EPSKG 10 mg/ml	0,073 $\pm$ 0,003	47 (*)

(\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .

Según estos resultados los tipos de EPS obtenidos de leche kefirada tienen efecto sobre la adhesión de *E. coli* pre-incubando los mismos sobre las células Caco-2, logrando que la adherencia de la bacteria a las células sea del 3% en el caso de EPSKL a una concentración de 10 mg/ml (Fig. 22).

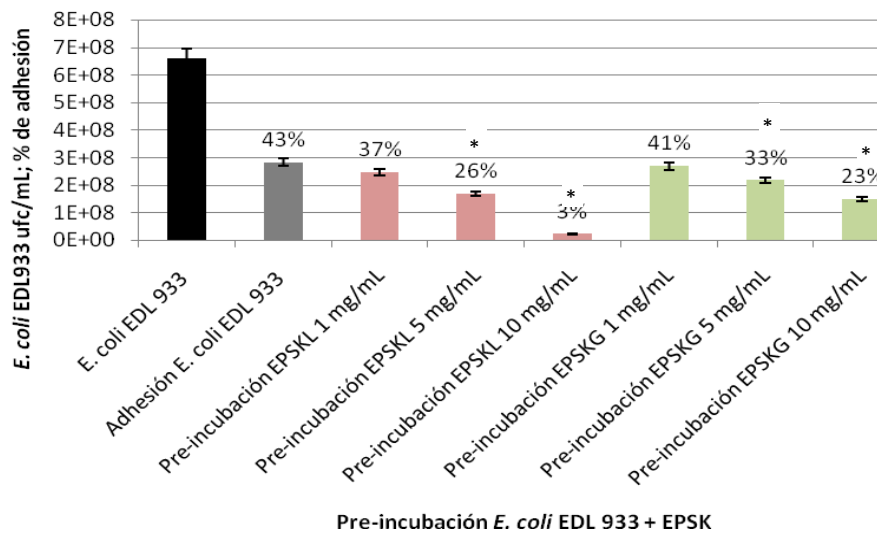


Fig. 22. Pre-incubación *E. coli* EDL 933 + EPSK. Ufc/ml y porcentaje de *E. coli* adherida a células Caco-2. Ref.: ■ Inóculo de *E. coli*; ■ Adhesión *E. coli*; ■ Pre-incubación EPSKL; ■ Pre-incubación EPSKG. (\*) Diferencia estadísticamente significativa a valor de  $p \leq 0,05$ .



c. Pos-incubación *E. coli* con células Caco-2

La pos-incubación de EPSKL y EPSKG sobre la línea celular no presentó inhibición de la adhesión de *E. coli* en ninguna de las concentraciones ensayadas. Las diferencias de DO de las muestras tratadas con EPSK respecto del control de adhesión de la cepa bacteriana, no fueron estadísticamente significativas a  $p \leq 0,05$  (Tabla 24), es decir que el porcentaje de adhesión de *E. coli* del 43% no fue afectada por la incubación con EPSK (Fig. 23). Esto determina que una vez que las bacterias están adheridas a las células Caco-2, no es posible revertir la adhesión con EPSK.

Tabla 24. *E. coli* EDL 933 no adheridas a células Caco-2. Porcentajes de inhibición de adhesión pos-incubando con EPSKL y EPSKG.

Muestras	DO Bacterias no adheridas $\pm$ DE	% de Inhibición de Adhesión
<i>E. coli</i> EDL 933	0,054 $\pm$ 0,002	
EPSKL 1 mg/ml	0,055 $\pm$ 0,003	4
EPSKL 5 mg/ml	0,054 $\pm$ 0,002	2
EPSKL 10 mg/ml	0,056 $\pm$ 0,002	6
EPSKC 1 mg/ml	0,054 $\pm$ 0,002	2
EPSKC 5 mg/ml	0,055 $\pm$ 0,003	3
EPSKC 10 mg/ml	0,056 $\pm$ 0,002	6

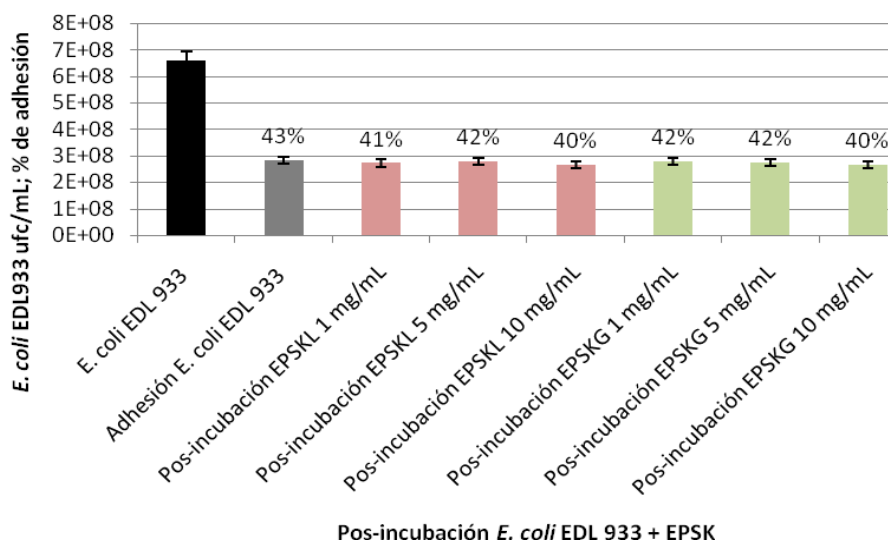


Fig. 23. Pos-incubación *E. coli* EDL 933 + EPSK. Ufc/ml y porcentaje de *E. coli* adherida a células Caco-2. Ref.: ■ Inóculo de *E. coli*; ■ Adhesión *E. coli*; ■ Pre-incubación EPSKL; ■ Pre-incubación EPSKG.

## Ensayos de inhibición de adhesión de *E. coli* ATCC 25922 a células Caco-2

Se realizó el estudio de adhesión de *E. coli* ATCC 25922 en células Caco-2 y se evaluó el efecto de EPSKL y EPSKG en distintas concentraciones y en los 3 períodos de incubación (co, pre y pos-incubación) con el fin de determinar si los mismos son capaces de inhibir la adhesión a células intestinales de una cepa de *E. coli* no patógena que se encuentra normalmente en el intestino del hombre. Según las lecturas de DO la cepa de *E. coli* ATCC 25922 presentó mayor adherencia a células Caco-2, entre un 61 y 65% comparado con *E. coli* EDL 933 que fue del 40 al 43%. Al evaluar los EPSK en los distintos períodos de incubación, se observó que solo se reduce la adhesión de la cepa *E. coli* ATCC 25922 al 60% pre-incubando concentraciones de 10 mg/ml de EPSKL (Fig. 24), y se disminuye a 56 y 55% co- y pre-incubando respectivamente con EPSKG (Fig. 25). La pos-incubación con EPSK no tuvo efecto sobre la adhesión de *E. coli* ATCC 25922, al igual que *E. coli* EDL 933, es decir que una vez adherida la cepa bacteriana no se revierte el proceso de unión a la célula. Concentraciones de 1 mg/ml y 5 mg/ml no tuvieron diferencias estadísticamente significativas a valor de  $p \leq 0,05$  con respecto al control de adhesión de *E. coli*. En base a estos resultados obtenidos se determina que los EPSK no afectan la adhesión de *E. coli* ATCC 25922 ni revierten su proceso de unión a células Caco-2.

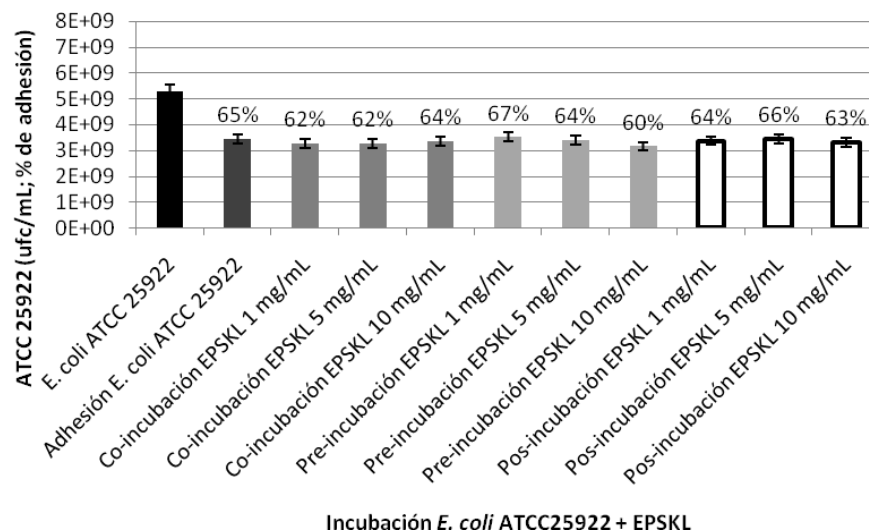


Fig. 24. Co, Pre y Pos-Incubación *E. coli* ATCC 25922 con EPSKL en distintas concentraciones. Ufc/ml y porcentaje de *E. coli* adherida a células Caco-2. Ref.: ■ Inóculo de *E. coli*; ■ Adhesión *E. coli*; ■ Co-incubación EPSKL; ■ Pre-incubación EPSKL; □ Pos-incubación EPSKL.

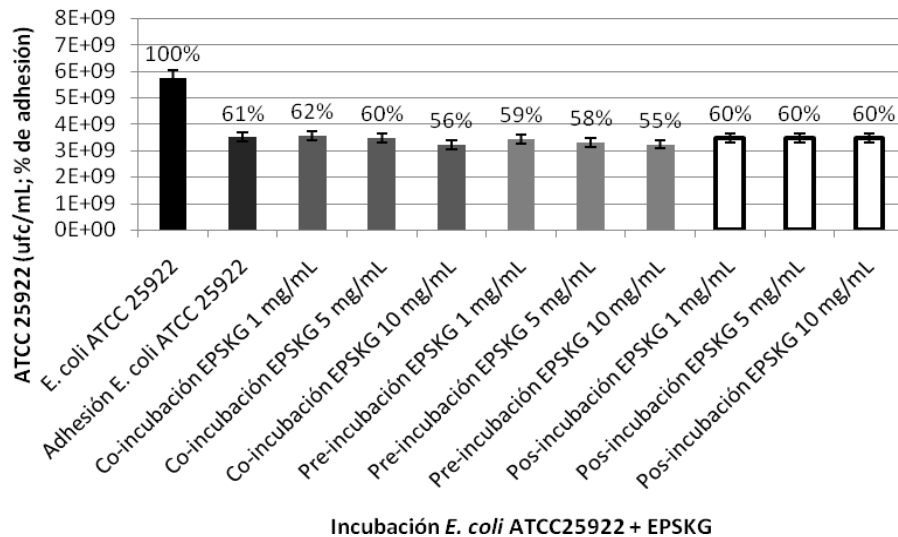


Fig. 25. Co, Pre y Pos-Incubación *E. coli* ATCC 25922 con EPSKG en distintas concentraciones. Ufc/ml y porcentaje de *E. coli* adherida a células Caco-2. Ref.: ■ Inóculo de *E. coli*; ■ Adhesión *E. coli*; ■ Co-incubación EPSKG; ■ Pre-incubación EPSKG; ■ Pos-incubación EPSKG.

### Evaluación de la adhesión de *E. coli* a células Caco-2

Además de cuantificar la adhesión de *E. coli* EDL 933 y ATCC 25922 y la inhibición de la adhesión con distintas concentraciones de EPSK, se evaluó por microscopía las monocapas de células Caco-2 con *E. coli* y EPSK. Al no ser efectivo el método de tinción con May-Grünwald Giemsa al 10% para visualizar y diferenciar bacterias-células en los ensayos realizados con EPSK, se utilizó tinción fluorescente con una concentración de 0,12 mg/ml de Hoechst y se observó en microscopio a 465 nm. Las fotografías de la figura 26(A y B) muestran el control de células Caco-2 sin infección con *E. coli*. En las fotografías de la figura 27 (C y D), se puede observar un puntillado alrededor de las células que determina la infección con *E. coli* EDL 933 luego de 60 minutos de incubación a 37 °C en agitación constante en estufa con atmósfera controlada.

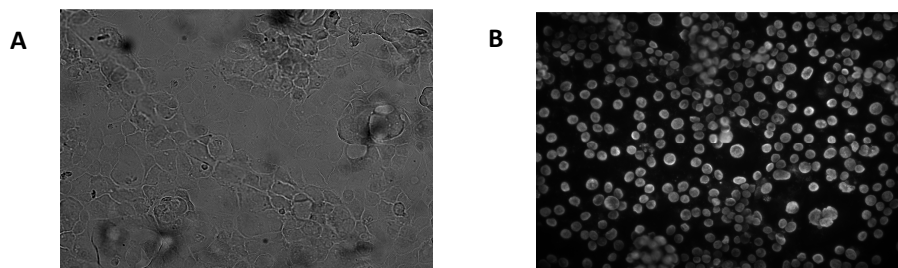


Fig. 26. Fotografías de Células Caco-2 sin infección bacteriana. Ref.: A.células Caco-2 (microscopía sin fluorescencia a 20x); B. células Caco-2 (microscopía con fluorescencia 465 nm a 40x).

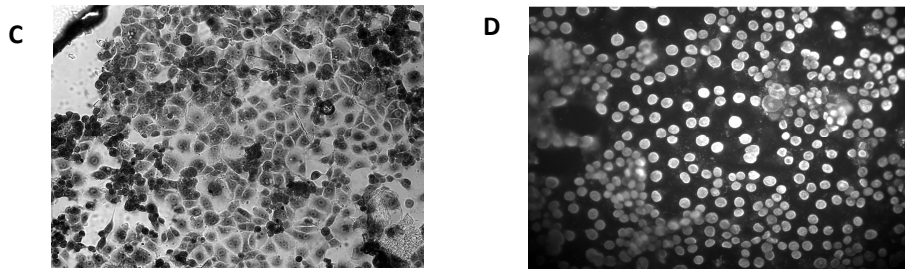


Fig. 27. Fotografía de Células Caco-2 infectadas con  $6,5 \times 10^8$  ufc/ml de *E. coli* EDL 933. **Ref.:** **C.** células Caco-2 infectadas con *E. coli* (microscopía sin fluorescencia a 20x); **D.** células Caco-2 infectadas con *E. coli* (microscopía con fluorescencia 465 nm a 40x).

En las fotografías E, F y G de la figura 28, se muestran las células Caco-2 poco infectadas con *E. coli* luego de la co-incubación con 10 mg/ml de EPSKL, pre-incubación con 10 mg/ml de EPSKL y pre-incubación con 10 mg/ml de EPSKG, respectivamente. Las lecturas de DO obtenidas para evaluar la adhesión de *E. coli* a la línea celular luego del tratamiento con EPSK, determinaron que co y pre-incubando con dichas concentraciones de EPSK, inhibieron la adhesión de la bacteria un 99, 92 y 47% respectivamente.

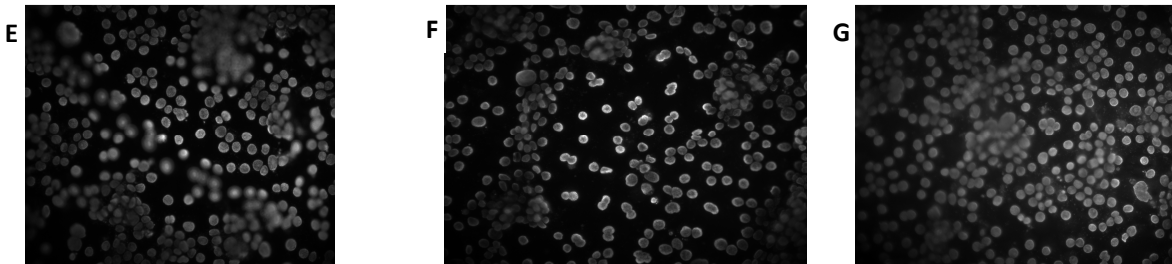


Fig. 28. Fotografías de Células Caco-2 infectadas con  $6,5 \times 10^8$  ufc/ml de *E. coli* EDL 933 e incubadas con EPSK. Microscopio con fluorescencia 450 nm a 40x. **Ref.:** **E.** células Caco-2 infectadas con *E. coli* co-incubando con 10 mg/ml de EPSKL; **F.** células Caco-2 infectadas con *E. coli* pre-incubando con 10 mg/ml de EPSKL; **G.** células Caco-2 infectadas con *E. coli* pre-incubando con 10 mg/ml de EPSKG.

Como puede observarse en las fotografías de la Figura 29, la adhesión de *E. coli* no patógena ATCC 25922 no fue afectada por la incubación con EPSK, específicamente por la co-incubación de 10 mg/ml de EPSKL durante 60 minutos (fotografía I) con un porcentaje de adhesión de esta cepa bacteriana igual al control (fotografía J).

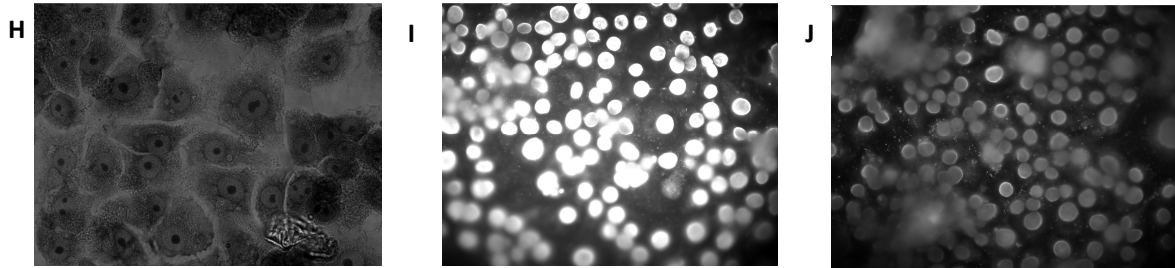


Fig. 29. Fotografías de Células Caco-2 infectadas con  $6,5 \times 10^9$  ufc/ml de *E. coli* ATCC 25922 e incubadas con EPSK. Microscopio a 40x. **Ref.:** H. células Caco-2 infectadas con *E. coli* (microscopía sin fluorescencia); I. células Caco-2 infectadas con *E. coli* (microscopía con fluorescencia); J. células Caco-2 infectadas con *E. coli* co-incubando con 10 mg/ml de EPSKL (microscopía con fluorescencia).

**CAPÍTULO 4**  
**DISCUSIÓN**

*Escherichia coli* O157:H7, identificado por primera vez como patógeno humano a principios de 1980 (Karmali et al, 1983), es el serotipo prevalente asociado a grandes brotes y casos esporádicos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (SUH). En Argentina, numerosos estudios han identificado a esta cepa como el agente etiológico más comúnmente asociado y aislado de pacientes con esta patología (Rivas et al, 2006 a; Ibarra et al, 2008; Fernandez-Brando et al, 2011 a), constituyendo un problema de salud pública, ya que representa la principal causa de falla renal aguda en la infancia, la segunda causa de falla renal crónica y el 20% de los casos de trasplante renal durante la infancia y la adolescencia (Torres et al, 2010). Se estima que aproximadamente el 10% de las infecciones por *E. coli* O157:H7 en niños menores de 10 años evolucionan a SUH (Fagundo et al, 2003; Keir et al, 2012) y estudios realizados por Rivas et al (2011) establecieron que el 50% de los pacientes con SUH requiere diálisis y el 75% requiere transfusión sanguínea. Los registros oficiales confirman que la enfermedad está distribuida en todo el territorio argentino con alrededor de 500 nuevos casos por año, siendo el país con mayor tasa de incidencia en el mundo (Fernandez-Brando et al, 2011 a).

Además Rivas et al (2006 a) establecieron que la habilidad de la cepa para causar enfermedad está relacionada no solo por su capacidad para secretar VT1, VT2 y sus variantes, responsables del daño del endotelio vascular, sino que además se demostró que los factores de virulencia de la bacteria que le permiten colonizar el epitelio intestinal y desencadenar reacción inflamatoria son absolutamente necesarios para el desarrollo del SUH (Keir et al, 2012).

Si bien *E. coli* O157:H7 es susceptible a la mayoría de los agentes antimicrobianos utilizados comúnmente, la antibioterapia en la fase aguda de la enfermedad es aún controversial (Gouali y Weill, 2013). Se ha comprobado que ciertos antibióticos como ciprofloxacina, co-trimoxazol, cefixime, tetraciclinas y quinolonas, en concentraciones subinhibitorias, incrementaron significativamente la producción y liberación extracelular de VT en cepas de *E. coli* O157:H7 como consecuencia de la injuria inducida en la membrana bacteriana (Zimmerhackl, 2000; Keir et al, 2012), además de ser potentes inductores de la expresión del gen para VT2 (Zhang et al, 2000; Ichinohe et al, 2009). Las complicaciones por el uso de antibióticos en el tratamiento del SUH ha llevado al estudio de análogos sintéticos del receptor Gb<sub>3</sub> con el objetivo de adsorber

VT libre en intestino y circulación sanguínea (Takeda et al, 1999; Nishikawa et al, 2005), al uso de bacterias recombinantes que expresan el receptor Gb3 en su membrana (Paton et al, 2001) así como de inhibidores farmacológicos de la síntesis del receptor Gb3 (Silberstein et al, 2009). Si bien estos estudios obtuvieron resultados favorables en la inhibición de *E. coli* enterohemorrágica y su principal factor de virulencia, resulta imperiosa la necesidad de avanzar en el estudio de nuevos componentes para la prevención y tratamiento del SUH. Es por ello que en esta tesis doctoral se planteó investigar desde la dietoterapia, extractos de origen vegetal y cepas probióticas que inhiban tanto la colonización de *E. coli* O157:H7 a nivel intestinal como medida preventiva, como la acción de VT sobre células eucariotas.

La utilización de ciertos extractos vegetales como fuentes naturales de componentes antimicrobianos, ha incrementado la investigación y estudio de plantas en busca de alternativas viables para el tratamiento de enfermedades como el SUH (Varavuthikunchai et al, 2004; Doughari et al, 2009; Doughari et al, 2012).

Durante siglos, las plantas han representado el único recurso medicinal para el tratamiento de enfermedades que afectan a los seres humanos, incluso con el advenimiento de la química farmacéutica (Moura-Costa et al, 2012). En el año 2001, la Organización Mundial de la Salud, publicó que aproximadamente el 65% de la población mundial utiliza plantas medicinales para la atención primaria de salud (World Health Organization, 2001). Aproximadamente el 6% de las plantas del mundo han sido estudiadas por su actividad biológica y sólo el 15% han sido evaluadas fitoquímicamente (Verpoorte, 2000).

Argentina es un país con abundante biodiversidad en flora y diversidad cultural. Las hierbas medicinales tradicionales son consideradas importantes en el cuidado de la salud de la mayoría de la población y dependen en gran medida de la utilización de plantas autóctonas. El uso de éstas es difundido generacionalmente y prevalece sobre la medicina ortodoxa (Simoes et al, 2007; Goleniowski et al, 2006). Entre ellas, se destacan Algarroba (*Prosopis alba*) como una importante especie indígena, cuyas frutas son utilizadas como alimento desde tiempos ancestrales (Bernardi et al, 2006) y Mistol (*Ziziphus mistol*) como una de las especies nativa del centro-norte, donde forma parte del estrato arbóreo de los bosques de quebracho colorado y quebracho blanco (Colares et al, 2008). Ambas especies arbóreas ampliamente distribuidas en nuestro



país, han sido utilizadas por comunidades nativas desde tiempos remotos y actualmente estudiadas por su participación en el mantenimiento del ecosistema, producción maderera, su uso a nivel familiar e industrial, por sus cualidades nutricionales y alimentarias, su aplicación en el tratamiento de enfermedades, actividad antimicrobiana, entre otras.

Los estudios realizados en la presente Tesis Doctoral, permitieron la obtención de compuestos potencialmente útiles de productos elaborados con frutos de *P. alba* y *Z. mistol* contra *E. coli* O157:H7, evaluando por un lado la potencial actividad antimicrobiana sobre la cepa y por otro lado la inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero, profundizando el estudio de sus propiedades, revalorizando su uso desde la etnobotánica y aplicación dietoterápica de infecciones producidas por esta cepa bacteriana.

La actividad antimicrobiana de extractos vegetales frente a *E. coli* O157:H7, ha sido ampliamente investigada. Estudios realizados por Varavuthikunchai et al (2004), demostraron que extractos acuosos y etanólicos de *Quercus infectoria* y acuoso de *Punica granatum* inhibieron el crecimiento *E. coli* O157:H7 en concentraciones de 0,09, 0,78, y 0,19, 0,39 mg/ml, respectivamente para ensayos de Concentración Bactericida Mínima (CBM) y Concentración Inhibitoria Mínima (CIM). Heredia et al (2005), demostraron que el extracto etanólico de *Haematoxylon brasiletto* a una concentración de 4 mg/ml inhibió el crecimiento de la cepa bacteriana por la técnica de CIM. Extractos de *Curtisia dentata* inhibieron el crecimiento de *E. coli* O157:H7 un 8 y 28% en la técnica de difusión en agar y se demostró además por el método de CIM, que los extractos etanólico, diclorometanólico, hexánico, clorofórmico y acetónico inhibieron el crecimiento de *E. coli* un 82,61%, 71,01%, 44,93%, 34,78% 27,54%, respectivamente (Doughari et al, 2012).

Los resultados obtenidos en esta tesis demostraron que por la técnica de turbidometría, la co-incubación de distintas concentraciones de extractos vegetales con *E. coli* O157:H7 inhibieron el crecimiento de la cepa bacteriana un 25% con extracto alcohólico de *P. alba* a una concentración de 2,45 mg/ml, y un 22 y 21% con extractos acuoso y alcohólico de *Z. mistol* en concentraciones de 11,90 mg/ml y 3,75 mg/ml, respectivamente. A diferencia de estos resultados, otro estudio realizado sobre la especie *Prosopis* (*P. kuntzei* y *P. ruscifol*), demostraron que la utilización de extractos

metanólicos inhibieron la actividad respiratoria de *E. coli* O157:H7, con una CIM de 0,08 a 0,5 mg/ml de extracto (Salvat et al, 2004).

Numerosos estudios confirman que la presencia de compuestos fenólicos juega un rol importante como bacteriostáticos/bactericidas, por diferentes mecanismos como disociación de la membrana bacteriana, alteración de proteínas y receptores de membrana, rigidez de membrana plasmática, quelación de metales, entre otros (Varavuthikunchai et al, 2004; Kim et al, 2008; Katalinic et al, 2013).

Estudios realizados por Twaha et al (2007) y Kalim et al (2010) demostraron una correlación entre el contenido de compuestos fenólicos totales de extractos vegetales y una alta actividad antimicrobiana y antioxidante. Se ha reportado además que compuestos fenólicos como taninos y flavonoides inhiben la proliferación microbiana por desnaturalización de enzimas implicadas en el metabolismo, por lo que son utilizados como agentes antivirales, antibacterianos y antiparasitarios (Doughari et al, 2012; Katalinic et al, 2013). Específicamente, Xiu-Li et al (2013) comprobaron que la inhibición del crecimiento de cepas de *E. coli* O157:H7 se debe a la interrupción de la función de la membrana plasmática por la presencia de taninos condensados que producen daño en la bicapa lipídica, lo que lleva a un aumento en la permeabilidad de la membrana y muerte celular.

Si bien la actividad antimicrobiana de los extractos de *P. alba* y *Z. mistol* en concentraciones no citotóxicas, no fue suficiente para inhibir el crecimiento de *E. coli* O157:H7, se determinó que los porcentajes de inhibición encontrados responden al contenido de compuestos fenólicos. Del análisis de la composición química por espectrofotometría y cromatografía, se estableció que los extractos vegetales que inhibieron entre el 20 y 25% el crecimiento de *E. coli* O157:H7, presentaron mayor contenido de polifenoles totales, siendo el extracto alcohólico de *P. alba* quien presentó además mayor contenido de flavonoides. Estos resultados sobre la composición de compuestos fenólicos encontrados en *Z. mistol* y *P. alba*, coinciden con los estudios realizados por Pelotto et al (2002) y Cardozo et al (2010) quienes confirmaron la presencia de taninos condensados, polifenoles totales y dos flavonoides (Quercetina y glicósido Rutin) en extractos de *Z. mistol* y *P. alba*.

Además de los esfuerzos para inhibir el crecimiento y desarrollo de *E. coli* O157:H7 con la aplicación de componentes de extractos vegetales, existe en la literatura

científica estudios sobre el uso de los mismos para inhibir la acción, producción y/o liberación de Verotoxina en modelos *in vitro* e *in vivo*. Se conoce que la capacidad de *E. coli* O157:H7 para causar enfermedad está relacionada con su capacidad para secretar esta toxina, el factor de virulencia central e indispensable de esta cepa para desarrollar SUH (Fernandez-Brando et al, 2011 a). En ensayos realizados sobre línea celular eucariota sensibles a VT, se ha demostrado que la muerte celular por apoptosis provocada por la toxina depende de la línea celular utilizada y varía con la sensibilidad o especificidad del ensayo empleado. En relación a esto la capacidad de la toxina de inducir apoptosis ha sido informada en diferentes tipos de celulares, incluyendo células Vero. Los primeros estudios describieron inhibición de la síntesis proteica e inactivación de la función ribosomal, mientras que, más recientemente, las investigaciones han indicado alteraciones en las vías redox con reducción de la actividad deshidrogenasa en células Vero como consecuencia de la exposición a VT (Inward et al 1995; Bouzari et al, 2009; Rasooly et al, 2010).

La citotoxicidad de VT sobre líneas celulares está ligada a la expresión del receptor Gb<sub>3</sub> en la superficie de las células blanco. El análisis estructural de la interacción entre VT y Gb<sub>3</sub> indicó que cada subunidad B se une al menos a 3 sitios de trisacáridos generando un total de 15 sitios por molécula de toxina. Una vez adherida la toxina a su receptor produce inhibición irreversible de la síntesis de proteínas induciendo apoptosis y muerte celular (Bauwens et al, 2013).

En base a lo expuesto, se evaluó la acción protectora de extractos vegetales de *P. alba* y *Z. mistol* frente a citotoxicidad de VT sobre línea celular eucariota sensible (células Vero), mediante 3 ensayos de incubación. Del análisis de viabilidad de células Vero frente a la acción de VT, se demostró que la incubación simultánea de los extractos vegetales con 1CC<sub>50</sub> de VT sobre las células, tuvo efecto poco significativo en la disminución de la citotoxicidad (9-18% de inhibición). El estudio de cinética de adhesión de VT a células Vero, demostró que la toxina una vez unida a sus receptores de membrana e interiorizada produce efecto citotóxico antes del minuto, por lo que los ensayos de pos-incubación con extractos vegetales no fueron efectivos. Sin embargo, la pre-incubación de los extractos de *P. alba* y *Z. mistol* en distintas concentraciones y en distintos solventes de extracción, inhibieron la citotoxicidad de VT hasta un 95%, siendo los extractos alcohólico de *P. alba* y acetónico de *Z. mistol*,

quienes presentaron el mayor efecto protector, con un 95% y 68% de inhibición respectivamente. Estos resultados de pre-incubación, sugieren que los extractos vegetales estarían ejerciendo acción directa sobre VT. Un estudio realizado sobre la producción de Productos Avanzados de Oxidación Proteica (AOPP) durante la incubación de VT con extractos vegetales, demostraron que extractos de *P. alba* y *Z. mistol* aumentaron los niveles de AOPP como consecuencia de un aumento de la degradación de la molécula proteica de la toxina, disminuyendo de esta manera su potencial efecto tóxico sobre células Vero (Pellarín et al, 2013). Estos resultados coinciden con estudios realizados por Habtemariam (2011), que proponen que los componentes aislados de extractos vegetales ejercen no solo acción antioxidante, sino también pro-oxidante de toxinas bacterianas. Por otra parte Quiñones et al (2009) demostraron que la incubación de extractos de uva con VT sobre células Vero-d2EGFP, disminuyó el daño citotóxico debido a posibles mecanismos como neutralización de VT antes del contacto celular, inhibición de la unión de la toxina a la célula huésped, alteraciones en el tráfico de la toxina o la translocación y la interrupción de las interacciones de la toxina-receptor.

Además de la inhibición de la acción citotóxica de VT sobre línea celular con la aplicación de extractos vegetales, se ha demostrado que los mismos son útiles para disminuir la producción y/o liberación de toxina. Se ha determinado que el extracto alcohólico de *Curtisia dentata* mostró además de actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7, disminución de la producción y expresión de los genes *vtx* de VT1 y VT2 (Doughari et al, 2012). Estudios realizados por Heredia et al (2005) sugirieron una inhibición de la producción y liberación de VT con concentraciones de 1, 2 o 3 mg/ml de extracto alcohólico de *Haematoxylon brasiletto*. Catequinas aisladas de té verde demostraron una inhibición de la liberación extracelular de VT de *E. coli* O157:H7 (Varavuthikunchai et al, 2004). En base a lo expuesto, se evaluó la actividad protectora de extractos de *P. alba* y *Z. mistol* frente a la producción y/o liberación de VT en cultivos con *E. coli* O157:H7, solos y combinados con ciprofloxacina, antibiótico comúnmente usado para el tratamiento del SUH. Los resultados sugirieron que si bien los extractos de *P. alba* y *Z. mistol* no presentaron efecto protector frente a la liberación de la toxina mediada por el antibiótico, si disminuyeron la citotoxicidad sobre células Vero cuando fueron cultivados solos con la cepa bacteriana, efecto que

puede demostrar una disminución en la producción y/o liberación de VT o en la acción directa de los extractos sobre la toxina ya producida por degradación de la molécula proteica (Bolatti et al, 2011), reforzando de esta manera el rol que desempeñan los mismos en la disminución de citotoxicidad de VT en células Vero.

En el estudio del tratamiento de infecciones por *E. coli* O157:H7, no solo ha sido investigada la utilización de extractos de origen vegetal, sino el uso de cepas probióticas por sus efectos benéficos en el tratamiento y modulación de la microflora intestinal, regulación inmunológica, tratamiento de enfermedades alérgicas, gastroenteritis aguda, colon irritable, cáncer de colon, constipación, entre otros (Sienzen et al, 2002; Servin y Coconnier, 2003; Calderón et al, 2007; Sarowska et al, 2013, Kim et al, 2013). Otros estudios determinan que los probióticos influyen en la regulación de la capacidad antioxidante de defensa del organismo (Kullisaar et al, 2003; Songisepp et al, 2005; Kmonickova et al, 2012). Se ha experimentado el uso de probióticos fundamentalmente en animales para reducir los reservorios de *E. coli* (Fairbrother y Nadeau, 2006). Existen antecedentes sobre la capacidad de interferir en el desarrollo de otras bacterias intestinales por parte de *Lactobacillus*, demostrándose inhibición de *E. coli* por parte de estas especies (Paraje et al, 2000). Cabe destacar que las bacteriocinas de cepas probióticas desempeñan un rol importante en la competencia contra microorganismos patógenos intestinales. Al respecto también se cuenta con antecedentes que indican a *Enterococcus* como productor de enterocinas con gran poder antibacteriano (Eraso y Albesa, 2004).

La utilización de microorganismos probióticos en la industria alimentaria ha tenido un gran incremento en las últimas décadas, especialmente su uso en productos obtenidos por procesos de fermentación. Esto ha llevado a la comunidad científica al estudio exhaustivo para la selección adecuada de microorganismos específicos con propiedades deseables, tales como la producción de bacteriocinas y exopolisacáridos (EPS) (Plessas et al, 2011). Numerosos estudios han definido propiedades antimicrobianas contra microorganismos patógenos gram positivos y gram negativos, debido al contenido de ácidos orgánicos, peróxido de hidrógeno, acetaldehído, dióxido de carbono y bacteriocinas producidos durante el proceso de fermentación (Farnworth, 2006; Ebringer et al, 2008; Guzel-Seydim et al, 2011). Mas precisamente, estudios realizados por Ulusoy et al (2007) demostraron que durante este proceso de

fermentación utilizando un cultivo comercial de kéfir en leche, se detectó actividad antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* ATCC 29213, *Bacillus cereus* ATCC 11778, *Salmonella enteritidis* ATCC 13076, *Listeria monocytogenes* ATCC 7644, y *E. coli* ATCC 8739. El kéfir es una bebida de leche fermentada producida por acción de bacterias y levaduras contenidas en los granos de kéfir. Esta biodiversidad de microorganismos, la variedad de compuestos bioactivos formados durante la fermentación y los beneficios estudiados en el kéfir, hacen de este producto lácteo fermentado un complejo probiótico (Guzel-Seydim et al, 2011). En base a estos estudios, se obtuvieron péptidos catiónicos de sobrenadante de leche fermentada a partir de granos de kéfir y se evaluó la actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7. Los péptidos obtenidos presentaron mayor porcentaje de inhibición del crecimiento de *E. coli* a pH 4-4,5. A concentraciones de 1,5, 0,75 y 0,32 mg/ml se obtuvieron un 96, 90 y 41% de actividad antimicrobiana, respectivamente. Los péptidos precipitados con sulfato de amonio al 40% inhibieron un 73 y 37% a una concentración de 1,6 y 0,8 mg/ml, respectivamente, mientras que al 60% de saturación solo se obtuvo una disminución del crecimiento de la cepa del 22% a una concentración proteica de 1,7 mg/ml. La incubación de péptidos catiónicos con tripsina, demostraron que los porcentajes de inhibición disminuyeron significativamente, corroborando la naturaleza proteica de los aislados de leche kefirada.

Con el fin de determinar si la actividad antimicrobiana encontrada contra *E. coli* O157:H7 es debida a péptidos catiónicos obtenidos de leche kefirada, se realizó la obtención de péptidos de leche entera comercial sin la fermentación con granos de kéfir y se compararon los resultados de inhibición del crecimiento de la bacteria patógena. Se confirmó que los péptidos obtenidos de leche entera comercial inhibieron un 37% el crecimiento de la cepa bacteriana, en comparación con el 73% obtenido con péptidos precipitados al 40% de leche kefirada, por lo que la actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 es debida fundamentalmente a la presencia de péptidos catiónicos producidos durante la fermentación de la leche con granos de kéfir.

Además de encontrar actividad antimicrobiana de péptidos obtenidos por precipitación salina, se observó que al agregarse una solución de ácido láctico equivalente a 11 °Dornic, el porcentaje de inhibición aumentó considerablemente en

los mismos inhibiendo un 73 y 78% el crecimiento de *E. coli*, por lo que pudo determinarse que la actividad antimicrobiana encontrada está mediada no solo por los péptidos catiónicos sino también por el contenido de ácido láctico, ambos presentes en la leche fermentada con granos de kéfir. Estudios realizados por Vandenberg (1993) demostraron que la producción de ácido láctico y acético por parte de cepas probióticas, producen disminución de la actividad bacteriana debido a una disminución del pH intracelular, ionización de protones en el citoplasma bacteriano e inhibición del metabolismo celular. Específicamente Ogawa et al (2001) demostraron que sobrenadantes de cultivo de *Lactobacillus lactis*, *casei* y *acidophilus*, redujeron el crecimiento de *E. coli* O157:H7, debido principalmente a la acción de ácido láctico no disociado presente en el medio de cultivo.

Si bien se sabe que los péptidos catiónicos son efectivos contra cepas biológicamente relacionadas, se ha demostrado que bacteriocinas de cepas gram positivas fueron efectivas para *E. coli* O157:H7, solo cuando se comprometió la integridad de la membrana plasmática de la cepa, después de shock osmótico, tratamiento con pH ácido, presencia de detergentes o agentes quelantes (Alakomi et al, 2003; Martinez et al, 2013). Grupos de investigación de Yang et al (2004), Hale y Hancock (2007), determinaron en sus trabajos que esta inhibición del crecimiento bacteriano por péptidos incluye múltiples mecanismos de acción como interacciones con la membrana celular, inhibición de la síntesis proteica y de ácidos nucleicos, funciones inmunomoduladoras y quimiotácticas. Estudios realizados por Mogna et al (2012) confirmaron in vitro que la actividad antimicrobiana de cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* contra *E. coli* O157:H7, era debido a la producción de una amplia variedad de bacteriocinas, péptidos catiónicos y aminos biógenas, responsables del daño bacteriano. Además Powell et al (2007) identificaron una bacteriocina de 3,5 kDa obtenida de cultivos de *Lactobacillus plantarum* ST8KF de aislados de granos de kéfir con actividad antimicrobiana contra cepas de *E. coli*.

Cabe destacar que la industria alimentaria tiene la alternativa de emplear biopreservadores para satisfacer las necesidades de los consumidores de obtener alimentos inocuos elaborados sin la adición de aditivos químicos artificiales (Devlieghere et al, 2004). Un ejemplo es la utilización de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* como bacteria ácido láctica con propiedades biopreservadoras,

capaz de producir nisina, una bacteriocina ampliamente usada en la industria alimentaria y reconocida como segura (GRAS, por sus siglas en inglés) por la Organización para la Agricultura y la Alimentación de las Naciones Unidas en 1969 (Thomas et al, 2000). Numerosos estudios han sido publicados reportando la eficacia de la nisina para inhibir el crecimiento de bacterias patógenas, como *L. monocytogenes*, *Clostridium* spp, *S. aureus* y *E. coli* O157:H7 (Rilla et al, 2003; Rodriguez et al, 2005). Teniendo en cuenta estos antecedentes, los resultados obtenidos en esta tesis doctoral constituyen un avance importante para la potencial utilización en la industria alimentaria de péptidos catiónicos obtenidos de leche fermentada con granos de kéfir como nuevos biopreservantes para mejorar la conservación, calidad y seguridad de los alimentos.

Numerosas investigaciones han enfocado su estudio en la neutralización de Verotoxina producida por *E. coli* O157:H7 y neutralización de la adhesión de esta cepa patógena a nivel intestinal. Específicamente, se ha comprobado que distintas cepas probióticas tienen capacidad anti-adherentes de patógenos y sus toxinas por un mecanismo de competencia con receptores de la pared intestinal (Gibson et al, 2003). Se ha demostrado que *Bifidobacterium longum* es capaz de neutralizar la acción de VT interfiriendo la unión de la subunidad B de la toxina al receptor específico celular Gb<sub>3</sub> (Kim et al, 2001). Tahamtan et al (2011) estudiaron sobre células Vero la acción protectora de cuatro cepas de Bifidobacterias contra VT de *E. coli* O157:H7, los resultados indicaron que la actividad de la toxina fue inhibida por las cepas probióticas dependiendo del momento de inoculación de la toxina sobre la línea celular.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral demostraron que en ensayos de pre-incubación de VT con EPS aislados de la matriz de los granos de kéfir, inhibieron la citotoxicidad sobre células Vero un 21%, y la co-incubación directa sobre la línea celular con EPS aislados de sobrenadante de leche kefirada inhibieron un 26%, en concentraciones de 10 mg/ml en ambos ensayos. Son escasos los trabajos científicos publicados sobre EPS aislados de kéfir y su acción sobre la citotoxicidad de VT en líneas celulares eucariotas, Kakisua et al, comprobaron que la cepa *Lactobacillus plantarum* aislado de kéfir reduce la actividad citotóxica de VT sobre línea celular eucariota, mediante un mecanismo de bloqueo de las subunidades B de la toxina mediada por proteínas de la pared celular del *Lactobacillus* (Kakisu et al, 2011; Kakisu et al, 2013).



Por otro lado, si bien los resultados de inhibición obtenidos en esta tesis son estadísticamente significativos, los EPS de leche kefirada no fueron más efectivos que los extractos vegetales de *P. alba* y *Z. mistol*.

Previo a la acción citotóxica producida por VT, el proceso de colonización de cepas de *E. coli* enterohemorrágicas en células mucosas de intestino grueso, consiste en la adherencia íntima de la bacteria a la célula epitelial, la iniciación de las señales de transducción, y la desorganización de las microvellosidades con la formación de la lesión AE (*Attaching and Effacing*), siendo el primer paso para el comienzo de la infección, secreción de VT y posterior desarrollo del SUH (Page et al, 2013).

Trabajos científicos han comprobado la capacidad de cepas probióticas viables de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* para inhibir la adhesión de cepas patógenas de *E. coli* por mecanismos de competencia por los receptores celulares intestinales (Hirano et al, 2003; Sherman et al, 2005; Chen et al, 2013), además de la utilización de prebióticos (Baines et al, 2011) y ensayos realizados en animales para evaluar la inhibición de adhesión a nivel intestinal (Takahashi et al, 2004; Yoshimura et al, 2010).

En esta tesis doctoral se evaluó la capacidad de inhibición de la adhesión de *E. coli* O157:H7 con exopolisacáridos obtenidos de leche kefirada sobre células epiteliales de adenocarcinoma colorectal (células Caco-2), como línea celular modelo de enterocitos humanos con propiedades de diferenciación y formación de un pseudoepitelio necesarios para ensayos de adhesión de cepas bacterianas (Santos et al, 2003; Servin y Coconnier, 2003; Farnworth, 2006).

Los resultados comprobaron que se logró la inhibición de la adhesión de *E. coli* O157:H7 sobre células Caco-2 dependiendo del EPSK utilizado, las concentraciones y momentos de incubación. Específicamente, la co y pre-incubación de concentraciones de 10 mg/ml EPSKL lograron reducir la adhesión bacteriana un 99% y 92%, respectivamente y la pre-incubación de EPSKG también mostró efecto protector de las células frente a *E. coli* inhibiendo su adhesión un 47% en la misma concentración. La pos-incubación de EPSKL y EPSKG sobre la línea celular no presentó inhibición de la adhesión de *E. coli* en ninguna de las concentraciones ensayadas, lo que determina que una vez que las bacterias están adheridas a las células Caco-2 no es posible revertir la adhesión con EPSK.

No se encuentra en la literatura científica estudios realizados para evaluar el contenido de EPS producidos en kéfir y la utilización de los mismos para la inhibición de *E. coli* O157:H7 sobre línea celular intestinal humana. Un estudio realizado con EPS obtenidos de una leche fermentada comercial escandilava denominada viili, determinaron que los mismos además de disminuir la adhesión de *Bifidobacterium lactis Bb12* y *Lactobacillus rhamnosus GG*, no modificaron la adhesión de cepas bacterianas patógenas como *E. coli* utilizando un modelo de mucus intestinal humano (Ruas-Madiedo et al, 2006 b). Siguiendo el mismo modelo celular, fracciones proteicas de EPS aislados de *B. longum* NB667, *B. animalis* IPLA-R1 y *Lactobacillus rhamnosus GG* aumentaron la adhesión de *E. coli* NCTC 8603, sugiriendo que componentes de la pared celular bacteriana se unen a EPS incrementando así la adhesión de la cepa patógena al moco intestinal (Ruas-Madiedo et al, 2006 a). Contrariamente, un estudio realizado por Kim et al (2008) determinó que EPS aislados de *L. acidophilus* inhibieron la adhesión de cepas de *E. coli* O157:H7 43889 y 43894 a células HT-29 en ensayos de co-incubación, demostrando además que el pre y co-tratamiento de *E. coli* con *L. acidophilus* viables y extractos celulares del probiótico, inhibieron significativamente la adhesión del patógeno por mecanismos de regulación del gen de MUC2 que secreta mucina y la expresión de citoquinas específicas.

Los resultados obtenidos en esta tesis doctoral demostraron la pre y co-incubación de EPS obtenidos de leche kefirada no solo disminuyeron la adhesión de *E. coli* O157:H7, siendo los EPSK obtenidos de sobrenadante más eficaces, sino que además ninguna de las concentraciones de EPSK en los distintos tiempos de incubación, modificaron la adhesión de cepas de *E. coli* ATCC 25922 no patógena para el hombre.

Cabe destacar que son pocos los estudios científicos realizados que evalúan las dosis de extractos (vegetales y microbianos) y el efecto citotóxico de los mismos sobre líneas celulares eucariotas, por lo que las concentraciones ensayadas *in vitro* podrían resultar perjudiciales para la posterior aplicación *in vivo*. En este sentido, resulta importante resaltar que los componentes obtenidos de *P. alba*, *Z. mistol*, péptidos catiónicos y EPSK fueron estudiados y utilizados en concentraciones no citotóxicas para línea celular eucariota (células Vero).

## CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS FUTURAS

Mediante la aplicación de las diferentes metodologías empleadas en la presente tesis doctoral, se obtuvieron resultados que permitieron cumplir con los objetivos planteados, confirmar la hipótesis de investigación y arribar a las siguientes conclusiones:

▶ Por los métodos de difusión en agar y CIM, no se detectó actividad antimicrobiana en los extractos vegetales, sin embargo por turbidometría se determinó que extracto alcohólico de *P. alba* inhibió un 25% el crecimiento de la cepa bacteriana tras la incubación durante 24 hs y los extractos acuoso y alcohólico de *Z. mistol* un 22 y 21%, respectivamente. Por espectrofotometría se determinó que estos extractos presentaron mayor contenido de polifenoles totales y flavonoides, por lo que la actividad antimicrobiana puede deberse a estos compuestos.

▶ Los péptidos catiónicos obtenidos de leche kefirada a pH 4-4,5 inhibieron el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en un 96 y 90% en concentraciones de 1,5 y 0,75 mg/ml, respectivamente. Péptidos precipitados con sulfato de amonio al 40% inhibieron un 73% a una concentración de 1,6 mg/ml. Se determinó que la actividad antimicrobiana encontrada no solo correspondía a péptidos catiónicos sino también a la presencia de ácido láctico en leche kefirada. Además el estudio de leche entera comercial sin la fermentación con granos de kéfir, permitió corroborar que los componentes obtenidos de leche kefirada son los responsables de la actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7.

▶ En ensayos de inhibición de citotoxicidad de VT en células Vero, la pre-incubación demostró que el extracto alcohólico de *P. alba* a una concentración de 2,45 mg/ml inhibió la citotoxicidad de VT un 95%, mientras que el extracto acetónico de *Z. mistol* a una concentración de 3,77 mg/ml inhibió un 68%, siendo los demás extractos también efectivos pero en menor porcentaje (entre un 45 y 55%). Esta capacidad de inhibición puede estar mediada por la interacción extracto-VT que produciría degradación de la molécula proteica de la toxina.

▶ En cuanto a componentes obtenidos de leche kefirada, el EPSKG inhibió la citotoxicidad de VT un 21% en ensayos de pre-incubación, mientras que co-incubando EPSKL se inhibió un 26%, ambos en concentraciones de 10 mg/ml.

► En ensayos de inhibición de adhesión de *E. coli* 157:H7 a células Caco-2, la co-incubación demostró que los EPSKL inhibieron un 99% la adhesión de la cepa bacteriana en concentraciones de 10 mg/ml, seguido de un 61% co-incubando 5 mg/ml. Pre-incubando 10 mg/ml de EPSKL y EPSKG sobre la línea celular, se inhibió la adhesión un 92% y 47%, respectivamente. Cabe destacar que en ensayos realizados con *E. coli* ATCC 25922, se determinó que la adhesión de esta cepa bacteriana saprófita para el hombre no fue afectada por la incubación de EPSK tanto de sobrenadante como de grano.

El estudio de la actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7, inhibición de la adhesión a nivel intestinal e inhibición de la citotoxicidad de VT como su principal factor de virulencia, resultan de vital importancia para la prevención y tratamiento del SUH en nuestro país. Los extractos obtenidos de harina de algarroba (*P. alba*) y café de mistol (*Z. mistol*) si bien no lograron disminuir el crecimiento de *E. coli* O157:H7 en cultivos de 24 hs de incubación, protegen a células eucariotas sensibles a la acción de VT, ya sea por inhibición de la liberación y/o producción de VT, interferencia con receptores de membrana o por la acción pro-oxidante de los extractos sobre la molécula proteica de la toxina. Del análisis de composición química de los extractos por espectrofotometría y cromatografía, los compuestos fenólicos podrían estar involucrados en esta acción protectora.

La inhibición de la adhesión de *E. coli* O157:H7 a línea celular intestinal con el uso de EPS de leche kéfirada, implican un avance en la prevención de la infección y posterior colonización de cepas de *E. coli* enterohemorrágica, interfiriendo en el primer paso necesario para el desarrollo del SUH. Además del aislamiento y utilización de EPS de kéfir, el estudio preliminar de péptidos catiónicos con actividad antimicrobiana contra *E. coli* O157:H7 resulta de gran importancia para su potencial utilización en la industria alimentaria como biopreservantes con el fin de mejorar la conservación, calidad y seguridad de los alimentos.

El presente trabajo de tesis doctoral representa un avance en el conocimiento de nuevas y potenciales alternativas para la prevención y tratamiento del SUH. Desde el enfoque de la Dietoterapia involucra la utilización de compuestos obtenidos de subproductos de plantas autóctonas en nuestro país, como *P. alba* y *Z. mistol*, además

de componentes de origen microbiano a partir de leche fermentada con granos de kéfir.

El estudio completo de la composición química de los componentes obtenidos tanto de origen vegetal como de origen microbiano y de las cepas microbianas productoras de péptidos catiónicos y EPSK, así como el análisis de los mecanismos de inhibición, son los nuevos ejes emergentes de estos estudios, para continuar en un futuro con la investigación de estos compuestos y la acción contra *E. coli* O157:H7.

**CAPÍTULO 5**  
**BIBLIOGRAFÍA**

Adeniyi CBA, Odumosu BT, Aiyelaagbe OO, Kolude B. In-vitro antimicrobial activities of metanol extracts of *Zanthoxylum xanthoxyloides* and *Pseudo cedrelakotschyi*. Afr. J. Biomed. Res. 2010;13:61-68.

Alakomi HL, Skyttä E, Saarela M, Mattila-Sandholm T, Latva-Kala K, Helander IM. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. App Environ Microbiol. 2000;66:2001-2005.

Albrecht C, Pellarin G, Baroneti J, Rojas MJ, Albasa I, Eraso AJ. Chemiluminescence determination of antioxidant property of *Ziziphus mistol* and *Prosopis alba* during oxidative stress generated in blood by Hemolytic Uremic Syndrome-producing *Escherichia coli*. Luminiscence. 2010;26(6):424-8.

Alonso J, Desmarchelier C. 2005. Plantas medicinales autóctonas de la Argentina. *LOLA (Literature of Latin America)*, Buenos Aires, Argentina.

Alzate Tamayo LM, Arteaga González DM, Jaramillo Garcés Y. Propiedades farmacológicas del Algarrobo (*Hymenaea courbaril Linneaus*) de interés para la industria de alimentos. Rev Lasallista Invest. 2008;5(2):100-111.

Argentina. Instituto Nacional de Estadísticas y Censos. Tasa de notificación del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina (2005-2010), junio 2011. Buenos Aires: Ministerio de Salud de la Nación; 2011.

Baines D, Erb S, Lowe R, Turkington K, Sabau E, Kuldau G, Juba J, Masson L, Mazza A, Roberts R. A prebiotic, Celmanax™, decreases *Escherichia coli* O157:H7 colonization of bovine cells and feed-associated cytotoxicity in vitro. BMC Res Notes. 2011;4:110-15.

Bauwens A, Betz J, Meisen I, Kemper B, Karch H, Müthing J. Facing glycosphingolipid-Shiga toxin interaction: dire straits for endothelial cells of the human vasculature. Cell Mol Life Sci. 2013;70(3):425-57.

Bensmira M, Nsabimana C, Jiang B. Effects of fermentation conditions and homogenization pressure on the rheological properties of kefir. Lebenson Wiss Technol. 2010;43:1180-1184.

Bergan J, Dyve Lingelem AB, Simm R, Skotland T, Sandvig K. Shiga toxins. Toxicon. 2012;60(6):1085-107.

Bernardi C, Drago S, Sabbag N, Sanchez H, Freyre M. Formulation and sensory evaluation of *Prosopis alba* (Algarrobo) pulp cookies with increased iron and calcium dialyzabilities. *Plant Foods Hum Nutr.* 2006;61(1):39-44.

Blanco J, Blanco M, Blanco JE, Mora A, Alonso MP, González EA, Bernárdez MI. Enterobacterias: características generales. Género *Escherichia*. En: Vadillo S, Píriz S, Mateos E. *Manual de Microbiología Veterinaria*. Madrid, España: McGraw-Hill Interamericana; 2001. 301-325 p.

Bolatti YD, Lazzaretti N, Meler PG, Salcedo Corallo M. Efectos de los extractos de Granada, Algarroba y Mistol sobre la producción/liberación de toxina de *Escherichia coli* enterohemorrágica, y de sus combinaciones con antibióticos. [Tesina de grado]. Córdoba: Escuela de Nutrición; 2011.

Borenfreund E, Puerner JA. Toxicity determined in vitro by morphological alterations and neutral red absorption. *Toxicol Lett.* 1985;24(2-3):119-124.

Bouzari S, Oloomi M, Azadmanesh K. Study on induction of apoptosis on HeLa and Vero cells by recombinant shiga toxin and its subunits. *Cytotechnol.* 2009;60:105-113.

Bouzari S, Oloomi M, Azadmanesh K. Study on induction of apoptosis on HeLa and Vero cells by recombinant shiga toxin and its subunits. *Cytotechnol.* 2009;60(1-3):105-113.

Breusegem SY, Clegg RM, Loontjens FG. Base-sequence specificity of Hoechst 33258 and DAPI binding to five (A/T)<sub>4</sub> DNA sites with kinetic evidence for more than one high-affinity Hoechst 33258-AATT complex. *J Mol Biol.* 2002;315(5):1049-61.

Bustamante AV, Sanso AM, Parma AE, Lucchesi PM. Subtyping of STEC by MLVA in Argentina. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:111.

Calderón O, Padilla C, Chavez C, Villalobos L, Arias ML. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. *ALAN.* 2007;57(1):51-56.

Caprioli A, Morabito S, Brugere H, Oswald E. Enterohaemorrhagic *Escherichia coli*: emerging issues on virulence and modes of transmission. *Vet Res.* 2005;36:289-311.

Cardozo ML, Ordoñez RM, Zampini IC, Cuello AS, Dibenedetto G, Isla MI. Evaluation of antioxidant capacity, genotoxicity and polyphenol content of non conventional foods: *Prosopis* flour. *Food Res Int.* 2010;43(5):1505-10.



Casla D, Requena T, Gómez R. Antimicrobial Activity of lactic acid bacteria isolated from goat's milk and artisanal cheeses: characteristics of a bacteriocin produced by *Lactobacillus curvatus* IFPL105. *J Applied Bacteriol.* 1996;81:35-41.

Ceapa C, Wopereis H, Rezaiki L, Kleerebezem M, Knol J, Oozeer R. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2013;27(1):139-55.

Chekabab SM, Paquin-Veillette J, Dozois CM, Harel J. The ecological habitat and transmission of *Escherichia coli* O157:H7. *FEMS Microbiol Lett.* 2013;341(1):1-12.

Chen YP, Lee TY, Hong WS, Hsieh HH, Chen MJ. Effects of *Lactobacillus kefiranofaciens* M1 isolated from kefir grains on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection using mouse and intestinal cell models. *J Dairy Sci.* 2013;96(12):7467-77.

Chinen I, Epszteyn S, Melamed CL, *et al.* Shiga toxin producing *Escherichia coli* O157 in beef and chicken burgers, and chicken carcasses in Buenos Aires, Argentina. *Int J Food Microbiol.* 2009;132:167-71.

Colares MN, Arambarri AM. *Ziziphus mistol* (Rhamnaceae): Morfo-anatomía y Arquitectura foliar. *Acta Farm Bonaer.* 2008;27:568-77.

D'Souza AL, Rajkumar C, Cooke J, Bulpitt CJ. Probiotics in prevention of antibiotic associated diarrhoea: meta-analysis. *BMJ.* 2002;324(7350):1361.

Dai C, Zheng CQ, Jiang M, Ma XY, Jiang LJ. Probiotics and irritable bowel syndrome. *World J Gastroenterol.* 2013;19(36):5973-8.

De la Peña MR, Pensiero JF. 2004. Plantas argentinas. Catálogo de nombres vulgares. *LOLA (Literature of LatinAmerica)*, Buenos Aires, Argentina.

De Moreno de LeBlanc A, Matar C, Farnworth E, Perdigon G. Study of immune cells involved in the antitumor effect of kefir in a murine breast cancer model. *J Dairy Sci.* 2006;90:1920-28.

De Vuyst L, Leroy F. Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria: Production, purification, and food applications. *J Mol Microbiol Biotechnol.* 2007;13:164-199.

Demaió P, Karlin UO, Medina M. 2002. Árboles nativos del centro de Argentina. *LOLA (Literature of LatinAmerica)*, Buenos Aires, Argentina.

Devlieghere F, Vermeiren L, Debevere J. New preservation technologies: Possibilities and limitations. *Int Dairy J.* 2004;14:273-285.

Dewanto VX, Wukk Adom R, Liu H. Thermal processing enhances the nutritional value of tomatoes by increasing total antioxidant activity. *J Agric Food Chem.* 2002;50:3010-3014.

Doughari JH, Ndakidemi PA, Human IS, Benade S. Antioxidant, antimicrobial and antiverotoxic potentials of extracts of *Curtisia dentata*. *J Ethnopharmacol.* 2012;141:1041-1050.

Doughari JH, Ndakidemi PA, Human IS, Bennade S. Phytochemicals as chemotherapeutic agents and antioxidants: possible solution to the control of antibiotic resistant verocytotoxin producing bacteria. *J Med Plant Res.* 2009;3:839-848.

Douglas LC, Sanders ME. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. *J Am Diet Assoc.* 2008;108:510-21.

Dubois M, Gilles KA, Hamilton JK, Rebers PA, Smith F. Colorimetric methods for determination of sugars and related substances. *Anal Chem.* 1956;28:350-355.

Ebringer L, Ferencík M, Krajcovic J. Beneficial Health Effects of Milk and Fermented Dairy Products Review. *Folia Microbiol.* 2008;53(5):378-394.

Egly Feresin G, Tapia A, López SN, Zacchino SA. Antimicrobial activity of plants used in traditional medicine of San Juan province, Argentine. *J Ethnopharmacol.* 2001;78:103-107.

Eraso AJ, Albesa I. Bacteriocin of *Enterococcus* from lactoserum able to cause oxidative stress in *Staphylococcus aureus*. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;314:897-901.

Fagundo JCJ, Delgado Ginebra Y, Castillo González D, *et al.* Síndrome Hemolítico Urémico. *Rev Cubana Hematol Inmunol Hemoter.* 2003;19:2-3.

Fairbrother JM, Nadeau E. *Escherichia coli*: on-farm contamination of animals. *Rev Sci Tech.* 2006;25(2):555-69.

Farnworth ER. Kefir a complex probiotic. En: *Food Science and Technology Bulletin. Functional Foods.* USA: International Food Information Service; 2006. 1-19 p.

Felker P, Grados N, Cruz G, Prokopiuk DB. Economic assessment of production of flour from *Prosopis alba* and *Prosopis pallid* pods for human food applications. *J Arid Environ.* 2003;53(4):517-528.

Ferens WA, Hovde CJ. *Escherichia coli* O157:H7: animal reservoir and sources of human infection. *Foodborne Pathog Dis.* 2011;8(4):465-87.

Fernandez-Brando RJ, Bentancor LV, Mejías MP, *et al.* Antibody response to Shiga toxins in Argentinean children with enteropathic Hemolytic Uremic Syndrome at acute and long-term follow-up periods. PLoS One. 2011 (a);6:19-136.

Fernandez-Brando RJ, Bentancor LV, Mejías MP, Panek AC, Cabrera GG, Exeni RA, Palermo MS. Actualización en el tratamiento del Síndrome Urémico Hemolítico endémico. Patogénesis y tratamiento de la complicación sistémica más grave de las infecciones por *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Rev Medicina (Buenos Aires). 2011 (b);71:383-389.

García Garibay M, Revah MS, Gomez Ruiz L. Productos Lácteos. En: Grupo Noriega editores. Biotecnología Alimentaria. México: Limusa SA; 2004. 153-224.

Gasser C, Gautier E, Steck A, *et al.* Hämolytisch urämische Syndrome: bilateral Niernenrindennekrosen bei acute erworbenen hämolitischen Anämien. Schweizer Med Wochenschr. 1955;85:905-9.

Gianantonio C, Vitacco M, Mendilaharzu F, Rutty A, Mendilaharzu J. The Hemolytic-Uremic Syndrome. J Pediatr. 1964; 64: 478-91.

Gibson GR, Rastall RA, Fuller R. The Health benefits of probiotics and prebiotics. En: Blackwell Publishing Ltd. Gut Flora, Nutrition, Immunity and Health. USA: Fuller R, Perdígón G; 2003. 52-75 p.

Gill H, Prasad J. Probiotics, immunomodulation, and health benefits. Adv Exp Med Biol. 2008;606:423-54.

Goldstein J, Loidl CF, Pistone Creydt V, Boccoli J, Ibarra C. Intracerebro ventricular administration of shiga toxin type 2 induces striatal neuronal death and glial alterations: an ultrastructural study. Brain Res. 2007;1161:116-119.

Goleniowski ME, Bongiovanni GA, Palacio L, Nuñez CO, JJ Cantero. Review. Medicinal plants from the "Sierra de Comechingones", Argentina. J Ethnopharmacol. 2006;107(3):324-341.

Gorret N, Maubois J, Engasser, J, Ghould, M. Study of the effects of temperature, PH and yeast extract on the growth and Exopolisacharides production by *Propionibacterium Acidipropinici* on milk microfiltrate using a reponse surface methodology. J Applied Microbiol. 2001;90(5):788-796.

Gouali M, Weill FX. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* (EHEC): topical enterobacteriaceae. Presse Med. 2013;42(1):68-75.

Greally P, Hampton FJ, MacFadyen UM y Simpson H. Gaviscon and Carobel compared with cisapride in gastro-oesophageal reflux. *Arch Dis Child*. 1992;67:618-621.

Guzel-Seydim ZB, Kök-Tas T, Greene AK, Seydim AC. Review: Functional Properties of Kefir. *Crit Rev Food Sci Nutr*. 2011;51(3):261-268.

Gyles CL. Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: An overview. *J Anim Sci*. 2007;85:45-62.

Habtemariam S. Methyl-3-O-methyl gallate and gallic acid from the leaves of *Peltiphyll lumpeltatum*: isolation and comparative antioxidant, prooxidant, and cytotoxic effects in neuronal cells. *J Med Food*. 2011;14(11):1412-8.

Hale JDF, Hancock REW. Alternative mechanisms of action of cationic antimicrobial peptides on bacteria. *Exprt Rev Anti Infect Ther*. 2007;5:951-9.

Heredia N, Escobar M, Rodriguez Padilla C, García S. Extracts of *Haematoxylon brasiletto* inhibit growth, verotoxin production, and adhesion of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to HeLa cells. *J Food Prot*. 2005;68(7):1346-51.

Hernandez T, Canales M, Teran B, *et al*. Antimicrobial activity of the essential oil and extracts of *Cordia curassavica* (Boraginaceae). *J Ethnopharmacol*. 2007;111:137-141.

Hirano J, Yoshida T, Sugiyama T, Koide N, Mori I, Yokochi T. The effect of *Lactobacillus rhamnosus* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection of human intestinal cells in vitro. *Microbiol Immunol*. 2003;47:405-409.

Ibarra C, Goldstein J, Silberstein C, Zotta E, Belardo M, Repetto HA. Hemolytic uremic syndrome caused by enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Arch Argent Pediatr*. 2008;106(5):435-442.

Ichinohe N, Ohara-Nemoto Y, Nemoto TK, Kimura S, Ichinohe S. Effects of fosfomicin on Shiga toxin-producing *Escherichia coli*: quantification of copy numbers of Shiga toxin-encoding genes and their expression levels using real-time PCR. *J Med Microbiol*. 2009;58:971-973.

Instituto Nacional de Enfermedades Infecciosas - Administración Nacional de Laboratorios e Institutos de Salud "Dr. Carlos G. Malbrán", Servicio de Fisiopatogenia, Sociedad Argentina de Pediatría - Comité de Nefrología. Buenos Aires; 2007.

Inward CD, Williams J, Chant I, Crocker J, Milford DV, Rose PE, Taylor CM. Verocytotoxin-1 induces apoptosis in Vero cells. *J Infect.* 1995;30:213-218.

István S, Ka'polna E, Ka'polna B, Lugasi A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance A review. *Appetite.* 2008;51:456-467.

Juarez de Galindez M, *et al.* Ecuaciones altura-diámetro para *Ziziphus mistol*, Griseb. En: Santiago del Estero, Argentina. *Quebracho (Santiago del Estero)* [online]. 2006, n.13 [citado 2013-05-14], pp. 36-43. Disponible en: [http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S1851-30262006000100005&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-30262006000100005&lng=es&nrm=iso). ISSN 1851-3026.

Kakisu E, Abraham AG, Tironi Farinati, Ibarra C, De Antoni GL. *Lactobacillus plantarum* isolated from kefir protects vero cells from cytotoxicity by type-II shiga toxin from *Escherichia coli* O157:H7. *J Dairy Res.* 2013;80(1):64-71.

Kakisu E, Irigoyen A, Torre P, De Antoni GL, Abraham AG. Physicochemical, microbiological and sensory profiles of fermented milk containing probiotic strains isolated from kefir. *J Dairy Res.* 2011;78(4):456-63.

Kalim MD, Bhattacharyya D, Banerjee A, Chattopadhyay S. Oxidative DNA damage preventive activity and antioxidant potential of plants used in Unani system of medicine. *Altern Complement Med.* 2010;10:2-11.

Kaplan BS, Drummond KN. The Hemolytic-Uremic Syndrome is a Syndrome. *N. Engl. S. Med.* 1978;298:964.

Karmali MA, Gannon V, Sargeant JM. Verocytotoxin-producing *Escherichia coli* (VTEC). *Vet Microbiol.* 2010;140:360-370.

Karmali MA, Mascarenhas M, Shen S, *et al.* Association of genomic O island 122 of *Escherichia coli* EDL 933 with verocytotoxin-producing *Escherichia coli* seropathotypes that are linked to epidemic and/or serious disease. *J Clin Microbiol.* 2003;41:4930-40.

Karmali MA, Steele BT, Petric M., Lim C. Sporadic cases of hemolytic-uremic syndrome associated with faecal verotoxin and cytotoxin producing *Escherichia coli* in stools. *Lancet* 1983;1:619-29.

Katalinic V, Mozina SS, Generalic I, Skroza D, Ljubenkovic I, Klančnik A. Phenolic profile, antioxidant capacity, and antimicrobial activity of leaf extracts from six vitis vinifera L. varieties. *Int J Food Prop.* 2013;16:45-60.

Kauffmann F. The serology of the coli group. *J. Immunol.* 1947;57:71-100.

Keir LS, Marks SD, Kim JJ. Shiga toxin-associated hemolytic uremic syndrome: current molecular mechanisms and future therapies. *Drug Des Devel Ther.* 2012;6:195-208.

Kim HJ, Kim HY, Lee SY, Seo JH, Lee E, Hong SJ. Clinical efficacy and mechanism of probiotics in allergic diseases. *Korean J Pediatr.* 2013;56(9):369-376.

Kim JU, Kim Y, Han KS, Oh S, Whang KY, Kim JN, Kim SH. Function of cell bound and released exopolysaccharides produced by *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 9595. *J Microbiol Biotechnol.* 2006;16:939-945.

Kim SH, Yang SJ, Koo HC, Bae WK, Kim JY, Park JH, Baek YJ, Park YH. Inhibitory activity of *Bifidobacterium longum* HY8001 against Vero cytotoxin of *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot.* 2001;64(11):1667-73.

Kim TJ, Weng WL, Stojanovic J, Jung YS, Silva JL. Antimicrobial effect of water-soluble muscadine seed extracts on *Escherichia coli* O157:H7. *J Food Prot.* 2008;71:1465-68.

Kim Y, Kim SH, Whang KY, Kim YJ, Oh S. Inhibition of *Escherichia coli* O157:H7 attachment by interactions between lactic acid bacteria and intestinal epithelial cells. *J Microbiol Biotechnol.* 2008;18(7):1278-85.

Klancnik A, Piskernik S, Jeršek B, Smole Možina S. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antimicrobial activity of plant extracts. *J Microbiol Meth.* 2009;81:121-186.

Kmonickova E, Kverka M, Tlaskalová-Hogenová H, Kostecka P, Zidek Z. Stimulation of nitric oxide, cytokine and prostaglandin production by low-molecular weight fractions of probiotic *Lactobacillus casei* lysate. *Neuro Endocrinol Lett.* 2012;33(3):166-72.

Kök-Tas T, Seydim AC, Özer B, Guzel-Sedym Z. Effects of different fermentation parameters on quality characteristics of kéfir. *J Dairy Sci.* 2013;96:780-789.

Konowalchuk J, Speirs JI, Stavric S. Vero response to a cytotoxin of *Escherichia coli*. *Infect. Immunity.* 1977;18:775-9.

Kullisaar T, Songisepp E, Mikelsaar M, Zilmer K, Vihalemm T, Zilmer M. Antioxidative probiotic fermented goats' milk decreases oxidative stress-mediated atherogenicity in human subjects. *Br J Nutr.* 2003;90(2):449-456.

Kwon Y, Apostolidis E, Shetty K. Anti-diabetes functionality of kefir culture-mediated fermented soymilk supplemented with rhodiola extracts. *Food Biotechnol.* 2006;20:13-29.

Lilley DM, Stillwell RH. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. *Science.* 1965;147:747-748.

Line JE, *et al.* Isolation and Purification of Enterocin E-760 with broad antimicrobial activity against gram-positive and gram-negative bacteria. *Antimicrob agents Chem.* 2008;52(3):1094-100.

Loeb H, Vandenplas Y, Würsch P y Guesry P. Tannin-rich carob pod for the treatment of acute-onset diarrhea. *J Pediatr Gastroenterol Nutr.* 1989;8:480-485.

Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ. *J Biol Chem.* 1951;193:265-275.

Martinez RC, Wachsmann M, Torres NI, LeBlanc JG, Todorov SD, Franco BD. Biochemical, antimicrobial and molecular characterization of a noncytotoxic bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* ST71KS. *Food Microbiol.* 2013;34(2):376-81.

Mayer CL, Leibowitz CS, Kurosawa S, Stearns-Kurosawa DJ. Shiga toxins and the pathophysiology of hemolytic uremic syndrome in humans and animals. *Toxins (Basel).* 2012;4(11):1261-87.

Medrano M, Pérez PF, Abraham AG. Kefiran antagonizes cytopathic effects of *Bacillus cereus* extracellular factors. *Int J Food Microbiol.* 2008;122:1-2.

Meichtri L, Miliwebsky E, Gioffre A, *et al.* Shiga toxin producing *Escherichia coli* in healthy young beef steers from Argentina: prevalence and virulence properties. *Int J Food Microbiol.* 2004;96:189-98.

Miliwebsky E, Deza N, Chinen I, *et al.* Prolonged fecal shedding of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* among children attending day-care centers in Argentina. *Rev Argent Microbiol.* 2007;39:90-2.

Mogna L, Del Piano M, Deidda F, Nicola S, Soattini L, Debiaggi R, Sforza F, Strozzi G, Mogna G. Assessment of the In Vitro Inhibitory Activity of Specific Probiotic Bacteria Against Different *Escherichia coli* Strains. *J Clin Gastroenterol.* 2012;46:29-32.

Moura-Costa GF, Nocchi SR, Ceole LF, Mello JCP, Nakamura CV, Dias Filho BP, Temponi LG, Ueda-Nakamura T. Antimicrobial activity of plants used as medicinals on

an indigenous reserve in Rio das Cobras, Paraná, Brazil. *J Ethnopharmacol.* 2012;143:631-638.

Myers D. Probiotics. *J Exotic Pet Med.* 2007;16:195-7.

Naczka M, Shahidib F. Extraction and analysis of phenolics in Food. *J Chromatogr.* 2004;1054:95-111.

Nakajima H, Katagiri YU, Kiyokawa N, *et al.* Single-Step Method for Purification of Shiga Toxin-1 B Subunit Using Receptor-Mediated Affinity Chromatography by Globotriaosylceramide-Conjugated Octyl Sepharose CL-4B. *Protein Expr Purif.* 2001;22:267-275.

Neill MA, Tarr PI, Clausen CR, *et al.* *Escherichia coli* O157:H7 as the predominant pathogen associated with the hemolytic uremic syndrome: a prospective study in the Pacific Northwest. *Pediatrics.* 1987;80:37-40.

Nishikawa K, Matsuoka K, Watanabe M, *et al.* Identification of the optimal structure required for a Shiga toxin neutralizer with oriented carbohydrates to function in the circulation. *J Infect Dis.* 2005;191:2097-105.

O'Brien AD, LaVeck GD. Purification and characterization of a Shigella dysenteriae 1-like toxin produced by *Escherichia coli*. *Infect Immun.* 1983;40(2):675-683.

Ogawa M, Shimizu K, Nomoto K, Tanaka R, Hamabata T, Yamasaki S, Takeda T, Takeda Y. Inhibition of in vitro growth of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7 by probiotic *Lactobacillus* strains due the production of lactic acid. *Int J Food Microbiol.* 2001;68(1-2):135-140.

Oteiza JM, Chinen I, Miliwebsky E, Rivas M. Isolation and characterization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* from precooked sausages (morcillas). *Food Microbiol.* 2006;23:283-8.

Otes S, Cagindi O. Kefir: A Probiotic Dairy-Composition, Nutritional and Therapeutic Aspects. *Pakistan J Nutr.* 2003;2(2):54-59.

Pacheco AR, Sperandio V. Shiga toxin in enterohemorrhagic *E. coli*: regulation and novel anti-virulence strategies. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:81.

Page AV, Liles WC. Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Infections and the Hemolytic-Uremic Syndrome. *Med Clin North Am.* 2013;97(4):681-95.

Palermo MS, Exeni RA, Fernández GC. Hemolytic uremic syndrome: pathogenesis and update of interventions. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2009;7(6):697-707.



Panos GZ, Betsi GI, Falagas ME. Systematic review: are antibiotics detrimental or beneficial for the treatment of patients with *Escherichia coli* O157:H7 infection? *Aliment Pharmacol Ther.* 2006;24(5):731-42.

Paraje MG, Albesa I, Eraso AJ. Conservation in probiotic preparations of *Lactobacillus* with inhibitory capacity on other species. *New Microbiol.* 2000;23:423-431.

Parma AE, Sanz ME, Blanco JE, *et al.* Virulence genotypes and serotypes of verotoxigenic *Escherichia coli* from cattle and foods in Argentina. *Eur J Epidemiol.* 2000;16:757-62.

Paton AW, Morona R, Paton JC. Neutralization of Shiga toxins Stx1, Stx2c, and Stx2e by recombinant bacteria expressing mimics of globotriose and globotetraose. *Infect Immun.* 2001;69:1967-70.

Pellarín MG, Albrecht C, Rojas MJ, Aguilar JJ, Königheim BS, Paraje MG, Albesa I, Eraso AJ. Inhibition of Cytotoxicity of Shiga toxin of *Escherichia coli* O157:H7 on Vero cells by *Prosopis alba* Griseb (*Fabaceae*) and *Ziziphus mistol* Griseb (*Rhamnaceae*) extracts. *J Food Prot.* 2013;76(10):1733-9.

Pelotto JP, Del Pero de Martinez MA. Chemical defenses in the tree *Ziziphus mistol* against the leaf-cutting ant *Acromyrmex striatus*. *Ecol Austral.* 2002;12:11-18.

Pennington H. *Escherichia coli* O157. *Lancet.* 2010;376:1428-35.

Pinto Vitorino G, Toledo IB, Córdoba OL, Flores ML y Cabrera JL. Análisis fitoquímico de *Colliguaya integerrima* (Hook.) Gill. et Hook. (*Euphorbiaceae*), una planta de la Patagonia Argentina. *Acta Farm Bonaer.* 2004; 23: 459-465.

Pistone Creydt V, Nuñez P, Zotta E, Ibarra C. Efecto Citotóxico de la Toxina Shiga tipo 2 y su subunidad B en células epiteliales tubulares renales humanas en cultivo. *Rev Medicina (Buenos Aires).* 2005;65:147-150.

Piyaman S, Vuthikunchai V, Suwalak S. Antibacterial activities of semipurified fractions of *Quersus Infectoria* against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 and its verocytotoxic production. *J Food Prot.* 2008;71:1223-1227.

Plessas S, Alexopoulos A, Voidarou C, Stavropoulou E, Bezirtzoglou E. Microbial ecology and quality assurance in food fermentation systems. The case of kefir grains application. *Anaerobe.* 2011;17(6):483-5.

Powell JE, Witthuhn RC, Todorov SD, Dicks LMT. Characterization of bacteriocin ST8KF produced by a kefir isolate *Lactobacillus plantarum* ST8KF. *Int Dairy J.* 2007;17:190-198.

Prokopiuk DB, Cruz D, Grados N, Garro O, Chirat A. Estudio comparativo entre frutos de *Prosopis alba* y *Prosopis pallida*. *Multequina.* 2000;9(1):35-45.

Prokopiuk DB. Sucedáneo del café a partir de algarroba (*Prosopis alba* Griseb). [Tesis Doctoral] Valencia, España: Universidad Politécnica de Valencia; 2004.

Pruimboom-Brees IM, *et al.* Cattle lack vascular receptors for *Escherichia coli* O157:H7 Shiga toxins. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(19):10325-29.

Quiñones B, Massey S, Friedman M, Swimley MS, Teter K. Novel cell-based method to detect Shiga Toxin 2 from *Escherichia coli* O157:H7 and inhibitors of toxin activity. *App Environm Microbiol.* 2009;1410-16.

Rahal EA, Kazzi N, Nassar FJ, Matar GM. *Escherichia coli* O157:H7-Clinical aspects and novel treatment approaches. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:138.

Rahal EA, Kazzi N, Nassar FJ, Matar GM. *Escherichia coli* O157:H7-Clinical aspects and novel treatment approaches. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012;2:138.

Rasooly R, Do PM, Levin CE, Friedman M. Inhibition of Shiga toxin 2 (Stx2) in apple juices and its resistance to pasteurization. *J Food Sci.* 2010;75(5):296-301.

Riley LW, Remis RS, Helgerson, *et al.* Hemorrhagic colitis associated with a rare *Escherichia coli* O157:H7 serotype. *N Engl J Med.* 1983;308:681-85.

Rilla N, Martínez B, Delgado T, Rodríguez A. Inhibition of *Clostridium tyrobutyricum* in Vidiago cheese by *Lactococcus lactis ssp. lactis* IPLA 729, a nisin Z producer. *Int J Food Microbiol.* 2003;85(1-2):23-33.

Rivas M, Caletti MG, Chinen I, *et al.* Home-prepared hamburger and sporadic hemolytic uremic syndrome, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2003; 9: 1184-6.

Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, Deza N, Leotta GA. Epidemiología del Síndrome Urémico Hemolítico en Argentina. Diagnóstico del agente etiológico, reservorios y vías de transmisión. *Rev Medicina (Buenos Aires).* 2006 (a);66(3):27-32.

Rivas M, Miliwebsky E, Chinen I, *et al.* Characterization and epidemiologic subtyping of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains isolated from hemolytic uremic syndrome and diarrhea cases in Argentina. *Foodborne Pathog Dis.* 2006 (b);3:88-96.

Rivas M, Miliwebsky E, Deza N. Manual de Procedimientos: Diagnóstico y caracterización de *Escherichia coli* productor de toxina Shiga. Buenos Aires: INEI-ANLIS “Carlos Malbrán”; 2011.

Rivas M, Sosa-Estani S, Rangel J, et al. Risk factors for sporadic Shiga Toxin-producing *Escherichia coli* infections in children, Argentina. *Emerg Infect Dis.* 2008; 14: 763-71.

Rodriguez E, Calzada J, Arqués J, Rodriguez J, Nuñez M, Medina M. Antimicrobial activity of pediocin-producing *Lactococcus lactis* on *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* O157:H7 in cheese. *Int Dairy J.* 2005;15:51-57.

Roig F. 1993. Aportes a la Etnobotánica del Género *Prosopis*. En: Instituto Argentino de Investigaciones de las Zonas Áridas (eds). Conservación y Mejoramiento de Especies del Género *Prosopis*. Quinta Reunión Regional para América Latina y el Caribe de la Red de Forestación del Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo, Mendoza, 99-119 p.

Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Margolles A, Reyes-Gavilán, Sgreyes-Gavilá N, Salminen S. Exopolysaccharides produced by probiotic strains modify the adhesion of probiotics and enteropathogens to human intestinal mucus. *J Food Prot.* 2006 (a);69(8): 2011-15.

Ruas-Madiedo P, Gueimonde M, Reyes-Gavilán CG, Salminen S. Short Communication: Effect of Exopolysaccharide isolated from “Viili” on the adhesion of probiotics and pathogens to intestinal mucus. *J Dairy Sci.* 2006 (b);89(7):2355-58.

Ruiz G. Utilidad de los antibióticos para prevenir el síndrome urémico hemolítico en pacientes con diarrea sanguinolenta. *Archivos de medicina familiar y general [en línea]* 2005 [10 de enero de 2013]; 1: (40-44). URL disponible en: [http://www.famfyg.org.ar/revista/revista\\_famfyg/volumen1/numero2/v1\\_nro2\\_p40-45.pdf](http://www.famfyg.org.ar/revista/revista_famfyg/volumen1/numero2/v1_nro2_p40-45.pdf)

Ruiz-Roso B, Quintela JC, De la Fuente E, Haya J y Pérez-Olleros L. Insoluble carob fiber rich in polyphenols lowers total and LDL cholesterol in hypercholesterolemic subjects. *Plant Foods Hum Nutr.* 2010;65:50-56.

Salamanca Grosso G, Correa Carvajal IL, Principal. Flavonoids profile and oxidation indexes for some Colombian propolis. *Zoo Trop.* 2007;25:95-102.

Salvadori M, Bertoni E. Update on hemolytic uremic syndrome: Diagnostic and therapeutic recommendations. *World J Nephrol.* 2013;2(3):56-76.

Salvat A, Antonacci L, Fortunato RH, Suarez EY, Godoy HM. Antimicrobial activity in methanolic extracts of several plant species from northern Argentina. *Phytomedicine.* 2004;11:230-234.

Santos A, San Mauro M, Sanchez A, Torres JM, Marquina D. The antimicrobial properties of different strains of *Lactobacillus* spp. Isolated from kefir. *Syst Appl Microbiol.* 2003;26:434-437.

Sarowska J, Choroszy-Król I, Regulska-Ilow B, Frej-M<sup>1</sup>drzak M, Jama-Kmiecik A. The therapeutic effect of probiotic bacteria on gastrointestinal diseases. *Adv Clin Exp Med.* 2013;22(5):759-66.

Schaafsma G. State of the art concerning probiotic strains in milk products. *IDF Nutr Newsl.* 1996;5:23-24.

Schmalstieg FC, Goldman AS. Ilyallich Metchnikoff (1845-1915) and Paul Ehrlich (1854-1915): the centennial of the 1908 Nobel Prize in Physiology or Medicine. *J Med Biogr.* 2008;16(2):96-103.

Scopes RK. *Protein Purification Principles and Practice.* 2<sup>o</sup> Edición. Verlog. New York. 1987.

Servin AL, Coconnier MH. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens. *Best Pract Res Clin Gastroenterol.* 2003;17:741-754.

Sherman PM, Johnson-Henry KC, Yeung HP, Ngo PSC, Goulet J, Tompkins TA. Probiotics reduce enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7- and enteropathogenic *E. coli* O127:H6-induced changes in polarized T84 epithelial cell monolayers by reducing bacterial adhesion and cytoskeletal rearrangements. *Infect Immun.* 2005;5183-88.

Sienzen RJ, Kok J, Abbe T, Schasfsma G. 2002. *Lactic Acid Bacteria: Genetics, Metabolism and Applications.* Kluwer Academic Publishers. Antonie van Leeuwenhoek. 279-289 p.

Silberstein C, Copeland DP, Chiang W, Repetto HA, Ibarra C. A Glucosylceramide synthase inhibitor prevents the cytotoxic effects of Shiga Toxin-2 on human renal tubular epithelial cells. *J Epithel Biol Pharmacol.* 2009;1:71-5.

Simoes CMO, Schenkel EP, Gosmann G, Mello JCP, Mentz LA, Petrovick PR. 2007. Farmacognosia: da planta ao medicamento, sixth. ed. Florianópolis.

Singh VP, Sharma J, Babu S, Rizwanulla, Singla A. Role of probiotics in health and disease: a review. J Pak Med Assoc. 2013;63(2):253-7.

Songisepp E, Kals J, Kullisaar T, Mändar R, Hütt P, Zilmer M, Mikelsaar M. Evaluation of the functional efficacy of an antioxidative probiotic in healthy volunteers. Nutr J. 2005;4:22-26.

Szabo MR, Radu D, Gavrilas S, Chambre D, Idoiou C. Antioxidant and antimicrobial properties of selected spice extracts. Int J Food Prop. 2010;13:535-545.

Tahamtan Y, KargarM, Namdar N, Rahimian A, Hayati M, Namavari MM. Probiotic inhibits the cytopathic effect induced by *Escherichia coli* O157:H7 in Vero cell line model. Lett App Microbiol. 2011;52(5):527-531.

Takahashi M, Taguchi H, Yamaguchi H, Osaki T, Komatsu A, Kamiya S. The effect of probiotic treatment with *Clostridium butyricum* on enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 infection in mice. FEMS Immunol Med Microbiol. 2004;41(3):219-26.

Takeda T, Yoshino K, Adachi E, Sato Y, Yamagata K. In vitro assessment of a chemically synthesized Shiga toxin receptor analog attached to chromosorb P (Synsorb Pk) as a specific absorbing agent of Shiga toxin 1 and 2. Microbiol Immunol 1999;43(4):331-7.

Tarr P, Gordon C, Chandler W. Shiga-toxin producing *Escherichia coli* and haemolytic uremic syndrome. Lancet. 2005;365:1073-1086.

Tawaha K, Alali FQ, Gharaibeh M, Mohammad M, El-Elimat T. Antioxidant activity and total phenolic content of selected Jordanian plant species. Food Chem. 2007;104:1372-1378.

Teel LD *et al.* Rapid Detection of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* by Optical Immunoassay. J Clin Microbiol. 2007;45(10):3377-3380.

Thomas L, Clarkson M, Delves-Broughton J. Nisin. In: Naidu A. (Ed) Natural Food Antimicrobial System. USA: CRC Press. 463-524. 2000.

Toba T, Kotani T, Adachi S. Capsular polysaccharide of a slime-forming *Lactococcus lactis* ssp. Cremoris LAPT 3001 isolated from Swedish fermented milk langfil. Int J Food Microbiol. 1991;12:167-172.

Todoriki K, Mukai T, Sato S, Toba T. Inhibition of adhesion of food-borne pathogens to Caco-2 cells by Lactobacillus strains. J Applied Microbiol. 2001;91:154-159.

Toledo BA, Galetto L, Colantonio S. Ethnobotanical knowledge in rural communities of Cordoba (Argentina): the importance of cultural and biogeographical factors. J Ethnobiol Ethnomed. 2009;5:40-45.

Torres AG, Arenas-Hernández MMP, Martínez-Laguna Y. Pathogenic *Escherichia coli* in Latin America. Bentham Science Publishers, USA: University of Texas; 2010. 1-7 p.

Ulusoy BH, Colak H, Hampikyan H, Erkan ME. An in vitro study on the antibacterial effect of kefir against some food-borne pathogens. Turkish Microbiol Soc. 2007;37:103-107.

Ushah WA. Walker Adverse Host Responses to Bacterial Toxins in Human Infants. J Nutr. 2000;130:420-425.

Vandenbergh PA. Lactic acid bacteria, their metabolic products and interference with microbial growth. FEMS Microbiol Rev. 1993;12:221-238.

Varavuthikunchai S, Lortheeranuwat A, Jeeju W, Sririrak T, Phongpaichit S, Supawita T. Effective medicinal plants against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. J Ethopharmacol. 2004;94:49-54.

Verpoorte R. Pharmacognosy in the new millennium: lead finding and biotechnology. J Pharm Pharmacol. 2000;52:253-262.

Wong CS, Jelacic S, Habeeb RL, Watkins SL y Tarr PI. The risk of the hemolytic-uremic syndrome after antibiotic treatment of *Escherichia coli* O157:H7 infections. N Engl J Med. 2000; 342: 1930-1936.

World Health Organization. 2001. Legal status of traditional medicine and complementary/alternative medicine: a worldwide review. [Sitio en Internet]. Disponible en: [http://libdoc.who.int/hq/2001/WHO\\_EDM\\_TRM\\_2001.2.pdf](http://libdoc.who.int/hq/2001/WHO_EDM_TRM_2001.2.pdf). Consultado: 11 de marzo de 2013.

Xiu-Li L, Yong-Qing H, Long J, Zhong-Jun X, McAllister TM, Wang Y. Anti-*Escherichia coli* O157:H7 properties of purple prairie clover and sainfoin condensed tannins. Molecules. 2013;18:2183-99.

Yang D, Biragyn A, Hoover DM, Lubkowski J, Oppenheim JJ. Multiple roles of antimicrobial defensins, cathelicidins, and eosinophil-derived neurotoxin in host defense. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:181-215.

Ying X, Wang R, Xu J, Zhang W, Li H, Zhang C, Li F. HPLC determination of eight polyphenols in the leaves of *Crataegus pinnatifida* Bge. var. major. *J Chromatogr Sci.* 2009;47(3):201-5.

Yoshimura K, Matsui T, Itoh K. Prevention of *Escherichia coli* O157:H7 infection in gnotobiotic mice associated with *Bifidobacterium* strains. *Antonie van Leeuwenhoek.* 2010;97:107-17.

Yossa N, Patel J, Millner P, Ravishankar S, Lo YM. Antimicrobial activity of plant essential oils against *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* on lettuce. *Foodborne Pathog Dis.* 2013;10(1):87-96.

Younghoon K, Sejong O, Sea Hun K. Released exopolysaccharide (r-EPS) produced from probiotic bacteria reduce biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009;379:324-329.

Zhang X, McDaniel AD, Wolf LE. Quinolone antibiotics induce Shiga toxin-encoding bacteriophages, toxin production, and death in mice. *J Infect Dis.* 2000;181:664-70.

Zimmerhackl LB. *E. coli*, antibiotics, and the hemolytic-uremic syndrome. *N Engl J Med.* 2000;342:1990-1991.

Zunft HJF, Lüder W, Harde A, Haber B, Graubaum HJ y Gruenwald J. Carob pulp preparation for treatment of hypercholesterolemia. *Adv Ther.* 2001;18:230-236.

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Concentraciones de extractos de origen vegetal expresados en mg de SD por ml, ensayados para evaluar la actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	53
Tabla 2. Concentraciones de péptidos catiónicos de origen microbiano expresados en mg de proteína por ml, ensayados para evaluar la actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> O157:H7.....	53
Tabla 3. Concentraciones de extractos de origen vegetal expresadas en mg de SD por ml, ensayados para evaluar citotoxicidad en células Vero.....	57
Tabla 4. Concentraciones de péptidos catiónicos de origen microbiano expresadas en mg de proteína por ml, ensayados para evaluar citotoxicidad en células Vero.....	58
Tabla 5. Concentraciones de EPSK de origen microbiano expresadas como Equivalentes de Glucosa por mg, ensayados para evaluar citotoxicidad en células Vero.....	58
Tabla 6. Concentraciones de VT expresadas en mg de proteína por ml, y Cicloheximida expresadas en mg de droga por ml, ensayadas para determinar una CC <sub>50</sub> en células Vero.....	58
Tabla 7. Contenido de SD de extractos vegetales según el solvente de extracción..	65
Tabla 8. Contenido de polifenoles totales y flavonoides de extractos vegetales según el solvente de extracción.....	66
Tabla 9. Contenido proteico de péptidos catiónicos obtenidos de leche kefirada....	69
Tabla 10. Contenido de Equivalentes de glucosa de EPSK obtenidos de leche kefirada.....	69
Tabla11. Concentraciones no citotóxicas de extractos de origen vegetal y componentes de origen microbiano.....	70
Tabla 12. Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> EDL 933 con extractos de origen vegetal.....	76
Tabla 13. Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> EDL 933 con péptidos catiónicos de leche kefirada.....	78



Tabla 14. Inhibición de crecimiento de <i>E. coli</i> EDL 933 con péptidos catiónicos de leche entera comercial.....	80
Tabla 15. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con extractos de <i>P. alba</i> . Pre-incubación VT con extracto.....	84
Tabla 16. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con extractos de <i>Z. mistol</i> . Pre-incubación VT con extracto.....	86
Tabla 17. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con extractos vegetales. Pre-incubación extracto con células Vero.....	87
Tabla 18. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con extractos vegetales. Co-incubación VT con extractos en células Vero.....	88
Tabla 19. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con EPSK. Pre-incubación VT con EPSK.....	90
Tabla 20. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con EPSK. Pre-incubación EPSK con células Vero.....	90
Tabla 21. Inhibición de citotoxicidad de VT sobre células Vero con EPSK. Co-incubación VT con EPSK en células Vero.....	91
Tabla 22. <i>E. coli</i> EDL 933 no adheridas a células Caco-2. Inhibición de adhesión co-incubando con EPSKL y EPSKG.....	93
Tabla 23. <i>E. coli</i> EDL 933 no adheridas a células Caco-2. Porcentajes de inhibición de adhesión pre-incubando con EPSKL y EPSKG.....	95
Tabla 24. <i>E. coli</i> EDL 933 no adheridas a células Caco-2. Porcentajes de inhibición de adhesión pos-incubando con EPSKL y EPSKG.....	96

## ÍNDICE DE FIGURAS

Fig. 1. Representación gráfica de Cromatografía en capa delgada (TLC) para flavonoides aglicones de extractos de <i>P. alba</i> y <i>Z. mistol</i> .....	67
Fig. 2. Representación gráfica de Cromatografía en capa delgada (TLC) para flavonoides glicósidos de extractos de <i>P. alba</i> .....	67
Fig. 3. Representación gráfica de Cromatografía en capa delgada (TLC) para taninos de extractos de <i>P. alba</i> y <i>Z. mistol</i> .....	68
Fig. 4. Curva de calibración con albúmina bovina.....	69
Fig. 5. Curva de calibración con glucosa.....	69
Fig. 6. Curva patrón de crecimiento de <i>E. coli</i> EDL 933.....	71
Fig. 7. Curva patrón de crecimiento de <i>E. coli</i> ATCC 25922.....	71
Fig. 8. Método de Difusión en agar representativo con extractos vegetales.....	72
Fig. 9. Método de Difusión en agar representativo con péptidos catiónicos de origen microbiano.....	73
Fig. 10. Método CIM con extractos de <i>P. alba</i> .....	74
Fig. 11. Método CIM con extractos de <i>Z. mistol</i> .....	74
Fig. 12. Método CIM con componentes de origen microbiano.....	75
Fig. 13. Actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> EDL 933 con péptidos catiónicos obtenidos de leche kefirada.....	79
Fig. 14. Actividad antimicrobiana contra <i>E. coli</i> EDL 933 con péptidos catiónicos obtenidos de leche entera comercial.....	81
Fig. 15. Resultado de reacción antígeno-anticuerpo en kit comercial (BioStar OIA Shigatoxin).....	82
Fig. 16. Determinación de CC <sub>50</sub> de VT sobre células Vero.....	82
Fig. 17. Determinación de CC <sub>50</sub> de Cicloheximida sobre células Vero.....	82
Fig. 18. Inhibición de citotoxicidad de VT de <i>E. coli</i> EDL 933 sobre células Vero con extractos de <i>Prosopis alba</i> . Pre-incubación VT con extracto.....	84
Fig. 19. Inhibición de citotoxicidad de VT de <i>E. coli</i> EDL 933 sobre células Vero con extractos de <i>Ziziphus mistol</i> . Pre-incubación VT con extracto.....	86
Fig. 20. Cinética de adhesión de VT a receptores celular y posterior efecto citotóxico en células Vero en diferentes períodos de incubación.....	89

Fig. 21. Co-incubación <i>E. coli</i> EDL 933 + EPSK. Ufc/ml y porcentaje de <i>E. coli</i> adherida a células Caco-2.....	94
Fig. 22. Pre-incubación <i>E. coli</i> EDL 933 + EPSK. Ufc/ml y porcentaje de <i>E. coli</i> adherida a células Caco-2.....	95
Fig. 23. Pos-incubación <i>E. coli</i> EDL 933 + EPSK. Ufc/ml y porcentaje de <i>E. coli</i> adherida a células Caco-2.....	96
Fig. 24. Co, Pre y Pos-Incubación <i>E. coli</i> ATCC 25922 con EPSKL en distintas concentraciones. Ufc/ml y porcentaje de <i>E. coli</i> adherida a células Caco-2.....	97
Fig. 25. Co, Pre y Pos-Incubación <i>E. coli</i> ATCC 25922 con EPSKG en distintas concentraciones. Ufc/ml y porcentaje de <i>E. coli</i> adherida a células Caco-2.....	98
Fig. 26. Fotografías de Células Caco-2 sin infección bacteriana.....	98
Fig. 27. Fotografías de Células Caco-2 infectadas con $6,5 \times 10^8$ ufc/ml de <i>E. coli</i> EDL 933.....	99
Fig. 28. Fotografías de Células Caco-2 infectadas con $6,5 \times 10^8$ ufc/ml de <i>E. coli</i> EDL 933 e incubadas con EPSK. Microscopio con fluorescencia 450 nm a 40x.....	99
Fig. 29. Fotografías de Células Caco-2 infectadas con $6,5 \times 10^9$ ufc/ml de <i>E. coli</i> ATCC 25922 e incubadas con EPSK. Microscopio a 40x.....	100