

EFFECTO DEL HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO SOBRE LA FIMBRIACIÓN DE BACTERIAS UROPATÓGENAS

Balagué, Claudia.; Evangelista de Duffard, Ana María
Laboratorio de Toxicología Experimental. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas
Suipacha 531. (2000) Rosario. Argentina. TE/FAX: 0341 4804598.
Correspondencia: Claudia Balagué. E-mail: cbalague14@yahoo.com.ar

Resumen: EFECTO DEL HERBICIDA ÁCIDO 2,4-DICLOROFENOXIACÉTICO SOBRE LA FIMBRIACIÓN DE BACTERIAS UROPATÓGENAS. Claudia Balagué y Ana María Evangelista de Duffard. *Acta Toxicol. Argent. (2006) 14 (1): 12-17.* Existen algunos datos epidemiológicos que demuestran que, en poblaciones rurales, la frecuencia de lesiones inflamatorias de origen infeccioso en el riñón es mayor en individuos expuestos a pesticidas. Estudios previos han demostrado que el herbicida 2,4-D altera las propiedades de adherencia bacteriana a riñón, mediada por fimbrias de *Escherichia coli* uropatógena, si bien aún no se ha estudiado el mecanismo que podría estar involucrado. El 2,4-D demostró capacidad de generar uniones covalentes a proteínas de superficie gram negativos. Debido a este hallazgo, se hipotetizó que la unión del herbicida a proteínas involucradas en la síntesis, exportación o ensamble de las subunidades fimbriales podía alterar la expresión de las fimbrias. En este trabajo se demuestra una unión covalente del herbicida a proteínas de membrana externa de *Escherichia coli* uropatógena y paralelamente una disminución de la fimbriación, determinada por tres técnicas diferentes: hemoaglutinación, cuantificación de proteínas de superficie y microscopía electrónica. Una conclusión importante está referida a que la exposición accidental de trabajadores rurales al 2,4-D en muy bajas dosis y durante un corto período de tiempo tendría un efecto protector de la pielonefritis por disminución de la fimbriación; mientras que los altos niveles de exposición predispondrían a la recurrencia del proceso infeccioso en el modelo de la pielonefritis ascendente no obstructiva en ratón (Balagué *et al* 2002). Probablemente los estudios epidemiológicos que asocian exposición a los herbicidas e infección renal estén relacionados con este último tipo de exposiciones.

Abstract: EFFECT OF THE HERBICIDE 2,4-DICHLOROPHOXYACETIC ACID ON FIMBRIATION OF UROPATHOGENIC BACTERIA. Claudia Balagué y Ana María Evangelista de Duffard. *Acta Toxicol. Argent. (2006) 14 (1): 12-17.* Epidemiological data demonstrate, on rural populations, that the frequency of inflammatory lesions in renal tissue is higher for individuals exposed to pesticides. Previous studies demonstrated that the herbicide 2,4-D altered the bacterial adherence properties to renal tissue, mediated by fimbriae in uropathogenic *Escherichia coli*, but the mechanism involved is still unknown. The acid 2,4-D has the ability to perform covalent bonds to proteins in gram-negative bacteria. Because of this fact, we hypothesized that the 2,4-D acid binds proteins involved in the synthesis, export or ensemble of fimbrial subunits, modifying fimbrial expression. In this work we demonstrated a covalent bond of the herbicide to outer membrane proteins in uropathogenic *E. coli* and a parallel decrease of fimbriation, assayed by three different methods: hemmaglutination, surface protein quantification and electron microscopy. An important conclusion is that the accidental exposure of rural workers to 2,4-D may have a protective effect by a decrease in fimbriation, when it is used in low doses and during a short period of exposure. But, it must be considered that high doses and several days of exposure had adverse effects, like recurrence of infection, in the mouse model of ascending pyelonephritis (Balagué *et al*, 2002). Probably, the epidemiological studies that associate the herbicide exposure with renal infection were due to the last kind of exposure described.

Palabras clave: 2,4-D, fimbrias, *Escherichia coli*, infección urinaria.

Key Words: 2,4-D, fimbriae, *Escherichia coli*, urinary infection.

INTRODUCCIÓN

La exposición accidental u ocupacional a xenobióticos puede modificar la interacción hospede-ro-bacteria. Existen algunos datos epidemiológicos que demuestran que en poblaciones rurales la frecuencia de lesiones inflamatorias de origen infeccioso en el riñón es mayor en individuos expuestos a pesticidas (7,9-13,4%) que en individuos controles (1,5%), (1). El ácido 2,4-Diclorofenoxiacético (2,4-D) es un herbicida que se excreta por la vía renal de manera inalterada o, en baja proporción, en sus formas conjugadas (2) en el sitio de adhesión de las cepas de *Escherichia coli* productoras de pielonefritis - las células tubulares renales -.

Las bacterias que exitosamente infectan el tracto urinario poseen una constelación de factores que contribuyen a la virulencia (3). La adherencia bacteriana es un pre-requisito de patogenicidad, dado que el sistema de flujo continuo de orina elimina

permanentemente los microorganismos. Colonizar específicamente a los túbulos renales a través de interacciones adhesina - receptor requiere de la presentación de diversos tipos de adhesinas y/o de una regulación estricta de su expresión. Los principales tipos de adhesinas de superficie de *E. coli* uropatógena son de naturaleza fimbrial. Duguid *et al* (4) describió que las fimbrias son apéndices de la superficie celular bacteriana compuestas por subunidades proteicas ensambladas que median la adherencia a células epiteliales y simultáneamente la aglutinación de eritrocitos; y además clasificó a las fimbrias en dos tipos: las que producían un tipo de hemoaglutinación que se inhibió por la adición de manosa en el medio de reacción (manosa - sensibles, MS) y las hemoaglutinantes manosa - resistentes (MR).

En *E. coli* pielonefritogénica las fimbrias se encuentran codificados en el cromosoma bacteriano en un segmento denominado isla de patogenicidad

dad. En esta cepa, los determinantes de virulencia hallados constantemente, son hemolisina (una proteína citolítica) y fimbria P o la fimbria relacionada Prs (5,6). Se han descrito varios mecanismos diferentes que intervienen en la regulación de la expresión de la fimbria P. Uno de ellos involucra al fenómeno de variación de fase, que permite a la población bacteriana el cambio de fase fimbriada a no fimbriada con una frecuencia de 10^{-2} células por generación (7).

Muy diversas condiciones del medio ambiente regulan la expresión de la fimbria P tales como cambios en la temperatura, osmolaridad y la adición al cultivo de concentraciones subinhibitorias de algunos antibióticos u otros compuestos tales como salicilato. Sin embargo no todos los cambios ambientales alteran la expresión de P en el mismo nivel regulatorio y algunos interfieren con el ensamble de las subunidades fimbriales. Estudios previos han demostrado que 2,4-D altera las propiedades de adherencia mediada por fimbrias en *E. coli* (8), si bien aún no se ha estudiado el mecanismo que podría estar involucrado. El objetivo de este estudio fue conocer cual sería el mecanismo por el cual 2,4-D modifica la colonización renal por bacterias uropatógenas en personas expuestas a este herbicida.

MATERIAL Y MÉTODOS

Ensayo de hemaglutinación: La cepa uropatógena en estudio, T149, y la cepa control no patógena HB101 (9), fueron clasificadas según su capacidad de hemoaglutinación. Para ello se obtuvieron glóbulos rojos humanos y de cobayo, elegidos por sus receptores predominantes globósidos y manósidos, respectivamente, se lavaron y resuspendieron en buffer fosfato salino (PBS, pH 7,2) con o sin manosa al 2%. Se determinó el título de hemoaglutinación de las cepas crecidas en agar factor antigénico de colonización (CFA) y resuspendida en PBS hasta un valor de 10^{10} bacterias/ml. Diluciones seriadas de la suspensión de microorganismos (50 µl) se enfrentaron con una gota de una suspensión de cada tipo de eritrocito al 5% en microplacas. La hemoaglutinación se observó por 10 min. a temperatura ambiente y se consideró manosa - resistente cuando se produjo el mismo título de aglutinación en presencia de manosa (10).

Ensayo de reconocimiento del receptor específico: La cepa T149 que resultó manosa-resistente, a partir del ensayo anterior, fue caracterizada según la especificidad de su receptor. Para ello, se prepararon suspensiones en PBS de antígeno de Forssman (GbO5) o de globósido (GbO4) de 200 µg/ml. A 0,5 ml de cada solución se le agregó 20 µl de una suspensión al 20% en PBS de eritrocitos de cobayo y las mezclas fueron incubadas por 3 h a 37°C. Luego de 3 lavados, los eritrocitos se resuspendieron en PBS al 3 % y se usaron para los ensayos de hemoaglutinación descriptos anteriormente (11).

Cuantificación de hemolisina: Las cepas se desarrollaron durante 4 h en caldo de carne alcalino suplementado con 0,2 % de glucosa. Luego de una centrifugación, los sobrenadantes en diluciones seriadas, se incubaron durante 2 h a 37°C con igual volumen (0,5 ml) de una suspensión de eritrocitos de carnero al 2 % en SF.

Posteriormente se efectuó una centrifugación de 3 min. a 7.000 rpm para descartar los glóbulos rojos no lisados. La hemoglobina liberada se midió a 540 nm y el valor se normalizó por unidad de densidad óptica (DO) de cultivo bacteriano (12).

Determinación de proteínas de superficie: La extracción de proteínas de superficie se realizó según la técnica descrita por Hoschützky *et al* (13). Brevemente, en 2ml de NaCl 75mM se suspendieron 1013 bacterias/ml desarrolladas en agar CFA durante 24 h. Las suspensiones se calentaron a 65°C durante 30 min. con agitación. Luego de una centrifugación para separar las bacterias defimbriadas, el sobrenadante se trató con glicina 20 mM y EDTA 5 mM y se precipitó con sulfato de amonio 10%. Para separar a los lípidos contaminantes se redisolviaron en etanol al 50% y se precipitaron las proteínas de superficie con LiCl 250 mM. Se realizó su cuantificación por el método de Bradford (14).

Microscopía electrónica: Se realizó la observación de las células bacterianas por tinción negativa. Se colocó una gota de cada suspensión bacteriana de 10^{10} - 10^{11} bacterias/ml, desarrolladas en caldo CFA, en la superficie de una grilla soporte recubierta con Formvar (polivinil formaldehído). Se mezcló una gota de colorante negativo electrodensito (1 % de ácido fosfotúngstico) y se dejó secar. La observación de 100 células por ensayo se hizo en un microscopio electrónico de transmisión perteneciente al Centro de Investigación en Ciencias Veterinarias (INTA, Castelar). Las fimbrias y flagelos se vieron como estructuras filamentosas transparentes al haz de electrones.

Ensayos con 2,4-D: Se efectuaron todos los ensayos anteriormente descriptos, en medios controles o suplementados con distintas concentraciones de 2,4-D (Sigma Chemical), según se observa en *tablas y figuras*.

Determinación de la unión del 2,4-D a proteínas de E. coli: Las cepas bacterianas se desarrollaron en 10 ml de medio Vogel-Bonner (V-B) durante 6 h a 37°C. Luego de sucesivos lavados, los microorganismos se resuspendieron en 2 ml de PBS. La exposición de las células comenzó con el agregado del herbicida ^{14}C -2,4-D ($2 \cdot 10^6$ dpm/ml) conjuntamente con una solución concentrada de 2,4-D (en etanol) para lograr una concentración final de 100 µM de 2,4-D. La incubación se realizó durante 2 h a 37°C y luego de 3 lavados las bacterias se resuspendieron en 1 ml de PBS. Los niveles del xenobiótico radioactivo unido a las proteínas de *E. coli* se determinaron precipitando la suspensión con igual volumen de acetona (4°C), se centrifugó (2.000 rpm durante 10 min.) para obtener el sedi-

mento de proteínas y se lavó varias veces para eliminar el radioactivo libre. Finalmente, el sedimento se solubilizó en Tris 50 mM (pH 7,4), 2% SDS, y se lo calentó a 80°C durante 10 min. Los niveles de ¹⁴C provenientes de las proteínas bacterianas se midieron por espectrometría líquida de centelleo. Se tomaron alícuotas conteniendo 400 µg de proteínas, se las colocó en viales con 3,5 ml de medio de centelleo [PPO 5 mg/ml y POPOP 0,5 mg/ml en Tritón X-100 – Tolueno (34:66)] y se realizó la lectura en un espectrofotómetro de centelleo líquido (Beckman Instruments Co, Fullerton, CA). La eficiencia de conteo se determinó mediante el método de estándar externo según Horrocks (15). Luego, las proteínas se resolvieron mediante electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato de sodio (SDS-PAGE) al 12%. Se sumergió el gel en solución intensificadora de señal (Enlightning Amershan) durante 45 min. y se secó al vacío. El gel se expuso frente a una placa X-Omat de alta sensibilidad a -80°C durante 2 meses.

Análisis estadístico: Todos los datos se presentan como la media ± el desvío estándar, las diferencias fueron analizadas por ANOVA seguido de la prueba de comparaciones múltiples de Tukey-Kramer.

RESULTADOS

Identificación de las fimbrias: Los resultados de las cepas estudiadas por hemoaglutinación se representan en la *Tabla I*. T149 se presentó como una cepa P fimbriada, mientras que HB101 no reveló fimbrias hemoaglutinantes.

Efecto de 2,4-D sobre la hemolisina y sobre la fimbriación: La cepa T149 presentó características hemolíticas sobre glóbulos rojos de carnero. El título de hemolisina resultó 1:8 y se calculó en base al porcentaje de hemólisis que genera esta dilución con respecto a la máxima hemoglobina liberada (Absorbancia = 1). T149 alcanzó un 25 % de este valor en la dilución 1:8, mientras HB101 no provocó una hemólisis significativa. El título de hemolisina no se modificó en presencia de 2,4-D 1 mM (*Figura 1*).

Los resultados cuantitativos de los efectos de 2,4-D, ensayado en dos concentraciones diferentes, sobre la fimbriación de T149 se presentan en la *Tabla II*. Ambas concentraciones del herbicida (0,1 y 1 mM) disminuyeron la adherencia bacteriana a glóbulos rojos. Asimismo, los valores obtenidos de la cuantificación de proteínas superficiales y

Especie de eritrocitos y receptor							
Cepa	Humanos grupo A (P1)		Cobayo				Tipo fimbrial
	-	manosa	-	manosa	GbO5	GbO4	
T149	1,81±0,17	1,81±0,00	-	-	-	1,81±0,17	P
HB101	-	-	-	-	-	-	-

Tabla I. Títulos de hemoaglutinación de eritrocitos recubiertos de receptores específicos. Los valores se expresan como el log de la inversa de la máxima dilución con aglutinados visibles y representan la media de tres ensayos independientes ± DS. **GbO5:** globopentaosilceramida o antígeno de Forssman; **GbO4:** globotetraosilceramida o globósido.

Medio, suplemento	Título de hemoaglutinación ^a	Proteínas de superficie (mg/g peso seco)	Células fimbriadas (%) ^b
control	1,81 ± 0,17	0,24 ± 0,06	80 ± 12
2,4-D 0,1 mM	1,20 ± 0,00 *	0,12 ± 0,04 *	25 ± 9 *
2,4-D 1 mM	0,90 ± 0,17 **	0,05 ± 0,01**	8 ± 2 **

Tabla II. Efecto de 2,4-D sobre la adherencia a eritrocitos, proteínas de superficie y fimbriación de *E. coli* T149. Los valores representan la media ± DS de tres ensayos independientes; a log de la inversa de la máxima dilución con aglutinados visibles; b observadas por microscopía electrónica; * p < 0,05, ** p < 0,01 significativamente diferente respecto al control.

los números de células fimbriadas fueron significativamente menores por efecto de los tratamientos. En las microfotografías electrónicas se presentan algunos microorganismos representativos de la población en las condiciones de cultivo

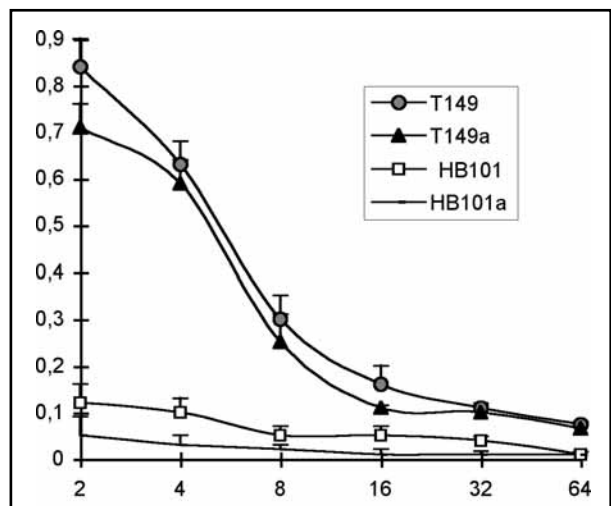


Figura 1. Actividad hemolítica de las cepas, expresada como la cantidad de hemoglobina liberada de glóbulos rojos de carnero. Los valores representan la media de tres experimentos independientes +DS. La letra a significa exposición a 2,4-D a la concentración 1 mM.

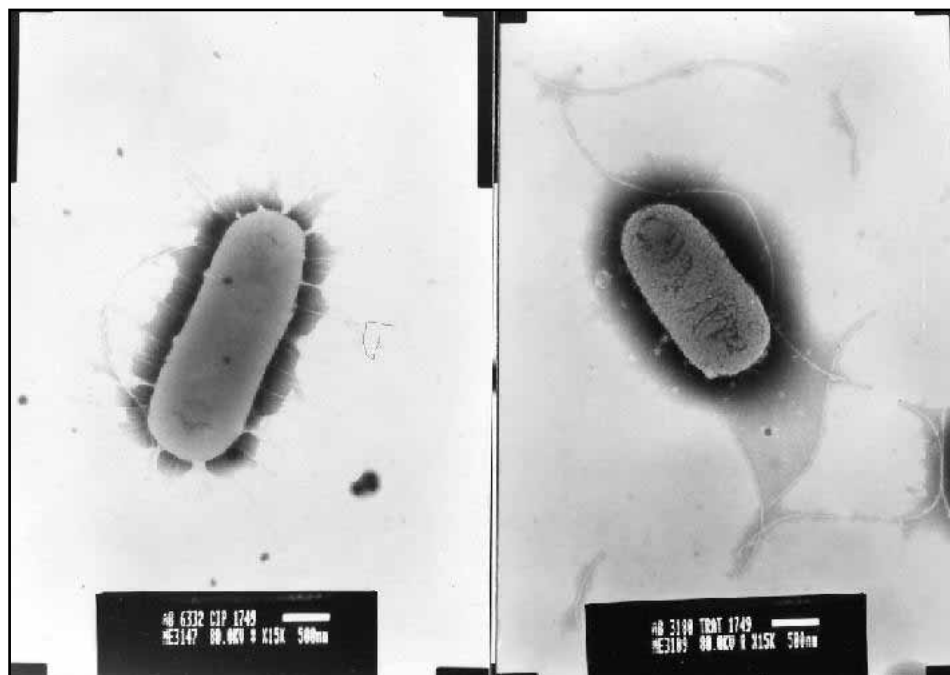


Figura 2. Microscopías electrónicas de células representativas de la población de la cepa bacteriana T149, desarrolladas en medio control (izquierda) o suplementado con 2,4-D 1 mM (derecha). Las estructuras con aspecto de pelos son las fimbrias, mientras que las prolongaciones más largas son los flagelos bacterianos.

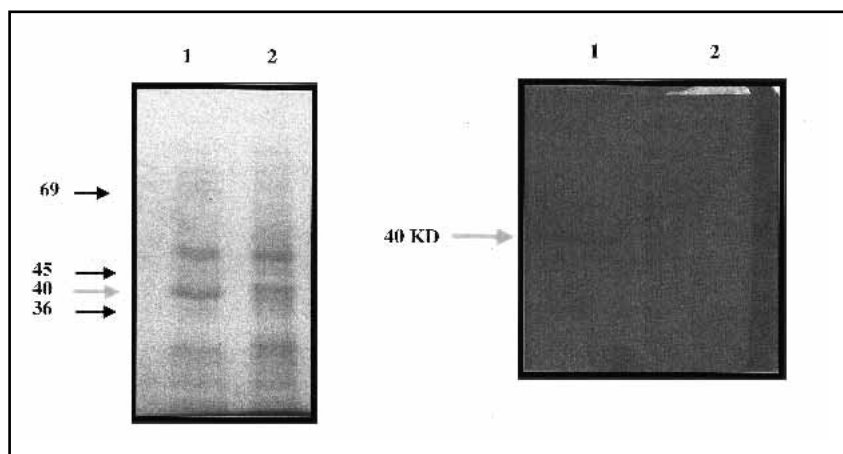


Figura 3. Unión covalente del ^{14}C -UL-2,4-D a proteínas de *E. coli* pielonefritogénica en cultivos bacterianos. La calle 1 muestra a la cepa T149 y la calle 2 a la cepa HB101 no patogénica. Izquierda: electroforesis de proteínas totales en gel de poliacrilamida al 12 %. Se sembraron en cada calle 30 μg . Derecha: fluorografía que demuestra exclusivamente en la calle 1 unión covalente del ^{14}C -UL-2,4-D con proteínas de pesos moleculares próximos a los 40 kD. La ubicación en ambos paneles fue corroborada mediante los marcadores de peso molecular.

ensayadas (Figura 2). El 80% de las células bacterianas desarrolladas en el medio control (izquierda) se mostró abundantemente fimbriada y con algunos flagelos. Las fimbrias tenían una longitud entre 0,25 y 1 nm, y se encontraron distribuidas sobre toda la superficie celular. Las zonas oscuras que rodean a las células se asocian a los carbohidratos de superficie que no excluyen el colorante

negativo. El tratamiento con 2,4-D disminuyó la proporción de células fimbriadas y además cada célula mostró una menor fimbriación (derecha). Estas alteraciones persistieron con la concentración 0,1 mM del herbicida, no obstante resultaron menos notorias.

Unión del 2,4-D a proteínas bacterianas: El 2,4-D ha podido generar uniones covalentes a proteínas de bacilos gram negativos (16). Debido a este hallazgo, se hipotetizó que la unión del herbicida a proteínas involucradas en la síntesis, exportación o ensamble de las subunidades podía alterar la expresión de las fimbrias; en consecuencia se decidió analizar esta posibilidad mediante la unión específica del ^{14}C -UL-2,4-D a proteínas

en experimentos *in vivo* del cultivo bacteriano. La cantidad de compuesto radioactivo unido a proteínas está representada por la medida de la radioactividad, ya que la precipitación de las proteínas celulares fue seguida de lavados exhaustivos (17). La radioactividad detectada en la preparación proveniente de las bacterias incubadas durante 2 h con el herbicida marcado correspondió a una actividad específica de 2.350 ± 200 dpm/mg de proteína para la cepa T149. Al explorar la selectividad del xenobiótico radioactivo para unirse covalentemente, se detectó radiactividad mediante fluorografía sobre bandas de proteínas correspondientes a pesos moleculares próximos a los 40 kD para esta cepa uropatogénica y no se detectó radioactividad en el perfil proteico de la cepa no patogénica HB101 (Figura 3).

DISCUSIÓN

Debido a la relevancia de la fimbria P en la pielonefritis y a su asociación con hemolisina en la misma isla de patogenicidad, se resolvió proseguir los estudios previos de los efectos de 2,4-D sobre

la cepa que expresaba alto título de ambos factores de virulencia (T149). Con anterioridad demostramos alteraciones inducidas por 2,4-D en la capacidad de adherencia a eritrocitos de esta cepa (8). En este trabajo se demuestra que el herbicida disminuyó significativamente el contenido de proteínas de superficie, resultados que son confirmados y relacionados con fimbrias por microscopía electrónica. Cabe destacar que el tratamiento con ambas concentraciones del herbicida (0,1 y 1 mM) disminuyó la proporción de células fimbriadas del 80% al 25% y 8 % y adicionalmente estas células revelaron una menor fimbriación (Figura 2). Estos resultados demostraron que las reducciones de los títulos de hemoaglutinación y la disminución del contenido de proteínas de superficie se debieron a una menor fimbriación de la población bacteriana. Por el contrario, la presencia de flagelos y la actividad de la exotoxina hemolisina no se encontró alterada por la exposición a 2,4-D, por lo que se dedujo que estos factores permanecieron intactos.

La disminución de la expresión fimbrial puede obedecer a varios mecanismos: una alteración en la exportación y/o ensamble de las subunidades proteicas a nivel de las membranas citoplasmática y/o externa, una inhibición de la síntesis de las mismas por alguno de los mecanismos regulatorios como variación de fase, o una pérdida de la isla de patogenicidad, como ha sido descrito para otras cepas uropatógenas (5). Algunos de estos eventos podrían ser descartados, así si fimbria P y hemolisina se encuentran en la misma isla de patogenicidad, no habría una delección de la isla en presencia de 2,4-D debido a que la actividad hemolítica se mantuvo inalterada. Tampoco sería probable una alteración generalizada de las proteínas de exportación de subunidades flagelares, fimbriales y hemolisina por rigidez de las membranas. Si bien previamente determinamos un aumento significativo en la proporción de ácidos grasos saturados / insaturados (18), esta rigidez no alteraría la funcionalidad de las proteínas de membrana involucradas en la expresión de todos los factores de virulencia.

La especificidad de la inhibición fimbrial podría responder a una modificación de la síntesis, y/o exportación de las subunidades proteicas de estas estructuras. La translocación inicial de las subunidades a través de la membrana citoplasmática ocurre por el sistema de secreción general Sec (19), dicha translocación podría encontrarse alterada por los cambios en el ambiente lipídico de la membrana citoplasmática. Una hipótesis probable, entonces, sería una funcionalidad disminuida del sistema Sec. Sin embargo Sec es una proteína esencial y la alteración de su función involucraría modificaciones de parámetros de crecimiento microbiano.

Estas modificaciones no fueron detectadas, tal como se demostró previamente (18), por lo que podría asumirse que la vía de exportación a través

de la membrana citoplasmática no se encuentra alterada.

La fimbria P se exporta completamente por la vía chaperona periplásmica - acomodador de membrana externa, y las proteínas implicadas son específicas de cada tipo fimbrial. La unión covalente a proteínas involucradas en la exportación o ensamble de las subunidades en la membrana externa podría alterar la fimbriación. Para corroborar esta presunción se efectuó el ensayo de unión de 2,4-D radioactivo a proteínas de *E. coli*. La banda radioactiva se detectó dentro del rango de pesos moleculares de proteínas de membrana externa (40 kD, Figura 3). Considerando que no se reveló esta unión covalente (2,4-D - proteína) en la cepa no fimbriada HB101, podría tratarse de proteínas de membrana externa implicadas en el ensamblaje fimbrial como PapC y/o sus precursores. Probablemente la unión del xenobiótico a estas proteínas altere sus funciones de acomodadoras. Otra probable hipótesis es que la unión del 2,4-D a proteínas de membrana dispare la variación de fase fimbrial. No se puede descartar la inducción de variaciones de fase de estas fimbrias. Esta es una respuesta muy rápida a cambios ambientales y permite una adecuada adaptación. Se conoce que una proteína involucrada en el metabolismo global de aminoácido y que responde a la concentración de leucina intracelular (Lrp) participa de este mecanismo regulatorio. Previamente, fue descrito por Fabra *et al* (20) un ingreso disminuido de leucina al interior celular de bacilos gram-negativos inducido por el 2,4-D.

Hasta el momento no existen evidencias claras con respecto a cuáles son las señales que disparan estos cambios de fase. Podría sugerirse que los desbalances en la composición de fosfolípidos de la membrana citoplasmática, así como la unión covalente del 2,4-D a proteínas de membrana externa pueden desencadenar las transformaciones fenotípicas observadas. La regulación de la expresión fimbrial ha sido estudiada generando variantes del cultivo *in vitro* que simulan a las condiciones presentes dentro del huésped (temperatura, osmolaridad, privación de nutrientes), pero no se conocen hasta el momento variaciones de fase inducidas por la exposición a xenobióticos. Resulta entonces de interés continuar con estos estudios.

Una conclusión importante está referida a que la exposición accidental de trabajadores rurales al 2,4-D en muy bajas dosis y durante un corto período de tiempo tendría un efecto protector de la pielonefritis por disminución de la fimbriación; mientras que los altos niveles de exposición predispondrían a la recurrencia del proceso infeccioso en el modelo de la pielonefritis ascendente no obstructiva en ratón (8).

Sería importante determinar si los estudios epidemiológicos que asocian exposición a los herbicidas y cicatrices renales están relacionados con este último tipo de exposiciones.

BIBLIOGRAFÍA

1. Allazov, S. (1994). The characteristics of acute infectious-inflammatory kidney diseases in pesticide exposure. *Urol. Nefrol.* 2: 14-16.
2. Knopp, D., and Glass, S. (1991). Biological monitoring of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid exposed workers in agriculture and forestry. *Int. Arch. Occup. Environ. Health.* 63: 329-333.
3. Johnson, J. R. (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infections. *Clin. Microbiol. Rev.* 4: 80-128.
4. Duguid, J. P., Clegg, S., Wilson, M. I. (1979). The fimbrial and non - fimbrial haemagglutinins of *Escherichia coli*. *J. Med. Microbiol.* 12: 213-227.
5. Blum, G., Ott, M., Lischewski, A., Ritter, A., Imrich, H., Tschape, H., and Hacker, J. (1994). Excision of large DNA regions termed pathogenicity islands from tRNA-specific loci in the chromosome of an *Escherichia coli* wild-type pathogen. *Infect. Immun.* 62: 606-614.
6. Guyer, D. M., Kao, J., and Mobley, H. L. T. (1998). Genomic analysis of a pathogenicity island in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073: distribution of homologous sequences among isolates from patients with pyelonephritis, cystitis, catheter-associated bacteriuria and from faecal samples. *Infect. Immun.* 66: 4411-4417.
7. Rhen, M., Makela, P. H., and Korhonen, T. K. (1983). P-fimbriae of *Escherichia coli* are subject to phase variation. *FEMS Microbiol. Lett.* 19: 267-271.
8. Balagué, C., Silva de Ruiz, C., Rey, R., Evangelista de Duffard, A. M., Nader-Macias, M. E. (2002) Effect of the herbicide 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors. *Toxicol.* 177: 143-155.
9. Boyer, H. W., and Roulland-Dussoix, D. (1969). A complementation analysis of the restriction and modification of DNA en *Escherichia coli*. *J. Mol. Biol.* 41: 459-472.
10. Kunin, C. M. (1994). Urinary tract infections in females. *Clin. Infect. Dis.* 18: 1-12.
11. Leffer, H., and Svanborg-Edén, C. (1980). Chemical identification of a glycosphingolipid receptor for *Escherichia coli* attaching to human urinary tract epithelial cells and agglutinating human erythrocytes. *FEMS Microbiol. Lett.* 8: 127-134.
12. van den Bosch, J. F., Postma, P., de Graaff, J., and MacLaren, D. M. (1980). Determination of the -haemolytic urinary *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol. Lett.* 8: 75-77.
13. Hoschützky, H., Lottspeich, F., and Jann, K. (1989). Isolation and characterisation of the alpha-Galactosyl-1,4-Beta-Galactosyl-Specific adhesin (P Adhesin) from fimbriated *Escherichia coli*. *Infect. Immun.* 57: 76-81.
14. Bradford, M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilising the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochem.* 72: 248-254.
15. Horrocks, D. L. (1974). Applications of liquid scintillation counting. Academic Press, New York.
16. Fabra de Peretti, A. I., Mori de Moro, G. B., Ghittoni, N. E., Evangelista de Duffard, A. M. and Duffard, R. O. (1997). Effects of 2,4-dichlorophenoxyacetic acid on *Rhizobium sp.* in pure culture. *Toxicity Assess.* 2: 217-228.
17. Boelsterli, U. A. (1993). Specific of covalent drug - protein interactions in hepatocytes and their toxicological significance in drug - induced liver injury. *Drug Metabol. Rev.* 25: 395-451.
18. Balagué, C., Sturtz, N., Duffard, R., Evangelista de Duffard, A. M. (2001) Effect of 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid herbicide on *Escherichia coli* growth, chemical composition and cellular envelope. *Environ. Toxicol.* 16: 35-45.
19. Soto, G. E., Hultgren, S. J. (1999). Bacterial adhesins: common themes and variations in architecture and assembly. *J. Bacteriol.* 181: 1059-1071.
20. Fabra de Peretti, A. I., Duffard, R., and Evangelista de Duffard, A. M. (1992). Effects of 2,4-D on *Rhizobium sp* membrane fluidity. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* 23: 301-306.

AGRADECIMIENTOS

Al Dr. Oscar Di Paolo por brindar su experiencia y asesoramiento en los ensayos de unión covalente del 2,4-D a proteínas bacterianas.