

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA



TEMA:

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS FOSFODIESTERASAS PDEI Y PDER
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y LA FORMACIÓN DE
BIOPELÍCULA EN *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA”**

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniera en Biotecnología

AUTOR(A):

Jazmin Mariuxy Garrido Carrera

DIRECTOR(A):

Biol. Pedro Miguel Barba Estrella MSc.

Ibarra, 2024

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERÍA EN BIOTECNOLOGÍA

**“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LAS FOSFODIESTERASAS PDEI Y PDER
SOBRE LA EXPRESIÓN DE GENES DE VIRULENCIA Y LA FORMACIÓN DE
BIOPELÍCULA EN *Escherichia coli* ENTEROPATÓGENA”**

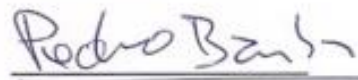
Trabajo de titulación revisado por el Comité Asesor, por lo cual se autoriza su
presentación como requisito parcial para obtener el Título de:

INGENIERA EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADO:

MSc. Pedro Barba

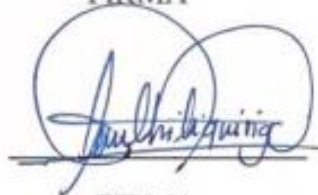
DIRECTOR



FIRMA

MSc. Andrea Chilingua

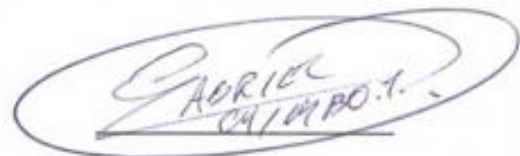
MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA

MSc. Gabriel Chimbo

MIEMBRO TRIBUNAL



FIRMA

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

BIBLIOTECA UNIVERSITARIA

AUTORIZACIÓN DE USO Y PUBLICACIÓN A FAVOR DE LA UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

1. IDENTIFICACIÓN DE LA OBRA

En cumplimiento del Art. 144 de la Ley de Educación Superior, hago la entrega del presente trabajo a la Universidad Técnica del Norte para que sea publicado en el Repositorio Digital Institucional, para lo cual pongo a disposición la siguiente información:

DATOS DE CONTACTO			
CÉDULA DE IDENTIDAD:	0402030423		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Garrido Carrera Jazmin Mariuxy		
DIRECCIÓN:	Juana Atabalipa y Cap. José Espinoza de los Monteros		
EMAIL:	jmgarridoc@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	-	TELÉFONO MÓVIL:	0996039544

DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Determinación del efecto de las fosfodiesterasas PdeI y PdeR sobre la expresión de genes de virulencia y la formación de biopelícula en <i>Escherichia coli</i> enteropatógena
AUTOR (ES):	Garrido Carrera Jazmin Mariuxy
FECHA: DD/MM/AAAA	29/01/2024
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TÍTULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniera en Biotecnología
ASESOR /DIRECTOR:	MSc. Pedro Barba MSc. Andrea Chilingua MSc. Gabriel Chimbo

2. CONSTANCIAS

El autor manifiesta que la obra objeto de la presente autorización es original y se la desarrolló, sin violar derechos de autor de terceros, por lo tanto, la obra es original y que es el titular de los derechos patrimoniales, por lo que asume la responsabilidad sobre el contenido de la misma y saldrá en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 29 días, del mes de enero de 2024

EL AUTOR:



Jazmin Mariuxy Garrido Carrera

C.I: 0402030423

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTERGRACIÓN CURRICULAR

Ibarra, 29 de enero de 2024

MSc. Pedro Barba

DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

CERTIFICA:

Haber revisado el presente informe final del trabajo de Integración Curricular, el mismo que se ajusta a las normas vigentes de la Universidad Técnica del Norte; en consecuencia, autorizo su presentación para los fines legales pertinentes.

Pedro Barba

MSc. Pedro Barba

C.I: 1716751183

AGRADECIMIENTO

Con humildad y gratitud, inicio estos agradecimientos en primer lugar a Dios que ha iluminado cada paso de este camino con su fuente inagotable de sabiduría y fortaleza. Gracias por haberme brindado perseverancia y serenidad para completar esta etapa académica.

Quiero expresar mi profundo agradecimiento a la Universidad Técnica del Norte, cuyo compromiso con la excelencia académica fueron fundamentales para el desarrollo de esta investigación, ha sido un privilegio formar parte de esta institución que cada día me ha enriquecido intelectualmente.

Asimismo, quiero extender mis sinceros agradecimientos a toda la distinguida planta docente de la carrera, no solo por compartir conocimientos, sino por ser mentores y modelos a seguir. Ha sido un honor aprender de profesionales tan dedicados y apasionados.

En especial, quiero agradecer al MSc. Pedro Barba, a la MSc. Andrea Chilibingua, al MSc. Gabriel Chimbo y a la Dra. Nubia Grijalva, por haber contribuido positivamente en el desarrollo de este proyecto de investigación.

Igualmente, mi reconocimiento al Instituto de Biotecnología de Universidad Nacional Autónoma de México (IBt-UNAM), donde encontré un entorno propicio para el desarrollo de mi tesis.

Quiero agradecer a los profesionales del laboratorio 2 del IBt y en especial Dr. Ricardo Oropeza Navarro por aceptarme como su alumna, su orientación y apoyo incondicional fueron esenciales para el éxito de este proyecto. De igual manera a la MSc. Stephanie Ortiz por su paciencia, solidaridad y apoyo en los trabajos experimentales.

La colaboración en este laboratorio no solo me brindó acceso a recursos de vanguardia, sino también la oportunidad de aprender de un equipo excepcionalmente talentoso, agradezco sinceramente la oportunidad de haber sido parte de esta comunidad académica y científica. De manera importante, aprovecho para agradecer al Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT) por la beca otorgada durante mi estancia en el instituto.

Por último y no menos importante, aprovecho para agradecer a mi familia, amigos y a todos los que creyeron, apoyaron y compartieron este camino. El próximo capítulo nos espera con nuevas aventuras. ¡Hasta siempre!

DEDICATORIA

A mis amados padres Consuelito y Joselito y a mi querido hermano Jefferson,

Este logro no hubiese sido posible sin su amor, su paciencia y apoyo incondicional en todas las etapas de mi vida. Son y siempre serán mi inspiración constante y mi mayor ejemplo. Gracias por ser mis pilares fundamentales, por creer en mi cuando dudé y por mantener mis sueños vivos. A ustedes que han compartido mis alegrías y desafíos de este viaje, les dedico con todo mi corazón este logro. Cada línea de esta tesis representa su sacrificio y lleva impresa mi gratitud y el amor que me han brindado y les tengo.

¡Todos mis éxitos también son los suyos!

A mis amigos, en especial a Karencita Rivera, gracias por ser esa amiga incondicional, por los momentos de aliento y por compartir alegrías y tristezas. Tu amistad ha sido una fortaleza y este logro es tan tuyo como mío. Plasmo en estas páginas mi agradecimiento por tu amistad.

Finalmente, a esa persona especial, quien con su apoyo emocional ha sido mi ancla en momentos difíciles lejos de casa. A la distancia siempre supiste estar ahí dándome ese soporte que tanto necesitaba. Cada paso de este viaje ha sido más significativo gracias a ti.

Con mucho cariño,

Jaz

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un agente que causa diarrea aguda, especialmente en niños menores de dos años en países en desarrollo, empleando un sistema llamado A/E (Adherencia y Esfacelación) que afecta la estructura intestinal. Esta investigación, se centró en entender cómo las fosfodiesterasas PdeI y PdeR influyen en la formación de biopelículas y la expresión de genes de virulencia en EPEC. Al comprender estos aspectos a nivel molecular, buscamos identificar estrategias para reducir el impacto de EPEC en la salud infantil. Por esta razón se construyó un plásmido recombinante con los genes bajo estudio, en donde, a partir de su sobreexpresión, se realizó ensayos de biopelícula mediante espectrofotometría, Western blot y se evaluó el perfil de proteínas secretadas mediante electroforésis vertical en geles de poliacrilamida, así como también fusiones reporteras a *cat*. Entre los resultados más importantes en esta investigación se destaca la producción y secreción de factores de virulencia en los fondos mutantes PerC y pEAF, los cuales carecen del gen *perC*, y el plásmido de virulencia EAF. El gen *perC* está codificado en el plásmido de virulencia de EPEC y actúa como un regulador positivo de la isla de patogenicidad LEE. Esto sugiere que las fosfodiesterasas en estudio podrían estar activando la isla de patogenicidad de alguna manera. Se observó actividad de las fusiones reporteras de los genes de virulencia a *cat* en el medio LB y DMEM, que representan condiciones de represión e inducción. Este hallazgo sugiere su posible implicación en la virulencia de EPEC.

PALABRAS CLAVES: *Escherichia coli* enteropatógena, biopelícula, Western Blot, fosfodiesterasas, factores de virulencia, patogenicidad.

ABSTRACT

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) is an agent that causes acute diarrhea, especially in children under two years of age in developing countries, using a system called A/E (Attaching and Effacing) that affects the intestinal structure. This research focused on understanding how the phosphodiesterases PdeI and PdeR influence biofilm formation and the expression of virulence genes in EPEC. By understanding these aspects at the molecular level, we seek to identify strategies to reduce the impact of EPEC on children's health. For this reason, a recombinant plasmid was constructed with the genes under study, where, based on their overexpression, biofilm tests were carried out by spectrophotometry, Western blot and the profile of secreted proteins was evaluated by vertical electrophoresis in polyacrylamide gels, as well as reporter fusion to *cat*. Among the most important results in this research, the production and secretion of virulence factors in the PerC and pEAF mutant backgrounds, which lack the *perC* gene, and the EAF virulence plasmid, stand out. The *perC* gene is encoded on the EPEC virulence plasmid and acts as a positive regulator of the LEE pathogenicity island. This suggests that the phosphodiesterases under study could be activating the pathogenicity island in some way. Activity of the reporter fusions of the virulence genes to *cat* was observed in LB and DMEM medium, which represent repression and induction conditions. This finding suggests its possible involvement in the virulence of EPEC.

KEYWORDS: Enteropathogenic *Escherichia coli*, biofilm, Western Blot, phosphodiesterases, virulence factors, pathogenicity.

LISTA DE SIGLAS

μg	Microgramo
μl	Microlitro
A	Absorbancia
A/E	Adherencia y Esfacelación (<u>A</u> ttaching and <u>E</u> ffacing)
Amp	Ampicilina
BFP	Pili formador de la agregación (<u>B</u> undle <u>F</u> orming <u>P</u> ili)
°C	Grado centígrado
CAT	<u>C</u> loranfenicol <u>A</u> cetiltransferasa
c-di-GMP	Diguanosín monofosfato cíclico
CHASE	<u>C</u> yclase / <u>H</u> istidine Kinases- <u>A</u> ssociated <u>S</u> ensing <u>E</u> xtracellular
DGC	Diguanilato ciclasa
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium)
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidad óptica
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroagregativa
EAF	Factor de adherencia de EPEC (<u>E</u> PEC <u>A</u> dherence <u>F</u> actor)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica
Esc	Genes de secreción de <i>E. coli</i> (<u>E. coli</u> <u>s</u> ecretion genes)
Esp	Proteína secretada por <i>E. coli</i> (<u>E. coli</u> <u>s</u> ecretion protein)
g	Gramo
GrlA	Regulador global activador de LEE (<u>G</u> lobal <u>r</u> egulator of <u>L</u> EE <u>A</u> ctivator)
GrlR	Regulador global represor de LEE (<u>G</u> lobal <u>r</u> egulator of <u>L</u> EE <u>R</u> epressor)
h	Horas
Kb	Kilobases
Km	Kanamicina

L	Litro
LB	Luria Bertani
LEE	Locus de eliminación del enterocito (<u>L</u> ocus of <u>E</u> nterocyte <u>E</u> ffacement)
mA	Miliampere
Mg	Miligramo
Min	Minuto
ml	Mililitro
mM	Milimolar
Ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro
ON	Durante la noche (<u>O</u> ver <u>N</u> ight)
PB	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PDE	Fosfodiesterasa
pH	Potencial de hidrógeno
rpm	Revoluciones por minuto
SDS	Dodecil sulfato sódico
Seg	Segundos
SOC	Medio súper óptimo con represión catabólica (<u>S</u> uper <u>O</u> ptimal broth with <u>C</u> atabolite repression)
SST3	Sistema de secreción tipo 3
Stp	Estreptomicina
Tm	Temperatura de melting
Tc	Tetraciclina
TDTT	<u>T</u> ris-HCl <u>D</u> itio <u>t</u> reitol
Tir	Receptor translocado de intimina (<u>T</u> ranslocated <u>i</u> ntimin <u>r</u> eceptor)
UV	Ultravioleta
V	Voltios
WT	Cepa silvestre (<u>W</u> ild <u>T</u> ype)

ÍNDICE DE CONTENIDOS

CAPÍTULO I	16
INTRODUCCIÓN.....	16
1.1 Problema de investigación	16
1.2 Justificación	16
1.3 Objetivos	17
1.3.1 Objetivo General	17
1.3.2 Objetivos Específicos.....	17
1.4 Hipótesis	18
CAPÍTULO II.....	19
MARCO TEÓRICO	19
2.1 <i>Escherichia coli</i>	19
2.1.1 Aspectos generales	19
2.1.2 Patotipos de <i>Escherichia coli</i>	19
2.2 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	19
2.2.1 Sintomatología y transmisión de EPEC	20
2.3 Modelo de infección de EPEC	21
2.3.1 Secreción de proteínas en EPEC	22
2.3.2 Factores de virulencia en EPEC.....	22
2.3.2.1 Plásmido EAF.	22
2.3.2.2 Locus de Eliminación de Enterocitos (LEE).	23
2.4 Biopelícula bacteriana.....	25
2.4.2 Formación y desarrollo de biopelículas.....	25
2.5 Di guanosín monofosfato cíclico (c-di-GMP).	26
2.5.1 Diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas	27
2.6 Genes reporteros.....	27
2.6.1 Ventajas del uso de genes reporteros	28
2.7 Medios de cultivo.....	28
2.7.1 Medio LB	28
2.7.1 Medio DMEM.....	28
CAPÍTULO III.....	29
3. MATERIALES Y MÉTODOS	29
3.1 Plásmidos y cepas bacterianas	29
3.2 Condiciones de crecimiento	31
3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR).....	31
3.3.1 Extracción de ADN.....	31

3.3.2	<i>Diseño de oligonucleótidos</i>	31
3.3.3	<i>Estandarización de la PCR</i>	32
3.3.4	<i>Electroforesis en gel de agarosa</i>	33
3.4	Construcción de plásmidos recombinantes.	33
3.4.1	<i>Purificación de productos de PCR</i>	33
3.4.2	<i>Digestión y ligación enzimática de productos de PCR y plásmidos</i>	34
3.4.3	<i>Preparación de células competentes para electroporación</i>	34
3.4.4	<i>Transformación de plásmidos recombinantes mediante electroporación</i>	35
3.4.5	<i>Selección de colonias y comprobación por PCR</i>	36
3.5	Evaluación de formación de biopelícula y expresión de factores de virulencia	36
3.5.1	<i>Ensayo de cuantificación de biopelícula</i>	36
3.5.2	<i>Perfil de proteínas secretadas</i>	37
3.5.3	<i>Detección de proteínas intracelulares mediante Western Blot</i>	38
3.6	Fusiones transcripcionales de LEE1, LEE2, <i>bfpA</i> al gen reportero <i>cat</i>	40
3.7	Análisis estadístico	41
CAPÍTULO IV		42
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN		42
4.1	Construcción de una cepa recombinante de EPEC mediante la transformación con un vector que expresa a <i>pdeI</i>	42
4.2	Formación de biopelícula	44
4.3	Perfil de proteínas secretadas	47
4.4	Detección de proteínas mediante la técnica de Western Blot	48
4.5	Fusiones reporteras de LEE1-<i>cat</i>	50
4.6	Fusiones reporteras de LEE2-<i>cat</i>	51
4.7	Fusiones reporteras de <i>bfpA-cat</i>	51
4.8	Fusión transcripcional del gen <i>pdeR</i> a <i>cat</i>	52
CAPÍTULO V		55
Conclusiones y recomendaciones		55
Referencias bibliográficas		57
ANEXOS		63

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 Plásmidos y cepas utilizados en este proyecto	29
Tabla 2 Cepas bacterianas utilizadas en este proyecto	29
Tabla 3 Oligonucleótidos usados en este trabajo.....	31
Tabla 4 Coctel para PCR de pdeI y pdeR.....	32
Tabla 5 Condiciones del termociclador	32
Tabla 6 Preparación del gel desnaturalizante de SDS-poliacrilamida 12%	38
Tabla 7 Anticuerpos utilizados	39

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 Micrografía electrónica de la lesión A/E	20
Figura 2 Modelo esquemático de infección por EPEC	21
Figura 3 Plásmido EAF.....	23
Figura 4 Isla de patogenicidad LEE.....	24
Figura 5 Regulación de la isla LEE.....	25
Figura 6 Etapas de la formación de biopelículas bacterianas.....	26
Figura 7 Síntesis del c-di-GMP.....	27
Figura 8 Construcción del plásmido recombinante del gen pdeI	42
Figura 9 Construcción del plásmido recombinante del gen pdeR.....	43
Figura 10 Cuantificación de ensayo de biopelícula en medio LB 30°C	45
Figura 11 Cuantificación de ensayo de biopelícula en medio LB 37°C.....	45
Figura 12 Perfil de proteínas secretadas.....	47
Figura 13 Western Blot en medio LB y DMEM.....	48
Figura 14 Western Blot en medio DMEM	49
Figura 15 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión LEE 1 en medio LB y DMEM.	50
Figura 16 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión de LEE 2 en medio LB y DMEM	51
Figura 17 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión de bfpA en medio LB y DMEM	52
Figura 18 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión transcripcional de pdeR.....	52

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

1.1 Problema de investigación

En la década de los cuarenta, en Inglaterra, se identificaron brotes de diarrea en niños y lactantes de 0 a 11 meses, convirtiéndose en una importante causa de mortalidad (Nataro y Kaper, 1998). En Estados Unidos, EPEC fue reconocida como causa importante de muerte en guarderías a mediados del siglo XIX, a partir de esto, adquiere el nombre de *E. coli* enteropatógena (Enteropathogenic *E. coli* o EPEC), para hacer referencia a un tipo patogénico que se diferencia de la bacteria presente en la microbiota normal (Levine, M. et al., 1978).

Los síntomas asociados a este patógeno pueden incluir fiebre, malestar, vómitos, deshidratación, entre otros. Por lo general, la enfermedad causada por EPEC, dura entre 5 a 15 días, pero puede hacerse crónica y resultar en una tasa de mortalidad elevada, alrededor del 50% (Donnenberg, 2002). Se han utilizado una variedad de antibióticos para tratar a EPEC y muchos de los casos han mostrado ser útiles, sin embargo, la resistencia a múltiples antibióticos se ha convertido en un problema en la actualidad (Canata, M, et al., 2016).

Un rasgo distintivo de las infecciones causadas por EPEC, es la lesión histopatológica de adherencia y esfacelación (A/E). Esta se caracteriza por destruir las microvellosidades intestinales y formar estructuras tipo pedestal entre la bacteria y el enterocito. Una vez ocurrida esta adherencia, se inyecta a la célula una serie de proteínas efectoras mediante el sistema de secreción tipo III (SST3) desencadenándose una serie de cascadas de señales provocando la infección en el hospedero (Nataro et al, 1998).

Las cifras de letalidad por cuadro diarreico a causa de EPEC son elevadas en países en vías de desarrollo. Estudios en Brasil, México, y Sudáfrica, han demostrado que entre el 30 y 40% de los casos de diarrea pueden ser atribuidos a EPEC y en algunos países latinoamericanos supera la provocada por *Campylobacter* spp. y rotavirus en la población infantil (Roque, M. 2017). Por lo tanto, es necesario seguir identificando nuevas estrategias y mecanismos para combatir con EPEC, basados en todos los datos que en la actualidad han sido publicados.

1.2 Justificación

E. coli enteropatógena es una bacteria que puede transmitirse de manera fecal oral o indirectamente a través del agua o alimentos. Está íntimamente relacionada con cuadros diarreicos en infantes y es la causa de un importante problema de salud a nivel mundial (Clements, et al., 2012). Por lo tanto, es importante estudiar las bases moleculares que favorecen la infección en el huésped y entender cómo funcionan los mecanismos de regulación de aquellos genes que se encuentran implicados en su virulencia.

El interés de este estudio radica en conocer si las fosfodiesterasas PdeI y PdeR están involucradas en procesos que le permiten a EPEC establecer una infección en un hospedero. Es importante conocer la relación de las fosfodiesterasas con el metabolito secundario c-di-GMP en la formación de biopelícula y la expresión de genes de virulencia (Lindenberg, et al., 2013).

Por lo tanto, al ser un problema que no se ha estudiado a fondo, se propone investigar la señalización intracelular que ocurre en EPEC para controlar diversos fenotipos importantes involucrados en su patogénesis. Con este conocimiento generado, estaremos en la posición de proponer alternativas de manipulación de estos mecanismos con diferentes fines biotecnológicos y en beneficio de la salud humana.

1.3 Objetivos

1.3.1 Objetivo General

Determinar el efecto de las fosfodiesterasas PdeI y PdeR en la expresión de los factores de virulencia y la formación de biopelícula en la cepa típica de *Escherichia coli* enteropatógena

1.3.2 Objetivos Específicos

- Generar una cepa de EPEC con un vector recombinante que contenga los genes *pdeI* y *pdeR*.
- Evaluar la formación de biopelículas y la expresión de factores de virulencia en las cepas recombinantes de EPEC.
- Evaluar el comportamiento de las cepas recombinantes de EPEC con fusiones reporteras a *cat*.

1.4 Hipótesis

Las actividades de las proteínas PdeI y PdeR son relevantes en la expresión de los genes de virulencia y en la formación de biopelícula en *Escherichia coli* enteropatógena.

CAPÍTULO II

MARCO TEÓRICO

2.1 *Escherichia coli*

2.1.1 Aspectos generales

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, se encuentra entre las primeras bacterias colonizadoras del intestino después del nacimiento y es uno de los organismos modelo más estudiados en microbiología y biología molecular (Kaper et al., 2004; Pokharel et al., 2023).

Esta bacteria se identificó en el año de 1885, llegando a ser hasta la fecha, una de las bacterias más estudiadas por su fácil crecimiento y manipulación en el laboratorio (Clements et al., 2012). Algunas cepas de *E. coli*, debido a mutaciones y a la transferencia horizontal de genes por conjugación y transducción, han adquirido capacidades virulentas, así como mecanismo para supervivencia y rápida propagación entre hospederos, incluso en ambientes diferentes al intestinal (Kaper et al., 2004; Dobrindt et al., 2004).

2.1.2 Patotipos de *Escherichia coli*

Escherichia coli comprende un grupo de cepas que causan diferentes síndromes diarreicos que diferencian por sus factores de virulencia, epidemiología, patogenia. Entre los patotipos más estudiados se encuentran *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteropatógena (EPEC) y el patotipo extraintestinal *E. coli* uropatógena (UPEC) (Moli et al. 2022).

2.2 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

EPEC fue identificado como un patotipo responsable de un brote de diarrea que resultó en muerte entre niños en Estados Unidos e Inglaterra y desde 1998 se sabe que la infección tiene altas tasa de mortalidad en infantes (Nataro y Kaper, 1998). Es una bacteria patógena que causa daños severos en las microvellosidades de las células epiteliales, causando inflamación de los intestinos y adelgazamiento de la mucosa intestinal (Croxen y Finlay, 2010).

Los factores asociados con posibles causas de infecciones diarreicas son la susceptibilidad del huésped, en los que se destaca la edad, estado inmunológico y nutricional, factores ambientales como condiciones de higiene y factores bacterianos como genes de virulencia (Ochoa y Contreras, 2011).

Actualmente, EPEC es estudiada con el fin de entender el desarrollo de las lesiones A/E (Figura 1) así como el mecanismo de virulencia en este microorganismo.

Figura 1

Micrografía electrónica de la lesión A/E



Nota. Se observa la adherencia íntima de la bacteria a un huésped (naranja), en donde EPEC induce la formación de pedestales (Procedente de: Frischknecht y Michael, 2001).

2.2.1 Sintomatología y transmisión de EPEC

El principal síntoma asociado a la infección por EPEC es diarrea acuosa, pero también se destacan otros como; náuseas, vómitos, fiebre, cólicos abdominales. La enfermedad dura alrededor de 5 días y puede extenderse hasta los 15 días, teniendo altos índices de deshidratación en niños (Rock, 2014; Kuhnert, et al., 2000).

La principal vía de transmisión en países en vías de desarrollo es mediante la ingesta de agua contaminada. Por otro lado, en países industrializados se ha visto que su infección se da por el consumo de alimentos, sin embargo, no se ha visto asociado a un alimento en específico. La formación de aerosoles, también podría ser una forma de

diseminación de EPEC, cuando se encuentran en contacto niños sintomáticos con otros que no poseen síntomas previos (Vidal, 2003).

2.3 Modelo de infección de EPEC

La lesión A/E consta de 3 etapas características que son: 1) adherencia inicial, 2) transducción de señales y 3) anclaje íntimo (Figura 2).

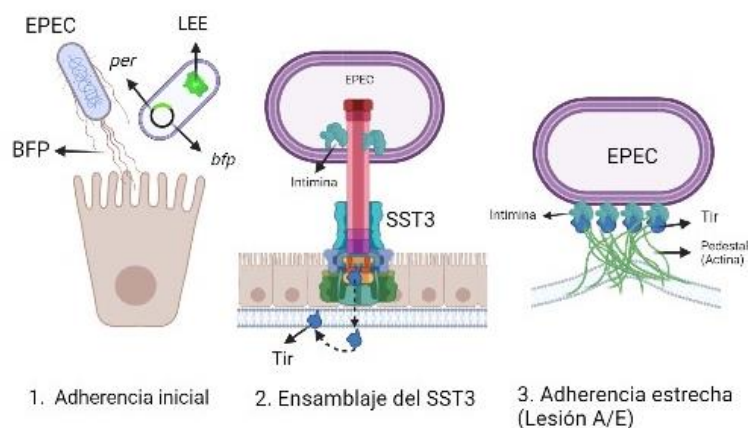
En la primera etapa, interviene el gen *bfp* que está involucrado en la adhesión bacteriana para la formación de microcolonias, esta fimbria esta codificada en el plásmido de virulencia EAF (EPEC adherence factor) (Teixeira et al. 2015).

En la segunda etapa, actúa un aparato de secreción de proteínas llamado sistema de secreción tipo III (SST3), en donde las bacterias interfieren con varias vías de transducción de señales en la célula huésped, a través de la translocación de proteínas de virulencia, llamados efectores. Este inyectisoma permite el paso de proteínas efectores a través de su propia membrana a otra célula (Garmendia et al., 2005).

En la tercera etapa, las bacterias se unen a la célula huésped a través de una proteína llamada intimina que se encuentra en la membrana externa y se fusiona con el ligando la proteína receptora translocada Tir que se encuentra en la membrana del huésped. La actina se polimeriza y forma la estructura de tipo pedestal (Kenny et al., 1997).

Figura 2

Modelo esquemático de infección por EPEC



Nota. 1. Bfp ayuda a la adherencia entre las bacterias y el enterocito, 2. El inyectisoma (SST3) permite el paso de proteínas efectoras a través de su membrana a otra célula y 3. Ocurre la fusión de Tir y la intimina, generando una estrecha adherencia (Elaboración propia).

2.3.1 Secreción de proteínas en EPEC

Como se mencionó anteriormente, las cepas de EPEC, tienen la capacidad de formar lesiones A/E. Para establecer una infección en el hospedero estos patógenos secretan proteínas para que ocurra la adherencia estrecha entre EPEC y el enterocito intestinal. Estas proteínas se dividen en dos grupos; las moléculas efectoras (EspF, EspG, EspH, Tir) y las transportadoras (EspA, EspB, EspD) (Croxen y Finlay, 2010; Deng, et al., 2004).

Una de las proteínas más importantes es Tir, que luego de ser traslocada, se inserta en la membrana del hospedero y recepta a la intimina. Esta proteína también interviene en mecanismos de señalización celular. Todas estas proteínas secretadas participan en el fenotipo A/E y las lesiones ocasionadas en el intestino que caracteriza a la enfermedad producida por EPEC (Kenny et al., 1997).

2.3.2 Factores de virulencia en EPEC

En EPEC los genes de virulencia se encuentran controlados por una cascada de regulación que aún no se ha definido en su totalidad. Entre los reguladores hasta ahora estudiados, se encuentran los codificados en el plásmido EAF y los reguladores codificados en la isla de patogenicidad LEE (Bustamante et al., 2001).

2.3.2.1 Plásmido EAF.

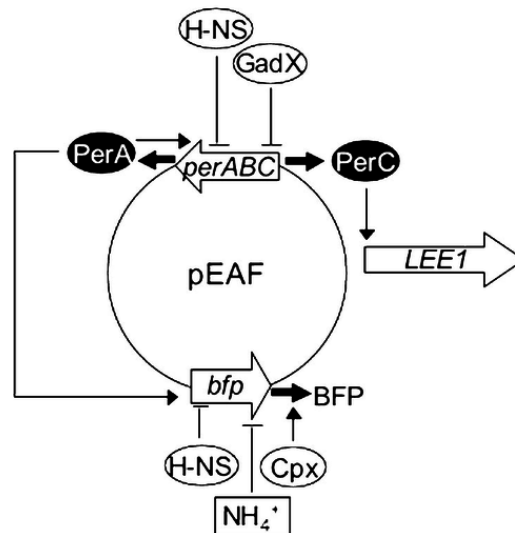
El plásmido EAF de 69kb (Figura 3), codifica para operones relacionados con la virulencia de EPEC. Uno de ellos es el operón *bfp*, que tienen genes necesarios para la biosíntesis de fimbrias Bfp y por otro lado se encuentra el operón *perABC*, compuesto por genes reguladores necesarios para la transcripción de *bfp* y para la activación transcripcional del gen *eae* en la isla de patogenicidad LEE, que codifica para la proteína de membrana externa intimina (Teixeira et al., 2015, Tobe et al., 1996).

PerC que está codificado en dicho operón, es el principal activador transcripcional de *ler*; sin embargo, su mecanismo de acción aún no ha sido esclarecido en su totalidad (Bustamante, et al., 2001).

Se ha reportado que las cepas que no poseen este plásmido son significativamente menos patógenas y no presentan el fenotipo de adherencia localizada (LA). Por lo que estos estudios demuestran que el plásmido EAF no solo posee genes importantes para la virulencia de EPEC, sino que también controla la expresión de genes localizados cromosómicamente (Tobe et al., 1999; Gómez, 1995).

Figura 3

Plásmido EAF



Nota. Regulación de los genes de virulencia codificados en el plásmido EAF (Procedente de: Mellies, J. 2007).

2.3.2.2 Locus de Eliminación de Enterocitos (LEE).

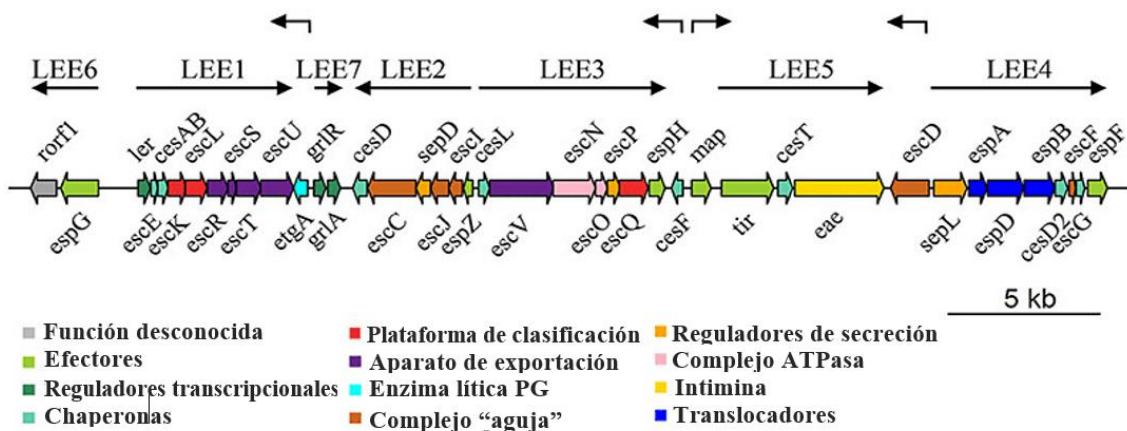
Los elementos necesarios para que ocurra la infección por EPEC, se encuentran codificados en esta isla de patogenicidad LEE (Figura 4). Contiene genes altamente conservados para ensamblar el SST3 y genes variables de proteínas efectoras que serán inyectadas a través de este sistema directamente en el citoplasma de la célula huésped (Brady et al., 2011).

LEE codifica dos factores de virulencia de gran importancia que se había mencionado anteriormente, los cuales son: la proteína de membrana externa denominada intimina y el receptor translocado de intimina, Tir (Nataro y Kaper, 1998). La Intimina es una proteína de membrana, indispensable para que se produzca la adhesión y colonización intestinal por A/E (Brady, et al., 2011).

Los reguladores de los genes LEE son el regulador positivo Ler (*LEE encoded regulator*) y el regulador negativo H-NS (*Histone-like nucleoid-structuring protein*). Por otro lado, en el operón LEE7 se encuentran codificados: *grlA* que actúa como activador transcripcional de *ler* y *grlR* que actúa como regulador negativo. Es así como se establece un circuito de regulación positiva en el que Ler activa el operón *grlA* y GrlA activa a *ler* (Figura 5). En lo que respecta a GrlR forma homodímeros con GrlA y así actúa como represor (Padavannil, et al., 2013; Bustamante, et al., 2001).

Figura 4

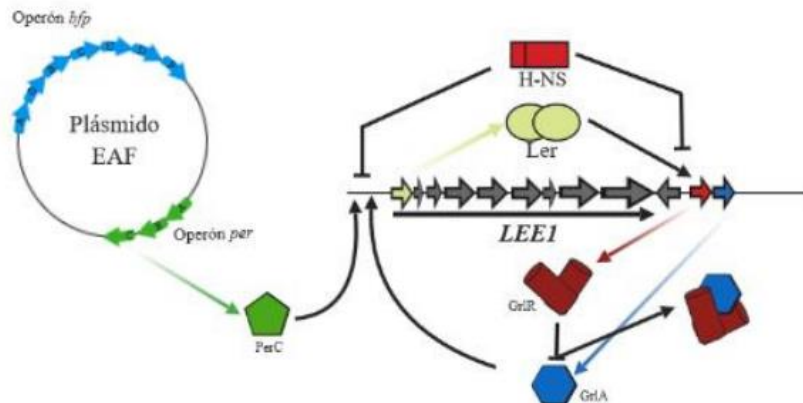
Isla de patogenicidad LEE



Nota. Organización genética ilustrativa de la isla de patogenicidad LEE en EPEC (Adaptado de: Gaytán, M et al., 2016).

Figura 5

Regulación de la isla LEE



Nota. PerC y GrlA actúan como activadores transcripcionales independientes de *ler*. Estos actúan sobre su promotor y activan la transcripción haciendo que ejerza su función como regulador positivo (Procedente de: Morales, 2019).

2.4 Biopelícula bacteriana

Cuando las bacterias se encuentran ante condiciones que pueden afectar su supervivencia o desarrollo, estas responden ante esos cambios, agrupándose sobre una superficie y presentando estados metabólicos y de expresión génica; a esta conglomeración se le conoce como biopelícula (Flemming et al., 2016).

Las biopelículas proporcionan protección frente a estreses mecánicos y frente a compuestos tóxicos. Las bacterias que forman parte de biopelículas muestran una tolerancia mayor al tratamiento con antibióticos y suelen estar asociadas a enfermedades crónicas (Romling y Balsalobre, 2012).

La mayoría de las bacterias pueden existir en dos estados, ya sea células sencillas móviles o sésiles. El diguanosín-monofosfato cíclico (c-di-GMP) media el intercambio entre estos dos estados celulares (Reinders et al, 2016).

2.4.2 Formación y desarrollo de biopelículas

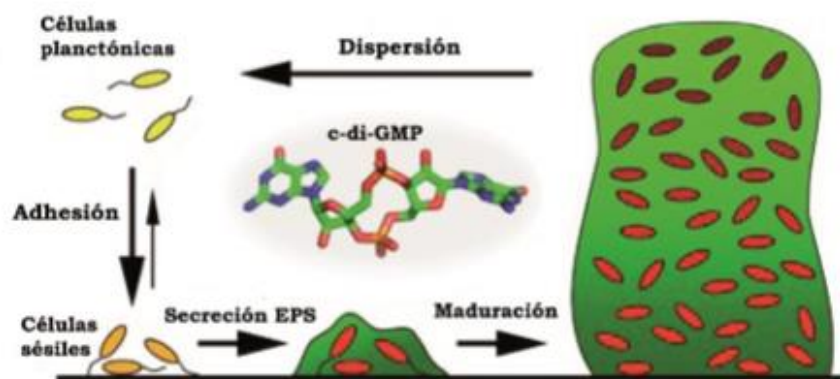
La formación de la biopelícula (Figura 6) consta primero del acondicionamiento de la superficie, en donde las bacterias generan un ambiente favorable para la fijación. Como segundo paso se da la adhesión primaria, en donde las células sésiles se

adhieren a la superficie formando microcolonias en donde participan las fimbrias de tipo I, Ag43, EspA y BFP. En tercer lugar se da la colonización y maduración aquí las células se unen al sustrato para la producción de exopolisacáridos, limitándose la disponibilidad de nutrientes (Flemming et al., 2016).

Finalmente, se da el desprendimiento de microorganismos, mediante distintos procesos como erosión, oleaje, siembra, entre otros. Se produce este último paso para que las células se desprendan y colonicen nuevos ambientes, debido a que en su entorno los nutrientes son escasos y se estima la presencia de sustancias tóxicas (Wang y Zhang, 2012).

Figura 6

Etapas de la formación de biopelículas bacterianas



Nota. Formación de la biopelícula a partir de células sésiles hasta su dispersión en nuevos ambientes, mediado por el c-di-GMP (Procedente de Krasteva et al, 2010).

2.5 Di guanósín monofosfato cíclico (c-di-GMP).

El c-di-GMP es capaz de regular importantes procesos biológicos como la motilidad, adherencia, formación de biopelículas, virulencia, y desarrollo del ciclo celular. La regulación de la concentración del c-di-GMP está determinado por la acción antagonista de las enzimas diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas (Hengge, 2009)

Esta molécula es clave a la hora de llevar a cabo todos esos procesos bacterianos, interiorizando las señales ambientales percibidas a través de cascadas regulatorias. Este segundo mensajero está implicado en la transición hacia un estilo de vida sedentaria en EPEC y en otras bacterias más (Romling y Balsalobre, 2012).

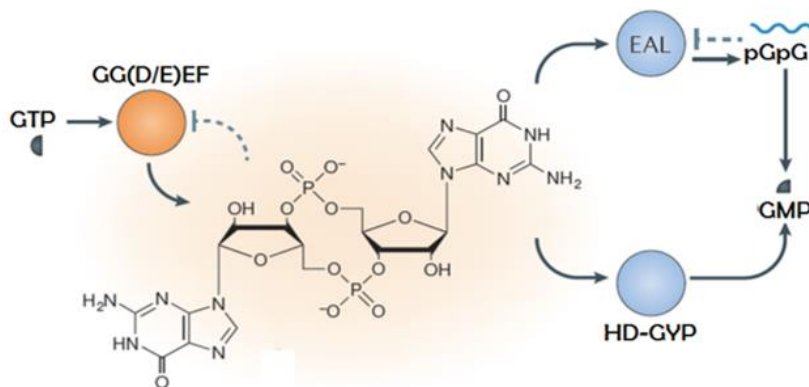
2.5.1 Diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas

Las diguanilato ciclasas (DGCs) son enzimas encargadas de la síntesis del c-di-GMP y las fosfodiesterasas (PDEs) catalizan la hidrólisis de esta molécula. Tanto las DGCs y las PDEs presentan dominios funcionales en su extremo carboxilo característicos de su actividad. Para las DGCs es un dominio conocido como GG(D/E)EF (Figura 7) por los residuos de aminoácidos que presenta (Gly-Gly-(Asp/Glu)-Glu-Phe). Por otro lado, para las PDEs poseen un dominio llamado EAL (Figura 5) (Glu-Ala-Leu) ó HD-GYP (His-Asp-Gly-Tyr-Pro) (Hengge, 2009; 2016).

Según Hengge (2016), la producción de c-di-GMP en diversas condiciones está vinculada a la presencia o ausencia de genes que codifican para DGCs y PDE. Esto sugiere que ciertos efectores se activan o reprimen, ya que la señalización por c-di-GMP es específica.

Figura 7

Síntesis del c-di-GMP



Nota. Figura esquemática de la síntesis del c-di-GMP con las enzimas DGCs y PDEs con sus respectivos dominios (Tomado de: Jenal, et al., 2017).

2.6 Genes reporteros

Un gen reportero es usado para definir a un gen con fenotipo medible. Generalmente son escogidos de acuerdo con su sensibilidad, conveniencia y estabilidad. Adquieren este nombre debido a que proveen de información que corresponde a la regulación o acción de un gen distinto. Estos genes codifican proteínas cuya expresión es detectable, entre los más usados está el cloramfenicol acetil transferasa (CAT). Este gen tiene la capacidad de inactivar el antibiótico cloramfenicol mediante la acetilación,

impidiendo que este una a los ribosomas y permitiendo la síntesis de proteínas. La cantidad de acetilcloramfenicol producido se correlaciona con la actividad del promotor o la expresión del gen de interés (Naylor, 1999).

2.6.1 Ventajas del uso de genes reporteros

Los genes reporteros, tienen la ventaja de amplificar la señal de la expresión (transcripción, estabilidad, traducción) de un gen en la superficie de una célula para recibir una respuesta fácilmente detectable. Su uso facilita la comparación de diferentes secuencias y mejora la sensibilidad con la cual se puede medir la actividad de un gen (Naylor, 1999).

2.7 Medios de cultivo

El medio Luria-Bertani (LB) y el medio Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM), son dos tipos de medios de cultivo con composiciones diferentes utilizados comúnmente para crecimiento de bacterias y células eucariotas, respectivamente. La influencia de estos medios en la expresión de factores de virulencia en EPEC puede explicarse por las condiciones ambientales y los nutrientes proporcionados por cada medio (Hazen et al, 2015).

2.7.1 Medio LB

Este medio es común para cultivar bacterias y es rico en nutrientes como peptona, extracto de levadura y sales. Es usado mayormente para el crecimiento en condiciones de laboratorio. Su efecto en la expresión de factores de virulencia puede variar según la cepa bacteriana y el contexto experimental (Hazen et al, 2015)

2.7.1 Medio DMEM

Es un medio de cultivo diseñado para el crecimiento de células eucariotas, como las células de mamíferos. Es rico en aminoácidos, glucosa, sales y otros nutrientes primordiales para el crecimiento celular. Cuando se cultivan bacterias como EPEC en este medio, están expuestas a condiciones que imitan el entorno del hospedero mamífero. Esto explicaría porqué la bacteria promueve la expresión de factores de virulencia, debido a que percibe que se encuentra en un entorno similar al del intestino y se adapta para favorecer la colonización y la infección (Hazen et al, 2015).

CAPÍTULO III

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Plásmidos y cepas bacterianas

En la tabla 1 se describen los plásmidos utilizados para este proyecto de investigación.

Tabla 1

Plásmidos y cepas utilizados en este proyecto

Plásmidos	Descripción	Referencia
pMPM T6	Plásmido de bajo número de copias, Tc ^R , posee un promotor inducible con arabinosa.	Mayer, P. (1995)
pMPM T6- <i>pdeI</i>	Derivado de pMPM T6 que expresa PdeI.	Este trabajo.
pKK232-8	Vector utilizado para realizar fusiones transcripcionales al gen reportero <i>cat</i> .	Brosius, 1984.
pKK232-8+LEE1- <i>cat</i>	Fusión transcripcional de la región LEE1 unido al gen reportero cloranfenicol acetil transferasa.	
pKK232-8+LEE2- <i>cat</i>	Fusión transcripcional de la región LEE2 unido al gen reportero cloranfenicol acetil transferasa.	
pKK232-8+ <i>bfpA</i> - <i>cat</i>	Fusión transcripcional de la región <i>bfpA</i> unido al gen reportero cloranfenicol acetil transferasa.	

En la Tabla 2 se describen las cepas bacterianas usadas en este proyecto de investigación.

Tabla 2

Cepas bacterianas utilizadas en este proyecto

Cepas	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> K-12	Silvestre	Cepa de laboratorio
EPEC	Silvestre, Sm ^R . EPEC E2348/69	Levine, et al. (1978)
EPEC-T6	EPEC, transformada con pMPMT6, Tc ^R	Este trabajo
EPEC- <i>pdeI</i>	EPEC transformada con pMPMT6 - <i>pdeI</i> .	Este trabajo
EPEC- <i>pdeR</i> /pKK	EPEC- <i>pdeR</i> transformada con pKK232-8.	Este trabajo
EPEC-T6/pKK-LEE1	EPEC-T6 transformada con pKK232-8+LEE1-cat.	Este trabajo
EPEC-T6/pKK-LEE2	EPEC-T6 transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo
EPEC-T6/pKK- <i>bfpA</i>	EPEC-T6 transformada con pKK232-8+ <i>bfpA</i> -cat.	Este trabajo
EPEC- <i>pdeI</i> /pKK-LEE1	EPEC- <i>pdeI</i> transformada con pKK232-8+LEE1-cat.	Este trabajo
EPEC- <i>pdeI</i> /pKK-LEE2	EPEC- <i>pdeI</i> transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo
EPEC- <i>pdeI</i> /pKK- <i>bfpA</i>	EPEC- <i>pdeI</i> transformada con pKK232-8+ <i>bfpA</i> -cat.	Este trabajo
Δ <i>grlA</i>	EPEC mutante en <i>grlA</i> , Sm ^R	Puente, et al., (1996)
Δ <i>perC</i>	EPEC mutante en <i>perC</i>	Puente, et al., (1996)
pEAF	EPEC mutante del plásmido EAF	Puente, et al., (1996)
Δ GrlA/EPEC-T6	EPEC- Δ GrlA transformada con pMPM T6	Este trabajo
Δ <i>perC</i> /EPEC-T6	EPEC- Δ <i>perC</i> transformada con pMPMT6	Este trabajo
pEAF/EPEC-T6	pEAF transformada con EPEC-T6	Este trabajo
Δ GrlA/EPEC- <i>pdeI</i>	EPEC- Δ GrlA transformada con pMPM T6- <i>pdeI</i> .	Este trabajo
Δ <i>perC</i> /EPEC- <i>pdeI</i>	EPEC- Δ <i>perC</i> transformada con pMPM T6- <i>pdeI</i>	Este trabajo
pEAF/EPEC- <i>pdeI</i>	pEAF transformada con EPEC- <i>pdeI</i>	Este trabajo

3.2 Condiciones de crecimiento

Los preinóculos crecieron durante la noche (ON) en 5ml de medio LB (Luria-Bertani) a 37°C en agitación. A continuación, se inoculó 50 µL en medio LB o DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium + 1% de LB) suplementados con 5 µL de antibióticos correspondientes. En cuanto a medios sólidos, se agregó 15% de agar. Las concentraciones de los antibióticos son las siguientes: Tetraciclina (Tc 12 µg *mL⁻¹), Ampicilina (200 µg *mL⁻¹), Kanamicina (Km 25 µg *mL⁻¹), Estreptomicina (Stp 100 µg *mL⁻¹).

3.3 Reacción en cadena de la polimerasa (PCR)

3.3.1 Extracción de ADN

La extracción de ADN genómico se realizó mediante precipitación con cloruro de sodio y para la extracción de ADN plasmídico de EPEC se utilizó el kit de Biomiga - Plasmid Miniprep, siguiendo los protocolos establecidos de fábrica.

3.3.2 Diseño de oligonucleótidos

Los oligonucleótidos se diseñaron con el programa SnapGene 6.0.5. y su secuencia se describe en la tabla 3.

Tabla 3

Oligonucleótidos usados en este trabajo

Nombre	Secuencia 5'→ 3'	TM
<i>pdeI-NcoI</i> F	GCG <u>CCATGGT</u> ATCGGAACGCGCG	60° C
<i>pdeI-PstI</i> R	CGC <u>CTGCAGAG</u> TACGAATTTATTGATTCTGGACATACGT	59° C
<i>pdeR-BamHI</i> F	GCGGGAT <u>CCCCTTCG</u> TATATCCCGGCAG	59° C
<i>pdeR-HindIII</i> R	GCGA <u>AGCTTCA</u> ACGTTGTGGACTCCCTAACG	59° C

Nota. En esta tabla, se muestra los oligonucleótidos diseñados para amplificar los fragmentos de interés. En la secuencia, los nucleótidos subrayados son los sitios de reconocimiento de las enzimas empleadas, como son *NcoI*, *PstI*, *BamHI*, *HindIII*.

3.3.3 Estandarización de la PCR

Para amplificar las regiones de interés, se estandarizó la técnica de PCR a las condiciones que se detalla en la tabla 4.

Tabla 4

Coctel para PCR de pdeI y pdeR

Reactivo	Cantidad (μL)	
	<i>pdeI</i>	<i>pdeR</i>
Gen		
DNA (100 ng*mL^{-1})	1	2.5
Oligo Forward (10 pmo*μL^{-1})	0.65	0.625
Oligo Reverse (10 pmol*μL^{-1})	0.65	0.625
dNTP's (10 mM)	0.3	0.635
Máster mix	2.82	-
Buffer HF	3	-
H₂O	16.9	16.41
MgCl₂ (50 mM)	-	1.5
Buffer 10x	-	2.5
Taq polimerasa (5U* μL^{-1})	-	0.2

Nota. La temperatura de alineamiento para ambos genes fue de 51°C, los datos mencionados son para una reacción de 25 μL .

Debido al tamaño de los fragmentos, las condiciones del termociclador fueron distintas para cada gen, por lo que se detallan a continuación (tabla 5).

Tabla 5

Condiciones del termociclador

<i>pdeI</i>					
1	2	3	4	5	6
98°C	98°C	Tm= 51°C	72°C		72°C
30seg	10seg	30 seg	1 min	30 ciclos	10 min
<i>pdeR</i>					
95°C	95°C	Tm= 51°C	72°C		72°C
3 min	45 seg	30 seg	1 min	29 ciclos	5 min

Nota. Se describen los ciclos y las condiciones a las cuales se programó el termociclador para las PCR's.

3.3.4 Electroforesis en gel de agarosa

Las muestras de *pdeR* se corrieron en geles de agarosa al 1.5% y para *pdeI* se corrieron en geles de agarosa al 1%, dichas muestras son: productos de PCR, extracciones de ADN genómico, plásmidos y digestiones enzimáticas, con TAE 1X durante 45 min, a 100 V. Una vez que se terminó la corrida, se tiñó con bromuro de etidio durante 3 minutos en agitación y se observó en el transiluminador, bajo luz UV.

3.4 Construcción de plásmidos recombinantes.

3.4.1 Purificación de productos de PCR

Se realizó las reacciones de PCR tal como se describe en las tablas 4 y 5 para los genes *pdeI* y *pdeR*, respectivamente. Una vez corridas las muestras de los productos de PCR en geles de agarosa, en el caso del gen *pdeR*, se procedió a concentrar las reacciones en un tubo Eppendorf de 1.5 ml, posteriormente se agregó 1ml de etanol absoluto y 1 µl de glucógeno, se procedió a mezclar uniformemente con la ayuda del vortex y se almacenó en ultracongelación a -70°C, durante 30 min como mínimo.

Pasado el tiempo de espera, se procedió a centrifugar durante 15 min a 13,500 rpm, posteriormente se desechó el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 70%, se mezcló durante 10 segundos aproximadamente y se centrifugó 5 min a 13,500 rpm. Se tiró el sobrenadante y se extrajo con pipeta cualquier residuo de líquido sobrante, para luego proceder a secar completamente el pellet en un concentrador de vacío. Luego de este proceso, se resuspendió en 50 µl de agua mQ. Para finalizar, se procedió a evaluar la presencia e integridad del producto purificado en un gel de agarosa al 1.5%.

Si las bandas que se observaron en el gel de electroforesis no fueron específicas, se procedió a cortar la banda de acuerdo con el tamaño del fragmento de interés y se le colocó en un tubo Eppendorf, para posteriormente usar Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, siguiendo sus instrucciones y al finalizar se eluyó en 30 µl de agua mQ. Para comprobar si el producto de PCR está íntegro, se corrió una muestra en gel de agarosa al 1%.

3.4.2 Digestión y ligación enzimática de productos de PCR y plásmidos

Una vez purificados los productos de PCR y extraído el plásmido, se procedió a digerirlos con enzimas de restricción. Para el caso de *pdeI*, se digirió el plásmido pMPM T6 y el producto de PCR, con las enzimas *NcoI* y *PstII*. Para *pdeR* se digirió el plásmido pKK 232-8 y el producto de PCR con las enzimas *BamHI* y *HindIII*, para finalmente ligar el plásmido con el fragmento digerido.

Para la digestión del plásmido pMPM T6 se usó 30 μ l de ya purificado + 5 μ l de buffer de rápida digestión (FD) + 1 μ l de la enzima *NcoI* + 1 μ l de la enzima *PstI* + 13 μ l de H₂O para tener un volumen final de 50 μ l. Para el plásmido pKK 232-8 se usó 47.5 μ l del plásmido purificado + 5.5 de buffer FD + 1 μ l de enzima *BamHI* + 1 μ l de enzima *HindIII*, de igual manera para un volumen final de 55 μ l.

Para la digestión de *pdeI* se usó 25 μ l del producto de PCR + 3 μ l de buffer FD + 1 μ l de la enzima *NcoI* + 1 μ l de la enzima I para tener un volumen final de 30 μ l. En el caso de *pdeR* se utilizó 16.5 μ l del producto de PCR + 2 μ l de buffer FD + 0.75 μ l de la enzima *BamHI* + 0.75 μ l de la enzima *HindIII*, para tener un volumen final del 20 μ l. Estas digestiones se dejaron 10 min a 37°C y se inactivaron 10 min a 85°C, en todos los casos.

Una vez digeridos los vectores y los insertos, se procedió a ligarles usando las siguientes cantidades: para *pdeI*, se usó 8 μ l del plásmido pMPM T6 + 9 μ l del inserto + 2 μ l de buffer + 1 μ l de enzima ligasa, para un volumen final de 20 μ l. En el caso de *pdeR*, se usó 7 μ l del plásmido pKK 232-8 + 10 μ l del inserto + 2 μ l de buffer + 1 μ l de enzima ligasa. En ambos casos se dejaron toda la noche a 4°C.

3.4.3 Preparación de células competentes para electroporación

Se preparó un inóculo de la cepa en 5 ml de LB adicionado con los antibióticos para los cuales tiene resistencia la cepa y se incubó toda la noche a 37°C en agitación. Luego se transfirió 1 ml del inóculo incubado toda la noche, a un matraz con 100 ml de LB adicionado los antibióticos adecuados, se incubó a 37°C en agitación hasta obtener una densidad óptica (DO_{600 nm}) de 0.6 – 0.8, en aproximadamente 2-3 horas.

Posteriormente, se transfirió a tubos Falcon de 50 ml y se centrifugó durante 6 min a 8,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se procedió a realizar lavados con agua

mQ. Se agregó 40 ml de agua mQ estéril previamente enfriada, se resuspendió el pellet completamente con vortex y se volvió a centrifugar 6 min a 8,000 rpm, este lavado se repitió 2 veces, al tercer lavado se agregó 25 ml de agua y se centrifugó en las mismas condiciones, de igual manera entre cada lavado se desechó el sobrenadante y al poner agua se resuspendió completamente con vortex.

Para finalizar, se agregó 40 ml de glicerol al 10% previamente enfriado (para proteger las células) y se centrifugó durante 8 min a 8,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se resuspendió con pipeta en glicerol al 10% de acuerdo con el tamaño de la pastilla final (200 – 400 μ l), se distribuyó 80 μ l de bacterias concentradas en tubos Eppendorf y se guardaron en ultracongelación.

3.4.4 Transformación de plásmidos recombinantes mediante electroporación

Previamente se enfriaron las celdillas de electroporación (1 para cada plásmido a transformar); aparte, en tubos Eppendorf de 1.5 ml se agregó 1 ml de medio SOC; se preparó la ligación colocando 10 μ l en un tubo Eppendorf de 500 μ l y por último se prepararon las células competentes para electroporar, colocándoles en hielo durante 2min.

Para iniciar la transformación, se mezcló 50 μ l de células concentradas con 10 μ l de la ligación y se insertó la mezcla en una celdilla para su electroporación. En la sección de ajustes, se seleccionó en “bacteria” en la opción “Ec2” y en mediciones, se programó en milisegundos para la realización del experimento. Una vez que se dio la descarga en el electroporador, se le agrega el medio SOC y se realiza un lavado de la celdilla con el medio, para recuperar la mezcla de células y productos de ligación.

Se incubó las bacterias transformadas durante 1h30 a 37°C en agitación. Pasado este tiempo, se centrifugó 1 min a 12,000 rpm y se procedió a resuspender el pellet con el medio restante en el tubo, posteriormente se plaqueó todo el cultivo concentrado en cajas Petri con agar LB y Tc para la transformación de *pdeI* con el plásmido pMPPM T6 y en cajas de LB y Amp para la transformación de *pdeR* con el plásmido pKK 232-8. Se dejó incubando durante 24 a 48h a 37°C.

3.4.5 Selección de colonias y comprobación por PCR

Se realsó colonias desarrolladas en las cajas de Petri previamente plaqueadas, en cajas de LB y Tc para el plásmido recombinante de *pdeI* y en cajas de LB y Amp para el plásmido recombinante de *pdeR*, se dejó incubando a 37°C durante 24 horas y se verificó el crecimiento de las colonias.

Después de identificar las colonias que crecieron en las placas con el antibiótico específico del plásmido recombinante, se procedió a inocular una o dos colonias de cada gen en 5 ml de medio LB. Posteriormente, se llevó a cabo una incubación nocturna a 37°C con agitación.

Posteriormente, se extrajo los plásmidos de estas colonias, y se utilizó como templado en la PCR, usando una combinación de oligonucleótidos, entre forward y reverse del gen y forward y reverse que reconocían sitios específicos del plásmido.

Los plásmidos fueron enviados a la unidad de secuenciación para corroborar la ausencia de mutaciones generadas en la PCR. Una vez cercioradas que las colonias seleccionadas contienen el plásmido recombinante, se procedió a criopreservar los cultivos usando 200 µl de glicerol al 100% y 800 µl del cultivo.

3.5 Evaluación de formación de biopelícula y expresión de factores de virulencia

3.5.1 Ensayo de cuantificación de biopelícula

Para los ensayos de cuantificación de biopelícula se usó la metodología propuesta por Stepanovic et al., (2000).

Se dejó crecer durante toda la noche el preinóculo transformado con cada plásmido recombinante, con sus respectivos antibióticos a 37° C en agitación. Luego se procedió a realizar diluciones de cada cultivo en relación 1:100 en medio LB y DMEM (añadido 1% de LB). Posteriormente se sembró 200 µl de cultivo en placas de microtitulación de poliestireno, para incubar en medio estático a 30 y 37°C, cabe recalcar que se añadió arabinosa al 1% y glucosa al 1%, para evaluar a distintas condiciones. Se usó como control negativo la cepa de EPEC con el plásmido pMPMT6 sin el inserto del gen *pdeI*.

Se dejó durante 24, 48 y 72 horas, para realizar la lectura de espectrofotometría y cuantificarlas a 630 nm. Pasado el tiempo correspondiente, se desechó el cultivo

bacteriano y se lavó cada pozo con 200 µl de PBS 1X, haciendo tres repeticiones. A continuación, se fijó la biopelícula, añadiendo 200 µl de metanol a cada pozo y se dejó actuar durante 15 min a temperatura ambiente. Una vez pasado el tiempo, se desechó el metanol y se dejó secar completamente cada placa.

Se procedió a teñir los pozos con 200 µl de cristal violeta al 0.2% durante 10 min, luego se retiró el cristal violeta y se realizó tres lavados con agua. Cada placa se incubó a 50° C durante 15 min para evaporar completamente el agua y posterior a eso, se resolubilizó el cristal violeta absorbido por la biopelícula con 200 µl de ácido acético al 33%. Finalmente, se vuelven a leer estas placas a 570 nm, para conocer la cantidad de biopelícula formada, se realizó una división de las lecturas obtenidas de cristal violeta y las lecturas de células planctónicas.

3.5.2 Perfil de proteínas secretadas

La metodología usada se basó en lo descrito por Deng, W., et al. (2005).

Los preinóculos de cada bacteria crecieron en 5 ml de LB con sus respectivos antibióticos a 37° C en agitación durante toda la noche. Posteriormente se realizaron diluciones de cada cultivo 1:100 en medio LB o DMEM (añadido 1% de LB), se evaluó a 3 condiciones, añadiendo arabinosa al 0.01%, glucosa al 0.01% y sin añadir azúcares, y se incubó a las mismas condiciones. Cuando los cultivos alcanzaron una $DO_{595nm} \sim 1.0$, se recuperó 4.5 ml de cada cultivo, repartido en 3 tubos Eppendorf de 1.5 ml, y se centrifugaron 5 min a 14,000 rpm.

Se recolectaron 720 µl del sobrenadante de cada tubo en uno nuevo (los pellets se almacenaron a -20° C para ser usados en Western Blot), luego se les agregó 540 µl de metanol, mezclando completamente con vortex, posteriormente se añadió 180 µl de cloroformo y se mezcló nuevamente con vortex. Se centrifugó a 4° C durante 5 min a 14,000 rpm, se desechó el sobrenadante sin tocar el velo formado y se añadió 540 µl de metanol, se mezcló con vortex y se centrifugó a 4° C durante 10 min a 14,000 rpm.

Posteriormente, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar el pellet durante toda la noche. Al día siguiente se resuspendió en 25 µl de buffer de carga para proteínas y se incubaron 10 min a 95° C para desnaturalizar a las proteínas.

Finalmente, se juntaron los tubos Eppendorf pertenecientes a la misma muestra y se corrieron en un gel desnaturizante de SDS-poliacrilamida al 12% (Tabla 6) durante 5 horas con voltaje de 25 mA por gel, usando como buffer Tris-Glicina. Pasado el tiempo de corrida, se tiñeron los geles con azul de Coomasie durante 2 horas en agitación y se destiñeron con ácido acético-metanol ON.

Tabla 6

Preparación del gel desnaturizante de SDS-poliacrilamida 12%

Reactivos	Gel separador	Gel concentrador
H ₂ O	7 ml	6 ml
Acrilamida 30% - bisacrilamida 0.8%	8 ml	1.5 ml
1.5 M Tris – HCl pH 8.8, 0.4% SDS	5 ml	-
0.5 M Tris – HCl pH 6.8, 0.4% SDS	-	2.5 ml
PSA 10%	100 µl	50 µl
TEMED	16 µl	16 µl

Nota. Se describen las cantidades correspondientes a los geles de poliacrilamida para correr muestras de proteínas.

3.5.3 Detección de proteínas intracelulares mediante Western Blot

Para realizar esta técnica, se siguió la metodología planteada por Kurien, B. (2006).

A las pastillas recolectadas en el ensayo de perfil de proteínas secretadas, se resuspendieron en 300 µl de PBS 1X y se sonicaron durante 3 min a intervalos de pulsos “on” 10 y pulsos “off” 5, posteriormente se les agregó 100 µl de buffer de carga y se calentaron a 95°C durante 10 min. Se homogeneizaron las muestras y se corrieron en un gel desnaturizante de SDS-poliacrilamida al 12% durante 5 horas con voltaje de 25 mA por gel.

Finalizada la corrida, se transfirió las proteínas a una membrana de nitrocelulosa de la siguiente manera: se colocó 3 papeles filtro, después se situó la membrana de nitrocelulosa, luego el gel de poliacrilamida y finalmente otros 3 papeles filtro, se debe recalcar que todos los componentes antes mencionados fueron humedecidos en buffer de transferencia. Se dejó transferir durante 43 min a 17V.

Al finalizar la transferencia, se tiñó la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau, para verificar que se hayan transferido correctamente las proteínas y se enjuagó con agua destilada para retirar toda la tinción. Después se bloqueó la membrana con PBS-T mezclado con leche en polvo comercial sin grasa al 5% durante 1 hora en agitación.

Pasado ese tiempo, se realizó lavados de la membrana con PBS-T 3 veces en intervalos de 10 min y se incubó con los anticuerpos primarios (Tabla 7) durante 1 hora a temperatura ambiente, en agitación. Una vez finalizado el tiempo, se lavó la membrana con PBS-T, 3 veces en intervalos de 10 min, posteriormente se añadió el anticuerpo secundario (Tabla 8) por 1h30 min a temperatura ambiente, de igual manera al finalizar el tiempo se lavó 3 veces con PBS-T y se le añadió el reactivo oxidante y luminol 1:1 durante 2 min.

La membrana se reveló sobre películas Kodak en absoluta oscuridad, el tiempo de exposición varió de acuerdo con la intensidad de la reacción de los anticuerpos. Finalmente, la película se reveló, se fijó y se enjuagó con agua, dejándole secar completamente.

Tabla 7

Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios	Concentración
α -GroEL	1:50,000
α -Tir	1:10,000
α -EspB	1:10,000
α -EscJ	1:10,000
Anticuerpo secundario	Concentración
α -Conejo	1:10,000

Nota. Se detallan los anticuerpos primarios y secundarios para el ensayo de Western Blot con sus respectivas diluciones.

3.6 Fusiones transcripcionales de LEE1, LEE2, *bfpA* al gen reportero *cat*

Los preinóculos de cada una de las cepas transformadas con las fusiones transcripcionales crecieron en 5ml de LB a 37°C, durante toda la noche. Al siguiente día se realizó diluciones en relación 1:100 en medios LB y DMEM (adicionado 1% de LB) con sus respectivos antibióticos para cada cepa y también se añadió arabinosa al 0.1% y glucosa al 0.1%. Luego se colectó 1 ml de cada inóculo cuando alcanzó una $DO_{595nm} \sim 0.6, 0.8, 1.0$.

Se centrifugó durante 1 min a 12,000 rpm, se desechó el sobrenadante y se lavó el pellet con 800 μ l de buffer TDTT, nuevamente se centrifugó a las mismas condiciones, se desechó el sobrenadante y se guardaron los pellets a -20°C.

Al día siguiente se agregaron 600 μ l a los pellets guardados anteriormente, se resuspendió y se sonicaron a pulsos “on” de 10 segundos y pulsos “off” de 5 segundos. Una vez terminado ese proceso, se centrifugó durante 15 min a 13,500 para recuperar el sobrenadante a un tubo Eppendorf nuevo.

Para la lectura de proteínas totales, se procedió a colocar 10 μ l de cada muestra en una placa de poliestireno de 96 pozos, siguiendo el siguiente orden:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	1	8	8	16	16	24	24	32	32	40	40
B	2	2	9	9	17	17	25	25	33	33	41	41
C	3	3	10	10	18	18	26	26	34	34	42	42
D	4	4	11	11	19	19	27	27	35	35	43	43
E	5	5	12	12	20	20	28	28	36	36	44	44
F	6	6	13	13	21	21	29	29	37	37	45	45
G	7	7	14	14	22	22	30	30	38	38	46	46
H	Blanco	Blanco	15	15	23	23	31	31	39	39	47	47

A continuación, se procedió a preparar el reactivo BCA (Protein Assay Kit Reagent) y se añadieron 200 μ l de este a cada pocillo. Las placas fueron incubadas a 37°C durante 30 minutos, tras lo cual se procedió a medir sus absorbancias a 562 nm.

Para la lectura de la actividad de CAT, se colocó 10 μ l de cada muestra en una placa de poliestireno de 96 pozos en el siguiente orden:

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	1	9	17	25	33	41	1	9	17	25	33	41
B	2	10	18	26	34	42	2	10	18	26	34	42
C	3	11	19	27	35	43	3	11	19	27	35	43
D	4	12	20	28	36	44	4	12	20	28	36	44
E	5	13	21	29	37	45	5	13	21	29	37	45
F	6	14	22	30	38	46	6	14	22	30	38	46
G	7	15	23	31	39	47	7	15	23	31	39	47
H	8	16	24	32	40	48	8	16	24	32	40	48

Se disolvió 0.02 g de DNTB (ácido ditiobisnitrobenzoico) en 5 ml de Tris HCl 1M pH 7.8 con vortex, se tomó 2.5 ml de esta mezcla y se diluyó con 22 ml de agua mQ. Posteriormente, se agregó 500 µl de acetyl CoA 0.2 mM y 500 µl de cloranfenicol 0.2 mM. Se mezcló bien y se agregó 200 µl de este reactivo a cada uno de los pozos de la placa con la pipeta multicanal e inmediatamente leer su absorbancia, en el modo cinético de lectura (cada 10 seg durante 5 min).

3.7 Análisis estadístico

Las variables de crecimiento bacteriano en cuantificación de biopelícula y actividad específica de *cat*, fueron analizadas a través de un análisis de la varianza (ANOVA) ajustado a un modelo de diseño de bloques completos al azar (DBCA). La cuantificación de biopelícula recibió un tratamiento distinto ya que esta fue analizada a través de un ANOVA de medidas repetidas. Todas las variables fueron evaluadas para establecer si se cumplían con los supuestos de la estadística paramétrica. La normalidad fue testeada mediante la prueba de Shapiro Wilks, por otra parte, la homocedasticidad se determinó a través de la prueba de Levene.

Variabes que no cumplieron con los supuestos paramétricos fueron transformadas mediante raíz cuadrada para posteriormente ser analizadas con un ANOVA. Aquellas que presentaron significancia estadística en el ANOVA fueron sometidas a una prueba de rangos de significancia de Tukey ($\alpha=0.05$). La medida de dispersión presentada en las gráficas y tablas de resultados corresponde al error estándar.

CAPÍTULO IV

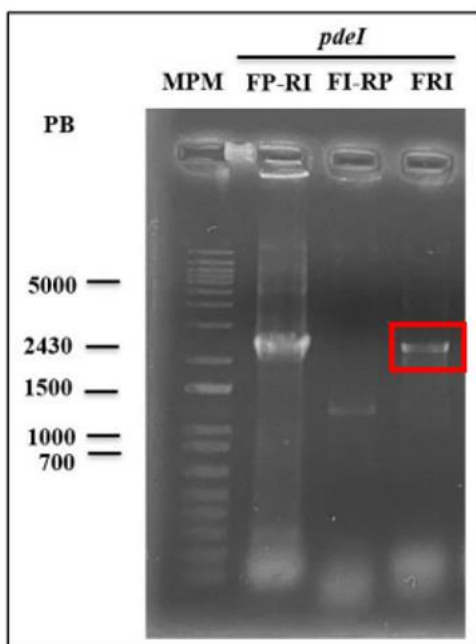
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Construcción de una cepa recombinante de EPEC mediante la transformación con un vector que expresa a *pdeI*

Se construyó un plásmido recombinante para expresar el gen *pdeI* desde el promotor pBad del plásmido pMPM T6 (Figura 1). Para su comprobación se realizó PCR's, empleando juegos de oligonucleótidos que reconocen sitios específicos del plásmido y el inserto.

Figura 8

Construcción del plásmido recombinante del gen pdeI



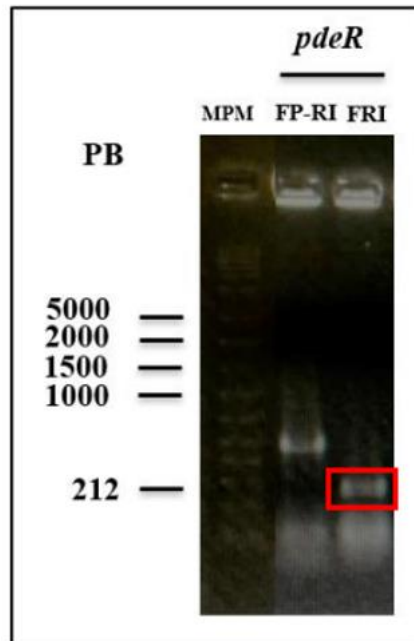
Nota: Electroforesis de PCR's donde se observa la banda del inserto de 2430 PB, usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos: Forward del Plásmido y Reverse de Inserto (FP-RI), Forward del Inserto y Reverse del Plásmido (FI-RP) y Forward y Reverse del Inserto (FRI). El tamaño del fragmento es de 2430 PB.

Por otro lado, se obtuvo de manera efectiva la construcción del plásmido recombinante del gen *pdeR* con el plásmido pKK 232-8, para la fusión reportera a *cat*

(Figura 2). Se realizó PCR's comprobatorias usando tanto los oligonucleótidos diseñados como los que reconocen sitios específicos de pKK 232-8.

Figura 9

*Construcción del plásmido recombinante del gen *pdeR**



Nota: Electroforesis de PCR's usando las siguientes combinaciones de oligonucleótidos: Forward del Plásmido y Reverse del Inserto (FP-RI) y Forward y Reverse del Inserto (FRI). El tamaño del fragmento es de 212 PB.

Durante el proceso de clonación del marco de lectura del gen *pdeI*, surgieron varios inconvenientes que llevaron a la decisión de eliminar los sitios que codifican para segmentos transmembranales. Esta elección se hizo debido a que la abundancia de proteínas ancladas a la membrana interna puede ser tóxica para la bacteria y provoca su muerte. Por lo tanto, se consideró prudente eliminar estos segmentos para garantizar de alguna manera la funcionalidad del gen clonado (Pérez, M y Mota, M. 2006).

Es por ello que se excluyó un dominio denominado CHASE (Cyclase / Histidine Kinases-Associated Sensing Extracellular), que se encuentra flanqueado por dichos segmentos involucrados en la señalización extracelular. Estas modificaciones fueron

diseñadas para mejorar la viabilidad y funcionalidad de la bacteria con el gen *pdeI*, asegurando su expresión (Anantharaman, V., y Aravind, L. 2001).

De la misma forma para el gen *pdeR*, se decidió realizar una fusión transcripcional, usando la región reguladora del gen, para explorar su expresión (Bustamante, et al. 2001).

El mecanismo molecular encargado de la señalización celular para la regulación de factores de virulencia, como en cualquier otro patógeno, aún no ha sido completamente estudiado. Sin embargo, hasta el momento se conoce que estos mecanismos le confieren a la bacteria la habilidad de ser patógena. Por lo que, los constructos bajo estudio permiten ampliar el enfoque y contribuir a la comprensión de dicha señalización, proporcionando información nueva sobre la regulación génica y los mecanismos de transducción de señales en esta cepa bacteriana (Contreras, 2010).

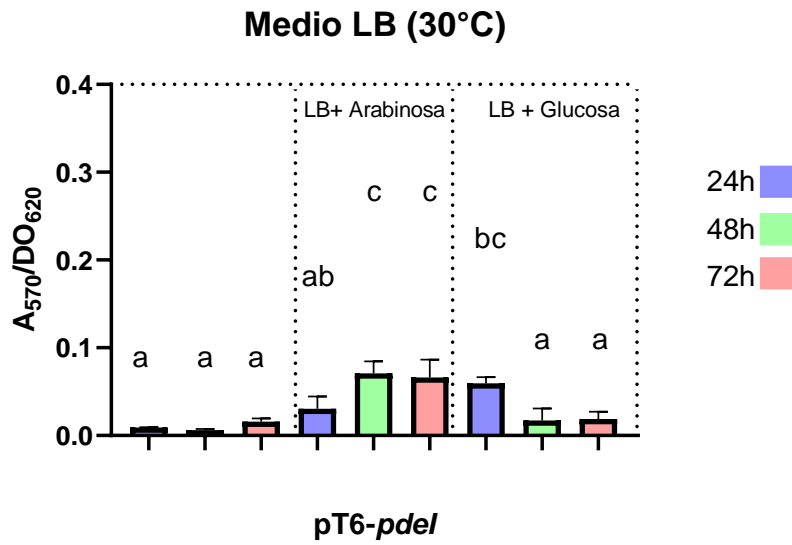
4.2 Formación de biopelícula

De acuerdo con los datos obtenidos en las condiciones experimentales estudiadas, no se observó formación de biopelícula en medio DMEM a 30° C y 37° C, en la cepa de EPEC-*pdeI*, por lo que los datos se descartaron.

Se encontraron diferencias significativas en la formación de biopelícula en diferentes formulaciones con medio LB a 30°C (F= 42.51; gl= 2, 18; p<0.0001). Se determinó que el medio óptimo para la formación de biopelícula fue LB + arabinosa a un tiempo de 48h y 72h con un valor de 0.070 y 0.066 A₅₇₀/DO₆₂₀, respectivamente (Figura 10).

Figura 10

Cuantificación de ensayo de biopelícula en medio LB 30°C

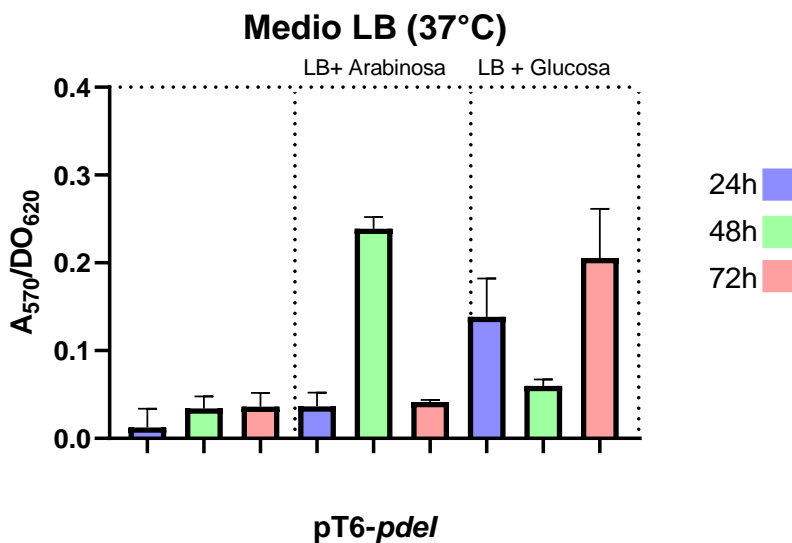


Nota: Las barras de error, representan el error estándar. La figura se encuentra dividida en 3 partes, que corresponden al medio LB sin agregar ningún azúcar, LB añadido arabinosa y LB añadido glucosa, medidos a 24, 48 y 72 horas. Las barras con una letra en común no indican diferencias significativas entre ellas ($p > 0.05$).

En medio LB a 37°C (Figura 11) no se observaron diferencias significativas entre los medios en la cepa de EPEC/pT6-*pdeI* ($F= 3.51$; $gl= 2, 18$; $p=0.05$).

Figura 11

Cuantificación de ensayo de biopelícula en medio LB 37°C



Nota: Las barras de error, representan el error estándar. La figura se encuentra dividida en 3 partes, que corresponden al medio LB sin agregar ningún azúcar, LB añadido arabinosa y LB añadido glucosa, medidos a 24, 48 y 72 horas. No existen diferencias significativas entre los medios y el tiempo de incubación ($p > 0.05$).

La formación de biopelícula es muy variable y depende de situaciones propias de cada bacteria, el ambiente y el sustrato para adherirse. Por lo que, en diversos estudios, se destacan medios de cultivo, superficies, temperatura, para evaluar si alguna de estas afecta la formación de biopelícula (Ryu, et al., 2004; Dourou, et al., 2011).

Uhlich, et al., (2006), menciona que las mejores temperaturas a las que observó mayor adherencia y formación de biopelículas, fue a las 28, 30 y 37° C. Sin embargo, según los resultados obtenidos aquí y bajo las condiciones estudiadas, la mejor temperatura fue 37° C, pero no se podría considerar una biopelícula robusta debido a que no se aprecia visualmente su presencia.

Esto sugiere que, además de estas condiciones, la superficie utilizada (biótica o abiótica) desempeña un papel crucial en el proceso. Estudios anteriores realizados por Moreira et al, en 2006, han destacado como la interacción entre EPEC y diferentes superficies puede modular la formación de biopelículas. La variabilidad en la composición y textura de las superficies puede influir en la capacidad de adherencia.

Así mismo, la dinámica del entorno también juega un papel significativo. Las condiciones de estática o flujo continuo pueden tener impacto en la capacidad de EPEC para formar biopelículas. Moreira et al (2006), también menciona que un flujo continuo favorece esta formación en comparación con la condición estática. Por lo que se subraya la importancia de considerar no solo factores químicos, sino también características físicas en las cuales se va a desarrollar la bacteria.

No obstante, es crucial reconocer que la formación de biopelículas es un fenómeno multifactorial, por lo tanto, no se puede descartar que variando la temperatura y bajo condiciones similares a las que se encuentra EPEC silvestre, se puedan observar respuestas distintas en la capacidad de formar biopelícula. Por lo tanto, se resalta la necesidad de un enfoque completo al estudiar los procesos moleculares de EPEC y sus interacciones con su entorno (Uhrlich et al., 2006).

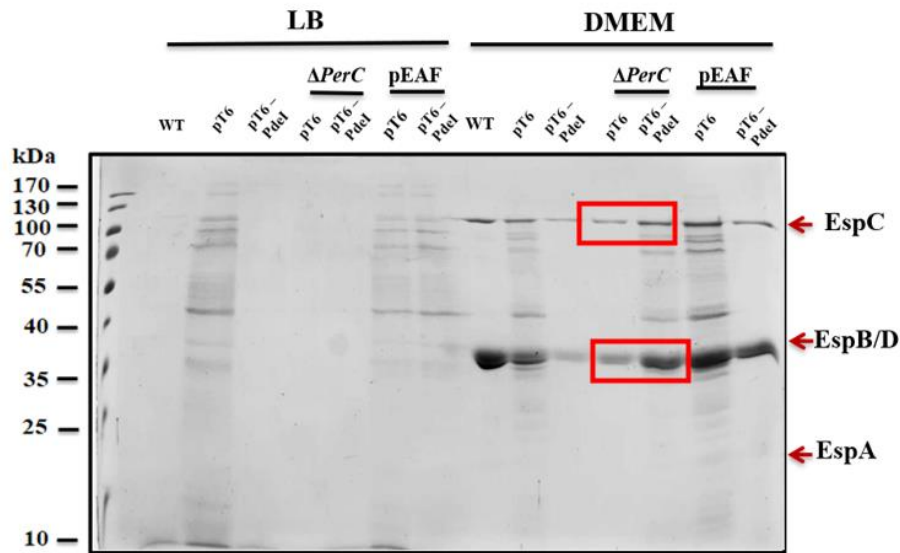
Otra de las razones a la cual está vinculado este fenotipo observado, es debido a que las fosfodiesterasas degradan el c-di-GMP. Se ha sugerido que este metabolito podría armar complejos y secuestrar moléculas o unirse a receptores de membrana bloqueando señales externas, impidiendo así la formación de biopelícula. Lo que sugiere que, para observar este fenotipo, depende de la concentración del c-di-GMP. En esta investigación se usó una cepa de EPEC transformada solo con el plásmido T6, para observar que fenotipo se obtiene, sin embargo, los datos no se incluyeron en la gráfica porque eran basales. (Méndez. M., Membrillo, J. 2005).

4.3 Perfil de proteínas secretadas

Mediante el análisis del perfil de proteínas secretadas, se determinó la secreción de factores de virulencia en medio DMEM comparándole con LB (Figura 12). Las proteínas que se observaron en la condición inductora fueron EspC y EspB/D, en los fondos mutantes de PerC y pEAF donde no se encuentran el gen que codifica para *perC* y el plásmido de virulencia EAF, respectivamente.

Figura 12

Perfil de proteínas secretadas



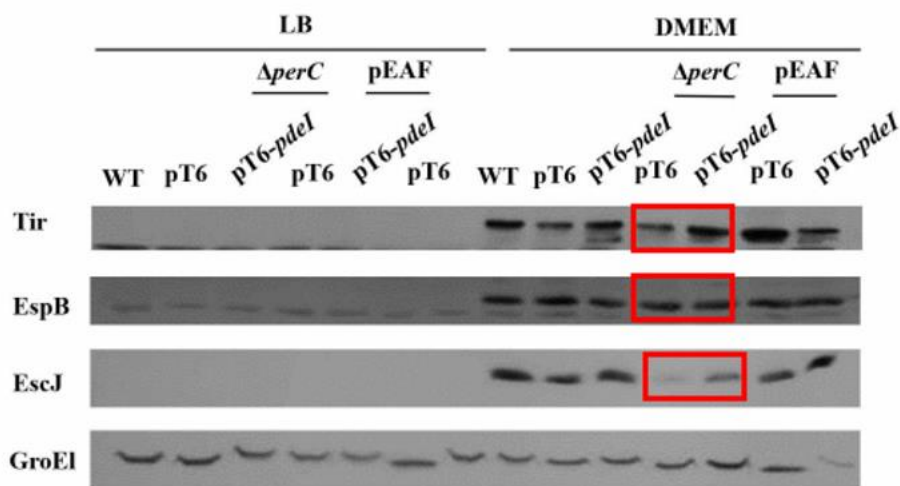
Nota. Gel comparativo entre medio LB (condición represora) y DMEM (condición inductora). Las proteínas secretadas en estos medios son aquellas que integran el traslocón del inyectisoma.

4.4 Detección de proteínas mediante la técnica de Western Blot

Utilizando esta técnica, se logró detectar algunas proteínas importantes para la virulencia de EPEC codificadas en la isla LEE, entre ellas Tir, EspB y EscJ (Figura 13), mientras que GroEL se empleó como control de carga, debido a que esta proteína se expresa de forma constitutiva en EPEC. Además, se observó la presencia de estas proteínas en los fondos mutantes de PerC y pEAF en la condición inductora. Sin embargo, cabe destacar que en medio LB no fue posible detectarlas. Del mismo modo, se evaluó en el fondo mutante de GrlA; no obstante, no se detectó la presencia de proteínas en medio DMEM como se puede apreciar en la figura 14.

Figura 13

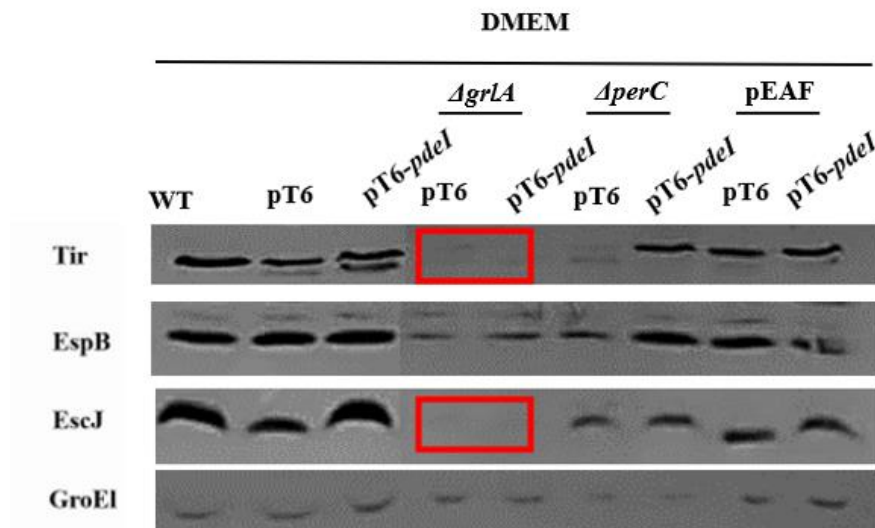
Western Blot en medio LB y DMEM



Nota. Comparación de medio LB vs DMEM, en los fondos mutantes estudiados. Se observó producción de proteínas internas en la condición inductora.

Figura 14

Western Blot en medio DMEM



Nota. No se observó producción de proteínas Tir, EscJ y GroEL en el fondo mutante de GrlA

El análisis del perfil de proteínas secretadas constituye una estrategia fundamental para comprender la expresión y secreción de factores de virulencia en condiciones específicas de cultivo. En este estudio, se llevó a cabo un análisis comparativo entre el medio DMEM y el medio LB para evaluar las diferencias en la secreción de proteínas relacionadas con la virulencia

Se observó una respuesta significativa en la secreción de factores de virulencia en medio DMEM en comparación con el medio LB. Específicamente, las proteínas EspC y EspB/D fueron identificadas en la condición inductora del medio DMEM. Este hallazgo sugiere que estas proteínas desempeñan un papel crucial en la adaptación y respuesta de la bacteria a condiciones similares a las del hospedador, como las proporcionadas por el medio DMEM. (Hazen et al., 2015).

De manera interesante, en el fondo mutante de PerC, se observaron factores de virulencia, lo que sugiere que la isla de patogenicidad LEE fue activada de alguna manera con la presencia de pT6-PdeI (Bustamante, V. et al., 2011).

Sin embargo, al evaluar el fondo mutante de GrlA, no se observó ni producción ni secreción de las proteínas asociadas a la patogenicidad de EPEC. En una investigación realizada por Bustamante et al. (2011), se menciona la existencia de activadores transcripcionales como PerC y GrlA, ambos capaces de activar la isla LEE de manera independiente. A pesar de que PerC estaba presente en el fondo mutante de GrlA, no se observó la producción de proteínas implicadas en la virulencia de EPEC. Por lo tanto, se podría atribuir a pT6-PdeI una posible participación en este fenómeno.

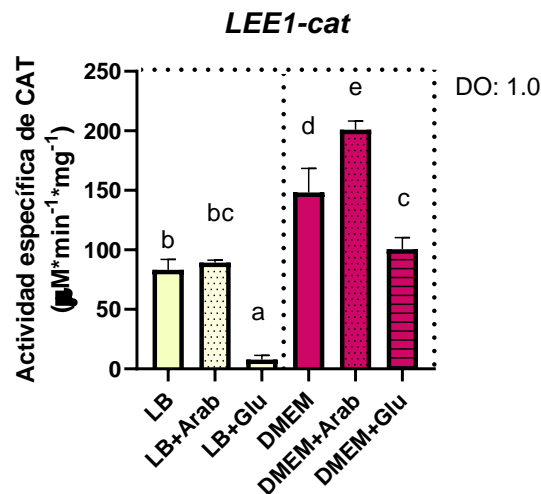
4.5 Fusiones reporteras de LEE1-cat

Para evaluar el comportamiento de las cepas recombinantes con las fusiones reporteras a *cat*, se evaluó a tres DO distintas, como se indica en la metodología, sin embargo, debido a que seguían la misma tendencia, se escogió reportar los datos de DO₅₉₅ de ~1.0.

Se determinó que el medio en el que existe mayor actividad específica de LEE1-*cat* es en DMEM añadido arabinosa y menor actividad en LB añadido glucosa (F= 363.86; gl= 5, 25; p<0.0001), con un valor de 201.01 y 7.83 $\mu\text{M}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$, respectivamente (Fig. 15).

Figura 15

Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión LEE 1 en medio LB y DMEM.



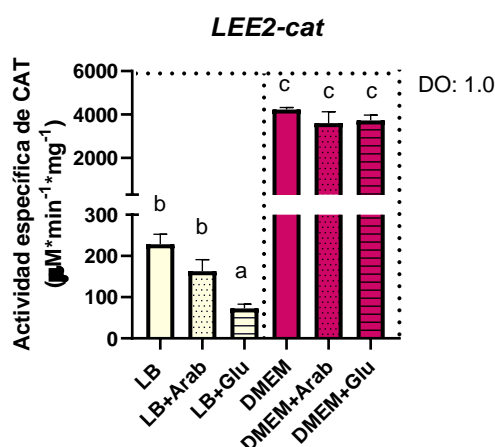
Nota. Las barras representan el error estándar y aquellas que tienen una letra en común significa que no son significativamente diferentes ($p > 0.05$). Se aplicó una prueba de Tukey

4.6 Fusiones reporteras de LEE2-cat

Se determinó que el medio en el que existe mayor actividad específica de LEE2-cat es DMEM sin importar los inductores añadidos ($F = 972.06$; $gl = 5, 25$; $p < 0.0001$), debido a que en este medio no existen diferencias significativas entre sí. Por otro lado, en medio LB se determinó que existe la misma actividad en medio LB y LB añadido arabinosa y menor actividad en presencia de glucosa (Figura 16).

Figura 16

Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión de LEE 2 en medio LB y DMEM



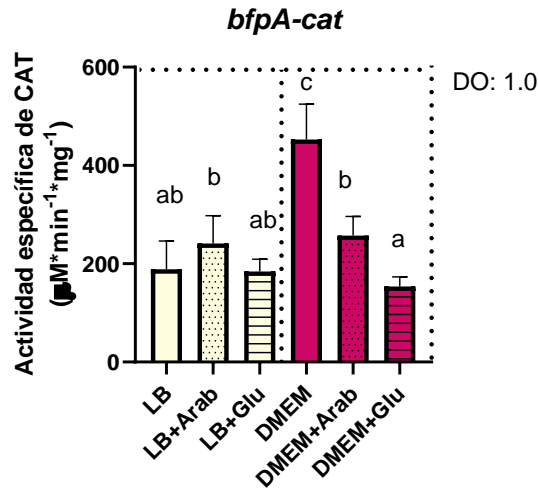
Nota. Las barras de error representan el error estándar y las barras con una letra en común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$),

4.7 Fusiones reporteras de bfpA-cat

Se identificó que el medio en el que existe mayor actividad específica de *bfpA-cat* es DMEM sin ningún azúcar inductor ($F = 29.54$; $gl = 5, 30$; $p < 0.0001$), con un valor de $452.56 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$. Por otro lado, en medio LB y DMEM añadido arabinosa no se encontraron diferencias significativas, así como en medio LB y DMEM adicionado glucosa (Figura 17).

Figura 17

Cuantificación de la actividad específica de *cat* correspondiente a la fusión de *bfpA* en medio LB y DMEM



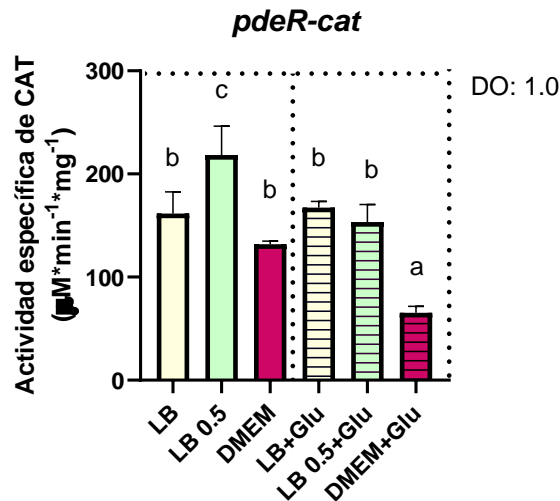
Nota. Las barras representan el error estándar y aquellas que tienen una letra en común no muestran diferencias significativas ($p > 0.05$).

4.8 Fusión transcripcional del gen *pdeR* a *cat*

Se evidenció que el medio óptimo para la expresión de *pdeR* es LB diluido y el que determinó menor expresión fue el medio DMEM añadido glucosa ($F = 39.66$; $gl = 5, 12$; $p < 0.0001$), con un valor de 218,45 y 65,30 $\mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$, respectivamente (Fig. 18).

Figura 18

Cuantificación de la actividad específica de *cat* correspondiente a la fusión transcripcional de *pdeR*.



Nota. Las barras representan el error estándar y aquellas que tienen una letra en común no indican diferencias significativas ($p > 0.05$).

Este proyecto se abordó desde una perspectiva regulatoria, lo cual implicó el diseño de diversos experimentos para investigar la transcripción, traducción y secreción de proteínas. Con el objetivo de vincular los resultados previamente obtenidos, se llevaron a cabo fusiones transcripcionales en los operones de la isla LEE y *bfpA*, con el propósito de evaluar si se ven afectados por la expresión de la fosfodiesterasa PdeI. De esta manera, se estableció una conexión entre los experimentos realizados y los resultados obtenidos anteriormente.

De esta manera, al analizar en medio LB y DMEM, se esperaba ver que en LB no exista actividad específica de *cat* o sea baja con respecto a DMEM, por ser una condición represora e inductora, respectivamente. Sin embargo, en las fusiones de LEE1 y *bfpA*, existieron casos en los que no se observó diferencias significativas entre medios (Hazen, et al., 2015).

Una posible explicación para esta condición podría involucrar la existencia de múltiples niveles de regulación génica. Es posible que ciertos elementos de las fusiones de LEE1 y *bfpA* estén respondiendo de manera diferente a las condiciones del medio. Esto puede deberse a que en la regulación existen múltiples elementos necesarios para que ocurra de manera eficaz, sin embargo, no siempre sucede de esta forma. Puede haber transcripción, pero por diversas razones no se traduce en proteína. Por otro lado,

también puede haber traducción, pero al detectar las proteínas se observan diferencias en las cantidades entre ellas debido a una traducción ineficiente (Anello, 2021).

Es importante recalcar que la actividad de *cat* es solo una medida de la expresión génica de los genes bajo estudio y puede no reflejar completamente la complejidad de su regulación. Otros factores como la interacción entre proteínas reguladoras específicas podrían estar influyendo en los resultados (López, 2022).

En la fusión reportera LEE2-*cat*, se observó mayor actividad específica de *cat*, en medio DMEM, lo que sugiere que el pT6-PdeI, continúa activando la isla de patogenicidad y por ende LEE2. Esto también, contrastando con lo reportado en la literatura, se observó este fenotipo debido a que este operón tiene el promotor más fuerte de la isla de patogenicidad LEE (Contreras, 2010).

CAPÍTULO V

Conclusiones y recomendaciones

Conclusiones

Se generó una cepa de EPEC con un vector recombinante que contiene los genes de interés. En el caso de *pdeI*, se llevó a cabo un recorte en el marco de lectura, excluyendo regiones que codifican para segmentos transmembranales. Por otro lado, para el gen *pdeR*, se utilizó la región reguladora, que incluye los promotores presentes en este fragmento.

Se determinó que, en medio LB la formación de biopelícula en las cepas recombinantes de EPEC fue mayor a la que se observó en DMEM.

Durante el análisis del perfil de proteínas secretadas y mediante Western Blot, se pudo constatar la expresión de factores de virulencia en las cepas recombinantes de EPEC en medio DMEM. Además, se observó que en los fondos mutantes de PerC y pEAF, se detectó tanto la producción como la secreción de proteínas asociadas al ensamblaje del inyectisoma. Estos hallazgos sugieren una posible implicación de pT6-PdeI en la activación de la isla LEE.

Al evaluar las fusiones reporteras de los operones de la isla LEE y *bfpA*, se encontró actividad en medio LB y DMEM, a pesar de que son condiciones represoras e inductoras, respectivamente. Esto indica que pT6-PdeI, está afectando la expresión de estas fusiones. Por otro lado, se observó una mayor actividad de *cat* en medio LB diluido para la fusión reportera de PdeR, lo que sugiere que esta podría ser la mejor condición evaluada hasta el momento para estudiar la expresión de este gen.

Los resultados de las actividades transcripcionales de los operones LEE1, LEE2 y *bfpA* no se correlacionaron con los resultados obtenidos mediante Western Blot y perfil de proteínas secretadas. Esto podría indicar que otros factores están influyendo en la expresión y regulación de estos genes, o que existen mecanismos de regulación adicionales que no se han tenido en cuenta en este estudio.

En conclusión, los hallazgos obtenidos en este estudio subrayan la complejidad de la regulación génica y la importancia de una investigación exhaustiva para comprender los mecanismos involucrados en mayor detalle. La expresión génica está sujeta a una serie de factores y condiciones ambientales que pueden influir de manera

significativa en los resultados obtenidos. Por lo tanto, es fundamental considerar y controlar cuidadosamente estas condiciones al diseñar experimentos y analizar resultados.

La investigación en este campo está en constante evolución que requiere de una comprensión profunda de todos los mecanismos involucrados. Estos resultados proporcionan una base sólida para futuros estudios que permitan un conocimiento más completo y preciso de los procesos de expresión y regulación génica.

Recomendaciones

Con los resultados de esta investigación, se recomienda indagar más sobre los genes bajo estudio, cambiando las condiciones experimentales y así en un futuro poder desarrollar un mecanismo más útil para contender con EPEC.

Para el gen *pdeR*, sería necesario realizar recortes en el marco de lectura para transformarlo en un vector. Esto permitiría analizar la formación de biopelícula y la expresión de factores de virulencia.

Se recomienda evaluar la expresión de factores de virulencia en fondos mutantes de GrIR y Ler, para tener un panorama más amplio sobre la producción y secreción de proteínas implicadas en la virulencia de EPEC.

Realizar ensayos de biopelícula en flujo continuo, variar medios de cultivo y cambiar condiciones experimentales, para observar si existe o no mayor formación.

Para los perfiles de proteínas secretadas, se recomendaría usar ácido tricloroacético en lugar del protocolo de metanol y cloroformo usado en este proyecto, para precipitar proteínas y obtener bandas más claras y geles limpios.

Referencias bibliográficas

- Anantharaman, V., & Aravind, L. (2001). The CHASE domain: a predicted ligand-binding module in plant cytokinin receptors and other eukaryotic and bacterial receptors. *Trends in biochemical sciences*, 26(10), 579-582.
- Anello, M., Arnal, N., Barbisan, G., Catanesi, C. I., & Villegas Castagnasso, E. E. (2021). Regulación de la expresión génica. *Libros de Cátedra*.
- Bou, G., Fernández-Olmos, A., García, C., Sáez-Nieto, J. A., y Valdezate, S. (2011). Métodos de identificación bacteriana en el laboratorio de microbiología. *Enfermedades infecciosas y microbiología clínica*, 29(8), 601-608.
- Brady, M., Radhakrishnan, P., Liu, H., Magoun, L., Murphy, K., Mukherjee, J., Donohue, A., Tzipori, S., Leong, J. (2011). Enhanced actin pedestal formation by enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 adapted to the mammalian host. *Front. Microbiol* , 2: 1-10.
- Brosius, J. (1984). Plasmid vectors for the selection of promoters. *Gene*, 27(2), 151-160.
- Bustamante, V. C. H., Santana, F. J., Calva, E., & Puente, J. L. (2001). Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic *Escherichia coli*: Ler antagonizes H-NS-dependent repression. *Molecular microbiology*, 39(3), 664-678.
- Bustamante, V. Santana, F. Calva, E y Puente, J. (2001). Regulación transcripcional de los genes de secreción de tipo III en *Escherichia coli* enteropatógena: ler antagoniza la represión dependiente de H-NS. *Microbiología molecular*, vol. 39, núm. 3, págs. 664–678, 2001.
- Bustamante, VH, Villalba, MI, García-Angulo, VA, Vázquez, A., Martínez, LC, Jiménez, R. y Puente, JL (2011), PerC y GrlA regulan de forma independiente la expresión de Ler en *Escherichia coli* enteropatógena. *Microbiología Molecular*, 82: 398-415.
- Canata, M. G., Navarro, R., Velázquez, G., Rivelli, S., Rodríguez, F., Céspedes, A., and Guillén, R. (2016). Caracterización molecular de factores de virulencia de aislados *Escherichia coli* obtenidas de heces de niños con gastroenteritis del

- Hospital Central de Instituto de Previsión Social en el 2012. *Pediatría (Asunción)*, 43(1), 13-17.
- Clements, A., Young, J., Constantinou, N., Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes* , 3(2): 71-87.
- Contreras García, C. A. (2010). Asociación de variabilidad genética y fenotípica de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) con cuadros de diarrea en niños menores de un año.
- Croxen, M. y Finlay, B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity . *Natural Review Microbiology* , 8, 26-38.
- Deng, W.; Puente, J.L.; Gruenheid, S.; Li, Y.; Vallance, B.A.; Vázquez, A.; Barba, J.; Ibarra, J.A.; O'donnell, P.; Metalnikov, P.; ashman, K.; Lee, S.; Goode, D.; Pawson, T.; Finlay, B.B. (2004) Dissecting virulence: Systematic and functional analyses of a pathogenicity island. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101, 3597-3602.
- Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U., Hacker, J. (2004). Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms. *Nat Rev Microbiol*, 2: 414-24.
- Donnenberg, M. S. (Ed.). (2002). *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen* (pp. xxi-xxv). San Diego, CA: Academic press.
- Dourou, D., Beauchamp, C. S., Yoon, Y., Geornaras, I., Belk, K. E., et al. (2011). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 at different temperatures, on various foodcontact surfaces encountered in beef processing. *International journal of food microbiology* 149, 262-268.
- Flemming, H., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S., Kjelleber, S. (2016). Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Micro*, 114: 563-575.
- Frischknecht, F., Michael, W. (2001). Surfing pathogens and the lessons learned for actin polymerization. *Trends Cell Biology* , 11(1).
- Garmendia, J., Frankel, G., Crepin, V. (2005). *Escherichia coli* infections: translocation. *Infect. Immun*, 73, 2573-2585.

- Gaytán, M., Matrinez-Santos, V., Soto, E., González, B. (2016). Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens. *Front Cell Infect Microbiol*, 6: 129.
- Gómez-Duarte, O. G., and Kaper, J. B. (1995). A plasmid-encoded regulatory region activates chromosomal *eaeA* expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 63(5), 1767-1776.
- Hazen, T. H., Daugherty, S. C., Shetty, A., Mahurkar, A. A., White, O., Kaper, J. B., and Rasko, D. A. (2015). RNA-Seq analysis of isolate-and growth phase-specific differences in the global transcriptomes of enteropathogenic *Escherichia coli* prototype isolates. *Frontiers in microbiology*, 6, 569.
- Hengge, R. (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria . *Nat Rev Microbiol*, 7(4): 263-73.
- Hengge, R., Galperin, M., Ghigo, J., Gomelsky, M., Green, J., Hughes, K., Jenal, U., Landini, P. (2016). Systematic nomenclature for GGDEF and EAL domain-containing cyclic di-GMP turnover proteins of *Escherichia coli* . *J Bacteriol*, 198: 7-11.
- Jenal, U., Reinders, A., Lori, C. (2017). Cyclin di-GMP: second Messenger extraordinaire. *Nat Rev Microbiol*, 15.
- Kaper, J., Nataro, J., Mobley, H. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2(2): 123-140.
- Kenny, B., DeVinney, R., Stein, M., Reinscheid, D., Frey, E., Finlay, B. (1997). Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells . *Cell*, 91, 511-520.
- Krasteva, P., Fong, J., Shikuba, N., Beyhan, S., Navarro, M., Yildiz, F and Sondermann, H. (2010). Sensing the messenger: The diverse ways that bacteria signal through c-di-GMP. *Protein Sci*, 21, 929-948.
- Kuhnert, P., Boerlin, P., Frey, J. (2000). Target genes for virulence assessment of *Escherichia coli* isolates from water, food and the environment. *FEMS Microbiol Rev*, 24: 107-17.
- Kurien, B. T., and Scofield, R. H. (2006). Western blotting. *Methods*, 38(4), 283-293.

- Levine MM, Bergquist E, Nalin, D. (1978). *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. . *Lancet* , 1119-1122.
- Lindenberg, S., Klauck, G., Pesavento, C., Klauck, E., Hengge, R. (2013). The EAL domain protein YciR acts as a trigger enzyme in a c-di-GMP signalling cascade in *E. coli* biofilm control. *EMBO J.*, 32(14): 2001-2014.
- López Martínez, D. (2022). Bases moleculares de la interacción, de proteínas de transporte vesicular. Proyecto de investigación: Interacciones de proteínas multidominio con membranas: proteínas quinasas cy rabfilina-3a como paradigmas; Interacciones de las PKCs con membranas celulares: un ejemplo de posible aplicación terapéutica; Caracterización estructural y funcional de proteínas periféricas de membrana involucradas en señalización celular y fusión de membranas; Aplicación de métodos de cribado de alto rendimiento para el descubrimiento de nuevos inhibidores de proteínas quinasas C; Searching for the rabphilin-3a interactome.
- Mayer, P., Möhlig, M., Idlibe, D., and Pfeiffer, A. (1995). Novel and uncommon isoforms of the calcium sensing enzyme calcium/calmodulin dependent protein kinase II in heart tissue. *Basic research in cardiology*, 90, 372-379.
- Mellies, J. L., Barron, A. M., & Carmona, A. M. (2007). Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* virulence gene regulation. *Infection and immunity*, 75(9), 4199-4210.
- Méndez-Ortiz, M. M., y Membrillo-Hernández, J. (2005). Proteínas con dominios GGDEF y EAL: su función en el metabolismo bacteriano. *Rev. Latinoam. Microbiol*, 47(3-4), 130-139.
- Molina, N. B., Oderiz, S., Vescina, C., Córdoba, A., Basualdo, J. Á., and Sparo, M. D. (2022). Primer reporte de *Escherichia coli* diarreogénica en población pediátrica ambulatoria con diarrea atendida en la ciudad de La Plata, Argentina. *Revista argentina de microbiología*, 54(1), 15-21.
- Morales, A. (2019). Regulación del gen *E2348C_1013* de *Escherichia coli* enteropatógena. Cuernavaca, Morelos.

- Moreira, C. G., Palmer, K., Whiteley, M., Sircili, M. P., Trabulsi, L. R., Castro, A. F., and Sperandio, V. (2006). Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 188(11), 3952-3961.
- Nataro, J., Kaper, J. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* , 11(1): 142-201.
- Naylor, L. (1999) Reporter gene technology: the future looks bright. *Biochemical Pharmacology*. 58:749-757.
- Ochoa, T. y Contreras, C. (2011). Enteropathogenic *Escherichia coli* infection in children. *Current opinion in infectious diseases* , 24, 478-483.
- Padavannil, A., Jobichen, C., Mills, E., Velazquez-Campoy, A., Li, M., Leung, K. Y., and Sivaraman, J. (2013). Structure of GrlR–GrlA complex that prevents GrlA activation of virulence genes. *Nature communications*, 4(1), 2546.
- Pérez, M., Cabezas, P., Castro, E., Crandall, K. (2013). Pathogen typing in the genomics era: MLST and the future of molecular epidemiology. *Infect Gen. and Evol.*, 16: 38-53
- Pérez, M., & Mota, M. (2006). Morfología y estructura bacteriana. *Temas de bacteriología y virología médica*, 23-42.
- Pokharel, P., Dhakal, S., & Dozois, C. M. (2023). The diversity of *Escherichia coli* pathotypes and vaccination strategies against this versatile bacterial pathogen. *Microorganisms*, 11(2), 344.
- Reinders, A., Hee, C., Ozaki, S., Mazur, A., Boehm, A., Schirmer, T and Jenal, U. (2016). Expression and genetic activation of cyclic di-G;P- specific phosphodiesterases in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 198(3) 448-462.
- Rock, C., & Rivera, B. (2014). La calidad del agua, *E. Coli* y su salud. *College of Agriculture and life Sciences*, 1.
- Romling, U., Balsalobre, C. (2012). Biofilms infection, their resilience to therapy and innovative treatment strategies. *J Intern Med* , 272, 541-561.

- Roque, M. (2017). Frecuencia de *Escherichia coli* diarreogénicas aisladas de niños en un hospital pediátrico en Lima-Perú. *Ciencia e Investigación*, 20(2), 23-28.
- Ryu, J. H., Kim, H., Beuchat, L. R., (2004). Attachment and biofilm formation by *Escherichia coli* O157:H7 on stainless steel as influenced by exopolysaccharide production, nutrient availability, and temperature. *J Food Prot* 67, 2123–2131.
- Stanier, R. Y., & Villanueva, J. R. (1996). *Microbiología*. Reverté.
- Stepanovic S., Vukoic, D., Dakic, I., Savic, B. and Svabic-Vlahovic, M. (2000). A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *Jornal of microbiological methhods*, 40, 175-179.
- Teixeira, N. B., Rojas, T. C., da Silveira, W. D., Matheus-Guimarães, C., Silva, N. P., and Scaletsky, I. C. (2015). Genetic analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor (EAF) plasmid reveals a new deletion within the EAF probe sequence among O119 typical EPEC strains. *BMC microbiology*, 15(1), 1-9.
- Tobe, T., Hayashi, T., Han, C. G., Schoolnik, G. K., Ohtsubo, E., and Sasakawa, C. (1999). Complete DNA sequence and structural analysis of the enteropathogenic *Escherichia coli* adherence factor plasmid. *Infection and Immunity*, 67(10), 5455-5462.
- Tobe, T., Schoolnik, G. K., Sohel, I., Bustamante, V. H., and Puente, J. L. (1996). Cloning and characterization of bfpTVW, genes required for the transcriptional activation of bfpA in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 21(5), 963-975.
- Uhlich, G. A., Cooke, P. H, Solomon, E. B. (2006). Analyses of the red-dry-rough phenotype of an *Escherichia coli* O157:H7 strain and its role in biofilm formation and resistance to antibacterial agents. *Appl Environ Microbiol* 72, 2564-2572.
- Vidal-Graniel, J. E. (2003). *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC): Una causa frecuente de diarrea infantil. *Salud en tabasco*, 9(1), 188-193.
- Wang, Q., Zhang, T. (2012). Kinetic theories for biofilms. *Discrete Continuous Dyn Syst Ser B*, 17, 1027-1059.

ANEXOS

Cuadro de análisis de la varianza (ANOVA) de biopelícula

F.V.	Biopelícula 37 C					Biopelícula 30 C			
	gl	SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	8	0.02	2.0E-03	15.71	<0.0001	0.14	0.02	1.11	0.4027
Medio	2	0.01	4.6E-03	36.98	<0.0001	0.07	0.04	2.35	0.1243
Tiempo	2	2.4E-05	1.2E-05	0.10	0.9092	0.04	0.02	1.15	0.3392
Medio*Tiempo	4	0.01	1.6E-03	12.88	<0.0001	0.03	0.01	0.47	0.7580
Error	18	2.3E-03	1.3E-04			0.28	0.02		
Total	26	0.02				0.41			

Contrastes biopelícula 30 °C.

Tiempo	gl	Contraste	E.E.	SC	CM	F	p-valor
Constraste1	1	5.50E-04	0.01	1.40E-06	1.40E-06	0.01	0.9179
Constraste2	1	3.90E-03	0.01	2.30E-05	2.30E-05	0.18	0.6760
Total	2			1.20E-05	1.20E-05	0.10	0.9092

Contrastes biopelícula 37 °C.

Tiempo	gl	Contraste	E.E.	SC	CM	F	p-valor
Constraste1	1	0.08	0.06	0.03	0.03	1.84	0.1921
Constraste2	1	-0.07	0.10	0.01	0.01	0.46	0.5056
Total	2			0.04	0.02	1.15	0.3392

Cuadro de análisis de la varianza (ANOVA), LEE 1 y LEE2.

F.V.	gl	LEE 1				LEE 2			
		SC	CM	F	p-valor	SC	CM	F	p-valor
Modelo	10	452.33	45.23	182.82	<0.0001	19157.15	1915.72	486.62	<0.0001
Medio	5	450.12	90.02	363.86	<0.0001	19134.06	3826.81	972.06	<0.0001
Repeticiones	5	2.21	0.44	1.78	0.1528	23.09	4.62	1.17	0.3500
Error	25	6.19	0.25			98.42	3.94		
Total	35	458.51				19255.57			

Cuadro de análisis de la varianza (ANOVA), *bfpA*

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	348029.58	5	69605.92	29.54	<0.0001
Medio	348029.58	5	69605.92	29.54	<0.0001
Error	70682.67	30	2356.09		
Total	418712.25	35			

Cuadro de análisis de la varianza (ANOVA), *pdeR*

F.V.	SC	GI	CM	F	p-valor
Modelo	74.30	5	14.86	39.66	<0.0001
Medio	74.30	5	14.86	39.66	<0.0001
Error	4.50	12	0.37		
Total	78.80	17			

Normalidad (Prueba de Shapiro-Wilks modificado).

Variable	n	Media	D.E.	W*	P (unilateral D)
RDUO Transf	27	0.00	0.03	0.98	0.9152
Biopelícula 30 °C					
RDUO Transf	27	0.00	0.13	0.95	0.4985
Biopelícula 37 °C					
RDUO Transf LEE1	36	0.00	0.42	0.94	0.2425
RDUO Transf LEE2	36	0.00	1.68	0.97	0.8330
RDUO <i>bfpA</i>	36	0.00	44.94	0.92	0.0569
RDUO Transf <i>pdeR</i>	18	0.00	0.51	0.93	0.4326

Homogeneidad de la varianza.

Variable	N	R²	R² Aj	CV
Biopelícula 30 °C	27	0.87	0.82	18.11
Biopelícula 37 °C	27	0.39	0.12	53.14
LEE1	36	0.99	0.98	5.18
LEE2	36	0.99	0.99	5.66
<i>bfpA</i>	36	0.83	0.80	19.67
<i>pdeR</i>	18	0.94	0.92	5.08

Medios y soluciones

Medio LB al 100% (para 1 litro)

Bacto Triptona 1 %	10 g
Extracto de levadura 0.5 %	5 g
NaCl 1 %	10 g
Ajustar pH 7.4 con NaOH 1M	

Medio LB al 50% (para 1 litro)

Bacto Triptona 0.54 %	5 g
Extracto de levadura 0.25 %	2.5 g
NaCl 0.54 %	5 g
Ajustar pH 7.4 con NaOH 1M	11

Agar LB (para un litro)

LB medio líquido más	
Bacto Agar 1.5 %	15 g

Medio SOB (para 1 litro)

Bacto de Triptona 2 %	20 g
Extracto de levadura 0.5 %	5 g
NaCl 0.05 %	0.5 g
KCl 2.5 mM (KCL1 M)	2.5 ml

Medio SOC (para 1 litro)

Medio SOB más:

$MgCl_2$ 10 mM ($MgCl_2$ 1M)	10 ml
$MgCl_4$ 10 mM ($MgSO_4$ 1M)	10 ml
Glucosa 20 mM	3.6 g

Buffer TDTT (para 1 litro)

Tris.HCl 50mM (Tris-HCl 1 M pH 7.8)	50 ml
Ditiotreitol 30 μ M (DTT 1 M)	30 μ l

Buffer de transferencia (500 ml)

Tris-HCl 37 mM	2.91 g
Glicina 39 mM	1.465 g
SDS 20 %	0.9377 ml
Metanol 20 %	100 ml
Agua MQ	399.6 ml

Buffer PBS-T (1L)

PBS 10X 10 %	100 ml
NaCl 5 M	100 ml
Tween-20 0.1 %	1.0 ml
Metanol	10 ml
Agua MQ	800 ml

Mezcla de reacción para CAT

Acetil-CoA 0.1 mM	500 μ l
Cloramfenicol	500 μ l
5,5'-ditio-bis 2-ácido nitrobenzoico (DTNB sigma) 1 mM	0.01g
Disolver en Tris HCl M pH 7.8	2.5 ml

BCA Protein Assay Kit Reagent (Thermo Scientific Pierce) para proteínas totales

Reactivo A: BCA (ácido bicinconánico)	25 ml
Reactivo B: CuSO_4 prepararlos en	500 μ l

proporción 50:1 (A:B)