

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA



TEMA:

“DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA DIGUALINATO CICLASA Dgcl Y LA FOSFODIESTERASA PdeC SOBRE LA EXPRESION DE GENES DE VIRULENCIA Y FORMACION DE BIOPELÍCULA EN *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA”.

Trabajo de titulación previo a la obtención del título de Ingeniero en Biotecnología.

AUTOR(A):

Edison Xavier Sánchez Tubón

DIRECTOR(A):

Biol. Pedro Miguel Barba Estrella MSc.

Ibarra, 2024

UNIVERSIDAD TÉCNICA DEL NORTE

FACULTAD DE INGENIERÍA EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y AMBIENTALES

CARRERA DE INGENIERIA EN BIOTECNOLOGÍA

"DETERMINACIÓN DEL EFECTO DE LA DIGUALINATO CICLASA Dgcl Y LA FOSFODIESTERASA PdeC SOBRE LA EXPRESION DE GENES DE VIRULENCIA Y FORMACION DE BIOPELÍCULA EN *Escherichia coli* ENTEROPATOGENA".

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

INGENIERO EN BIOTECNOLOGÍA

APROBADO:

MSc. Pedro Barba

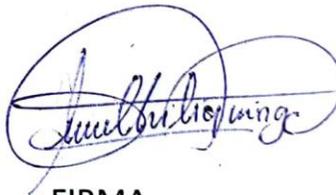
DIRECTOR



FIRMA

MSc. Andrea Chilibingua

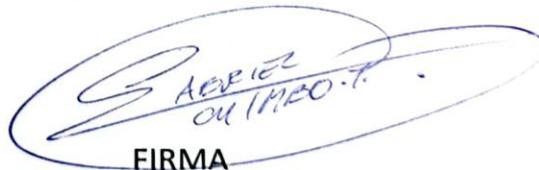
MIEMBRO TRIBUNAL



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:	1003928445		
APELLIDOS Y NOMBRES:	Sánchez Tubón Edison Xavier		
DIRECCIÓN:	Alpachaca Barrio Los Pinos, Calle Pelicano 793 y Pinzón		
EMAIL:	exsanchezt@utn.edu.ec		
TELÉFONO FIJO:	606018	TELÉFONO MÓVIL:	0983771314

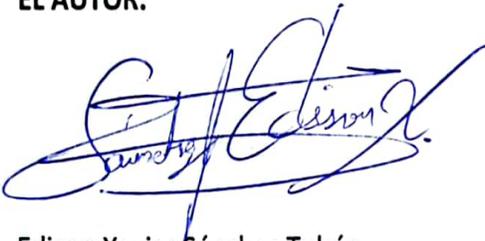
DATOS DE LA OBRA	
TÍTULO:	Determinación del efecto de la diguanilato ciclasa Dgcl y la fosfodiesterasa PdeC sobre la expresión de genes de virulencia y formación de biopelícula en <i>Escherichia coli</i> enteropatógena.
AUTOR (ES):	Sánchez Tubón Edison Xavier
FECHA: DD/MM/AAAA	07/03/2024
SOLO PARA TRABAJOS DE GRADO	
PROGRAMA:	<input checked="" type="checkbox"/> PREGRADO <input type="checkbox"/> POSGRADO
TITULO POR EL QUE OPTA:	Ingeniero 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 (n) en defensa de la Universidad en caso de reclamación por parte de terceros.

Ibarra, a los 07 días del mes de marzo de 2024

EL AUTOR:



Edison Xavier Sánchez Tubón
C.I: 1003928445

AGRADECIMIENTO

En primer lugar, quiero agradecer a Dios, por haberme permitido llegar a este mundo, por estar siempre presente forjándome como una persona de bien, guiando mi camino, brindándome sabiduría y haberme permitido culminar esta meta y uno de mis objetivos.

Agradezco también a mi segunda casa en donde experimente cosas increíbles, me llene de conocimientos, en donde al principio me propuse la meta de ser un profesional en la carrera que yo elegí para mi futuro la prestigiosa UNIVERSIDAD TECNICA DEL NORTE.

Agradezco profundamente a todos los profesionales y docentes que tuve dentro de toda mi carrera estudiantil y que me brindaron su sabiduría a través de sus enseñanzas en la cátedra.

Un agradecimiento especial para el Dr. Ricardo Oropeza Navarro, por haber sido un pilar fundamental en la guía para el desarrollo de esta investigación, por haberme brindado su apoyo en cada una de las etapas de esta investigación y por ser una persona con gran humanidad, sencillez y sobre todo un excelente profesional.

De manera especial, agradezco al MSc. Pedro Barba, MSc. Andrea Chiliquinga y al MSc. Gabriel Chimbo, por estar pendiente y aportando con cada granito de arena para que esta investigación finalice exitosamente.

Finalmente extendiendo mi más sincero agradecimiento al Laboratorio 2 de microbiología molecular de la UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO, en especial al grupo del Dr. José Luis Puente, quienes me brindaron sus conocimientos para poder solventar cualquier problema que surgiera dentro de la investigación y haberme brindado todos los medios para realizar esta investigación. Una mención especial dentro de este grupo de investigadores a la futura Dra. Stephanie Ortiz, por haber sido amiga, profesora, compañera incondicional en el laboratorio y por toda su paciencia como mentora en varios de los ensayos realizados.

DEDICATORIA

A las personas más importantes de mi vida, mis padres Arcenio Sánchez y Margarita Tubón, que han sido mi apoyo constantemente y me han demostrado su cariño en cada etapa de mi vida, por su sacrificio y enseñanzas para formarme como una persona de valores y ahora profesional, sin ellos nada de esto hubiera sido posible, para cumplir mis sueños y alcanzar mis metas.

A mis dos hermanos Deyssy y Cristian quienes me han acompañado y apoyado siempre a lo largo de todo este trayecto educativo.

A la mis Padrinos el Dr. Juan Eduardo Pilataxi y la MS.c Narcisa Sanipatin, por el apoyo incondicional como segundos padres dentro de toda mi vida.

A mis queridas tías Dora Tubón y Mariana Tubón por haber sido una pieza incondicional en todos los sentidos a lo largo de este trayecto para formarme como profesional.

A la Dra. Luz Marina Pereira Gonzales por haber sido mi más grande fuente de inspiración, admiración y por demostrarme siempre con el cariño de una madre que podía alcanza todas las metas que me proponga.

Muchas gracias a mis seres queridos, familia y amigos que siempre contribuyeron en este camino hacia esta meta.

Con cariño,

Edison

CERTIFICACIÓN DIRECTOR DEL TRABAJO DE INTEGRACIÓN CURRICULAR

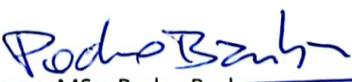
Ibarra, 07 de marzo de 2024

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 de Norte; en consecuencia, autoriza su presentación para los fines legales pertinentes.


MSc. Pedro Barba

C.I: 1716751183

Resumen

Escherichia coli enteropatógena (EPEC), es un organismo capaz de causar diarrea aguda, fiebre y vómito en niños menores de dos años procedentes de diferentes países en desarrollo, esto provoca índices de mortalidad y morbilidad elevados. Por esta razón es importante analizar y comprender el sistema de regulación génica implicado en la virulencia de EPEC. También es importante estudiar los genes implicados en la síntesis de proteínas relacionadas con la expresión de factores de virulencia y la formación de biopelículas. Por esta razón se determinó el efecto de la diguanilato ciclasa (DgcI) y la fosfodiesterasa (PdeC) sobre la expresión de genes de virulencia y la formación de biopelícula en *E. coli* enteropatógena. En esta investigación se estudió el efecto de la sobreexpresión de *dgcI* y *pdeC* en la formación de biopelícula en medio LB a diferente tiempo y temperatura. Además, se evaluó la expresión de factores de virulencia mediante ensayos de Western blot y perfil de proteínas secretadas. Los resultados demostraron que existe una influencia de los genes sobreexpresados al ser evaluados en los fondos mutantes $\Delta perC$ y *pEAF*, debido a que se observó cambios en la producción de proteínas involucradas en el sistema de secreción tipo 3 ubicado en la isla de patogenicidad LEE. Finalmente, se evaluó el comportamiento de las cepas mutantes con fusión al gen reportero *cat*, mediante el cual se comprobó que existe un fenotipo diferente al comparar las bacterias recombinantes contra su control. Con los datos obtenidos se corroboró que los genes bajo estudio están involucrados en la virulencia de EPEC.

ABSTRACT:

Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC), is an organism capable of causing acute diarrhea, fever and vomiting in children under two years of age from different developing countries, this causes high rates of mortality and morbidity. For this reason, it is important to analyze and understand the gene regulation system involved in the virulence of EPEC. The genes involved in the synthesis of proteins related to the expression of virulence factors and the formation of biofilms are also studied. For this reason, it is important to determine the effect of diguanylate cyclase (DgcI) and phosphodiesterase (PdeC) on virulence gene expression and biofilm formation in enteropathogenic *E. coli*. In this research, the clinical importance caused by diarrheal diseases in the world is considered, so the effect of overexpression of *dgcI* and *pdeC* on the formation of biofilm in LB medium at different times and temperatures was studied. In addition, the expression of virulence factors was evaluated through Western blot assays and secreted protein profiles, which demonstrated that there is an influence of overexpressed genes when evaluated in the mutant backgrounds $\Delta perC$ and *pEAF*, because changes are observed in the production of proteins involved in the type 3 secretion system located in the LEE pathogenicity island. Finally, the behavior of the mutant strains with fusion to the *cat* reporter gene was evaluated., through which it was verified that there is a different phenotype when comparing the recombinant bacteria against its control. With the data obtained, it was confirmed that the genes under study are involved in the virulence of EPEC.

Palabras clave: Patógenos, patotipos, biopelícula, sobreexpresión, virulencia, bacterias.

LISTA DE SIGLAS

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
A/E	Adherencia y esfacelamiento (<u>A</u> t <u>t</u> aching and <u>E</u> ffacing)
aa	Aminoácidos
Ap	Ampicilina
BFP	Pili formador de la agregación (<u>B</u> undle <u>F</u> orming <u>P</u> ili)
BCA	Ácido bicinconínico (<u>B</u> icin <u>ch</u> oninic <u>a</u> cid)
°C	Grado centígrado
CAT	Cloranfenicol <u>A</u> cetil- <u>T</u> ransferasa
c-di-GMP	Bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico
CDN	Dinucleótidos cíclicos
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa
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 (Desoxiribonucleic acid)
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
EPS	Sustancias polim
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
Esc	Genes de secreción de <i>E. coli</i> (<u>E. coli</u> <u>s</u> ecretion <u>g</u> enes)
Esp	Proteína secretada por <i>E. coli</i> (<u>E. coli</u> <u>s</u> ecretion <u>p</u> rotein)
FDE	Fosfodiesterasa
G	Gramo
GMP	Guanosín monofosfato
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)
GTP	Guanosin trifosfato
H	Horas
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
kV	Kilovolts
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	Toda la noche (<u>O</u> ver <u>N</u> ight)
Orf	Marco de lectura abierto (<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
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
PM	Peso molecular
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate <u>P</u> oly <u>A</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
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
St	Estreptomina
tm	Temperatura dentro de PCR donde el 50% de los cebadores están unidos a la secuencia blanco
Tc	Tetraciclina
TDTT	<u>T</u> ris- <u>H</u> Cl <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)
μL	Microlitro
V	Volts
wt	Cepa silvestre (<u>W</u> ild <u>T</u> ype)

Contenido

AGRADECIMIENTO	5
DEDICATORIA.....	6
Resumen.....	8
LISTA DE SIGLAS	9
ÍNDICE DE TABLAS.....	13
ÍNDICE DE FIGURAS.....	13
CAPÍTULO I.....	15
1.1 INTRODUCCIÓN	15
1.2 Problema.....	17

1.3	Justificación	18
1.4	Pregunta directriz	19
1.5	Objetivos	19
	1.5.1 <i>Objetivo general</i>	19
	1.5.2 <i>Objetivos específicos</i>	19
1.6	Hipótesis.....	19
CAPÍTULO II		20
2. MARCO TEÓRICO		20
2.1	<i>Escherichia coli</i>	20
	2.1.1 <i>Patotipos de Escherichia coli</i>	20
	2.1.2 <i>Escherichia coli enteropatógena (EPEC)</i>	23
2.2	Modelo de infección por EPEC.....	25
2.3	Inyectisomas y ataque bacteriano	26
	2.2.1 <i>Isla de patogenicidad LEE</i>	27
2.4	di-guanosin monofosfato cíclico (<i>c-di-GMP</i>).....	29
2.5	Biopelícula bacteriana	30
	2.5.1 <i>Características de biopelículas bacterianas</i>	31
	2.5.2 <i>Formación de biopelícula</i>	31
	2.5.3 <i>Biopelícula en EPEC</i>	33
Capítulo III.....		35
3. METODOLOGÍA		35
3.1	Descripción del área de estudio	35
3.2	Procedimiento de la investigación	36
3.3	Plásmidos y cepas.....	37
3.4	Condiciones de crecimiento.....	39

3.5 Extracción de DNA	39
3.6 Condiciones de PCR	40
3.7 Electroforesis en gel de agarosa 1.5 %.....	40
3.8 Clonación	40
3.9 Preparación de células electrocompetentes	42
3.10 Electroporación de productos de PCR que incluyen el plásmido recombinación con células competentes de EPEC.....	43
3.11 Ensayo de cuantificación de la biopelícula	43
3.12 Fusión transcripcional de <i>bfpA</i> y <i>LEE2</i> , al gen reportero <i>cat</i>	44
3.13 Perfil de secreción de proteínas	45
3.14 Análisis de proteínas mediante Wester Blot.....	47
3.15 Análisis estadístico	48
Capítulo VI	49
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	49
4.1 Construcción de las cepas recombinantes con <i>dgcI</i> y <i>pdeC</i>	49
4.2 Evaluación de la formación de biopelículas y la expresión de factores de virulencia en bacterias recombinantes de EPEC.....	51
4.3 Perfil de proteínas secretadas por las cepas recombinantes	58
4.4 Western Blot con las cepas recombinantes.....	61
4.5 Evaluación de las cepas mutantes de EPEC con fusión a CAT	64
CAPÍTULO V.....	71
CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	71
Conclusiones	71
Recomendaciones	72
REFERENCIAS.....	73
NEXOS.....	79

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1 <i>Patotipos de Escherichia coli</i>	222
Tabla 2 <i>Plásmidos y cepas utilizadas</i>	377
Tabla 3 <i>Oligonucleótidos empleados</i>	399
Tabla 4 <i>Reactivos utilizados para la reacción de PCR</i>	40
Tabla 5 <i>Plásmido y genes usados en la digestión</i>	41
Tabla 6 <i>Preparación del gel desnaturalizante de poliacrilamida 12%</i>	466
Tabla 7 <i>Anticuerpos primarios y secundario</i>	477

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 <i>Patotipos de Escherichia coli</i>	21
Figura 2 <i>Lesión de Adherencia y Esfacelamiento</i>	24
Figura 3 <i>Etapas de la formación de la lesión A/E</i>	26
Figura 9 <i>Ubicación satelital del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México</i>	35
Figura 10 <i>Diagrama del procedimiento seguido durante la investigación</i>	36
Figura 11 <i>Plásmidos recombinantes usados en este estudio</i>	41
Figura 12 <i>Confirmación de cepas recombinantes dgcIF1 y dgcIF2</i>	49
Figura 13 <i>Confirmación de la cepa recombinante pdeC</i>	50
Figura 14 <i>Formación de biopelícula de la cepa recombinante dgcI F1 a Tm de 30°C</i>	51
Figura 15 <i>Formación de biopelícula con el gen DgcI F1 a Tm de 37°C</i>	52
Figura 16 <i>Formación de biopelícula con el gen DgcI F2 a Tm de 30°C</i>	53
Figura 17 <i>Formación de biopelícula con el gen DgcI F2 a Tm de 37°C</i>	54
Figura 18 <i>Formación de biopelícula con el gen PdeC a Tm de 30°C</i>	55
Figura 19 <i>Formación de biopelícula con el gen PdeC a Tm de 37°C</i>	56

Figura 20 Perfil de proteínas secretadas con el gen pdeC.....	58
Figura 21 Perfil de proteínas secretadas con el gen dgI F1.....	59
Figura 22 Perfil de proteínas secretadas con el gen dgI F2.....	60
Figura 23 Western blot de dgI F1 en medio DMEM	61
Figura 24 Western blot de dgI F2 en medio DMEM	62
Figura 25 Western blot de pdeC en medio DMEM	62
Figura 26 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión LEE 2 en medio LB vs DMEM.	64
Figura 27 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión bfpA en medio LB vs DMEM	65
Figura 28 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión LEE 2 en medio LB vs DMEM	66
Figura 29 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión bfpA en medio LB vs DMEM	67
Figura 30 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión LEE 2 en medio LB vs DMEM	68
Figura 31 Cuantificación de la actividad específica de cat correspondiente a la fusión bfpA en medio LB vs DMEM	69

CAPÍTULO I

1.1 INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa que pertenece al grupo de las enterobacterias, se caracteriza por estar presente en la microbiota intestinal humana. Por otra parte, existen diversos patotipos de esta bacteria y algunos son patógenos para los humanos. De acuerdo con los estudios de Person, Giogha y Hartland (2016), se sabe que algunos patotipos de *E. coli* se encuentran implicados en el desarrollo de cuadros diarreicos en niños. Actualmente, se sabe que las cepas de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) está ligada a cuadros de fiebres agudas y diarreas infecciosas (Madigan et al., 2004).

Estudios realizados sobre EPEC comprueban que este patotipo de bacteria es el principal causante de muerte en niños menores de dos años en la Región Americana. Junto a otros patógenos, como *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), EPEC tiene la capacidad de adherirse con la célula huésped a la que infectan; esto involucra que tanto EPEC como EHEC sean considerados patógenos creadores de lesiones tipo A/E (*attaching/effacing*). La adherencia de *E. coli* está determinada por una isla de patogenicidad integrada en su genoma conocida como LEE (*locus of enterocyte effacement*, por sus siglas en inglés). LEE está organizada en al menos 5 operones policistrónicos denominados LEE1 a LEE5 en donde se codifican componentes estructurales del sistema de secreción tipo 3 necesarios para ocasionar lesiones. Este proceso es causado por el acoplamiento de una estructura supramolecular en la membrana de la bacteria, conocida como inyectisoma la cual actúa como jeringa molecular transfiriendo al citoplasma eucariótico proteínas denominadas efectoras (Pearson et al., 2016; McDaniel et al., 1995).

De acuerdo a Larzábal (2010), en el proceso infeccioso, EPEC se forman microcolonias mediante la fimbria Bfp (codificada por el operón *bfp*, contenida en el plásmido EAF) induciendo un acercamiento dirigido hacia la célula blanco. Posteriormente, se inicia el ciclo infectivo cuando la proteína llamada Tir (translocated intimin receptor) es translocada mediante el inyectisoma y se ancla en la superficie de la membrana externa de la célula hospedera interactuando con otra proteína receptora de Tir denominada Intimina, de esta manera se establece una unión íntima.

Después de Tir, varias proteínas efectoras son translocadas dentro del citoplasma hospedero a través del translocón (estructura en forma de poro constituido por tres proteínas) implicadas en la formación de una estructura de tipo pedestal a través de la polimerización de actina (Ochoa y Contreras, 2011).

El modelo de infección ha sido estudiado para explicar que sucede en la lesión A/E, y sus tres etapas: adherencia inicial, translocación de efectoras y anclaje íntimo. En la etapa de adherencia inicial en EPEC, se ha descubierto que la fimbria BFP (bundle forming pili) contribuye a la unión de las bacterias para formar microcolonias, de esta manera inicia la unión con las células del huésped (Deborah & Frankel, 2005).

El anclaje íntimo se da cuando Tir se transloca al enterocito, este receptor se adhiere a una adhesina bacteriana llamada íntima. Tir se ve involucrada en el reclutamiento de proteínas del citoesqueleto para formar un pedestal (estructuras formadas por la polimerización dinámica de la actina del hospedero) y la eliminación de microvellosidades (Coburn, *et al.*, 2007).

En la isla de patogenicidad LEE están presentes genes que codifican para proteínas efectoras y los involucrados en la formación del inyectisoma. LEE consta de 41 marcos de lectura abiertos que se organizan en cinco operones policistrónicos, dos bicistrónicos y cuatro monocistrónicos (Cronex *et al.*, 2013).

Se descubrió que Ler es un factor capaz de anular el silenciamiento que produce la proteína H-NS sobre la activación de LEE. H-NS es conocido como un silenciador global de genes que se adquieren por la transferencia horizontal o proceso de transferencia genética desde una célula a otra sobre la isla LEE (Navarre *et al.*, 2007).

La expresión diferencial de los genes de EPEC cuando la bacteria es evaluada en medios de cultivo distintos, LB y DMEN, se establecen tres fases de crecimiento o en presencia de células eucarióticas, lo que ha permitido evidenciar un conjunto de genes que expresan de forma diferente como las diguanilato ciclasas (DGCs) y fosfodiesterasas (PDEs) que presentan variaciones en su expresión con respecto a los genes de la isla LEE entre los cuales se encuentra los genes *dgcl* y *pdeC* (Hazen *et al.*, 2015).

EPEC por otro lado es una bacteria capaz de sobrevivir en diferentes condiciones ambientales y pueden intervenir en el desarrollo del nicho ecológico. Entre los factores involucrados se encuentran la disponibilidad de nutrientes, antibióticos, pH, oxígeno, entre otros. Estos microorganismos responden a estos cambios agrupándose a una superficie generando una matriz polimérica extracelular y expresión génica, a esta comunidad se le conoce como biopelícula. (Flemming, *et al.*, 2016).

1.2 Problema

En la última década la muerte de niños menores a cinco años ha alcanzado cifras alarmantes, principalmente por patógenos infecciosos capaces de causar neumonía, diarrea, malaria, entre otras (Organización Mundial de la Salud, 2015). *E. coli* enteropatógena es la principal causa de enfermedades relacionadas con la diarrea, debido a que puede estar presente en agua, leche materna (en caso de lactantes) y alimentos que son la principal fuente de vitaminas y nutrientes de las personas (Organización Mundial de la Salud, 2015).

Este es un problema mundial que representan el 95% de las enfermedades por transmisión alimentaria. Los niños están sujetos a un riesgo mayor de contraer enfermedades diarreicas que pueden ser adquiridas a través de los alimentos. Según los datos de la OMS, de los 220 millones que desarrollan enfermedad, 96000 mueren cada año debido a la ingestión de alimentos contaminados *E coli* enteropatógena (Organización Mundial de la Salud, 2015).

E. coli y sus patotipos son relacionados con gran frecuencia a dichas enfermedades. El patotipo más común es *Escherichia coli* enteropatógena mismo que se encuentra asociado a enfermedades causantes de diarrea, vómito y fiebre. Esta bacteria forma lesiones severas en el intestino y células epiteliales, destruyendo las microvellosidades por lo cual se produce la diarrea (Pearson, *et al.*, 2016).

Por otro lado considerando la importancia clínica que tienen las enfermedades diarreicas causadas por bacterias patógenas que contienen genes implicados en la codificación de proteínas que afectan al sistema inmune y causan infecciones gastrointestinales provocando decesos en el mundo es de suma importancia encontrar una solución a esta problemática, debido a que la

evolución de estos patotipos y el mal uso de los medicamentos pueden generar bacterias resistentes que son capaces de eludir un antibiótico y por sus propios sistemas son capaces de esquivar el sistema inmunológico para causar las enfermedades en el huésped.

Con el conocimiento generado en esta investigación se ayudará al desarrollo de la investigación biotecnológica sobre los fenotipos de formación de biopelícula y la expresión de genes de virulencia que permitirá diseñar estrategias para controlar las características infecciosas en las bacterias relacionadas con el tema de estudio y de esta forma erradicar las infecciones crónicas producidas por biopelículas y factores de virulencia, lo cual brindará beneficios a la salud de las personas infectadas por *E coli*.

1.3 Justificación

Debido a que *E. coli* Enteropatógena (EPEC) provoca índices de mortalidad y morbilidad elevados alrededor del mundo es importante conocer y entender cuál es el sistema de regulación génica implicado en su virulencia y la participación del segundo mensajero di-GMP cíclico en los procesos de patogénesis, además de los componentes clave en el aumento patogénico de este microorganismo que favorecen la infección al hospedero (Madigan et al., 2004).

En vista del impacto que generan los microorganismos enteropatógenos, especialmente los patógenos causantes de la lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) en la salud humana, es importante estudiar las bases moleculares implicadas en la infección del hospedero.

Por dichas razones, es importante conocer si las proteínas PdeC y DgcI codificadas en el genoma de EPEC tienen un efecto sobre la expresión de los genes de virulencia y la isla de patogenicidad LEE presentes en este microorganismo. Debido a que las fosfodiesterasas (FDEs) al hidrolizar el c-di-GMP cíclico promueven la formación de biopelícula bacteriana y bajas concentraciones de diguanilato ciclasas (DGCs) favorecen la motilidad de las bacterias y potencian la expresión de genes de virulencia. Esto contribuiría también a la búsqueda de alternativas farmacéuticas para encontrar tratamientos más eficaces que ayuden a contrarrestar el efecto patógeno que causa EPEC en la población más vulnerable.

1.4 Pregunta directriz

¿Cuál es la función de la fosfodiesterasa PdeC y la diguanilato ciclasa DgcI sobre la expresión de genes de virulencia y formación de biopelículas en EPEC?

1.5 Objetivos

1.5.1 Objetivo general

Determinar la función de DgcI y la PdeC en la expresión de factores de virulencia y formación de biopelícula en la cepa típica de *Escherichia coli* enteropatógena E2348/69.

1.5.2 Objetivos específicos

- Generar una cepa de EPEC con un vector recombinante que contenga los genes *dgcl* y *pdeC*.
- Evaluar la formación de biopelículas y la expresión de factores de virulencia en cepas recombinantes de EPEC.
- Evaluar el comportamiento de las cepas mutantes de EPEC con fusión a CAT

1.6 Hipótesis

La actividad de las proteínas DgcI y PdeC es importante en la expresión de genes de virulencia y la formación de biopelícula en cepas recombinantes de EPEC

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1 *Escherichia coli*

Conocida originalmente como “*Bacillus coli communis*”, esta bacteria fue aislada por primera vez en 1885 por el alemán Theodor Escherich quien se desempeñaba como bacteriólogo y pediatra. El bacteriólogo aisló por primera vez *E. coli* de las heces de un niño y fue nombrada como *Escherichia coli* después de su muerte y en la actualidad es la bacteria mejor estudiada. Se la puede encontrar comúnmente en el tracto gastrointestinal de los seres humanos y de los animales (Brenner et al., 2009).

Existen varias cepas de *Escherichia coli* que resultan ser inofensivas o patógenas importantes para los seres humanos y animales. *Escherichia coli* patógena consta de diversas cepas capaces de causar enfermedades en el tracto gastrointestinal, así como también, infectar otros lugares del cuerpo (Clements et al., 2012).

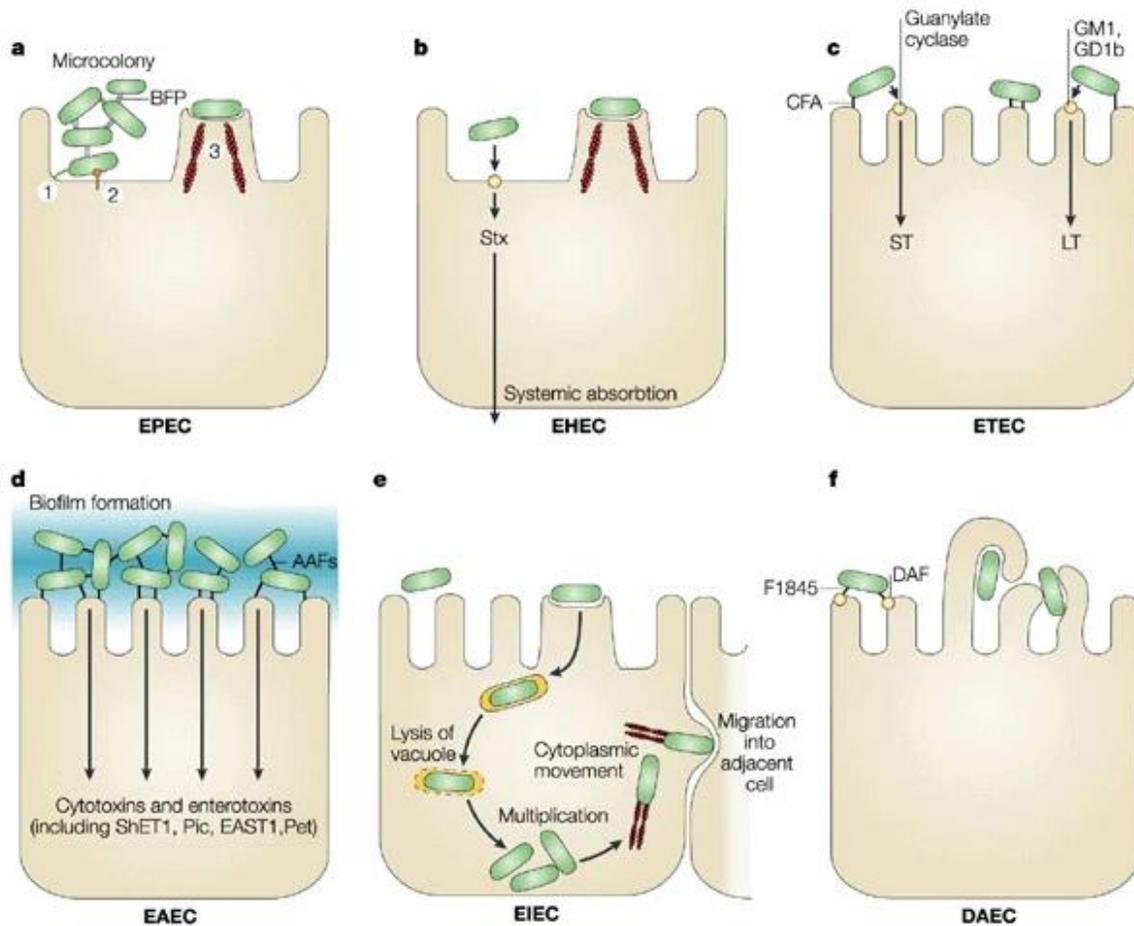
Escherichia coli es una bacteria que se puede cultivar fácilmente en laboratorio, sin embargo, para la identificación de los diferentes genotipos patógenos es necesario la detección de genes de virulencia. Por otro lado, este microorganismo puede ser encontrado en diferentes lugares como el agua, suelo y alimentos debido a la contaminación causada por heces (Brenner et al., 2009)

2.1.1 Patotipos de *Escherichia coli*

Se han descrito 6 diferentes patotipos intestinales en *Escherichia coli*. En la fFigura 1) se observa el efecto que genera cada tipo de *E. coli* en el epitelio intestinal.

Figura 1

Patotipos de *Escherichia coli*



Nota. Se observa los diferentes patotipos de *E. coli* Enteropatógena, cada una tiene características únicas en su interacción con células eucariotas. (Kaper et al., 2004)

Además, cada uno de estos patotipos tiene sus propias características como la edad de las personas que se contagian, el tipo de diarrea que causa, entre otros que observaremos a continuación:

Tabla 1*Patotipos de Escherichia coli*

Patotipos de <i>E.Coli</i>	Siglas	Características
<i>E.coli</i> enterotoxigénica	ETEC	Se caracteriza por producir diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave. Se presenta en mayores de cinco años, con una diarrea secretora.
<i>E. coli</i> enterohemorrágica	EHEC	Se caracteriza por producir dolor estomacal en el hospedero, diarrea acuosa con sangre y poco o nada de fiebre, cuadro al que se le llamó colitis hemorrágica y que era debido a la ingestión de carne cruda o mal cocida. Se presenta en todas las edades, con una diarrea inflamatoria
<i>E. coli</i> enteroinvasiva	EIEC	Se caracteriza por una diarrea acuosa, con sangre y moco, pero algunos casos sólo presentan diarrea, estos se asocian más con brotes que con casos aislados, en los cuales la transmisión puede ser de persona a persona, por ingestión de alimentos y agua contaminada. Se presenta en todas las edades, con una diarrea inflamatoria

		patógeno importante principalmente en niños mayores de seis meses.
<i>E. coli</i> enteropatógena	EPEC	Se caracteriza por una diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, con vómito, fiebre baja y mala absorción. Se presente en lactantes, con una diarrea secretora.
<i>E. coli</i> enteroagregativa	EAEC	Se caracteriza por manifestarse en niños con diarrea líquida, de color verde, con moco, sin sangre, y que en ocasiones puede llegar a ser severa y requerir rehidratación intravenosa. Algunas veces el cuadro clínico se presenta como diarrea con moco con o sin sangre, vómito y sin o con poca fiebre. Se presente en todas las edades, con una diarrea persistente y aguda.
<i>E. coli</i> de adherencia difusa	DAEC	Se caracteriza por presentarse principalmente en niños de cuatro a cinco años, con una diarrea acuosa sin sangre y sin leucocitos.

Nota. (Rodríguez, 2022)

2.1.2 *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC)

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es conocido como un patógeno altamente especializado gracias a su capacidad de supervivencia e infección en distintos nichos ambientales. Comúnmente causa enfermedades gastrointestinales en los seres humanos y en particular a los niños menores de 2 años (Levine & Edelman, 1984).

EPEC es el primer patotipo descrito de *E. coli* y uno de los seis patógenos entéricos identificados en el año 1980 debido a un brote diarreico en niños de hasta 2 años en Inglaterra

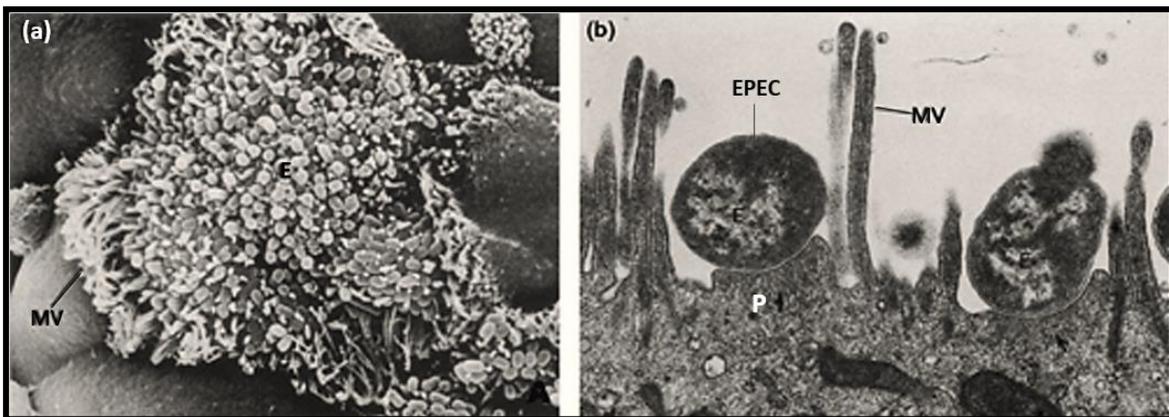
(Natarro & Kapper, 1998). EPEC al igual que EHEC genera la lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) de los enterocitos, por lo que se agrupa dentro de la familia A/E (Cronex et al., 2013).

Entre los síntomas que suele causar se encuentran la gastroenteritis, diarrea aguda, vómitos, fiebre y malestar en general. EPEC se transmite a través de la ruta fecal-oral, puede movilizarse a través de las manos, en alimentos contaminados y en fórmulas infantiles. EPEC presenta una tasa de mortalidad del 30 al 50% basándose en países como México (Matthew, 2013).

La principal característica de EPEC es la destrucción de las microvellosidades en el enterocito, la adherencia íntima a estos y la formación de una estructura tipo pedestal rica en actina, localizada debajo de la bacteria como se muestra en la Figura 2 (Deborah & Frankel, 2005).

Figura 2

Lesión de Adherencia y Esfacelamiento



Nota. Micrografía de la lesión de Adherencia y Esfacelamiento. Lesión A/E provocada por EPEC en la mucosa intestinal humana. En la figura (a) se observan enterocitos infectados por EPEC y en la imagen (b) se observa como EPEC destruye las microvellosidades del enterocito (MV) y da paso a la formación de la estructura tipo pedestal (P). Modificado de Deborah & Frankel (2005).

2.2 Modelo de infección por EPEC

EPEC es usada como modelo de investigación de los patógenos de humanos que ocasionan la lesión A/E (Cronex et al., 2013). La lesión A/E esta mediada por un mecanismo de patogenicidad de tres etapas: A) adherencia inicial, B) transducción de señales y C) el anclaje intimo como se muestra en la Figura 3.

Como se puede observar en la Figura 3, la etapa (A) se encuentra mediada por la fimbria BFP (bundle forming pili), la cual permite que se unan las bacterias formando microcolonias y luego la unión localizada con las células huésped. (Deborah & Frankel, 2005). BFP está codificada dentro del plásmido de virulencia EAF (EPEC adherence factor), mismo lugar en el que se encuentran codificados los genes del operón *perABC* (plasmid encoded regulator), *perA* es un activador transcripcional de *bfp*, sin embargo, no todos los serotipos de EPEC contienen el plásmido EAF (Whittam & McGraw, 1996), por tal motivo carecen del fenotipo de agregación en el tejido hospedero. Las cepas que no contienen EAF son agrupadas en EPEC atípicas (Scaletsky, et al., 1984).

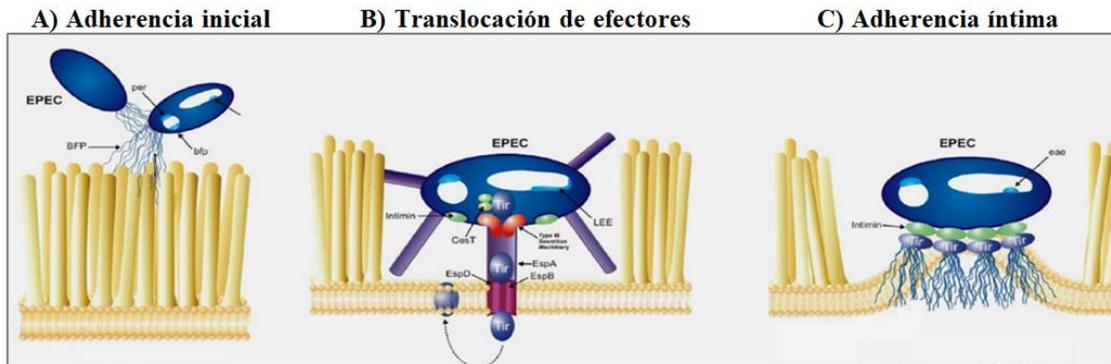
En la etapa (B) (Figura 3), encontramos el ensamblaje del inyectisoma que esta codificado en la isla LEE, el cual permite que la bacteria transporte proteínas efectoras a través de su propia membrana hacia otra célula (Coburn, et al., 2007). El inyectisoma es un complejo supramolecular con forma similar a una jeringa, y se encuentra en diversas bacterias patógenas, como cepas EHEC, *Salmonella* sp y *Pseudomonas aeruginosa*. La estructura de este sistema esta mediado por varias proteínas agrupadas en componentes de cuerpo basal, apéndice extracelular, sistemas de exportación y efectores citoplasmáticos (Hueck, 1998). Entre estas proteínas podemos destacar a: EscD, EscJ, EscL, EscN, EscR, EscS, EscT, EscU, EscV que forman un anillo interno en la membrana, EscJ conecta al anillo interno con EscC. La proteína EscF forma la estructura tipo aguja (Deng, et al., 2005; Gaytán, et al., 2016). El SST3 (Sistema de Secreción Tipo tres) que forma el inyectisoma y permite translocar diversas proteínas denominadas efectores bacterianos al huésped eucariótico, permitiéndole a la bacteria desarrollar infecciones exitosas.

En la última etapa (C) (Figura 3) se visualiza como se da la adherencia intima, esto ocurre cuando Tir (translocated intimin receptor) es translocado al enterocito, este se une a una adhesina

bacteriana llamada intimina promoviendo la creación de actina. Además de esto, Tir se involucra en la eliminación de las microvellosidades y el reclutamiento de proteínas del citoesqueleto para formar la estructura tipo pedestal (estructuras formadas por la polimerización dinámica de actina del hospedero) (Ruchaud-Sparagano, *et al.*, 2011).

Figura 3

Etapas de la formación de la lesión A/E



Nota. Etapas de la formación de la lesión A/E. A) Adherencia inicial, B) Translocación de efectores, C) Adherencia íntima. Fuente: (Lara et al., 2010).

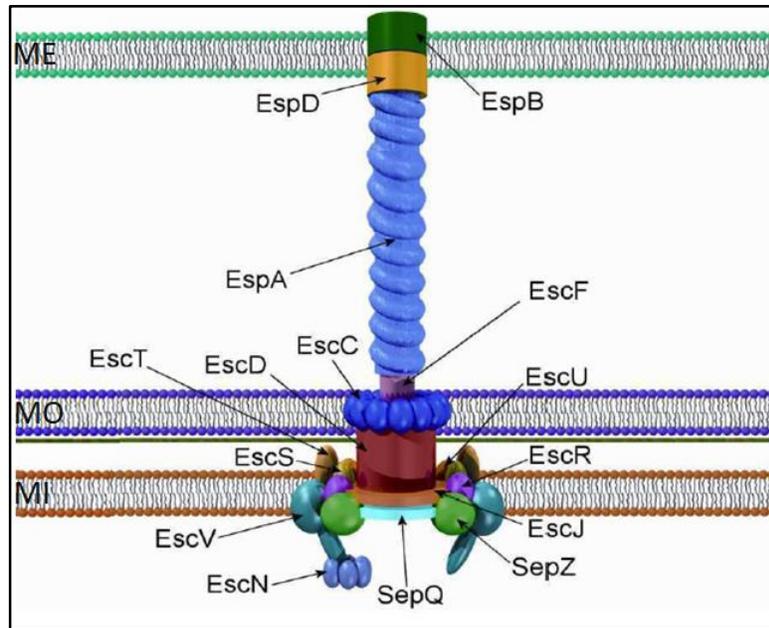
2.3 Inyectisomas y ataque bacteriano

Los sistemas de secreción tipo 3 (T3SS) o Inyectisomas son maquinarias transportadoras que usan los patógenos Gram-negativos con la finalidad de secretar proteínas directo hacia el citosol de la célula eucariota para evadir su sistema inmune. Estas máquinas también se especializan en enviar al exterior de las bacterias proteínas y varios tipos de moléculas biológicas, este sistema es de gran importancia en el ataque bacteriano (Cabañas-Romero y Huerta-Saquero, 2014).

La infección con EPEC, es resultado de la coordinación de la expresión de la fimbria Bfp, la cual es codificada en el plásmido EAF (factor de adherencia de EPEC) y su sistema de secreción SST3 que se codifica en la isla LEE como se muestra en la Figura 4, permitiendo el ensamblaje del inyectisoma (Pearson et al., 2016).

Figura 4

Modelo del sistema de secreción tipo tres (SST3)



Nota Modelo del sistema de secreción tipo tres (SST3) codificado en la isla LEE. Fuente:(Larzabal, 2010).

2.2.1 Isla de patogenicidad LEE

Los genes involucrados en la formación del inyectisoma que codifican para proteínas efectoras están ubicados en el cromosoma bacteriano, dentro de la isla de patogenicidad LEE (locus de eliminación del enterocito) que consta de 35.6 Kb (Elliot, *et al.*, 2013). LEE contiene 41 marcos de lectura abiertos (Open Reading Frame, ORF) organizados en cinco operones policistronicos (LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5), dos bicistronicos (LEE6 y LEE7) y 4 monocistronicos como se muestra en la Figura 5.

Figura 5

Isla de Patogenicidad LEE

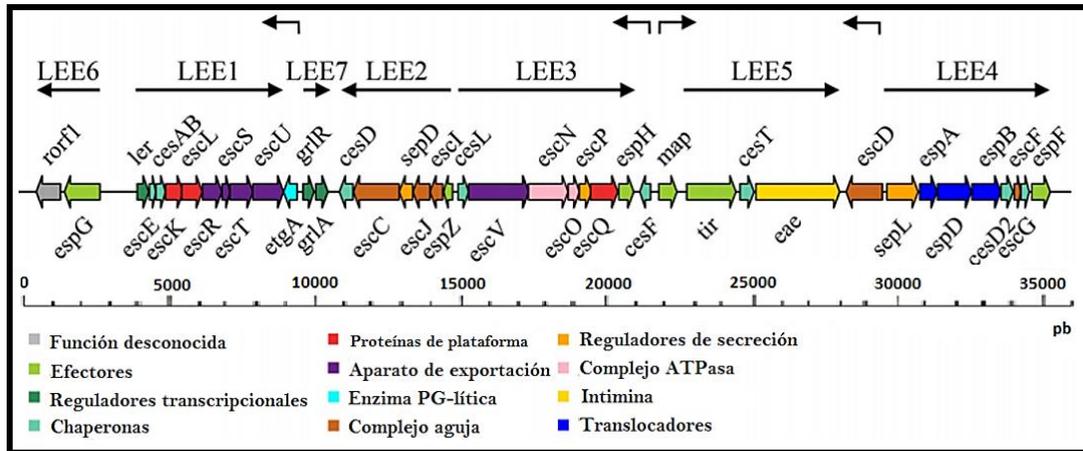


Figura 5. Isla de Patogenicidad LEE en EPEC E2348/69. Modificada de (Gaytán, *et al.*, 2016).

La regulación en la expresión de LEE a nivel transcripcional esta mediada principalmente por la proteína Ler, que se encuentra codificada en el primer operón de la isla. Ler es la encargada de activar la transcripción de los operones LEE2, LEE3, LEE4, LEE5 y LEE7 (Elliot, *et al.*, 2000). Dentro del séptimo operón se encuentran codificadas otras dos proteínas claves en la regulación de la isla LEE denominadas GrlA (Global regulator of LEE Activator) y GrlR (Global regulator of LEE repressor). GrlR al unirse al GrlA reprimen su función, por otro lado, GrlA es capaz de activar a Ler formando así un circuito de activación entre Ler-GrlA (Padavannil, *et al.*, 2013; Barba, *et al.*, 2005)

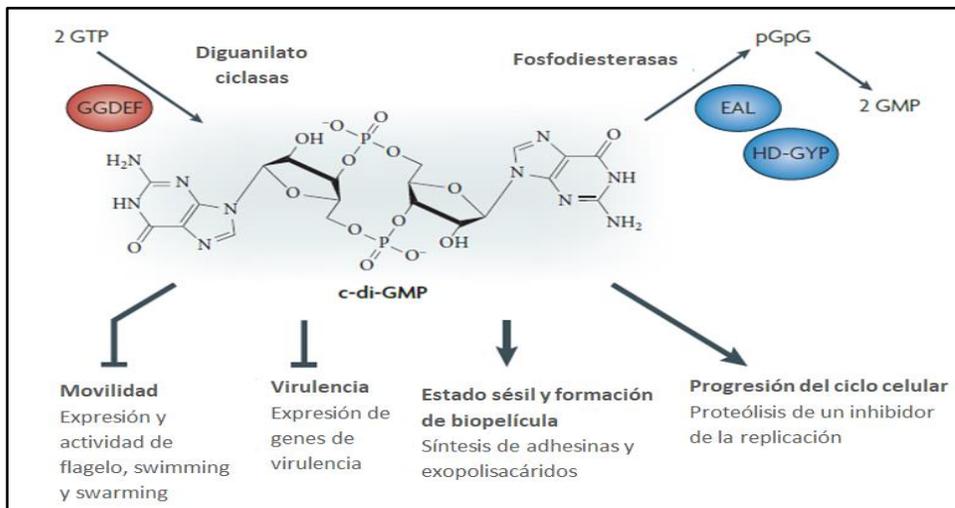
EPEC está dentro del grupo de patógenos capaces de formar lesiones denominadas A/E que se dan cuando la bacteria se une a la célula del epitelio intestinal o enterocitos. Esta unión genera la eliminación de las microvellosidades del intestino y la acumulación de proteínas del citoesqueleto de la célula huésped debajo del sitio de ataque bacteriano. En consecuencia, se genera una estructura tipo pedestal (Croxen y Finlay, 2010).

2.4 di-guanosin monofosfato cíclico (*c-di-GMP*)

El GMP (Guanosín monofosfato) cíclico (GMPc) es uno de los segundos mensajeros más estudiado en los últimos 50 años. Los estudios existentes de los dinucleótidos cíclicos (CDNs) proyectan un conocimiento más amplio de los procesos biológicos y el comportamiento celular en los que este mensajero se incluye, por ejemplo, influencia en el control del crecimiento bacteriano, ciclo de replicación, adaptación al medio formado biopelículas y regulación de virulencia. El di-guanosin monofosfato cíclico (*c-di-GMP*) Figura 6, fue descubierto en 1987 por Moshe Benziman, y fue el primer CDN reportado por su capacidad de estimular la síntesis de celulosa. Estos metabolitos secundarios tienen un monómero con doble simetría y está constituido por dos moléculas de GMP fusionadas (Jenal et al., 2017).

Figura 6

Estructura general del c-di-GMP



Nota. Estructura general del *c-di-GMP*, monómero que exhibe una simetría doble, con dos moléculas de GMP y muestra los dominios pertenecientes a diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas. Fuente: (Hengge, 2009).

La regulación y el balance de di-GMP cíclico se determina por la acción antagónica de dos enzimas; diguanilato ciclasa y fosfodiesterasas. Las DGCs (Diguanylatos ciclasas) son las encargadas de la síntesis del di-GMP cíclico, formando un homodímero en donde cada unidad toma una molécula de guanosin trifosfato (GTP), y a través de la unión de diguanosin- tetrafosfato (pppG3`p5`G), da lugar a la formación del di-GMP cíclico Figura 6. Las fosfodiesterasas (PDEs)

por otro lado, son las encargadas de hidrolizar el di-GMP cíclico al nucleótido (Christen et al., 2005).

Se puede encontrar DGCs y PDEs en casi todas las bacterias. Algunas cepas aún dentro de la misma especie tienen cantidades diferentes de genes que codifican para DGCs o PDEs. Una expresión diferencial y específica de DGCs y PDEs implica la producción de di-GMP cíclico con distinta concentración. Estas características pueden afectar a los efectores activándolos o reprimiéndolos, dicho de otra manera, la señalización por di-GMP cíclico es específica (Hengge, *et al.*, 2009; 2016).

2.5 Biopelícula bacteriana

Las bacterias se encuentran sometidas a diversas condiciones ambientales que pueden influir o ser perjudiciales para su supervivencia y desarrollo en un nicho ecológico. Estos factores incluyen la disponibilidad de nutrientes, competencia bacteriana, presencia de antibióticos, el pH, concentración de oxígeno, entre otros. (Goller & Romeo, 2008).

Por esta razón algunos microorganismos se agrupan sobre una superficie, recubiertas de una matriz polimérica extracelular, presentando un estado metabólico distinto y su expresión génica depende de su ubicación dentro de la conglomeración. A la comunidad formada se le conoce como biopelícula (Flemming et al., 2016).

Las biopelículas presentan rasgos interesantes debido a que hay coordinación en sus integrantes, comúnmente se cree que los miembros pertenecen a la misma especie bacteriana, sin embargo, estos pueden estar conformados por especies diferentes. Se conoce muy poco sobre la capacidad de EPEC para formar biopelícula. Debido a que las bacterias formando biopelículas son tolerantes a los antimicrobianos, la investigación sobre formación de biopelículas de EPEC puede ayudarnos a comprender su posible relación con las infecciones persistentes. Las bacterias que conforman la biopelícula están unidas a la superficie o entre ellas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) y estas a su vez están compuestas por diversas moléculas como ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y polisacáridos (Gupta, *et al.*, 2016).

2.5.1 Características de biopelículas bacterianas

En las biopelículas podemos encontrar rasgos importantes y muy llamativos por cómo se coordinan todos los integrantes. Si bien se cree que los miembros pertenecen a una misma especie bacteriana, la realidad es diferente debido a que también pueden formarse por diversas especies (Flemming, *et al.*, 2016).

Las EPS son sustancias producidas por bacterias, que brindan soporte, capacidad para comunicarse, protección ante el ambiente y retener nutrientes (Vila, *et al.*, 2008; Flemming, *et al.*, 2016).

En la biopelícula podemos encontrar nichos pequeños con características específicas de oxígeno, carbono, nitrógeno, concentración de iones y pH, conocidos comúnmente como microambientes, capaces de desarrollar roles metabólicos que permiten la permanencia de las bacterias en cualquier ambiente (Costerton, *et al.*, 1994; Vroom, *et al.*, 1999).

2.5.2 Formación de biopelícula

La formación de biopelículas como se ve en la Figura 7, se divide en 5 etapas generales (Ettinger, 2009). Inicialmente, las primeras bacterias se adhieren a una superficie utilizando pili o flagelos, una adhesión conocida como adhesión reversible porque las células no están firmemente adheridas a la superficie y, por lo tanto, aún pueden migrar a otro nicho. En esta etapa, las células detectan las condiciones ambientales que permiten la formación de biopelículas (Vila, *et al.*, 2008; Flemming, *et al.*, 2016).

Luego, el número de células aumenta y el EPS comienza a liberarse moderadamente, lo que resulta en una mayor adhesión a la superficie (Gupta, *et al.*, 2016). La expresión de fimbrias y flagelos bacterianos se ve afectada, lo que permite la transición de la vida planctónica a una asociada (Flemming, *et al.*, 2016).

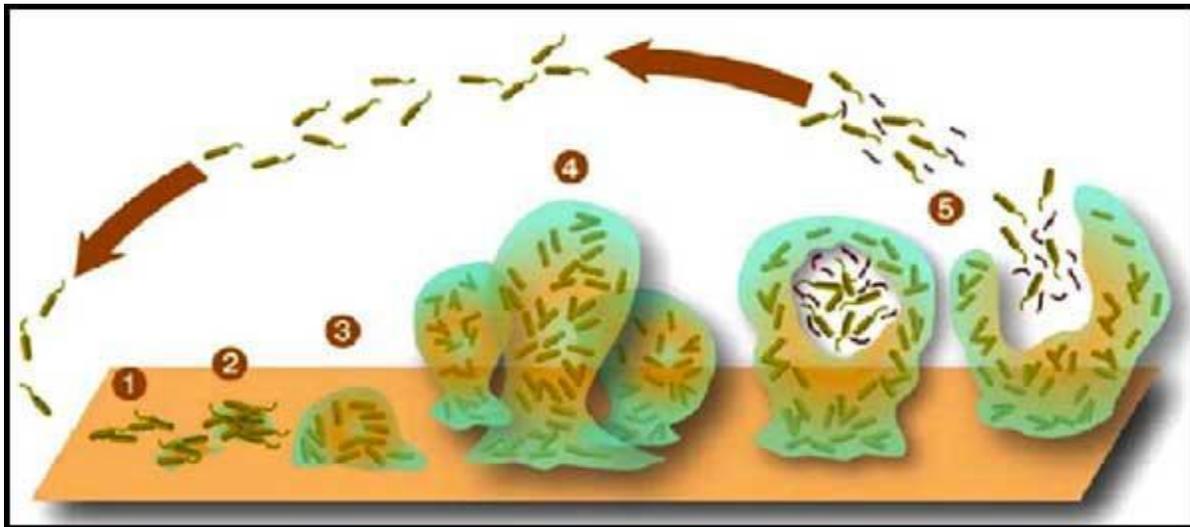
En la tercera fase, las bacterias adheridas forman microcolonias, aumentando su número y permitiendo la agregación de nuevos organismos (Vila, *et al.*, 2008; Gupta, *et al.*, 2016; Flemming, *et al.*, 2016), incrementando así concentración de EPS.

Posteriormente, el crecimiento tridimensional de las biopelículas y los límites espaciales de las interacciones bacterianas forman una estructura organizada (Vila et al., 2008), creando espacios heterogéneos en la composición fisicoquímica que influyen y promueven la diferenciación fisiológica y la expresión genética diferencial (Flemmings et al. al., 2016).

Finalmente, con la ayuda de enzimas capaces de degradar la matriz exomérica, algunas células se desprenden del biofilm y, en lo posible, se propagan a nuevos nichos formando nuevos biofilms (Vila, et al., 2008; Gupta, et al., 2016; Fleming et al., 2016). Entre las razones que determinan la liberación de células de los biofilms, encontramos principalmente las condiciones de nutrientes, que las bacterias determinan a través de moléculas de señalización típicas de detección de quórum o sistemas de dos componentes (Ramírez-Mata et al., 2014).

Figura 7

Etapas de formación de biopelículas



Nota. Etapas de formación de biopelículas. (1) Las células individuales se adhieren a una superficie. (2) Una vez que se establecen comienzan a adherirse a la superficie de manera irreversible. (3) La población crece, se forman microcolonias y por medio de la comunicación celular se incrementa la producción de EPS, (4) la biopelícula desarrolla una arquitectura tridimensional y organizada. (5) Finalmente las células individuales se separan de la biopelícula y pueden colonizar nuevas superficies. (Ettinger, 2009)

2.5.3 Biopelícula en EPEC

Se sabe que en *E. coli* los flagelos, fimbrias, antígeno 43 y los componentes de la matriz extracelular como celulosa, ácido colánico y poli- β -1,6-*N*-acetil-D-glucosamina, aportan a la formación de biopelículas (Danese, *et al.*, 2000; Pringent-Combaret, *et al.*, 2000; Jacobsen *et al.*, 2008).

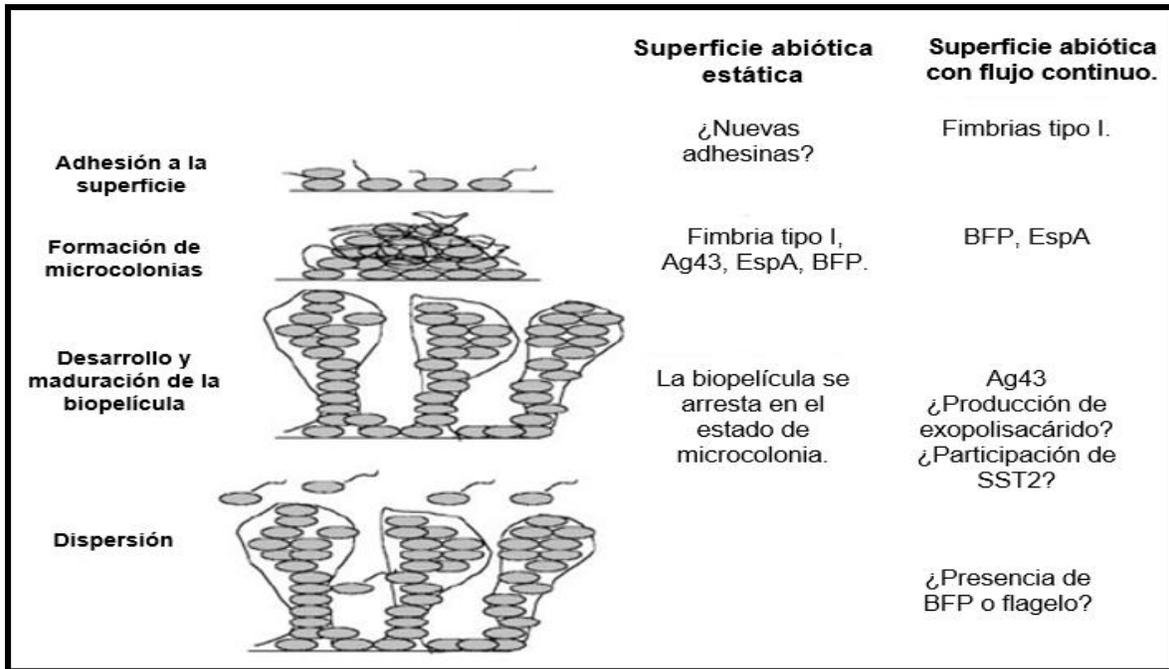
Aunque el proceso de formación de biopelícula en EPEC sea poco estudiado, se conoce que su mecanismo se diferencia en un 25% en su genoma con respecto al que presenta la cepa de *E. coli* K-12. (Luckjanceko, *et al.*, 2010). EPEC se diferencia principalmente porque contiene 1Mb mas en su genoma y no presenta genes involucrados con la producción de poli- β -1,6-*N*-acetilglucosamina que, en *E. coli* K-12, son necesarios para la formación de biopelículas (Reisner, *et al.*, 2006; Iguchi, *et al.*, 2009).

En un primer estudio sobre la formación de biopelícula en la cepa de EPEC E2348/69, se logró la formación de una biopelícula robusta bajo condiciones de flujo continuo sin importar la superficie que colonizaba y se encontraron algunas estructuras bacterianas como BFP, fimbrias tipo 1, Ag43 y EspA (proteína estructural del filamento del SST3) en la etapa inicial de formación de biopelícula (Figura 8) (Moreira, *et al.*, 2006).

En otro estudio se evaluó la formación de biopelícula en cepas atípicas de EPEC (no poseen el plásmido EAF) y se encontró que algunas cepas formaban biopelículas sólo a una determinada temperatura y en superficies abióticas de interfase aire-liquido (Weiss-Muzkat, *et al.*, 2010). Posteriormente se reportaron mutantes incapaces de adherirse a superficies abióticas por lo que no había formación de biopelícula, las mutaciones fueron encontradas en genes de fimbrias tipo1 (*fimC*, *fimD* y *fimH*), diguanilato ciclase DgcZ, ATP sintetasa F1 y el gen no caracterizado *yjiC* (Nascimento, *et al.*, 2014).

Figura 8

Formación de biopelícula en EPEC E2348/69



Nota. Formación de biopelícula en EPEC E2348/69. Modelo de formación de biopelícula en superficies abióticas bajo condiciones estáticas y de flujo continuo donde se encuentran involucradas las fimbrias de tipo I, Ag43, EspA y BFP (Modificado de Moreira, *et al.*, 2006)

Capítulo III

3. METODOLOGÍA

3.1 Descripción del área de estudio

La presente investigación fue realizada en el Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México, en el Laboratorio #2 de Microbiología Molecular; ubicado en el Estado de Morelos en la ciudad de Cuernavaca, México (Figura 9).

Figura 4

Ubicación satelital del Instituto de Biotecnología de la Universidad Nacional Autónoma de México

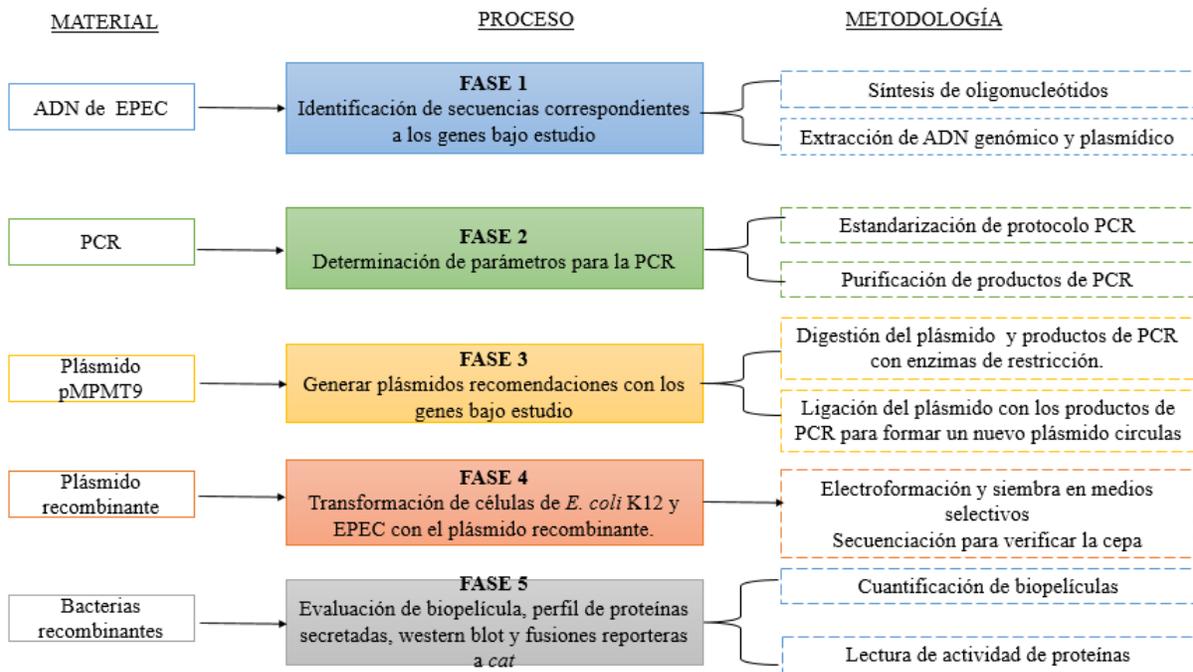


3.2 Procedimiento de la investigación

Como se muestra en la Figura 10 la investigación se llevó a cabo en 5 fases en las que se emplearon diversas metodologías, siguiendo protocolos al pie de la letra para concluir con el resultado de la investigación.

Figura 5

Diagrama del procedimiento seguido durante la investigación.



3.3 Plásmidos y cepas

En este trabajo se emplearon las cepas, plásmidos y oligonucleótidos descritos en la Tabla 2 y Tabla 3, respectivamente.

Tabla 2

Plásmidos y cepas utilizadas

Plásmido	Descripción	Referencia
pMPM T6	Plásmido de bajo número de copias, posee un promotor inducible con arabinosa y un cassette de resistencia a tetraciclina	Mayer, P. (1995)
pMPM T6-<i>dgcI</i>	Derivado de pMPM T6 que expresa <i>DgcI</i>	Este trabajo
pMPM T6-<i>pdeC</i>	Derivado de pMPM T6 que expresa <i>PdeC</i>	Este trabajo
pKK232-8+LEE2-cat	Fusión transcripcional de la región -469 a +121 a partir del inicio de LEE2 unido al gen reportero cloranfenicol acetil transferasa, con cassette de resistencia a ampicilina	Bustamante, et al. (2001)
pCAT232	Fusión transcripcional con la región promotora -232 a +76 de <i>bfpA</i> unida al gen reportero cloranfenicol acetil transferasa, con cassette de resistencia a ampicilina	Puente, et al. (1996)

Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> K-12	Silvestre	Cepa de laboratorio
EPEC	Silvestre, EPEC E2348/69	Levine, et al. (1978)
ΔgrlA	EPEC mutante en Δ grlA	Puente, et al., (1996)
ΔperC	EPEC mutante en Δ perC	Puente, et al., (1996)
ΔEAF-	EPEC mutante en Δ EAF-	Puente, et al., (1996)
EPEC-T6	EPEC transformada con pMPMT6	Este trabajo
EPEC-<i>dgcl</i> F1	EPEC transformada con pMPMT6- <i>Dgcl</i> (contiene 1291 pb)	Este trabajo
EPEC-<i>dgcl</i> F2	EPEC transformada con pMPMT6- <i>Dgcl</i> (contiene 608 pb)	Este trabajo
EPEC-<i>pdeC</i>	EPEC transformada con pMPMT6- <i>pdeC</i>	Este trabajo
EPEC-pLEE2	EPEC-T6 transformada con pKK232- 8+LEE2-cat	Este trabajo
EPEC-<i>dgcl</i> F1/ pLEE2	EPEC- <i>dgcl</i> F1 transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo
EPEC-<i>dgcl</i> F2/ pLEE2	EPEC- <i>dgcl</i> F2 transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo
EPEC-<i>pdeC</i>/ pLEE2	EPEC- <i>pdeC</i> transformada con pKK232- 8+LEE2-cat.	Este trabajo
EPEC-T6- pCAT232	EPEC-T6 transformada con pCAT232.	Este trabajo
EPEC-<i>dgcl</i> F1 - pCAT232	EPEC- <i>dgcl</i> F1 transformada con pCAT232.	Este trabajo

EPEC-dgcI F2 - EPEC-dgcI F2 transformada con Este trabajo pCAT232.

EPEC-pdeC - EPEC-pdeC transformada con Este trabajo pCAT232.

Los oligonucleótidos que se muestran en la tabla 2 fueron empleados para la obtención de los genes bajo estudio y los nucleótidos subrayados en las secuencias indican el sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción utilizadas (en negrita).

Tabla 3

Oligonucleótidos empleados

Nombre	Enzima	Secuencia	TM
DgcI F1 NcoIF	CCATGG	GGCC <u>CCATGG</u> CCTGCGGGATCTACTCAAATGG	65 ° C
DgcI F2 NcoIF	CCATGG	GGCC <u>CCATGG</u> CCTGCGGGATCTACTCAAATGG	61 ° C
DgcI SalR	GTCGAC	CGCGT <u>CGACT</u> GCGAATAATGATTACTGCCAGCT	60 ° C
PdeC NcoIF	CCATGG	GCG <u>CCATGG</u> AATCAGCTCCGAATCTTTGCTCA G	60 ° C
PdeC PstR	CTGCAG	CGC <u>CTGCAG</u> TTTTATTGCCCGCGCGTAACTC	65 ° C

Nota. Oligonucleótidos diseñados para esta investigación

3.4 Condiciones de crecimiento

Todos los preinóculos utilizados se cultivaron a 37° C con agitación en 5 mL de medio líquido LB (Luria-Bertani: 10 g/L de triptona de caseína, 5 g/L de extracto de levadura, 10 g/L de NaCl a pH 7.5). Posteriormente, se inocularon 50 µL en LB o en DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's Medium) con 0.01% de LB con el respectivo antibiótico. Para los medios sólidos se agregó 15 % de agar. Las concentraciones para los medios con antibiótico son las siguientes: Estreptomina (Sm) 100 µg/mL, Tetraciclina (Tc) 15 µg/mL, Ampicilina (Ap) 100 µg/mL y Kanamicina (Km) 30 µg/mL.

3.5 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA genómico y plasmídico se utilizó el kit comercial Wizard® Genomic DNA Purificación y el EZgene™ Plasmid Miniprep Kit, respectivamente, utilizando las recomendaciones del fabricante.

3.6 Condiciones de PCR

Para amplificar y verificar los plásmidos recombinantes generados se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los volúmenes detallados en la tabla 4:

Tabla 4

Reactivos utilizados para la reacción de PCR

Reactivo	Cantidad (μL)
DNA (100 ng/mL)	1
Oligo Forward (10 pmol/μL)	0.65
Oligo Reverse (10 pmol/μL)	0.65
dNTPs (10 mM)	0.3
Master Mix 10x	2.82
Buffer Hf 10x	3
H₂O	16.58

Nota. La reacción de PCR se hizo a una T_m de 51°C

Las condiciones empleadas en el termociclador fueron:

0:30 segundos ----- 98° C	} 30 ciclos
0:10 segundos ----- 98° C	
0:30 segundos ----- X	
1 minuto ----- 72° C	
10 minutos ----- 72° C	

3.7 Electroforesis en gel de agarosa 1.5 %

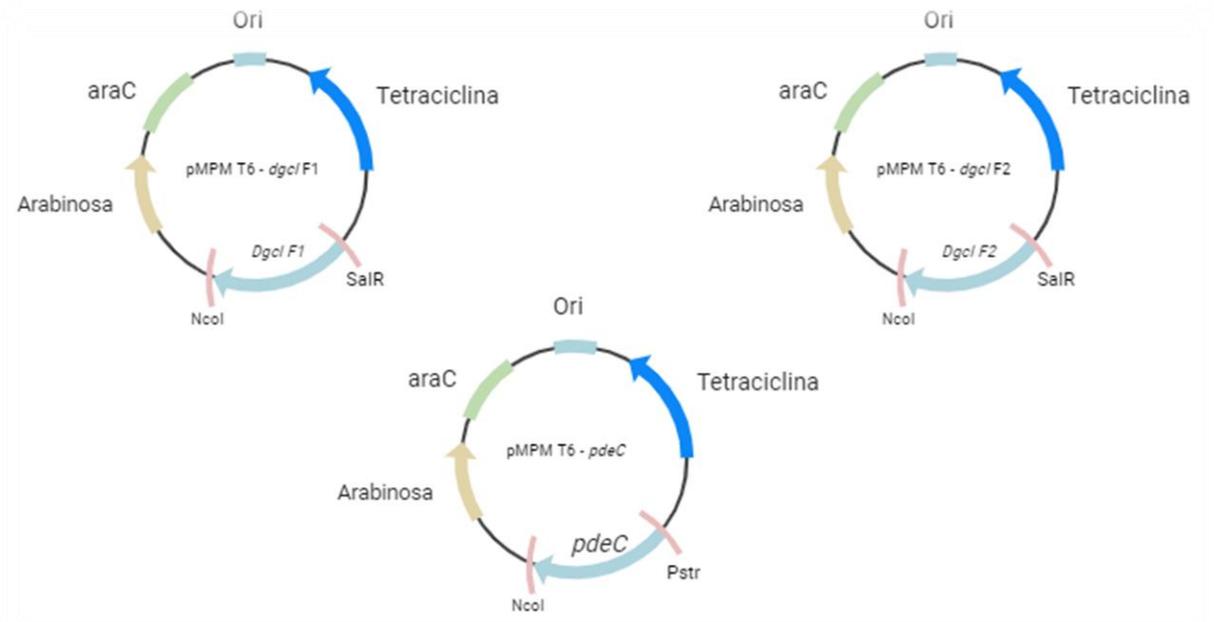
Las muestras obtenidas de las extracciones genómicas, plasmídicas, digestiones enzimáticas y productos de PCR se resolvieron en electroforesis en gel de agarosa al 1% con amortiguador TAE 1X a 100V, 400 miliamperes (mA) y por 45min. Una vez terminado el proceso de corrido, se tiñó el gel con una solución de bromuro de etidio por 3 min en agitación, para posteriormente lavarla con agua destilada y observar sobre la luz ultravioleta.

3.8 Clonación

Para clonar los genes *dgcl* y *pdeC*, se utilizó el plásmido pMPM T6(Mayer, 1995). A continuación, se presenta un esquema de las construcciones en la Figura 11.

Figura 6

Plásmidos recombinantes usados en este estudio



Nota. En base al plásmido pMPM T6, se diseñaron las construcciones para clonar *dgcl F1*, que contiene 1291pb incluyendo la secuencia señal y la región transmembrana, *dgcl F2*, que contiene 608pb y excluye la región transmembrana y la secuencia señal y *pdeC*.

Una vez amplificados los genes de ADN de EPEC que se clonaron a través de PCR y su posterior electroforesis, el siguiente proceso fue purificar las bandas del gel de agarosa 1.0% utilizando Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit, siguiendo las recomendaciones del fabricante. Una vez purificados los fragmentos de PCR y el plásmido, se realizó las digestiones para cada uno de estos como indica la tabla 5.

Tabla 5

Enzimas de restricción usadas en la digestión del plásmido y los genes en estudio

Digestión	Enzima de restricción
pMPM T6	NcoI / SalIR
	NcoI / Pstr
<i>dgcl F1</i>	NcoI / SalIR
<i>dgcl F2</i>	NcoI / SalIR
<i>pdeC</i>	NcoI / Pstr

Nota. Enzimas usadas para digerir los plásmidos y genes de esta investigación

Se usó 22 μL de producto de PCR, 5 μL del Buffer correspondiente a cada enzima y 1 μL de cada enzima y 20 μL de plásmido, los volúmenes se llevaron a 50 μL finales con agua.

La digestión se realizó utilizando una enzima de restricción NcoI durante 30min a 37°C, posteriormente la enzima SaIIIR durante 30min a 37°C y finalmente con la enzima Pstr (fast digestion) durante 10min a 37°C.

Los insertos y los vectores digeridos se ligaron utilizando: 8 μL de vector y 9 μL de inserto más 2 μL de Buffer 5x (Invitrogen) y 1 μL de T4 DNA ligasa. Se incubó toda la noche a 4° C.

Posteriormente, el producto de ligación se transformó en células electrocompetentes de *E. coli* K-12, dejando que se recuperen durante 1h30, para posteriormente ser inoculadas en medio selectivo. Se extrajo DNA plasmídico de al menos dos colonias candidatas de cada transformación, y se envió a secuenciar a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, IBt Unam, utilizando oligonucleótidos flanqueando una región de gen y del plásmido. Las secuencias fueron analizadas a través del programa Bioedit para verificar los correspondientes genes según el marco de lectura, además la existencia de posibles mutaciones. Como último paso se precedió a transformar las células EPEC E2348/69 con cada construcción.

3.9 Preparación de células electrocompetentes

Se preparó un inóculo de cada cepa en 5ml de LB suplementado con el antibiótico correspondiente, y se incubó toda la noche a 37°C en agitación. Luego se transfirió 1ml del cultivo a un matraz con 100ml de LB suplementado con el antibiótico adecuado.

Posteriormente, se incubo a 37°C en agitación hasta obtener una OD 600nm de 0.6- 0.8. Luego se transfirió a tubos Falcon de 50ml, se centrifugó durante 8min a 8000rpm y se desechó el sobrenadante.

Se agregó 40ml de agua mQ estéril enfriada a -4°C, se mezcló por inversión, se centrifugó durante 8min a 8000rpm, se desechó el sobrenadante y se repitió este procedimiento por 3 veces.

Posteriormente, se agregó 40ml de glicerol al 10% previamente enfriado y se mezcló por inversión, se centrifugó durante 8min a 8000rpm y se desechó el sobrenadante. Luego se resuspendió con la pipeta para no maltratar a las células en el glicerol al 10% de acuerdo al tamaño de la pastilla y se hizo alícuotas de 50 μL .

3.10 Electroporación de productos de PCR que incluyen el plásmido recombinación con células competentes de EPEC.

Para este ensayo se enfrió en hielo las celdillas de electroporación, una para cada plásmido recombinante se prepararon tubos eppendorf con 1000 µl de medio SOC. Para cada plásmido recombinante: en un tubo Eppendorf de 500 µl se agregó 10 µl de producto de PCR más 50 µl de bacterias concentradas y se mezcló con la pipeta. Se transfirió a una celdilla de electroporación y se electroporó.

Luego se extrajo todo medio ya electroporado de la celdilla y se pasó a un tubo Eppendorf nuevo. Posteriormente, se incubó las bacterias resuspendidas, en el tubo Eppendorf, con agitación a 37°C durante 1.5 horas. Una vez terminado el periodo de incubación se centrifugó los tubos por 1 minuto a 12, 000 rpm; se desechó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla bacteriana con la cantidad de medio SOC sobrante dentro del tubo. Se cultivó todo el cultivo concentrado en una placa con medio sólido LB y Tc (25 µg/ml) empleando perlas de vidrio. Por último, se incubó cada caja cultivada a 37°C durante 12 horas.

3.11 Ensayo de cuantificación de la biopelícula

Se cultivó un preinóculo de cada cepa, control y mutante. Se inoculó cada mutante en 5 ml de medio LB más 5 µg/ml de Tc, 5 ml de LB más 5 µl de Estreptomina para los controles que no llevan preinóculo; se colocó en agitación durante toda la noche a 37°C.

Se realizaron diluciones de cada cultivo en relación 1:100 en los medios LB al 50 % y DMEM al 100%.

Luego, se repartió las diluciones de cultivos bacterianos en placas de microtitulación de poliestireno añadiendo 200 µL del cultivo en cada pozo, cuatro pozos por muestra. Se llenó cada placa por triplicado para cuantificar a diferentes temperaturas en condiciones estáticas: 30 y 37°C.

Una vez que se cumplió el tiempo para cuantificación (24, 48 y 72 horas), las placas fueron tratadas de la siguiente manera: con el fin de conocer la cantidad total de células se realizó una lectura de espectrofotometría a 630 nm para cada pozo; en seguida se eliminó el cultivo bacteriano y el medio, lavando cada pozo con 200 µL de PBS 1x en tres ocasiones.

Luego de la lectura, para fijar la biopelícula formada se agregó 200 μL de metanol a cada pozo y se dejó en reposo a temperatura ambiente por 15 min. Una vez que transcurrió el tiempo, se eliminó el metanol y se dejó reposando la placa hasta secarse.

Posteriormente, se tiñó los pozos con 200 μL de cristal violeta al 0.2 % durante 10 min y se retiró el cristal violeta y enseguida se realizó tres lavados con agua corriente. Cada placa se incubó a 50°C durante 15 minutos para evaporar completamente el agua de los lavados.

Luego se resolubilizó el cristal violeta absorbido por la biopelícula con 200 μL de ácido acético al 33%, y, finalmente, para correlacionar la cantidad de células con la cantidad de biopelícula producida por éstas, se realizó una relación entre ambas dividiendo, la lectura correspondiente a la medición con cristal violeta entre la lectura de células planctónicas, obteniendo un coeficiente de producción de biopelículas.

Stepanovic *et al.*, 2000.

3.12 Fusión transcripcional de *bfpA* y *LEE2*, al gen reportero *cat*

Se realizó las transformaciones de las cepas mutantes más los controles con las fusiones transcripcional *bfpA-cat* y *LEE2-cat*, luego se almacenó cada cepa transformada en medio LB con glicerol al 20 % conservándose en ultracongelación.

Se incubaron los preinóculos de cada una de las cepas transformadas con la fusión transcripcional en 5 ml de LB a 37°C, durante toda la noche y se realizaron diluciones en relación 1:100 en medios LB y DMEM, más los respectivos antibióticos para cada cepa.

Se tomó 1.5 ml del cultivo en cuanto este alcanzó una DO ~0.6, ~0.8, ~1.0 a 600 nm de absorbancia y se centrifugó por 1 min a 12, 000 rpm; se desechó el sobrenadante y se dejó secar completamente la muestra.

Posteriormente, se realizó un lavado a cada pastilla bacteriana con 800 μL de buffer TDDT para posteriormente resuspenderla en 600 μL del mismo buffer del lavado. Luego de esto se sonicó las muestras bacterianas con pulsos de 10 segundos y 5 segundos de descanso, en un tiempo de tres minutos.

Al terminar el proceso de sonicación, se centrifugó las muestras por 15 min a 12, 000 rpm y se recuperó el sobrenadante con el contenido proteico trasladándolo a un tubo limpio.

Protocolo de lectura de proteínas totales:

1. Se colocó 10 µl de cada muestra en una placa de poliestireno de 96 pozos siguiendo el 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	Bco	Bco	15	15	23	23	31	31	39	39	47	47

2. Luego se preparó el reactivo BCA Protein Assay Kit Reagent (Thermo Scientific Pierce) y agregó 200 µl a cada pozo.
3. Se incubó la placa a 37°C por 30 min y se leyó en el equipo CERES a 562 nm.

Lectura de actividad de CAT

1. Se colocaron 5 µl de cada muestra en una placa de poliestireno de 96 pozos siguiendo el 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

2. Se tomó 2.5 ml de mezcla de reacción para CAT y se diluyó en 22 ml de agua MQ.
3. Finalmente se agregó 200 µl de esta mezcla a cada pozo con la pipeta multicanal. Nota: al ser una reacción enzimática debe ser leída de manera inmediata en el equipo CERES.

3.13 Perfil de secreción de proteínas

Se incubaron preinóculos de cada bacteria de interés y sus controles en 5mL de LB con sus respectivos antibióticos, a 37°C en agitación, durante toda la noche. Posteriormente, se realizaron diluciones 1:100 en medio LB al 1% o DMEM al 100%, luego se añadió azúcar arabinosa y glucosa al 0.01% o sin azúcar en cada dilución y se incubaron en las mismas condiciones.

Luego se recuperaron 4.5mL de cada cultivo repartidos en 3 tubos de 1.5mL, cuando estos alcanzaron un OD_{595nm} ~1.0 y se centrifugaron por 5 minutos a 14,000rpm, luego se recolectaron 720 µL del sobrenadante a un nuevo tubo Eppendorf (las pastillas fueron guardadas a -20°C para ser usadas en otro experimento, en el ensayo de Western Blot) y se les agregó 540 µL de metanol mezclándolo con vortex, posteriormente se les añadió 180 µL de cloroformo y se mezcló con vortex.

Se procedió a centrifugar por 5 minutos a 4°C a 14000 rpm. Se eliminó el sobrenadante cuidando de no tocar el velo que divide ambas fases y se añadió 540 µL de metanol mezclándolo con vortex.

Posteriormente, se centrifugó las muestras durante 10 minutos a 4°C a 14000 rpm, se desechó el sobrenadante y se dejó secar la pastilla. Luego, se resuspendió la pastilla en 25 µL de buffer de carga para proteínas (5mL de glicerol al 100% más 2mL SDS 20% más 1mL β-mercaptoetanol 10% v/v más 2.5mL Tris-HCL 1M pH 6.8 y 0.02g de azul de bromofenol) y se incubaron durante 10 minutos a 95°C.

Finalmente, se juntó los tubos Eppendorf que contenían la misma muestra y se corrieron en un gel desnaturante de SDS-poliacrilamida al 12% durante 5 horas con un voltaje de 25 mA por gel, añadiendo como Buffer Tris-Glicina (Tris base 2.5mM, glicina 19.2mM, SDS 0.1% pH8.3)

Una vez culminado el tiempo de corrida, se procedió a teñir los geles con azul de Coomassie durante 2 horas en agitación y se destiñeron con una solución de ácido acético-metanol durante toda la noche.

Tabla 6

Preparación del gel desnaturante de poliacrilamida 12%.

Reactivos	Gel Separador	Gel Concentrador
H ₂ O	7 mL	6 mL
1.5 M Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS	5 mL	---
1.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS	---	2.5 mL
Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0.8%	8 mL	1.5 mL
PSA 10%	100 µL	50 µL
TEMED	16 µL	16 µL

Nota. La tabla indica los diferentes reactivos usados para la elaboración del gel de poliacrilamida

3.14 Análisis de proteínas mediante Wester Blot

Las pastillas recolectadas en el ensayo de secreción de proteínas fueron resuspendidas en 300 μ L de PBS 1X y se sonicaron durante 3 minutos a intervalos de pulsos 10 segundos y 5 segundos de descanso.

Luego, se añadió 100 μ L de Buffer de carga a cada muestra y se calentaron a 95°C durante 10 minutos. Se homogenizó las muestras y se corrió en un gel desnaturalizante SDS-poliacrilamida al 12% durante 5 horas, con un voltaje de 25mA, por gel.

Culminada la electroforesis en vertical, se realizó una transferencia de las proteínas a una membrana de nitrocelulosa a través de una cámara de transferencia.

Se colocaron 3 papeles filtro, luego la membrana de nitrocelulosa, posteriormente el gel de poliácridamida y finalmente 3 papeles filtro, formando así un tipo sándwich, todo lo anterior previamente humedecido con Buffer de transferencia (2.91 g Tris 100% + 1.465 g glicina 100% + 0.935 mL SDS 20% + 100 mL metanol 20% + H₂O hasta alcanzar un volumen de 500 mL), finalmente se realizó la transferencia durante 43 minutos a 17V.

Al terminar la transferencia, se bañó la membrana de nitrocelulosa con rojo de Ponceau para comprobar que hubo una transferencia de proteínas exitosa, y se lavó con agua destilada hasta retirar toda la tinción.

Después, se bloqueó la membrana con PBS-T (100 mL PBS 10X + 100mL NaCl 5M + 1 mL Tween 20 + 800 mL H₂O), mezclándolo con leche en polvo comercial sin grasa al 5% durante 1 hora en agitación.

Una vez culminado el tiempo, se lavó la membrana con PBS-T 3 veces durante 10 minutos en agitación y se incubó con los anticuerpos primarios por 2 horas a temperatura ambiente y en agitación (Tabla 7).

Tabla 7

Anticuerpos primarios y secundario

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. La tabla indica los anticuerpos usados para bloquear las proteínas que se analizaron en el gel de poliácridamida.

Finalmente, se volvió a lavar la membrana con PBS-T en agitación y se incubó con el anticuerpo secundario por 2 horas a temperatura ambiente y en agitación. Luego se lavó la membrana 3 veces más con PBS-T y se añadió el reactivo oxidante y luminol 1:1 por 2 minutos. Por último, se reveló y fijó la membrana sobre películas Kodak X-omat en un cuarto oscuro a diferentes tiempos de exposición para poder observar un mejor fenotipo, se enjuagó y se dejó secar para observar los resultados.

3.15 Análisis estadístico

El análisis estadístico de la cuantificación de biopelícula y la actividad específica de *cat* fue realizado a través de un análisis de la varianza (ANOVA) en un modelo de bloques completos al azar (DBCA). Es importante mencionar que el análisis estadístico de la cuantificación de biopelícula tuvo que ser ajustado a un ANOVA de medidas repetidas. Luego se realizó la prueba de normalidad a través de Shapiro Wilks y por último se determinó la homocedasticidad mediante la prueba de Levene, para comprobar si las variables evaluadas cumplían con los supuestos paramétricos.

Para las variables que no cumplieron con los supuestos paramétricos se empleó una transformación (en este caso raíz cuadrada) y luego fueron analizadas con pruebas de ANOVA y Tukey.

Capítulo VI

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

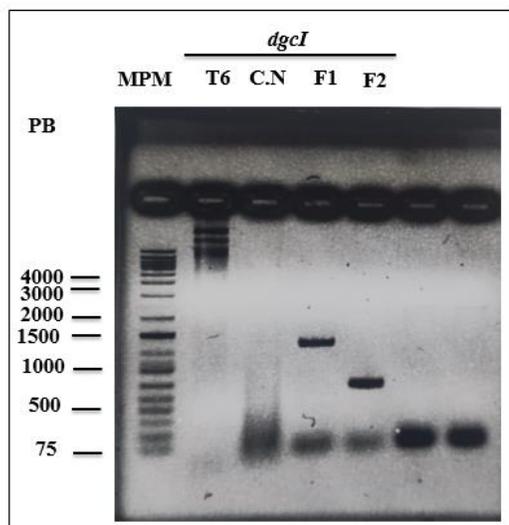
4.1 Construcción de las cepas recombinantes con *dgcl* y *pdeC*

Se determinó un alto grado de homología en las regiones adyacentes a los genes bajo estudio entre las cepas no patógena *E. coli* K-12 BW25113 y patógena EPEC E2348/69; se utilizó como base el genoma de la bacteria no patógena de *E. coli* K-12, colección Keio (Baba *et al.*, 2006s).

Como se puede observar en las Figuras 12 y 13 se logró obtener tres contrucciones recombinantes con los genes bajo estudio (*dgclF1*, *dgclF2* y *pdeC*), mismas que se corroboraron mediante de PCR empleando cebadores que reconocieron al gen y al vector previamente insertado en la célula bacteriana. Por otro lado, se secuenció la region que contienen los genes bajo estudio de la bacteria para comprobar la transformacion con el vector recombinante (Datsenko y Wanner, 2000)

Figura 7

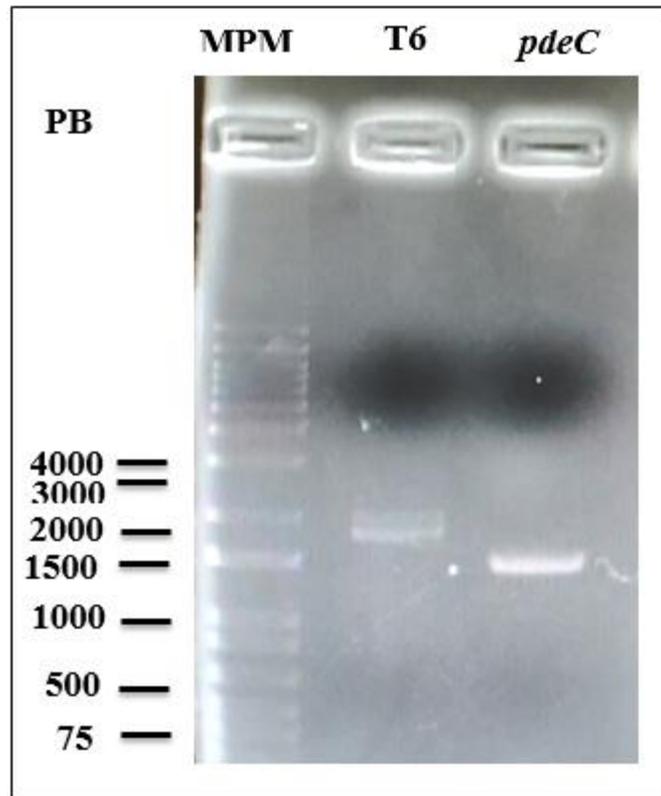
Confirmación de cepas recombinantes *dgclF1* y *dgclF2*.



Nota: Al analizar los tres productos de PCR se observó el tamaño esperado de fragmentos utilizando la siguiente combinación de oligos: Forward-Plásmido y Reverse-Gen para (F1) y (F2), el marcador de peso molecular (MPM), un control el plásmido (T6) vacío y un control negativo (CN)

Figura 8

Confirmación de la cepa recombinante *pdeC*



Nota: Al realizar las tres pruebas de PCR planteadas de acuerdo a la recombinación se obtuvo un tamaño esperado bandas utilizando la siguiente combinación de oligos: Forward-Plásmido y Reverse-Gen para *pdeC*, un control positivo T6 y un marcador de peso molecular (MPM).

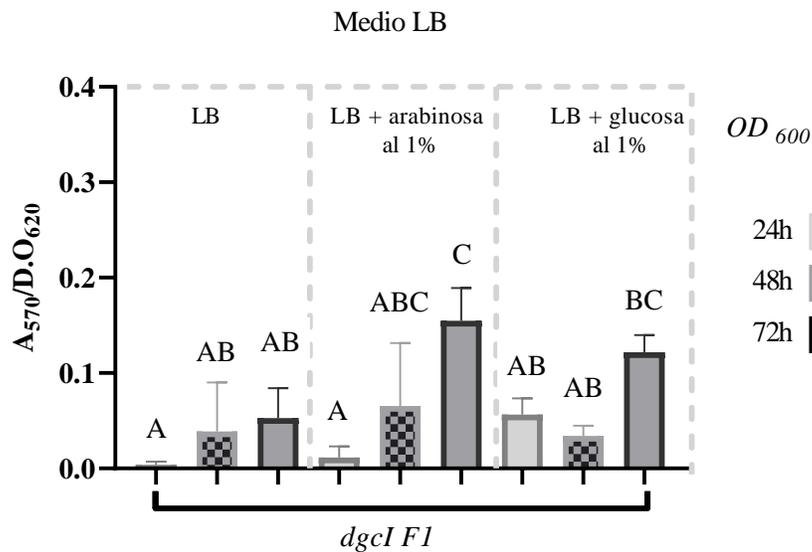
Se utilizó la técnica descrita por Barba *et al.*, (2006), para generar bacterias recombinantes en EPEC. Como parte inicial de la estrategia, se realizó un primer ensayo utilizando cebadores que reconocían la región total del marco de lectura del gen *dgcI*, pero al tener complicaciones en las primeras etapas de esta investigación para generar las cepas recombinantes con el gen *dgcI*, se procedió a analizar las secuencias señal y región transmembrana del gen, en donde se encuentran múltiples proteínas transmembrana que de acuerdo a lo propuesto por Píre & Mota, (2006) en esta región existen estructuras tóxicas para la célula huésped. Lo que podría estar interviniendo en la transformación de la célula y causaría apoptosis celular. (Arguello y Estephania, 2018). Por este motivo se diseñaron nuevos cebadores que excluyan las regiones antes mencionadas y de esta manera se logró obtener una bacteria recombinante que incluye parte de la región del marco de lectura del gen *dgcI*

4.2 Evaluación de la formación de biopelículas y la expresión de factores de virulencia en bacterias recombinantes de EPEC.

Para conocer si *dgcl F1* está implicada en la virulencia de EPEC se evaluó la formación de biopelícula en donde se determinó que existieron diferencias significativas en la formación de biopelícula entre la cepa recombinante *dgcl F1* en diferentes medios de cultivo y la cepa control con ($F=3.75$; $gl= 2, 22$; $p<0.03$). Se puede observar en la Figura 14 una mayor formación de biopelícula en medio LB + arabinosa a las 72h, con valores $0.16 A_{570}/DO_{620}$ correspondientes a unidades de formación de biopelícula.

Figura 9

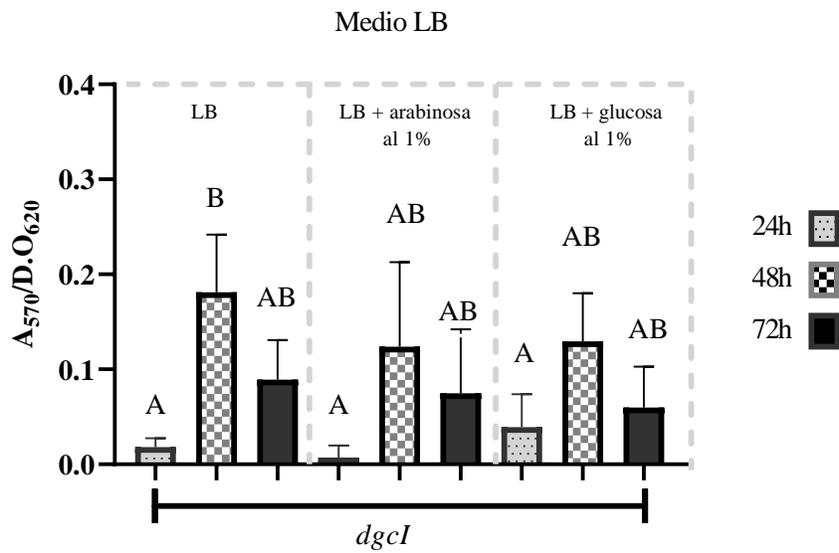
Formación de biopelícula de la cepa recombinante *dgcl F1* a T_m de $30^{\circ}C$



Para conocer si *dgcl F1* está implicada en la virulencia de EPEC se evaluó la formación de biopelícula en donde se determinó que existen diferencias significativas en la formación de biopelícula que produce la cepa recombinante *dgcl F1* en diferentes medios de cultivo con (F=14; gl= 2, 22; p<0.0001). Como se puede observar en la Figura 15 existe una mayor formación de biopelícula en medio LB a las 48h con un valor de 0.18 A_{570}/DO_{620} correspondientes a unidades de formación de biopelícula.

Figura 10

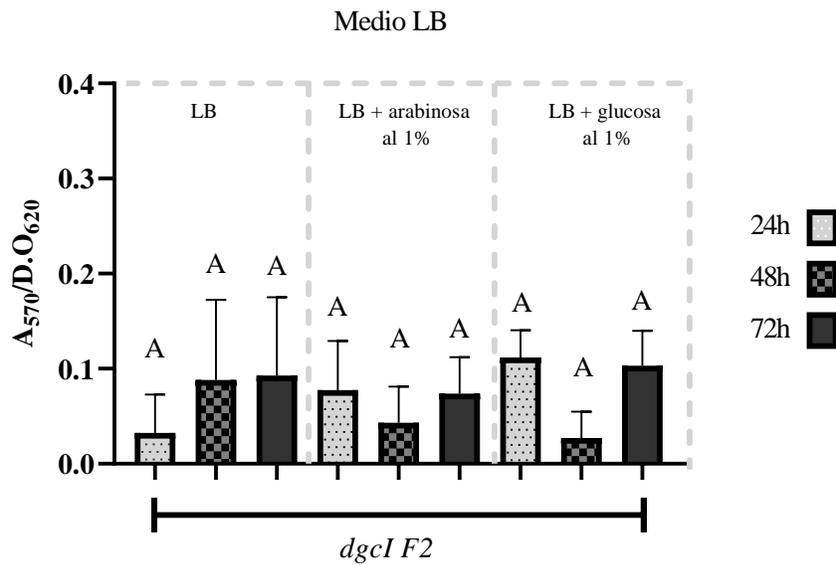
Formación de biopelícula con el gen Dgcl F1 a Tm de 37°C



Para conocer si *dgcl F2* está implicada en la virulencia de EPEC se evaluó la formación de biopelícula en donde se determinó con la prueba de Tukey que no existen diferencias significativas en la formación de biopelícula que produce la cepa recombinante *dgcl F2* en diferentes medios de cultivo con ($F=3.71$, $gl= 2, 22$, $p<0.04$). Como se puede observar en la Figura 16 existe formación de biopelícula similar en todos los medios.

Figura 11

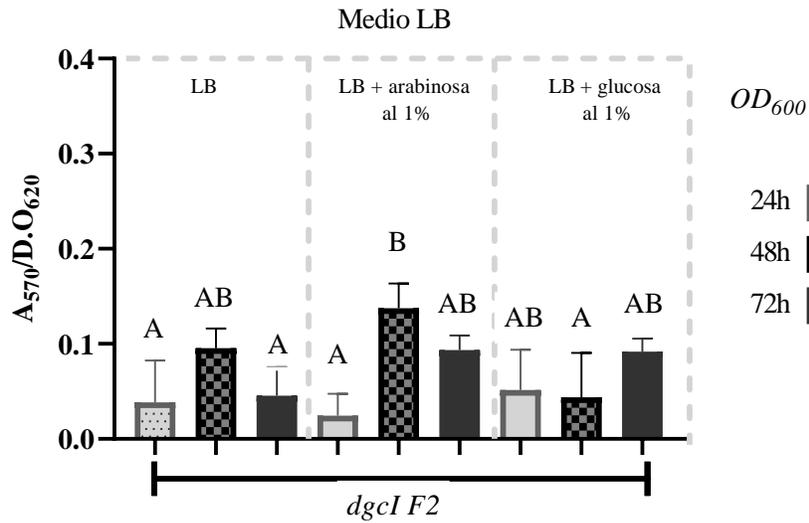
Formación de biopelícula con el gen Dgcl F2 a Tm de 30°C



Para conocer si *dgcI F2* está implicada en la virulencia de EPEC se evaluó la formación de biopelícula en donde se determinó que existen diferencias significativas en la formación de biopelícula que produce la cepa recombinante *dgcI F2* en diferentes medios de cultivo con ($F=4.6$, $gl= 2, 22$, $p<0.02$). Como se puede observar en la Figura 17 existe una mayor formación de biopelícula en medio Lb + arabinosa a las 48h con un valor de $0.14 A_{570}/DO_{620}$.

Figura 12

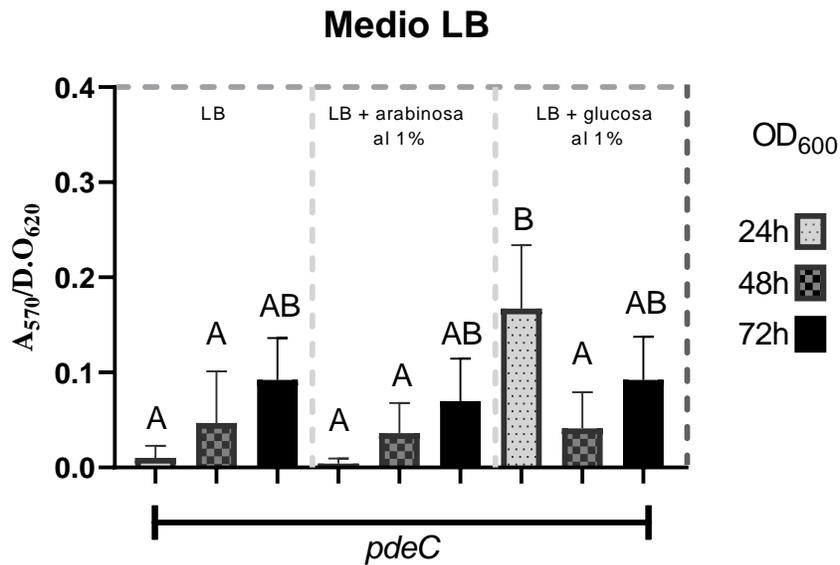
Formación de biopelícula con el gen DgcI F2 a Tm de 37°C



Para conocer si *pdeC* está implicada en la virulencia de EPEC se evaluó la formación de biopelícula en donde se determinó que existen diferencias significativas en la formación de biopelícula que produce la cepa recombinante *pdeC* en diferentes medios de cultivo con ($F=5.7$, $gl= 2, 18$, $p<0.01$). Como se puede observar en la Figura 18 existe una mayor formación de biopelícula en medio Lb + glucosa a las 24h con un valor de $0.17 A_{570}/DO_{620}$.

Figura 13

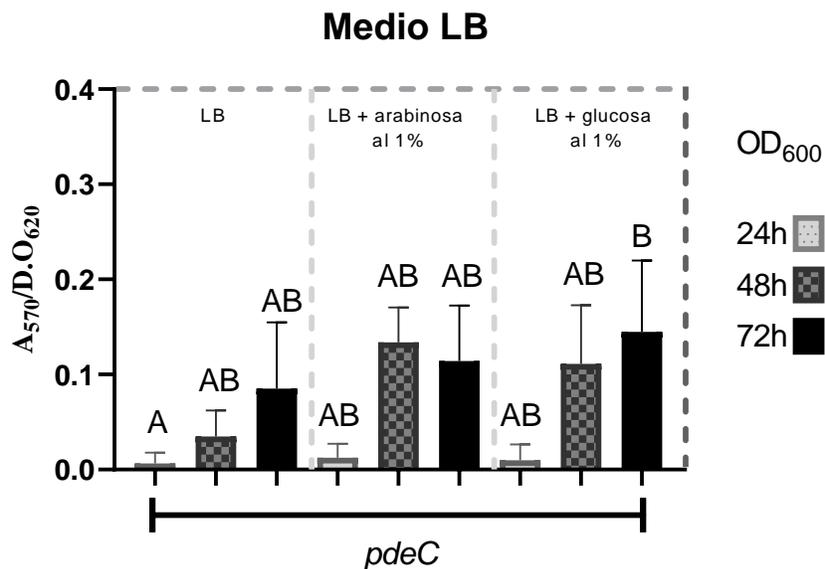
Formación de biopelícula con el gen PdeC a Tm de 30°C



Para conocer si *pdeC* está implicada en la virulencia de EPEC se evaluó la formación de biopelícula en donde se determinó que existen diferencias significativas en la formación de biopelícula que produce la cepa recombinante *pdeC* en diferentes medios de cultivo con (F12.26, $gl= 2, 18, p<0.0004$). Como se puede observar en la Figura 19 existe una mayor formación de biopelícula en medio Lb + glucosa a las 72h con un valor de $0.14 A_{570}/DO_{620}$.

Figura 14

Formación de biopelícula con el gen *PdeC* a Tm de 37°C



De acuerdo con el ensayo colorimétrico de CV (Stepanovic, et al., 2000) la inducción con el promotor de arabinosa en los genes bajo estudio aumenta la formación de biopelícula en EPEC. Este fenotipo se ha observado en *E. coli* K-12, además de regular la formación de biopelícula, reduce la motilidad de la bacteria (Sommerfeldt, 2009; Hengge, et al., 2016). Los niveles de biopelícula en EPEC con los genes bajo estudio comparado con *E. coli* K-12 son menores, debido a que la cepa no patógena expresa subunidades ABD (dominios citoplasmáticos de una histidina quinasa sensora) que son requeridas para la formación de biopelícula en *E. coli* K-12 (Oropeza, et al., 2015). Por este motivo no presenta el mismo fenotipo en EPEC, esto debido a que *E. coli* K-12 tiene 1Mb mas en su genoma (Reisner, et al., 2006)

Al usar medio LB las concentraciones nutritivas de este permiten un mayor índice de densidad celular, que el medio DMEM; por tal motivo, al hacer la relación con la cantidad de

cristal violeta absorbido por la biopelícula se obtienen valores bajos de UFB en el medio DMEM (Weiss, 2010). Usando la condición óptima para realizar los ensayos de biopelícula, de acuerdo con lo reportado, se sabe que una baja osmolaridad en un medio propicia una condición adecuada para la producción de componentes que integran la matriz extracelular de las biopelículas en *E. coli*, esto debido a que es un medio con baja cantidad de sales. Considerando que esta razón es detectada e interpretada por la bacteria como una señal de escases de nutrientes. Por este motivo la bacteria en lugar de seguir con una vida planctónica; deciden establecerse adheridas a una superficie como una estrategia para no tener desgaste de energía (Serra y Hengge, 2017).

De acuerdo con los datos reportados, al menos para las proteínas codificadas por los genes evaluados en esta investigación, su función no afecta la producción de biopelícula en el medio LB como se observa en las Figuras 4 - 9. Este mismo patrón se puede apreciar en las tres cepas con las mismas condiciones de estudio.

La formación de biopelícula en EPEC no se restringe a las condiciones en las que expresa factores de virulencia como propone Moreira (2006). Por lo que aún debe profundizar en la investigación sobre la formación de biopelículas en bacterias entéricas y patógenas.

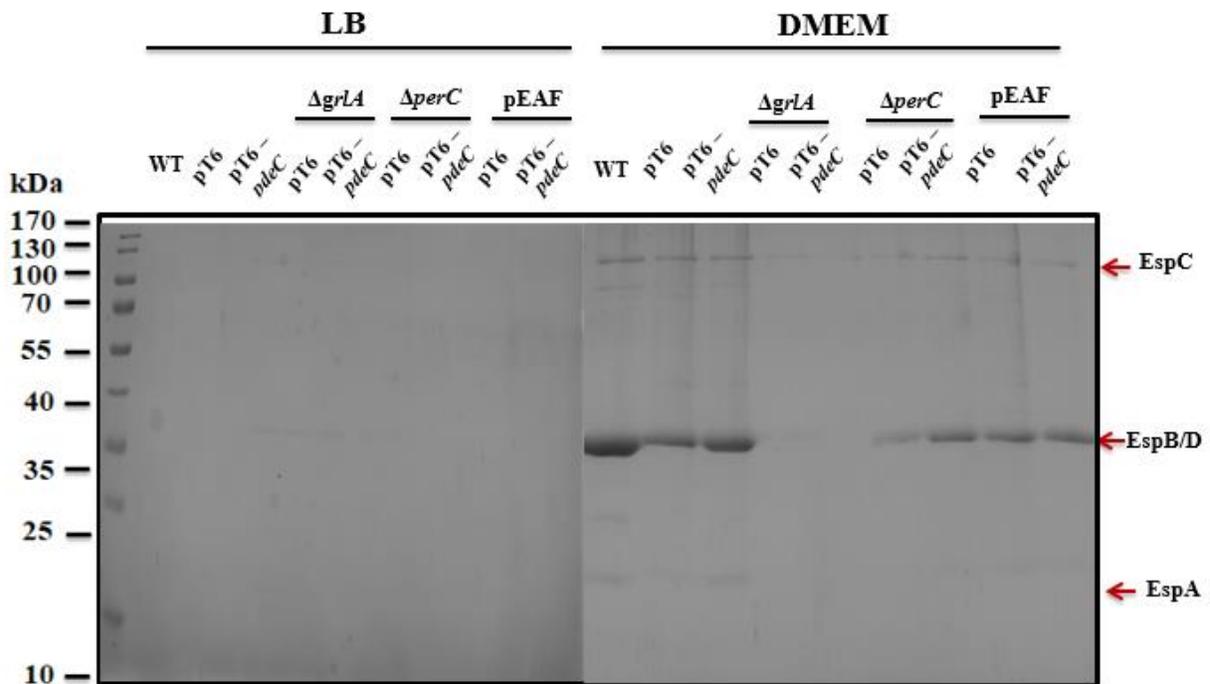
4.3 Perfil de proteínas secretadas por las cepas recombinantes

Para conocer si *pdeC* está involucrada en la virulencia de EPEC, como se puede observar en la Figura 20, se evaluó la secreción de las proteínas EspA, EspB y EspD involucradas en el desarrollo del inyectisoma codificado en la isla LEE de EPEC, observando como resultado que, cuando sobreexpresamos *pdeC*, hay una mayor producción de las proteínas EspB y EspD en la mutante $\Delta perC$.

No se esperaba observar secreción de proteínas en el medio LB, debido a que este reprime la expresión de factores de virulencia, al contrario que el medio DMEM que induce su expresión, brindando condiciones adecuadas para que se dé el ensamblaje del translocón que forma parte del inyectisoma. Se utilizó la cepa silvestre WT como un control positivo.

Figura 15

Perfil de proteínas secretadas con el gen pdeC

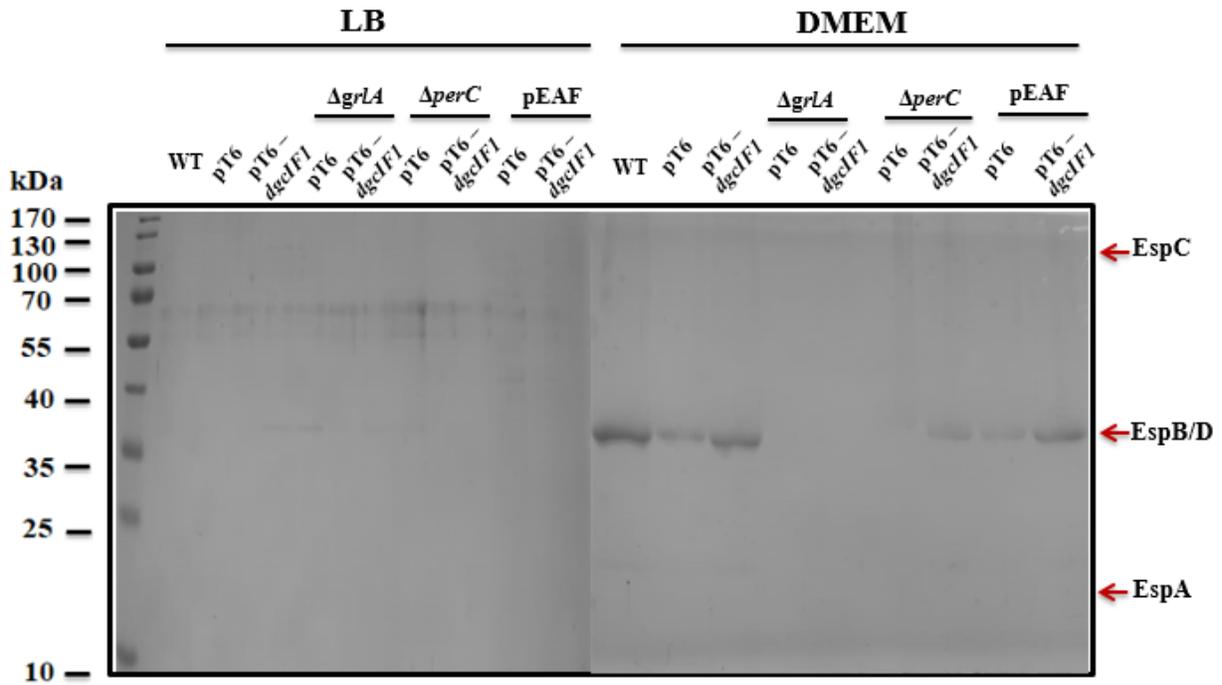


Nota. Perfil de proteínas secretadas en la cepa recombinante *pdeC* donde podemos observar que la sobre expresión de dicho gen aparentemente están interviniendo en la secreción de proteína en las mutantes de $\Delta perC$ y *pEAF*.

A través de análisis de perfil de proteínas secretadas, se determinó si *dgI F1* está involucrada en la virulencia de EPEC, se evaluó la secreción de las proteínas EspA, EspB y EspD en dos medios diferentes LB y DMEM, estas proteínas están involucradas con el inyectisoma codificado en la isla LEE de EPEC, observando como resultado que, cuando sobreexpresamos *dgI F1* (Figura 21) en el medio LB no existe una secreción de proteínas, al contrario que en el medio DMEM, además de haber una mayor producción de las proteínas EspB y EspD en la mutante *perC* y *pEAF*.

Figura 16

Perfil de proteínas secretadas con el gen dgI F1

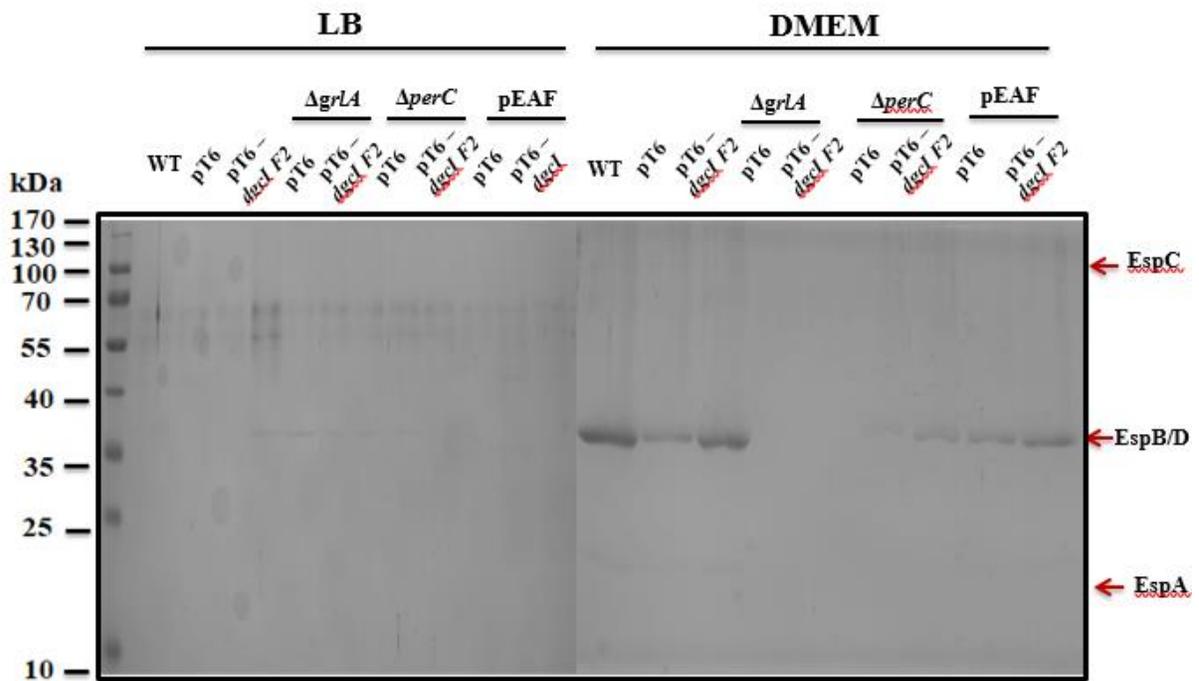


Nota. Perfil de proteínas secretadas en la cepa recombinante *dgI F1* donde podemos observar que la sobre expresión de dicho gen aparentemente están interviniendo en la secreción de proteína en las mutantes de $\Delta perC$ y *pEAF*

Para conocer si *dgcl F2* está involucrada en la virulencia de EPEC, como se puede observar en la Figura 22, se evaluó la secreción de las proteínas EspA, EspB y EspD involucradas en inyectisoma codificado en la isla LEE de EPEC, observando como resultado que, cuando sobreexpresamos *dgcl F2*, hay una mayor producción de las proteínas EspB y EspD en la mutante *perC* y *pEAF* involucrados en la activación de la proteína Ler.

Figura 17

Perfil de proteínas secretadas con el gen dgcl F2



Nota. Perfil de proteínas secretadas en la cepa recombinante *dgcl F2* donde podemos observar que la sobre expresión de dicho gen aparentemente están interviniendo en la secreción de proteína en las mutantes de Δ *perC* y *pEAF*

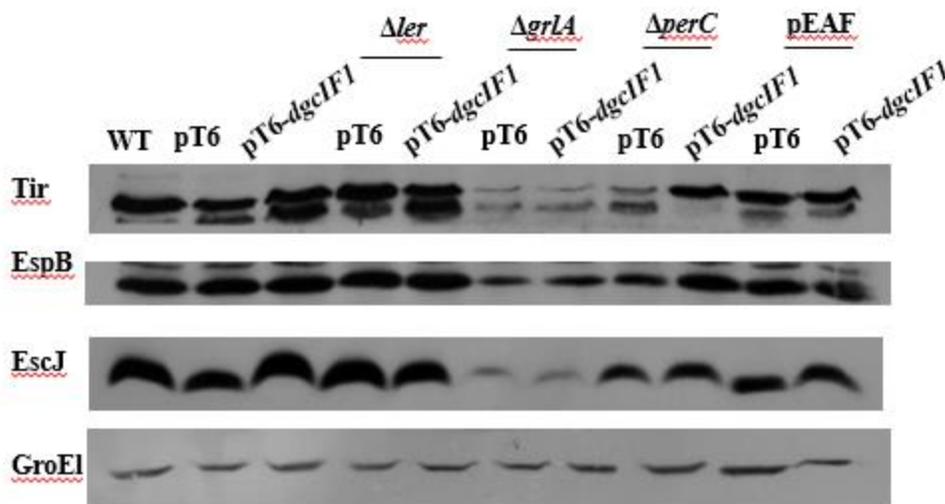
4.4 Western Blot con las cepas recombinantes

Utilizando esta técnica, se analizó las proteínas intracelulares de las cepas bajo estudio involucradas en la virulencia de EPEC, el mismo que nos ayudaría a comprobar si existe una variación en la producción de proteínas internas similar a lo que sucedió con las proteínas secretadas cuando se sobreexpresaron los genes codificados en la isla LEE.

Se buscó analizar la expresión de proteínas que participan en la adherencia íntima y el ensamblaje del inyectisoma: Tir, EscJ y EspB (Figura 25); para esto se utilizó anticuerpos específicos para cada proteína y como un control de carga se evaluó la presencia de la proteína GroEL. Se observó una alteración que incrementa la expresión de factores de virulencia en los fondos mutantes PerC y pEAF como se puede observar en las Figura 23, Figura 24 y Figura 25.

Figura 18

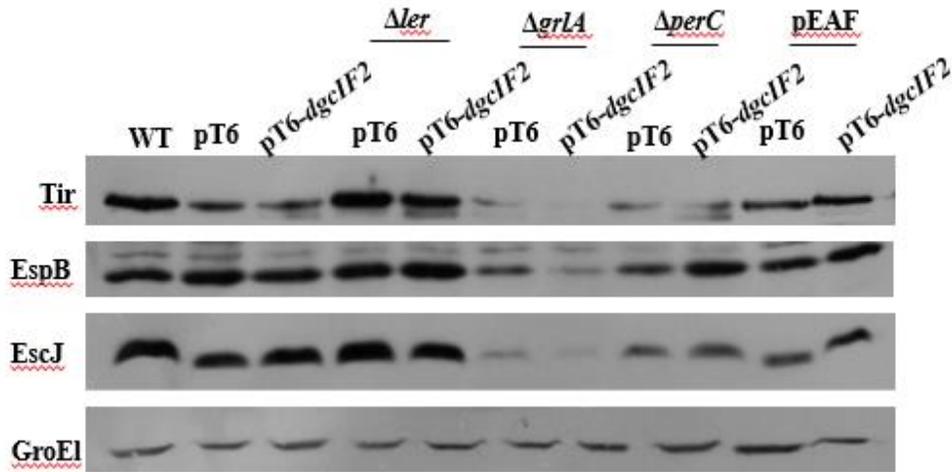
Western blot de *dgclF1* en medio DMEM



Nota. Western Blot de las proteínas Tir, EscJ y EspB junto al control GroEL. La sobre expresión del gen bajo estudio afectó la expresión de Tir, EscJ y EspB en presencia del medio DMEM. En los dos carriles $\Delta perC$ y pEAF se puede observar la expresión alterada en presencia de los genes bajo estudio.

Figura 19

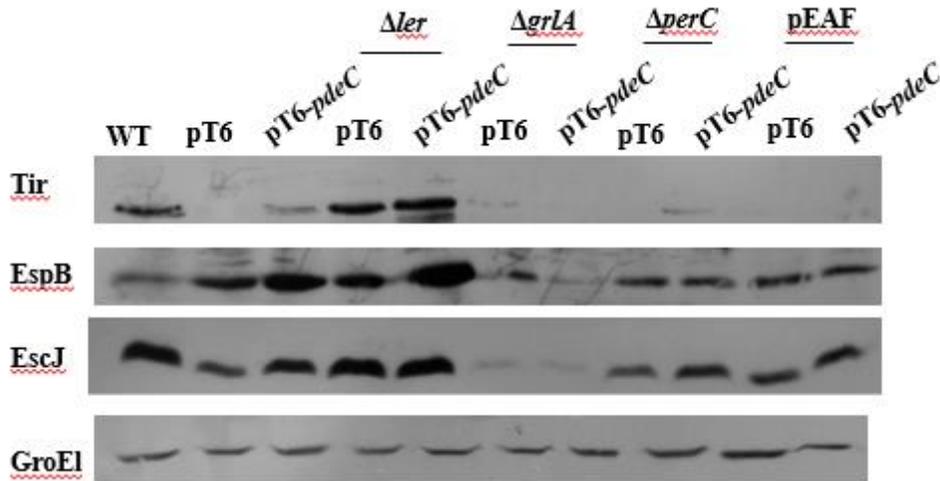
Western blot de *dgcl F2* en medio DMEM



Nota. Los dos carriles $\Delta perC$ y pEAF se observa la expresión alterada en presencia del gen *dgcl F1* bajo estudio.

Figura 20

Western blot de *pdeC* en medio DMEM



Nota. Los dos carriles $\Delta perC$ y pEAF indican la expresión alterada en presencia del gen *pdeC* bajo estudio.

El análisis de los resultados obtenidos en los ensayos del perfil de proteínas secretadas y Western Blot, en la sobreexpresión de los genes bajo estudio, es importante para entender cómo se da la expresión y secreción de los factores de virulencia en condiciones controladas de cultivo. En esta investigación, se realizó un análisis comparativo entre 3 genes y dos medios de cultivo diferentes para evaluar si existe alguna diferencia en la secreción o expresión de algunas proteínas que funcionan como factores de virulencia y que son reguladas por *ler*: EspA, EspB y EspD así como Tir y EscJ.

A través de este análisis se observó una expresión alterada en la secreción de proteínas evaluadas en medio DMEM al contrario de lo que sucedió en el medio LB, en las proteínas EspC, EspB y EspD que fueron identificadas. Este resultado sugiere que las proteínas codificadas en los genes sobreexpresados desempeñan una función importante en la respuesta bacteriana (Hazen et al., 2015)

De manera interesante, se puede apreciar que en la mutante *ler* en presencia del gen bajo estudio aumenta la cantidad de proteínas involucradas en los factores de virulencia; para corroborar este dato, se evaluó en las mismas condiciones las mutantes de *PerC* y *pEAF* obteniendo un resultado interesante, ya que en las dos mutantes se observaron la presencia de factores de virulencia, esto sugiere que la isla de patogenicidad LEE fue activada de alguna manera en presencia de *pT6-dgcIF1*, *pT6-dgcIF2* y *pT6-pdeC* (Bustamante, V. et al., 2011).

De acuerdo a los datos de Hazen *et al*, (2015) la sobreexpresión de estos genes daría lugar a la posibilidad de que afectara la expresión de los genes de la isla LEE, esto se reflejó en los resultados obtenidos en la presente investigación ya que los genes *dgcI F1*, *dgcI F2* y *pdeC*, afectan a proteínas reguladas en Δ *perC* y *pEAF*.

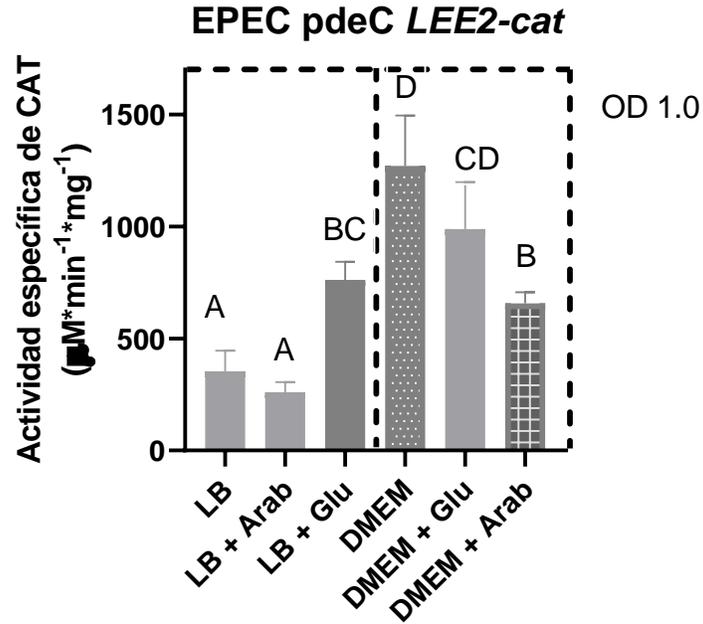
No se especifica cómo es esa alteración, en comparación al wt, aumenta, disminuye o cómo es esa alteración que mencionas.

4.5 Evaluación de las cepas mutantes de EPEC con fusión a CAT

Para conocer si el gen *pdeC* está involucrado con la virulencia de EPEC se realizaron fusiones reporteras al gen *cat*. Mediante la prueba de Tukey se determinó que *pdeC LEE2-cat* presenta una mayor actividad de proteína en el medio DMEM sin azúcar inductor con respecto a los demás medios ($F=56.6$ $gl= 5, 27$; $p<0.0001$). Con un valor de $1270.15 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ como se puede observar en la Figura 26.

Figura 21

Cuantificación de la actividad específica de *cat* correspondiente a la fusión LEE 2 en medio LB vs DMEM.

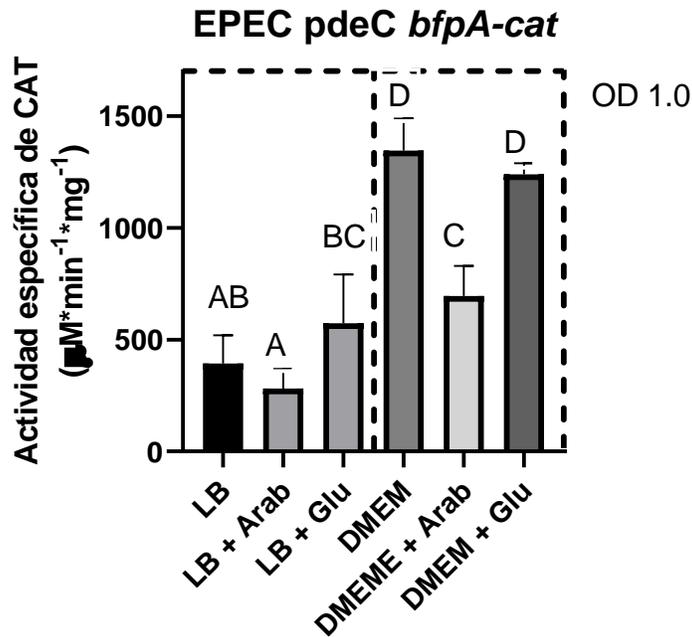


Nota: Las barras representan el error estándar y las letras, si son iguales no difieren significativamente y si son distintas indican que existe diferencias significativas entre cada medio.

Para conocer si el gen *pdeC* está involucrado con la virulencia de EPEC se realizaron fusiones reporteras al gen *cat*, mediante la prueba de Tukey se determinó que *pdeC bfpA-cat* presenta una mayor actividad de proteína en el medio DMEM sin azúcar inductor con respecto a los demás medios ($F=27.7$ $gl= 5, 24$; $p<0.0001$). Con un valor de $1345.4 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de acuerdo a la Figura 27.

Figura 22

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

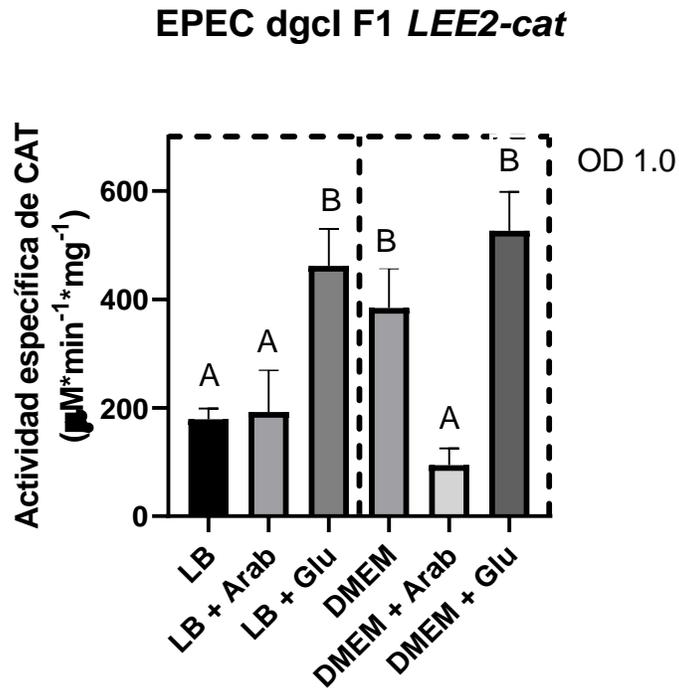


Nota: Las barras representan el error estándar y las letras, si son iguales no difieren significativamente y si son distintas indican que existe diferencias significativas entre cada medio.

Para conocer si el gen *dgcl F1* está involucrado con la virulencia de EPEC se realizaron fusiones reporteras al gen *cat*, mediante la prueba de Tukey se determinó que *dgcl F1 LEE2-cat* presenta una mayor actividad de proteína en el medio DMEM + glucosa con respecto a los demás medios ($F=29.6$ $gl= 5, 19$; $p<0.0001$). Con un valor de $526.7 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ como se puede observar en la Figura 28.

Figura 23

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

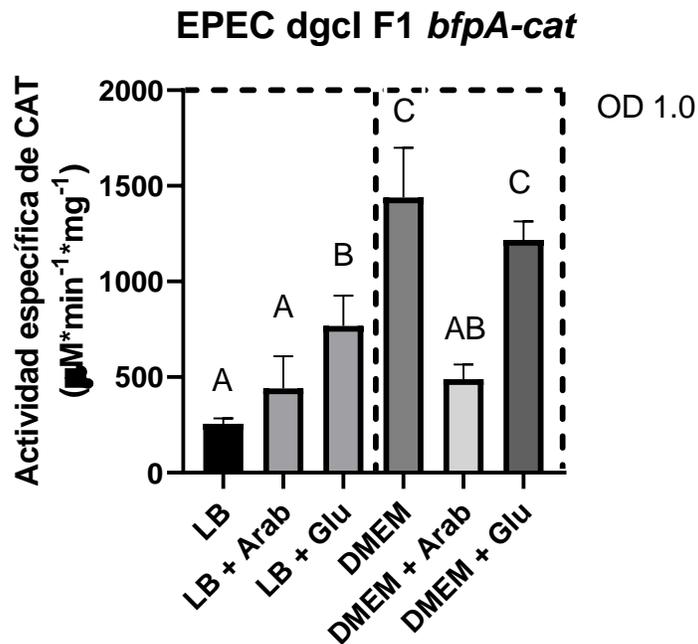


Nota: Las barras representan el error estándar y las letras, si son iguales no difieren significativamente y si son distintas indican que existe diferencias significativas entre cada medio.

Para conocer si el gen *dgcl F1* está involucrado con la virulencia de EPEC se realizaron fusiones reporteras al gen *cat*, mediante la prueba de Tukey se determinó que *dgcl F1 bfpA-cat* presenta una mayor actividad de proteína en el medio DMEM sin azúcar con respecto a los demás medios ($F=39$ $gl= 5, 21$; $p<0.0001$). Con un valor de $1440 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ como se visualiza en la Figura 29.

Figura 24

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

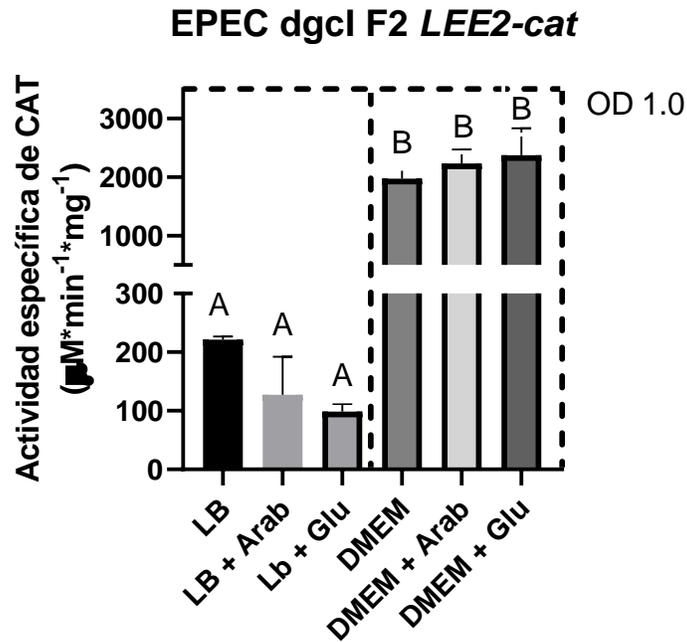


Nota: Las barras representan el error estándar y las letras, si son iguales no difieren significativamente y si son distintas indican que existe diferencias significativas entre cada medio.

Para conocer si el gen *dgcl F2* está involucrado con la virulencia de EPEC se realizaron fusiones reporteras al gen *cat*, mediante la prueba de Tukey se determinó que *dgcl F2 LEE2-cat* presenta una mayor proteína en el medio DMEM + glucosa con respecto a los demás medios ($F=234.9$ $gl= 5, 22$; $p<0.0001$). Con un valor de $2375.3 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}\cdot\text{mg}^{-1}$ de acuerdo a lo observado en la Figura 30.

Figura 25

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

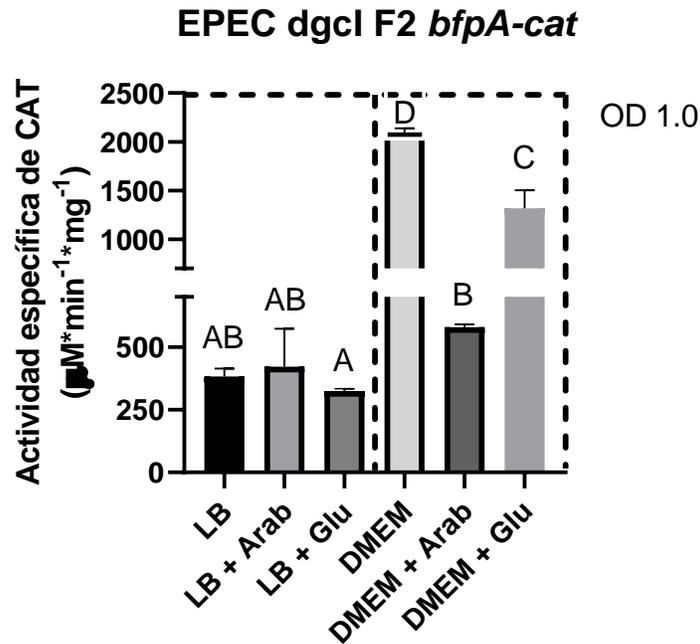


Nota: Las barras representan el error estándar y las letras, si son iguales no difieren significativamente y si son distintas indican que existe diferencias significativas entre cada medio.

Para conocer si el gen *dgcl F2* está involucrado con la virulencia de EPEC se realizaron fusiones reporteras al gen *cat*, mediante la prueba de Tukey se determinó que *dgcl F2 bfpA2-cat* presenta una mayor proteína en el medio medio DMEM sin azúcar con respecto a los demás medios ($F=160.4$ $gl= 5, 18$; $p<0.0001$). Con un valor de $2095.4 \mu\text{mol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}$ como se puede observar en la Figura 31.

Figura 26

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



Nota: Las barras representan el error estándar y las letras, si son iguales no difieren significativamente y si son distintas indican que existe diferencias significativas entre cada medio.

Esta investigación se realizó en base a metodologías planteadas para analizar la expresión de proteínas involucradas en la virulencia de EPEC, basados en que las PDEs y DGCs se expresa preferencialmente en medio DMEM y que beneficia la expresión de BFP, tenemos argumentos para suponer que DgcIF1, DgcIF2 y PdeC están involucrados en la variación de los factores de virulencia de EPEC.

Al existir un efecto que altera la expresión del promotor del LEE2 y el plásmido BFPA, aumenta la expresión de las proteínas involucradas en la virulencia de EPEC cuando se sobreexpresan los genes *dgcIF1*, *dgcIF2* y *pdeC* en la cepa EPEC E2348/69 en diferente medio LB y DMEM, en donde se espera observar mayor actividad específica de *cat* solo en el medio inductor DMEM, sin embargo, existieron casos en donde de acuerdo al análisis estadístico no existieron diferencias significativas entre las fusiones reporteras LEE2 y *bfpA* (Hanzen, et al., 2015).

En algunos casos es posible que se dé la transcripción, sin embargo, no siempre se traduce a proteína, lo que explicaría porque las fusiones reporteras LEE2 y *bfpA* no difieren significativamente. Por esta razón es importante conocer el fundamento de la actividad del gen reportero a *cat*, el cual menciona que es solo un ensayo de expresión génica y existen más interacciones entre proteínas que puede causar ruido en los resultados (Oropeza, et al., 2015).

De acuerdo a lo reportado por Contreras (2010), el operón LEE2 tiene el promotor más fuerte de la isla LEE, por lo que observamos en nuestra investigación una mayor actividad de *cat* en el medio DMEM, al ser estas fusiones transcripcionales implican que haya una mayor transcripción del gen cuando se encuentran involucrados los genes bajo estudio, el cual se puede verificar colectando ARN mensajero y cuantificándolo por q-RT-pcr en el transcrito de cada gen.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

Conclusiones

- Se generaron tres cepas recombinantes de EPEC E2348/69; que contienen dos variantes del gen *dgI F1*, *dgI F2*, (la variante *dgI F1* y *dgI F2* tienen excluida la región en donde se ubica la secuencial señal, además de excluir la región transmembrana del marco de lectura del gen en *dgI F2*) y el gen *pdeC*.
- Las cepas recombinantes *dgI F1*, *dgI F2* y *pdeC* de EPEC formaron biopelícula en el medio LB alcanzando una etapa de microcolonia. Por el contrario, en el medio DMEM, esta no se formó.
- La expresión individual de las proteínas DgcI y PdeC ocasiona una variación en la secreción de proteínas en el fenotipo de virulencia, las cuales fueron evaluadas a través de la transcripción del operón LEE2 y *bfpA*, la traducción y secreción de algunas de las proteínas codificadas en la isla LEE de EPEC E2348/69.
- Las condiciones óptimas para sobreexpresar las cepas recombinantes de EPEC son en medio de cultivo DMEM, en donde se observó una mayor actividad de la fusión reportera de *lee2* y *bfpA*, con efecto incrementado en la expresión génica en presencia de los genes *dgI* y *pdeC* por lo que se concluye que los genes bajo estudio están involucrados en la virulencia de EPEC.
- Se propone que la función de DgcI y PdeC en la expresión de factores de virulencia y formación de biopelícula, es por su efecto sobre la concentración del c-di-gmp cíclico.

Recomendaciones

- Realizar las construcciones de las cepas recombinantes por un método distinto que nos permita sobreexpresar el gen completo sin recortar regiones del marco de lectura, como el método de vector suicida, para de esta manera poder observar si existen algún fenotipo diferente al obtenido en esta investigación.
- Investigar las regiones reguladoras del gen *dgcI* de EPEC que podrían estar interviniendo en su expresión
- Realizar ensayos de biopelícula variando condiciones de crecimiento como temperatura, medio de cultivo, concentración del carbohidrato inductor y cambiando el ensayo a una superficie abiótica con flujo continuo.
- Diseñar y construir un biosensor de di-GMP cíclico que nos permita conocer las diferentes concentraciones de este segundo mensajero los diferentes fenotipos., para relacionarlo con la sobreexpresión en DGCs y PDEs.
- Replicar los estudios con fusiones reporteras a CAT en diferentes genes de diguanilato ciclasas y fosfodiesterasa de EPEC, para generar un modelo global que nos permita conocer que papel desempeñan en el contexto de la patogenicidad de EPEC.

REFERENCIAS

- Argüello, Z., & Estephania, L. (2018). Hacia el análisis de la dinámica de expresión de los diferentes sistemas de secreción de *Escherichia coli* enterohemorrágica durante la infección de células epiteliales.
- Barba, J., Bustamante, V., Flores-Valdez, M., Deng, W., Finlay, B. & Puente, J. 2005. *A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA*. J Bacteriol. 87: 7918-7930.
- Brenner J, Krieg R, Stley T. (2009) *Bergey's manual of systematic bacteriology*. (2 da Ed. Vol.3). New York, EUA: Springer.
- Cabañas-Romero, P. V. y Huerta-Saquero, A. (2014). Nanomáquinas biológicas: los sistemas de secreción bacterianos. *Mundo nano*, 7(13) 28-36.
- Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. & Jenal, U. (2005). *Identification and characterization of a cyclic di-GMP specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP*. J Biol Chem 280: 30829–30837.
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N. and Frankel, G. (2012). *Infection strategies of enteric pathogenic Escherichia coli*. *Gut microbes*, 3(2) 71-87. doi: 10.4161/gmci.19182
- Coburn, B., Sekirov, I. & Brett Finlay, B. (2007). *Type III Secretion Systems and Disease*. Clin Microbiol Rev, 20(4): 535-549.
- Contreras Garcia, C. A. (2010). Asociación de variabilidad genética y fenotípica de *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC) con cuadros de diarrea en niños menores de un año.
- Costerton, J., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. (1994). *Biofilms the customized microniche*. J Bacteriol 176: 2173-2242.
- Croxen, M., Law, R., Scholz, R., Keeney, K., Wlodarska, M. & Finlay, B. (2013). *Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli*. Clin. Microbiol. Rev. Canadá 4:822-879.

- Ettinger, M. (2009). *Dr. Ettinger's Biofilm Protocol for Lyme and Gut Pathogens*. Consultado el: 16 de Octubre de 2017, en: <http://www.advancedhealing.com/biofilm-protocol-for-lyme-and-gut-pathogens/>
- Danese P., Pratt L. & Kolter, R. (2000). *Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture*. J Bacteriol, 182:3593–3596
- Deborah, H. & Frankel, G. (2005). Enteropathogenic *Escherichia coli*: unravelling pathogenesis. Microbiol. Rev. 29:83-98.
- Deng, W., et al. (2005). Regulation of Type III Secretion Hierarchy of Translocators and Effectors in Attaching and Effacing Bacterial Pathogens. Infection and Immunity. 73(4):2135-2146.
- Gaytán, M. O., Martínez-Santos, V. I., Soto, E. and González-Pedrajo, B. (2016). *Type three secretion system in attaching and effacing pathogens*. Frontiers in cellular and infection microbiology, 6(129) 1-25. doi: 10.3389/fcimb.2016.00129.
- Grant, S.R., Fisher, E.J., Chang, J.H., Mole, B.M., and Dangl, J.L. (2006). *Subterfuge and manipulation: type III effector proteins of phytopathogenic bacteria*. Annu Rev Microbiol 60: 425-449
- Elliott, S., Sperandio, V., Giron, J., Shin, S., Mellies, J., Wainwright, L., Hutcheson, S., McDaniel, T. & Kaper, J. (2000). *The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic Escherichia coli*. Infect Immun. 68: 6115-6126.
- Flemming H., Wingender J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. & Kjelleberg, S. (2016). *Biofilms: an emergent form of bacterial life*. Nat Rev Micro 114: 563-575.
- Goller, C. & Romeo, T. (2008). *Environmental influences on biofilm development*. In: *Bacterial biofilms*. Romeo T, Ed. Curr Top Microbiol Immun :37-66
- Gupta, P., Sarkar, S., Das., B., Bhattacharjee, S. & Tribedi, P. 2016. *Biofilm, pathogenesis and prevention- a journey to break the Wall: a review*. Arch of Microbiol, 198: 1-15.
- Hazen, T. H., Daugherty, S. C., Shetty, A., Mahurkar, A. A., White, O., Kaper, J. B., & 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 cyclic-di-GMP signaling*. *Nat Rev Microbiol* 7: 263-273.
- Hengge, R., Galperin, M., Ghigo, J-M., 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
- Hueck C. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433-
- Jacobsen, S., Stickler, D., Mobley, H. & Shirliff, M. (2008). *Complicated catheter associated urinary tract infections due to Escherichia coli and Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*, 21: 26-58.
- Iguchi, A., Thomson, N., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M., Thuston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J. & Frankel, G. (2009). *Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic Escherichia coli O127:H6 Strain E2348/69*. *J Bacteriol*, 191(1): 347-354
- Jenal, U., Reinders, A. & Lori, C. (2017). *Cyclic di-GMP: second Messenger extraordinare*. *Nat Rev Microbiol* 15.
- Kaper, J., Nataro, J. & Mobley, H. (2004). *Pathogenic Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123-140.
- Lara-Ochoa, C., Oropeza, R., & Huerta-Saquero, A. (2010). *Regulation of the LEE-pathogenicity island in attaching and effacing bacteria*. *Current Research, Technology and Education Topics in Applied Microbiology and Microbial Biotechnology*. Badajoz: Formatex Research Center, 635-645.
- Larzabal, M. (2010). *Identificación de péptidos bloqueantes del sistema de secreción de tipo III y de la adherencia a epitelios de Escherichia coli enterohemorrágico (EHEC) y Escherichia coli enteropatógeno*. Universidad de Buenos Aires, Argentina.

- Luckjancenko, O., Wassenaar, T. & Ussery, D. (2010). *Comparison of 61 Sequenced Escherichia coli genomes*. *Microb Ecol.* 60(4): 708-720.
- Madigan, M. T., Martinko, J. M. y Parker, J. (2004). *Brock biología de los microorganismos* (10^a ed.). Madrid, España: Pearson educación.
- Matthew A. Croxen, RJL, Roland Scholz. (2013). *Recent Advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli*. *Clinical Microbiology Reviews* 26(4):822-880.
- McDaniel, T. K., Jarvis, K. G. Donnenberg, M. S. y Kapre, J. B. (1995). *A genetic locus of enterocyte effacement conserved among diverse enterobacterial pathogens*. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 1664-1668.
- Moreira, C., Palmer, K., Whiteley, M., Sircili, M., Trabulsi, L., Castro, A. & Sperandio, V. (2006). *Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic Escherichia coli*. *J Bacteriol*, 188:3952–3961.
- Nascimento, H., Silva, L., Souza, R., Silva, N. & Scaletsky, I. (2014). *Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic Escherichia coli (aEPEC) strains*. *BMC Microbiology* 14: 184-190.
- Navarre, W., McClelland, M., Libby, S. & Fang, F. (2007). *Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA*. *Genes Dev.* 21: 1456u-1471.
- Nataro, J. & Kapper, J. 1998. *Diarrheagenic Escherichia coli*. *Clin Microbiol*, 11(1): 142-201.
- Ochoa, T. J. and Contreras, C. A. (2011). *Enteropathogenic Escherichia coli infection in children. Current opinion in infectious diseases*, 24, 478-483. doi: 10.1097/QCO.0b013e32834a8b8b.
- Organización Mundial de la Salud. (2015). Informe niños menores de 5 años presentan un tercio de las muertes por enfermedades de transmisión alimentaria. Recuperado de: <https://n9.cl/ls8b>

- Oropeza, R., Salgado-Bravo, R. & Calva, E. (2015). Deletion analysis of RcsC reveals a novel signaling pathway controlling Poly-N-acetylglucosamine synthesis and biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 161 (Pt_4), 903-913.
- Padavannil, A., Jobichen, C., Mills, E., Velazquez-Campoy A., Li, M., Leung, Y., Mok, K., Rosenshine, I. & Sivaraman, J. (2013). *Structure of GrlR-GrlA complex that prevents GrlA activation of virulence genes*. *Nat Com* 4: 2546.
- Pearson, J. S., Giogha, T. W. F. L. and Hartland, E. L. (2016). *The genetics of enteropathogenic Escherichia coli virulence*. *Annual reviews genetic*, 50, 493-513. doi: 10.1146/annurev-genet-120215-035138.
- Pérez, M., & Mota, M. (2006). *Morfología y estructura bacteriana. Temas de bacteriología y virología médica*, 23-42.
- Pringent-Combaret, C., Prensier, G., Thi T., Vidal, O., Lejeune, P. & Dorel, C. (2000). *Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing Escherichia coli strains: role of flagella, curli and colonic acid*. *Environ Microbiol*, 2:450–464.
- Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I., Núñez-Reza, K., Xiqui-Vázquez, M & Baca, B. 2014. *Networks involving quorum sensing, cyclic-di-GMP and nitric oxide on biofilm production in bacteria*. *Rev Argen de Microbio*, 46(3): 242-255.
- Reisner, A., Krogfelt, K., Klein, B., Zechner, E. & Molin S. (2006). *In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic Escherichia coli Strains: Impact of Environmental and Genetic Factors*. *J. Bacteriol*, 188(10): 3572-3581.
- Rodriguez, A. (2002). *Principales características y diagnostic de los grupos patógenos de Escherichia coli*. *México Salud Publica*, 44, 464-475
- Ruchaud-Sparagano MH, Mühlen S, Dean P, Kenny B (2011) El efector Tir de E. coli enteropatógeno (EPEC) inhibe la actividad de NF-κB dirigiéndose a factores asociados al receptor de TNFα. PLoS Pathog 7 (12): e1002414. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1002414>.**

- Scaletsky, I., Silva, M. & Trabulsi, L. 1984. *Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic Escherichia coli to HeLa cells*. Infect Immun, 45:534–536.
- Vila, J., Soriano, A. & Mensa, J. (2008). *Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos*. Enferm Infecc Microbiol Clin. 26: 48-55.
- Vroom, J., De Grauw, K., Gerritsen, H., et al. (1999). *Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two photon excitation microscopy*. Appl Environ Microbiol 65: 3502-3511.
- Weiss-Muzkat, M., Shakh, D., Zhou, Y., Pinto, P., Belausov, E., Chapman, M. & Sela, S. (2010). *Biofilm formation and multicellular behavior in Escherichia coli O55:H7, an atypical enteropathogenic strain*. Appl Environ Microbiol, 76:1545–1554.
- Whittam, T. & McGraw, E. 1996. *Clonal Analysis of EPEC Serogroups*. Rev Microbiol.Sao Pablo. 27(1): 7-16.

ANEXOS

Anexo 1 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *dgcl F1* a temperatura 30°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.06	8	0.01	60.62	0.0004
Tiempo (h)	0.04	2	0.02	16.16	0.0001
Medio	0.01	2	0.01	4.91	0.0199
Tiempo * Medio	0.01	4	3.0E-03	2.71	0.0633
Error	0.02	18	1.1E-03		
Total	0.08	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.09	0.02	0.03	1	0.03	30	<0.0001
Contraste 2	0.04	0.03	2.6E-03	1	2.6E-03	2.31	0.1458
Total			0.04	2	0.02	16.16	0.0001

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB	3.8E-03	3	0.02	A
24	LB+ Arab	0.01	3	0.02	A
48	LB + Glu	0.03	3	0.02	A B
48	LB	0.04	3	0.02	A B
72	LB	0.05	3	0.02	A B
24	LB + Glu	0.06	3	0.02	A B
48	LB+ Arab	0.07	3	0.02	A B C
72	LB + Glu	0.12	3	0.02	B C
72	LB+ Arab	0.15	3	0.02	C

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 2 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *dgcl F1* a temperatura 37°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.08	8	0.01	3.68	0.0104
Tiempo (h)	0.07	2	0.03	13.04	0.0003
Medio	3.7E-03	2	1.8E-03	0.69	0.5140
Tiempo * Medio	0.01	4	1.3E-03	0.49	0.7431
Error	0.05	18	2.6E-03		
Total	0.13	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.05	0.02	0.01	1	0.01	4.78	0.0422
Contraste 2	-0.19	0.04	0.06	1	0.06	21.29	0.0002
Total			0.07	2	0.03	13.04	0.0003

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB+ Arab	0.01	3	0.03	A
24	LB	0.02	3	0.03	A
24	LB + Glu	0.04	3	0.03	A B
72	LB + Glu	0.06	3	0.03	A B
72	LB+ Arab	0.07	3	0.03	A B
72	LB	0.09	3	0.03	A B
48	LB+ Arab	0.12	3	0.03	A B
48	LB + Glu	0.13	3	0.03	B
48	LB	0.18	3	0.03	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 3 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *dgcl F2* a temperatura 30°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	8	2.9E-03	1.08	0.4198
Tiempo (h)	1.2E-03	2	5.8E-03	0.22	0.8078
Medio	0.01	2	3.1E-03	1.17	0.3332
Tiempo * Medio	0.02	4	3.9E-03	1.47	0.2540
Error	0.05	18	2.7E-03		
Total	0.07	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.02	0.02	1.2E-03	1	1.2E-03	0.43	0.5187
Contraste 2	0.06	0.04	0.01	1	0.01	1.90	0.1844
Total			0.01	2	3.1E-03	1.17	0.3332

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
48	LB + Glu	0.03	3	0.03	A
24	LB	0.03	3	0.03	A
48	LB+ Arab	0.04	3	0.03	A
72	LB+ Arab	0.07	3	0.03	A
24	LB+ Arab	0.08	3	0.03	A
48	LB	0.09	3	0.03	A
72	LB	0.09	3	0.03	A
72	LB + Glu	0.10	3	0.03	A
24	LB + Glu	0.11	3	0.03	A

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 4 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *dgcl F2* a temperatura 37°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.03	8	4.1E-03	4.17	0.0056
Tiempo (h)	3.5E-03	2	1.7E-03	1.78	0.1965
Medio	0.01	2	0.01	7.12	0.0053
Tiempo * Medio	0.02	4	3.8E-03	3.90	0.0189
Error	0.02	18	9.8E-04		
Total	0.05	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
	Contraste 1	0.04	0.01	1	0.01	6.88	0.0172
	Contraste 2	-0.07	0.03	1	0.01	7.35	0.0143
	Total		0.01	2	0.01	7.12	0.0053

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB + Arab	0.02	3	0.02	A
24	LB	0.04	3	0.02	A
48	LB + Glu	0.04	3	0.02	A
72	LB	0.05	3	0.02	A
24	LB + Glu	0.05	3	0.02	A B
72	LB + Glu	0.09	3	0.02	A B
72	LB + Arab	0.09	3	0.02	A B
48	LB	0.10	3	0.02	A B
48	LB + Arab	0.14	3	0.02	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 5 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *pdeC* a temperatura 30°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.06	8	0.01	4.30	0.0049
Tiempo (h)	0.02	2	0.01	5.71	0.0120
Medio	0.01	2	4.2E-03	2.40	0.1194
Tiempo * Medio	0.03	4	0.01	4.55	0.0103
Error	0.03	18	1.8E-03		
Total	0.09	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.02	0.02	2.6E-03	1	2.6E-03	1.49	0.2380
Contraste 2	0.06	0.03	0.01	1	0.01	3.31	0.0857
Total			0.01	2	4.2E-03	2.40	0.1194

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB + Arab	4.3E-03	3	0.02	A
24	LB	0.01	3	0.02	A
48	LB + Arab	0.04	3	0.02	A
48	LB + Glu	0.04	3	0.02	A
48	LB	0.05	3	0.02	A
72	LB + Arab	0.07	3	0.02	A B
72	LB	0.09	3	0.02	A B
72	LB + Glu	0.09	3	0.02	A B
24	LB + Glu	0.17	3	0.02	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 6 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *pdeC* a temperatura 37°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.08	8	0.01	4.25	0.051
Tiempo (h)	0.01	2	0.01	2.74	0.0912
Medio	0.06	2	0.03	12.26	0.0004
Tiempo * Medio	0.01	4	2.3E-03	1.00	0.4320
Error	0.04	18	2.3E-03		
Total	0.12	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.11	0.02	0.05	1	0.05	21.94	0.0002
Contraste 2	-0.6	0.04	0.01	1	0.01	2.58	0.1259
Total			0.06	2	0.03	12.26	0.0004

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB	0.01	3	0.03	A
24	LB + Glu	0.01	3	0.03	A B
24	LB + Arab	0.01	3	0.03	A B
48	LB	0.03	3	0.03	A B
72	LB	0.09	3	0.03	A B
48	LB + Glu	0.11	3	0.03	A B
72	LB + Arab	0.11	3	0.03	A B
48	LB + Arab	0.13	3	0.03	A B
72	LB + Glu	0.14	3	0.03	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 7 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *pdeC LEE2-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1628.85	5	325.77	56.66	<0.0001
Sustrato	1628.85	5	325.77	56.66	<0.0001
Error	155.24	27	5.75		
Total	1784.10	32			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB + Arab	16.06	6	0.98	A
LB	18.69	6	0.98	A
DMEM+ Arab	25.70	6	0.98	B
LB + Glu	27.58	6	0.98	B C
DMEM+ Glu	31.28	6	0.98	C D
DMEM	35.52	6	0.98	D

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 8 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *pdeC bfpA-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	76085.60	5	15217012	12.12	<0.0001
Sustrato	76085.60	5	15217.12	12.12	<0.0001
Error	22604.92	18	1255.83		
Total	98690.51	23			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB + Glu	325.16	3	59.38	A
LB	382.29	6	41.99	A B
LB+ Arab	422.18	6	41.99	A B
DMEM+ Arab	578.95	3	59.38	B
DMEM+ Glu	1317.73	3	59.38	C
DMEM	2095.41	3	59.38	D

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 9 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *dgcIF1 LEE2-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	586197.97	5	117239.59	29.62	<0.0001
Sustrato	586197.97	5	117239.59	29.62	<0.0001
Error	75192.07	19	3957.48		
Total	661390.05	24			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
DMEM+ Arab	94.44	5	28.13	A
LB	178.83	3	36.32	A
LB + Arab	192.26	5	28.13	A
DMEM	384.24	6	25.68	B
LB+ Glu	462	3	36.32	B
DMEM + Glu	526.72	3	36.32	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 10 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *dgcI F1 bfpA-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1635.90	5	327.18	39.02	<0.0001
Sustrato	1635.90	5	327.18	39.02	<0.0001
Error	176.10	21	8.39		
Total	1812.01	26			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB	15.92	3	1.67	A
LB + Arab	20.98	6	1.18	A
DMEM+ Arab	22.08	6	1.18	A B
LB + Glu	27.60	3	1.67	B
DMEM+ Glu	34.88	3	1.67	C
DMEM	37.82	6	1.18	C

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 11 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *dgcIF2 LEE2-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32.66	5	6.53	6.29	0.0009
Sustrato	32.66	5	6.53	6.29	0.0009
Error	22.86	22	1.04		
Total	55.52	27			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB+ Glu	9.93	3	1.54	A
LB + Arab	10.96	6	1.09	A
LB	14.87	3	1.54	A
DMEM	44.40	6	1.09	B
DMEM + Arab	47.19	6	1.09	B
DMEM + Glu	48.57	4	1.34	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 12 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *dgcl F2 bfpA-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	76085.60	5	15217.12	12.12	<0.0001
Sustrato	76085.60	5	15217.12	12.12	<0.0001
Error	22604.92	18	1255.83		
Total	98690.51	23			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB + Glu	325.16	3	59.38	A
LB	382.29	6	41.99	A B
LB + Arab	422.18	6	41.99	A B
DMEM+ Arab	578.95	3	59.38	B
DMEM+ Glu	1317.73	3	59.38	C
DMEM	2095.41	3	59.38	D

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 1 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *dgcl F1* a temperatura 30°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.06	8	0.01	60.62	0.0004
Tiempo (h)	0.04	2	0.02	16.16	0.0001
Medio	0.01	2	0.01	4.91	0.0199
Tiempo * Medio	0.01	4	3.0E-03	2.71	0.0633
Error	0.02	18	1.1E-03		
Total	0.08	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.09	0.02	0.03	1	0.03	30	<0.0001
Contraste 2	0.04	0.03	2.6E-03	1	2.6E-03	2.31	0.1458
Total			0.04	2	0.02	16.16	0.0001

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB	3.8E-03	3	0.02	A
24	LB+ Arab	0.01	3	0.02	A

48	LB + Glu	0.03	3	0.02	A B
48	LB	0.04	3	0.02	A B
72	LB	0.05	3	0.02	A B
24	LB + Glu	0.06	3	0.02	A B
48	LB+ Arab	0.07	3	0.02	A B C
72	LB + Glu	0.12	3	0.02	B C
72	LB+ Arab	0.15	3	0.02	C

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 2 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *dgcl F1* a temperatura 37°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.08	8	0.01	3.68	0.0104
Tiempo (h)	0.07	2	0.03	13.04	0.0003
Medio	3.7E-03	2	1.8E-03	0.69	0.5140
Tiempo * Medio	0.01	4	1.3E-03	0.49	0.7431
Error	0.05	18	2.6E-03		
Total	0.13	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.05	0.02	0.01	1	0.01	4.78	0.0422
Contraste 2	-0.19	0.04	0.06	1	0.06	21.29	0.0002
Total			0.07	2	0.03	13.04	0.0003

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB+ Arab	0.01	3	0.03	A
24	LB	0.02	3	0.03	A
24	LB + Glu	0.04	3	0.03	A B
72	LB + Glu	0.06	3	0.03	A B
72	LB+ Arab	0.07	3	0.03	A B
72	LB	0.09	3	0.03	A B
48	LB+ Arab	0.12	3	0.03	A B
48	LB + Glu	0.13	3	0.03	B
48	LB	0.18	3	0.03	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 3 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *dgcl F2* a temperatura 30°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.02	8	2.9E-03	1.08	0.4198

Tiempo (h)	1.2E-03	2	5.8E-03	0.22	0.8078
Medio	0.01	2	3.1E-03	1.17	0.3332
Tiempo * Medio	0.02	4	3.9E-03	1.47	0.2540
Error	0.05	18	2.7E-03		
Total	0.07	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.02	0.02	1.2E-03	1	1.2E-03	0.43	0.5187
Contraste 2	0.06	0.04	0.01	1	0.01	1.90	0.1844
Total			0.01	2	3.1E-03	1.17	0.3332

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
48	LB + Glu	0.03	3	0.03	A
24	LB	0.03	3	0.03	A
48	LB+ Arab	0.04	3	0.03	A
72	LB+ Arab	0.07	3	0.03	A
24	LB+ Arab	0.08	3	0.03	A
48	LB	0.09	3	0.03	A
72	LB	0.09	3	0.03	A
72	LB + Glu	0.10	3	0.03	A
24	LB + Glu	0.11	3	0.03	A

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 4 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *dgcl F2* a temperatura 37°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.03	8	4.1E-03	4.17	0.0056
Tiempo (h)	3.5E-03	2	1.7E-03	1.78	0.1965
Medio	0.01	2	0.01	7.12	0.0053
Tiempo * Medio	0.02	4	3.8E-03	3.90	0.0189
Error	0.02	18	9.8E-04		
Total	0.05	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.04	0.01	0.01	1	0.01	6.88	0.0172
Contraste 2	-0.07	0.03	0.01	1	0.01	7.35	0.0143
Total			0.01	2	0.01	7.12	0.0053

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB + Arab	0.02	3	0.02	A
24	LB	0.04	3	0.02	A
48	LB + Glu	0.04	3	0.02	A
72	LB	0.05	3	0.02	A
24	LB + Glu	0.05	3	0.02	A B
72	LB + Glu	0.09	3	0.02	A B
72	LB + Arab	0.09	3	0.02	A B
48	LB	0.10	3	0.02	A B
48	LB + Arab	0.14	3	0.02	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 5 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *pdeC* a temperatura 30°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.06	8	0.01	4.30	0.0049
Tiempo (h)	0.02	2	0.01	5.71	0.0120
Medio	0.01	2	4.2E-03	2.40	0.1194
Tiempo * Medio	0.03	4	0.01	4.55	0.0103
Error	0.03	18	1.8E-03		
Total	0.09	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.02	0.02	2.6E-03	1	2.6E-03	1.49	0.2380
Contraste 2	0.06	0.03	0.01	1	0.01	3.31	0.0857
Total			0.01	2	4.2E-03	2.40	0.1194

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB + Arab	4.3E-03	3	0.02	A
24	LB	0.01	3	0.02	A
48	LB + Arab	0.04	3	0.02	A
48	LB + Glu	0.04	3	0.02	A

48	LB	0.05	3	0.02	A
72	LB + Arab	0.07	3	0.02	A B
72	LB	0.09	3	0.02	A B
72	LB + Glu	0.09	3	0.02	A B
24	LB + Glu	0.17	3	0.02	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 6 Análisis de la Varianza para cuantificación de Biopelícula de *pdeC* a temperatura 37°C

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	0.08	8	0.01	4.25	0.051
Tiempo (h)	0.01	2	0.01	2.74	0.0912
Medio	0.06	2	0.03	12.26	0.0004
Tiempo * Medio	0.01	4	2.3E-03	1.00	0.4320
Error	0.04	18	2.3E-03		
Total	0.12	26			

Contrastes

Tiempo (h)	Contraste	E.E.	SC	gl	CM	F	p-valor
Contraste 1	0.11	0.02	0.05	1	0.05	21.94	0.0002
Contraste 2	-0.6	0.04	0.01	1	0.01	2.58	0.1259
Total			0.06	2	0.03	12.26	0.0004

Resultados de la prueba de Tukey

Tiempo (h)	Medio	Medias	n	E.E	
24	LB	0.01	3	0.03	A
24	LB + Glu	0.01	3	0.03	A B
24	LB + Arab	0.01	3	0.03	A B
48	LB	0.03	3	0.03	A B
72	LB	0.09	3	0.03	A B
48	LB + Glu	0.11	3	0.03	A B
72	LB + Arab	0.11	3	0.03	A B
48	LB + Arab	0.13	3	0.03	A B
72	LB + Glu	0.14	3	0.03	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 7 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *pdeC LEE2-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1628.85	5	325.77	56.66	<0.0001
Sustrato	1628.85	5	325.77	56.66	<0.0001
Error	155.24	27	5.75		
Total	1784.10	32			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB + Arab	16.06	6	0.98	A
LB	18.69	6	0.98	A
DMEM+ Arab	25.70	6	0.98	B
LB + Glu	27.58	6	0.98	B C
DMEM+ Glu	31.28	6	0.98	C D
DMEM	35.52	6	0.98	D

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 8 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *pdeC bfpA-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	76085.60	5	15217012	12.12	<0.0001
Sustrato	76085.60	5	15217.12	12.12	<0.0001
Error	22604.92	18	1255.83		
Total	98690.51	23			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB + Glu	325.16	3	59.38	A
LB	382.29	6	41.99	A B
LB+ Arab	422.18	6	41.99	A B
DMEM+ Arab	578.95	3	59.38	B
DMEM+ Glu	1317.73	3	59.38	C
DMEM	2095.41	3	59.38	D

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 9 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *dgcIF1 LEE2-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	586197.97	5	117239.59	29.62	<0.0001
Sustrato	586197.97	5	117239.59	29.62	<0.0001
Error	75192.07	19	3957.48		

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
DMEM+ Arab	94.44	5	28.13	A
LB	178.83	3	36.32	A
LB + Arab	192.26	5	28.13	A
DMEM	384.24	6	25.68	B
LB+ Glu	462	3	36.32	B
DMEM + Glu	526.72	3	36.32	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 10 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *dgcI F1 bfpA-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	1635.90	5	327.18	39.02	<0.0001
Sustrato	1635.90	5	327.18	39.02	<0.0001
Error	176.10	21	8.39		
Total	1812.01	26			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB	15.92	3	1.67	A
LB + Arab	20.98	6	1.18	A
DMEM+ Arab	22.08	6	1.18	A B
LB + Glu	27.60	3	1.67	B
DMEM+ Glu	34.88	3	1.67	C
DMEM	37.82	6	1.18	C

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 11 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *dgcIF2 LEE2-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	32.66	5	6.53	6.29	0.0009
Sustrato	32.66	5	6.53	6.29	0.0009
Error	22.86	22	1.04		

Total	55.52	27
-------	-------	----

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB+ Glu	9.93	3	1.54	A
LB + Arab	10.96	6	1.09	A
LB	14.87	3	1.54	A
DMEM	44.40	6	1.09	B
DMEM + Arab	47.19	6	1.09	B
DMEM + Glu	48.57	4	1.34	B

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)

Anexo 12 Análisis de la Varianza para fusiones reporteras de *dgcI F2 bfpA-cat*.

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	76085.60	5	15217.12	12.12	<0.0001
Sustrato	76085.60	5	15217.12	12.12	<0.0001
Error	22604.92	18	1255.83		
Total	98690.51	23			

Resultados de la prueba de Tukey

Sustrato	Medias	n	E.E	
LB + Glu	325.16	3	59.38	A
LB	382.29	6	41.99	A B
LB + Arab	422.18	6	41.99	A B
DMEM+ Arab	578.95	3	59.38	B
DMEM+ Glu	1317.73	3	59.38	C
DMEM	2095.41	3	59.38	D

Medidas con letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$)