



---

---

**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE  
MÉXICO**

**FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**

División de Estudios de Posgrado e Investigación  
Instituto de Investigaciones Biomédicas

Programa de Maestría y Doctorado en Ciencias Médicas, Odontológicas y  
de la Salud.

**Estudios genéticos sobre la formación de  
biocapas bacterianas.**

T E S I S

PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS (BIOLOGÍA BUCAL)

P R E S E N T A :

C.D. NORA SCARLET URREA RAMÍREZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. JORGE MEMBRILLO  
HERNÁNDEZ.





Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

## *Agradecimientos:*

*A Dios: Por permitirme experimentar momentos de dicha al lado de las personas que más quiero.*

*A mi Madre: Por enseñarme a tomar la vida con alegría. A ti te debo lo que soy, te quiero mucho.*

*A mis hermanos: cada uno de ustedes significan algo especial e importante en mi vida.*

*A Mi Abuela: Tu recuerdo alegra mis días, ojalá hubieses estado junto a mí para compartir todo lo que me llena de dicha.*

*A mis compañeros de laboratorio:*

*Eli, Tecilli, Luis, José, Luisa, Marcela, Gerry, Alondra, Marco: gracias por su tiempo, ayuda y apoyo en la elaboración de este trabajo.*

*A Don Mike Paez y a al Dr. Luis Delgado: Por la asistencia técnica, ¡Gracias por su enorme y valiosa contribución!*

*A mis Amigas: Eva, Elizabeth, Tecilli, Rossmary, Gina e Isela: Por acompañarme en las buenas y en las malas, por compartir lágrimas y risas, por escucharme y aconsejarme. Las quiero mucho.*

*Al Dr. Membrillo: Por su dedicación en el desarrollo de este trabajo, por su tiempo y su apoyo. ¡Gracias por todo!*

*Le agradezco a la institución que financió este trabajo a través del presupuesto del proyecto PAPIIT UNAM, IN207703.*

*Le agradezco a CONACYT, por su apoyo.*

*A la UNAM, por su apoyo y la educación recibida.*

*A Laura, Luz María y al Lic. Francisco Soto: Por su tiempo, apoyo y paciencia.*

## *Le dedico esta Tesis:*

*A Rolando: ¡por estar en todo momento!, por tu amistad, cariño, paciencia, confianza, por escucharme, aconsejarme y por ser el compañero con el que deseo compartir toda mi vida. Te Amo.*



El presente trabajo ha sido desarrollado bajo la dirección del Dr. Jorge Membrillo Hernández, en el Laboratorio de Microbiología y Genética Molecular del Departamento de Biología Molecular y Biotecnología del Instituto de Investigaciones Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México.

## Abreviaturas

<b>pb</b>	Pares de bases
<b>MOPS</b>	3- <i>N</i> -morfolino propano sulfonato
<b>PCR</b>	Reacción en cadena de la polimerasa
<b>Tris</b>	Tris (hidroximetil) aminometano
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>SDS</b>	Dodecil sulfato de sodio
<b>w/v</b>	Peso/volumen
<b>TA</b>	Temperatura ambiente
<b>DO</b>	Densidad óptica
<b>ADN</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>ARN</b>	Ácido ribonucleico
<b>Da</b>	Dalton
<b>aa</b>	Aminoácidos
<b>nm</b>	Nanómetros
<b>LB</b>	Medio de cultivo Luria Bertani
<b>rpm</b>	Revoluciones por minuto
<b>psi</b>	Libras por pulgada cuadrada
<b>TBE</b>	Trizma base 90mM, ácido bórico 90mM, EDTA 10mM, pH 8.3
<b>UV</b>	Ultravioleta
<b>H.A.</b>	Hidroxiapatita
<b>CFU</b>	Unidades formadoras de colonia
<b>M.D</b>	MgSO <sub>4</sub> 10mM

# ÍNDICE GENERAL

## 1. INTRODUCCIÓN

1.1	La placa dental.....	11
1.1.1	Descripción e importancia .....	11
1.1.2	Mecanismo de formación de la placa dental.....	12
1.1.3	Composición de la placa dental.....	13
1.1.4	Estructura.....	14
1.1.5	Interacciones y sucesión microbiana en la placa dental.....	14
1.1.6	Patologías bucales.....	17
1.1.7	Caries de esmalte.....	17
1.1.8	Caries de dentina.....	17
1.1.9	Caries radicular.....	17
1.2	Hidroxiapatita.....	17
1.2.1	Aplicaciones de la hidroxiapatita.....	17
1.3	Antecedentes.....	19
1.3.1	Biocapas.....	19
1.3.2	Etapas de la formación de biocapas bacterianas.....	19
1.3.3	Comunicación entre bacterias.....	23
1.4	Escherichia coli .....	25
1.4.1	Modelo de estudio para la formación de biocapas.....	25
1.5	Justificación.....	27
1.6	Hipótesis.....	29
1.7	Objetivo de esta tesis .....	29
1.7.1	Objetivo general .....	30
1.7.2	Objetivos específicos .....	30

## 2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1	Generalidades .....	33
2.1.1	Cepas bacterianas usadas en este estudio .....	33
2.1.2	Bacteriófagos utilizados .....	33
2.1.3	Plásmidos utilizados.....	33
2.1.4	Oligonucleótidos .....	33
2.1.5	Medios de cultivo .....	33
2.1.6	Condiciones de crecimiento.....	34
2.1.7	Preservación y mantenimiento de bacterias y fagos.....	35
2.2	Métodos genéticos .....	35
2.2.1	Mutagénesis .....	36

2.2.1.1 Mutagénesis por inserción de un elemento transponible.....	36
2.2.1.2 Preparación del lisado con fago NK.....	36
2.2.1.3 Inserción de transposones mini-Tn10.....	37
2.2.2 Transducción generalizada mediante el bacteriófago P1Vi.....	38
2.2.2.1 Obtención de los lisados.....	38
2.2.2.2 Transducción al genoma.....	39
2.2.3 Manipulación y análisis de ADN.....	40
2.2.3.1 Obtención de ADN genómico.....	40
2.2.3.2 Manipulación enzimática del ADN.....	42
2.2.3.3 Endonucleasas de Restricción.....	42
2.2.3.4 Secuenciación de ADN.....	42
2.2.3.5 Resolución y purificación de fragmentos de ADN.....	43
2.2.3.5.1 Separación de fragmentos de ADN en geles de agarosa.....	43
2.2.3.5.2 Purificación de fragmentos de ADN en solución.....	44
2.2.3.5.3 Purificación de fragmentos de ADN a partir de geles de agarosa.....	45
2.3 Métodos bioquímicos.....	47
2.3.1 Análisis tipo Southern blot.....	47
2.3.1.1 Procesamiento del gel de agarosa.....	47
2.3.1.2 Transferencia de ADN a la membrana.....	48
2.3.1.3 Marcado de la sonda.....	49
2.3.1.4 Hibridación y lavado de la membrana.....	50
2.3.1.5 Generación y detección de la señal luminosa.....	51
2.3.1.6 Revelado de película autoradiográfica.....	52
2.4 Otros ensayos.....	52
2.4.1 Ensayo de Biopanning.....	52
2.4.2 Ensayo de formación de biofilm.....	54
2.4.2.1 Condiciones de crecimiento.....	54
2.4.2.2 Detección y cuantificación de biofilm.....	55
2.4.3 Ensayo de nado.....	55
2.4.4 Ensayo de unión a rojo congo.....	56

### 3. RESULTADOS

3.1 Búsqueda de una mutante afectada en la adhesión a hidroxiapatita.....	58
3.1.1 Mutagénesis al azar utilizando elementos transponibles.....	58
3.2 Selección de las mutantes que no se adhieren a hidroxiapatita...58	
3.3 Formación de biofilm.....	59
3.3.1 Ensayos de formación de biofilm.....	60
3.4 Papel de la motilidad en la formación de biofilm.....	61
3.4.1 Ensayo de nado de las mutantes que no se adhirieron a H.A....62	
3.5 Selección de la mutante JMH1754 para su caracterización.....	63
3.6 Cinética de crecimiento y de formación de biofilm.....	63

3.6.1 Cinética de crecimiento de la cepa mutante (JMH1754) y la cepa parental W3110 bajo condiciones aeróbicas.....	63
3.6.2 Cinética de crecimiento en placas de microtitulación de PVC en aerobiosis.....	64
3.6.3 Cinética de formación de biofilm en aerobiosis.....	65
3.7 Transducción de la mutación a un fondo genético fresco.....	67
3.8 Cinética de motilidad.....	68
3.9 Ensayo de unión a rojo congo.....	68
3.10 Secuenciación del gen 16S rRNA de la mutante.....	70
3.10.1 Análisis tipo BLAST del producto obtenido de la secuenciación.....	71
3.11 Mapeo de la inserción de la mutación.....	72
3.11.1 Alineamiento pareado de las secuencias del gen que confiere resistencia a tetraciclina, del plásmido pACYC184 y TRN10TETR.....	76
4. CONCLUSIONES	

## 5. BIBLIOGRAFÍA

6. APÉNDICE. Revisión publicada en: Memorias de Biología bucal. ISBN: 970-32-2261-7.  
 7. Titulada: “Biología molecular de biocapas bacterianas” en colaboración con la Biol. Tecilli Cabellos Avelar y la supervisión del Dr. Jorge Membrillo Hernández.



## Resumen

En la formación de biofilm, la adherencia es un proceso importante en la colonización bacteriana en superficies bióticas y abióticas. Un ejemplo de biofilm en el cual existe una gran diversidad de especies bacterianas es la placa dental. Las superficies dentales están constituidas principalmente de Hidroxiapatita [ $\text{Ca}_{10}(\text{PO}_4)(\text{OH})_2$ ]. El objetivo de éste proyecto es identificar cepas de *Escherichia coli*, afectadas en su capacidad de adherencia a hidroxiapatita. Para alcanzar éste objetivo, se generó un banco de mutantes utilizando transposones como elementos mutagénicos en la cepa W3110. El banco de mutantes fue sometido a incubaciones repetidas con hidroxiapatita – (HA), seleccionando aquellas mutantes incapaces de adherirse a HA en un medio de selección. En una segunda selección se realizaron ensayos de formación de biofilm en placas de microtitulación de PVC y ensayos de nado en placas de agar suave, seleccionando a aquellas en las que se observó una mayor o nula formación de biofilm, así como una capacidad de nado diferente a la cepa silvestre.

Al analizar éstas mutantes se podrá identificar genes involucrados en la adherencia a la superficie dental, contribuyendo a una mejor comprensión de éste complejo bacteriano.

**CAPITULO 1.**

**INTRODUCCIÓN**

# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. La placa dental.

### 1.1.1. Descripción e importancia.

La placa dental es un término general con el cual se denomina a la comunidad microbiana (predominantemente de bacterias) la cual se encuentra sobre la superficie dental, embebida en una matriz de polímeros de origen bacteriano y salival. La placa se desarrolla naturalmente sobre los dientes y forma parte del sistema de defensa del huésped ayudando a la prevención de la colonización en el esmalte por parte de microorganismos exógenos (frecuentemente patógenos) (28).

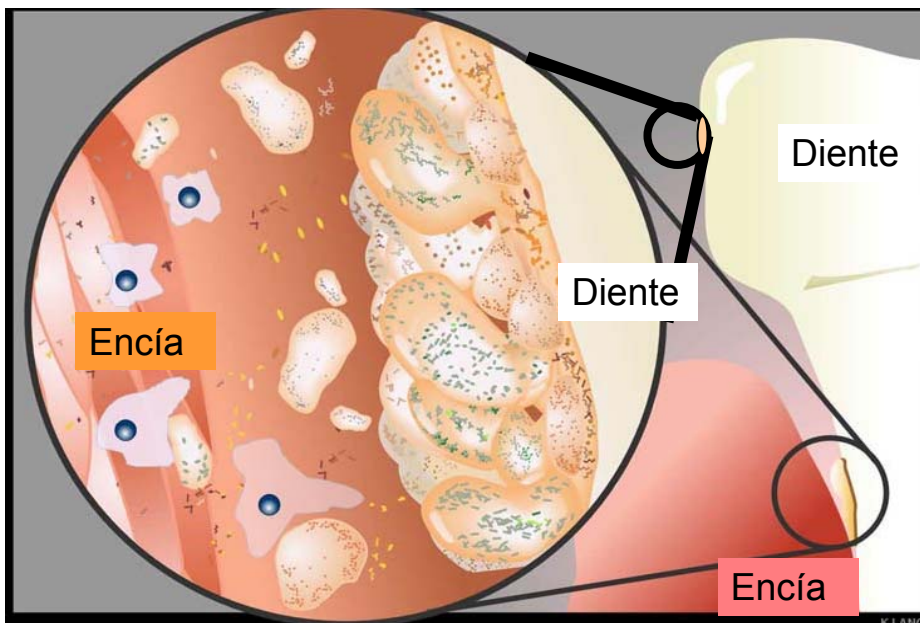


Fig. 1. La cavidad bucal, es un hábitat complejo donde se agrupan e interaccionan una gran cantidad de elementos bióticos y abióticos. (tomada de <http://www.erc.montana.edu/Res-Lib99->

[W/Image\\_Library/Medical%20&%20Health/Full-image%20Pages/CBE99\\_DentalInflam.htm](http://W/Image_Library/Medical%20&%20Health/Full-image%20Pages/CBE99_DentalInflam.htm)

### **1.1.2 Mecanismo de formación de la placa dental.**

La adhesión, crecimiento, remoción y re-adhesión de bacterias a la superficie dental, es un proceso dinámico. Sin embargo, se pueden distinguir distintas etapas:

1. Absorción de proteínas salivales y glicoproteínas, junto con algunas moléculas, a la superficie dental para formar una película acondicionada (la película adquirida).
2. Amplio rango de interacciones, no específicas de superficies microbianas con la película adquirida vía fuerzas de Van Der Waals (>50nm).
3. Corto rango de interacciones, en las cuales las fuerzas de Van Der Waals y la repulsión electrostática producen un área débil de atracción que puede resultar en una adhesión reversible a la superficie (10-20nm).
4. Adhesión estable, puede ocurrir si existen interacciones intermoleculares se dan entre adhesinas sobre las superficies celulares y receptores en la película adquirida.
5. Colonizadores tardíos o secundarios unidos a los colonizadores tempranos o primarios (congregación) también por interacciones moleculares específicas.

6. División celular de las células ya unidas, produciendo un crecimiento confluyente, y formación de biofilm o biocapa (18).

### 1.1.3. Composición de la placa dental y estructura.

Las condiciones ambientales sobre la superficie dental no son uniformes. Existen diferencias en el grado de protección de las fuerzas de remoción bucal y los gradientes de muchos factores biológicos y químicos que influyen en el crecimiento de la flora residente (Tabla 1). Estas diferencias son reflejadas en variaciones en la composición de la comunidad microbiana, particularmente en sitios tan distintos como lo son: el surco gingival, las regiones proximales, las superficies lisas, las fisuras y depresiones en la superficie dental.

**Tabla 1.** Bacterias predominantemente encontradas en los distintos sitios de la superficie dental (28).

<b>Bacteria</b>	Porcentajes de cuentas viables (rango).		
	<b>Fisuras</b>	<b>Área proximal</b>	<b>Fluido crevicular</b>
<i>Streptococcus</i>	8 - 86	<1 - 70	2 -73
<i>Actinomyces</i>	0 - 46	4.81	10.63
Bacilos Gram positivos anaerobios	0 -21	0 -6	0 - 37

<i>Neisseria</i>	0 <sup>a</sup>	0 - 44	0 -2
<i>Veillonella</i>	0 - 44	0 - 59	0 – 5
Bacilos Gram negativos anaerobios	0 <sup>a</sup>	0 - 66	8 -20

<sup>a</sup> Detectados ocasionalmente.

#### 1.1.4 Estructura

En estudios sobre la estructura de la placa dental por medio de microscopía electrónica se ha observado una estructura de tipo heterogéneo y una subestructura tipo colonia en secciones de la superficie lisa de la placa.

El tipo heterogéneo está asociado con regiones donde filamentos y cocci parecen estar alineadas en paralelo en ángulos rectos con respecto a la superficie dental.

Además se han observado microcolonias mono especie y estratificación horizontal.

En los estadios tempranos de desarrollo se observa una capa condensada de un aparente número limitado de tipos bacterianos. De 7 a 14 días, la forma de la capa muestra menos orientación pero, una alta diversidad morfológica. A esta capa se le ha atribuido directamente a la sucesión bacteriana. En la placa madura, los organismos se han observado en contacto directo con el esmalte debido al ataque enzimático sobre la película. Así mismo, se ha confirmado la presencia de una matriz inter - bacteriana de polisacáridos (27).

### **1.1.5 Interacciones y sucesión microbiana en la placa dental.**

La formación de la placa dental involucra un patrón ordenado de colonización (sucesión microbiana) por un amplio rango de bacterias. Tan pronto como un diente erupciona, o es limpiado, la superficie del esmalte es cubierta por un película acondicionada que contiene moléculas tanto del huésped como de las bacterias (5).

Los colonizadores tempranos son retenidos cerca de la superficie del diente por diversas interacciones físico-químicas entre las moléculas cargadas sobre las células y la superficie del huésped (5). Esto facilita el establecimiento específico de interacciones intermoleculares en un rango menor, pero más fuertes, entre las adhesinas bacterianas y los receptores complementarios en la película acondicionada, dando como resultado una unión irreversible (24, 48). Estos colonizadores tempranos crecen y modifican las condiciones ambientales locales, creando el sitio adecuado para la colonización de otras especies, como por ejemplo de anaerobios estrictos. Estos colonizadores tardíos se unen a las especies ya unidas por la vía similar al mecanismo adhesina - receptor (proceso denominado co-agregación o co-adhesión (21, 22). De ésta forma compleja y estructurada, son formados los biofilms multiespecies (Fig. 2).

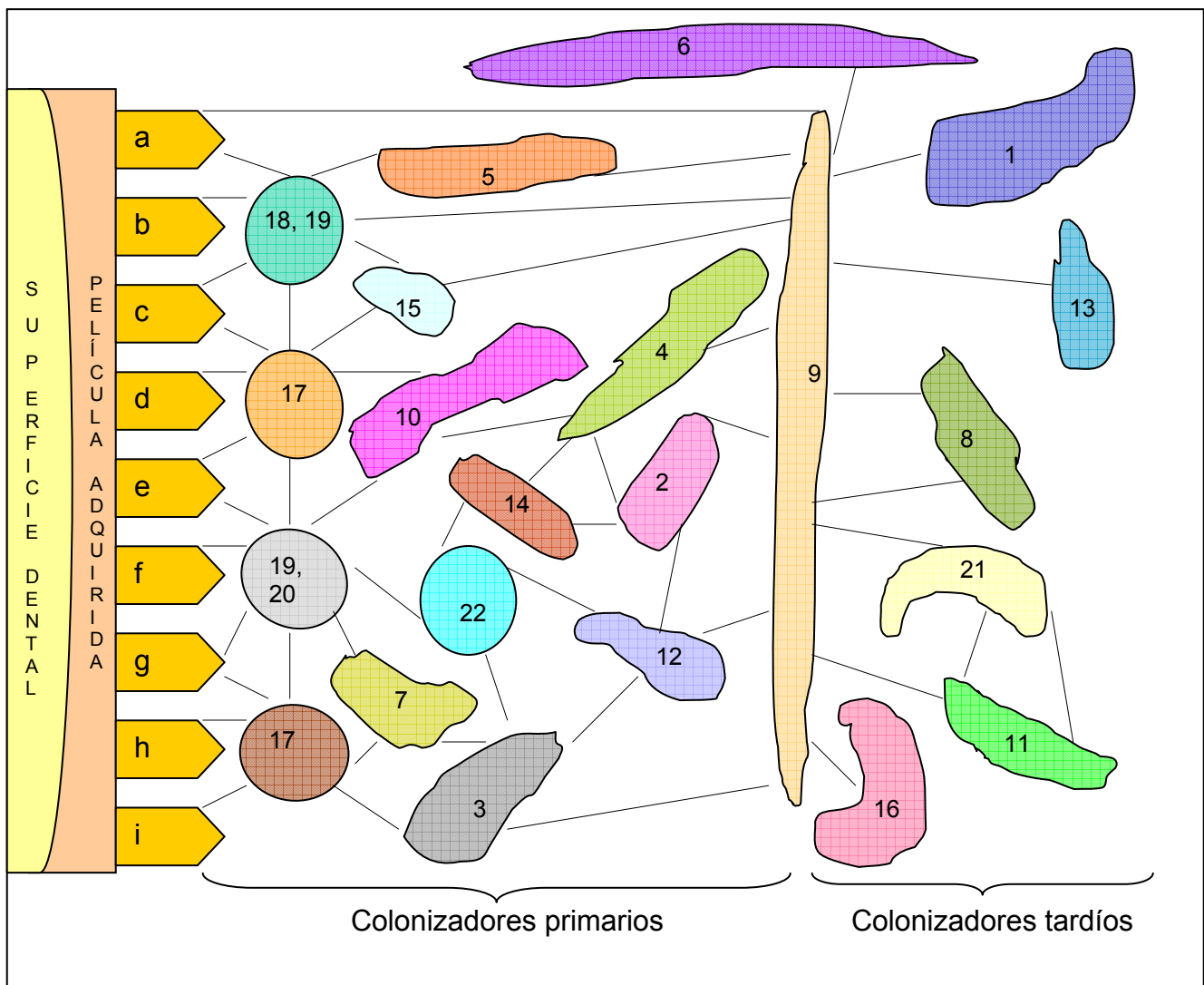




Fig. 2. La placa dentobacteriana como comunidad. Proteínas de adhesión. a) estaterina, b) mucina sialilada, c) proteína rica en prolina, d) aglutinina salival, e) fragmentos de pared celular bacteriana, f) mucina sialilada, g) aglutinina salival, h) alfa amilasas, i) proteína rica en prolina. Colonizadores de la placa dentobacteriana. 1) *Actinobacillus actinomycetemcomitans*, 2) *Actinomyces israelí*, 3) *Actinomyces naeslundii*, 4) *Capnocytophaga gingivalis*, 5) *Capnocytophaga ochracea*, 6) *Capnocytophaga sputigena*, 7) *Eikenella corrodens*, 8) *Eubacterium* spp. 9) *Fusobacterium nucleatum*, 10) *Haemophilus parainfluenzae*, 11) *Porphyromonas gingivalis*, 12) *Prevotella denticola*, 13) *Prevotella intermedia*, 14) *Prevotella loescheii*, 15) *Propionibacterium acnes*, 16) *Selenomonas flueggei*, 17) *Streptococcus gordonii*, 18) *Streptococcus mitis*, 19) *Streptococcus oralis*, 20) *Streptococcus sanguis*, 21) *Treponema* spp., 22) *Veillonella atípica*. (31)

### 1.1.6 Patologías bucales.

Las enfermedades más comunes por la presencia de estos microorganismos en boca son la caries y la enfermedad periodontal, aunque también se encuentran estos microorganismos involucrados en otras enfermedades de ámbito sistémico muy importantes, como la endocarditis bacteriana (12).

La microbiología de la caries dental es variada dependiendo de su localización o inclusive del curso clínico de ésta:

- **1.1.7 Caries de Esmalte.** En el inicio de la lesión cariosa, los *Streptococos* del grupo *mutans* se encuentran presentes provocando la desmineralización temprana, mientras que los *Actinomyces viscosus* y

*Lactobacillus sp.*, comienzan a hacerse presentes en las etapas tardías de la lesión.

- **1.1.8 Caries de Dentina.** En ésta entidad patológica, se encuentran presentes muchas bacterias anaerobias estrictas, las cuales pertenecen a los géneros *Actinomyces*, *Eubacterium*, *Lactobacillus* y *Propionibacterium*, aparecen con menor frecuencia los Estreptococos.
- **1.1.9 Caries Radicular.** En este tipo de caries se agregan nuevos géneros como: *Staphylococcus*, *Treptococcus*, *Actinomyces*, *Lactobacillus*, *Bacteroides*, *Prevotella*, *Selenomonas*, *Fusobacterium*, *Leptotrichis*, y *Capnocytophaga* (36).

## 1.2 Hidroxiapatita.

### 1.2.1 Aplicaciones de la hidroxiapatita

Un gran porcentaje de la porción inorgánica del esmalte dental consiste de Hidroxiapatita, y ha sido utilizada como modelo para el estudio de la placa dental. Muchos de los trabajos describen a adsorción de un número alto de bacterias (entre ellas *E. coli*), observándose que permanecen viables mediante una tinción fluorescente que indica viabilidad mediante estudios de microscopía, siendo utilizada esta adherencia bacteriana, para remover y concentrar bacterias en suspensiones en la industria alimenticia (3).

En el modelo de la placa dental se ha estudiado principalmente la adherencia bacteriana a hidroxiapatita cubierta con saliva, tratando de simular las condiciones naturales de la película adquirida.

La hidroxiapatita ha sido utilizada extensivamente como un matriz para la purificación y fraccionamiento de sustancias bioquímicas, incluyendo enzimas, hormonas y virus.

## **1.3 Antecedentes**

### **1.3.1 Biocapas**

La concepción de la existencia de las bacterias como microorganismos con una forma de vida unicelular ha sido uno de los paradigmas más grandes de la microbiología. Lejos de ésta conducta aislada, las bacterias tienen la capacidad de

vivir en poblaciones y/o en comunidades unidas a superficies formando estructuras sésiles denominadas biocapas o biofilms.

Las biocapas son ubicuas, casi todos los materiales que tienen contacto con fluidos naturales son susceptibles a esta forma de colonización bacteriana y son de importancia ambiental y económica para el hombre ya que se ven involucrados en procesos industriales (como biorremediación), en problemas médicos causando infecciones bacterianas dentro de los pacientes generando diversos tipos de enfermedades (35) como por ejemplo, muchas infecciones bacterianas crónicas, incluyendo periodontitis, otitis media, infecciones del tracto biliar y endocarditis (41).

### **1.3.2 Etapas de la formación de biocapas bacterianas.**

Los biofilms se forman sobre un vasto de superficies bióticas y abióticas y pueden estar compuestos de poblaciones de una sola especie o de comunidades derivadas de múltiples especies microbianas. Estudios sobre la genética molecular de biofilms de una sola especie, han mostrado modelos de la regulación, formación y disgregación de las biocapas bacterianas (Fig. 3). El biofilm cuenta básicamente de cuatro etapas que involucran los procesos de 1) transporte de la bacteria en estadios planctónico o de vida libre, por medio del movimiento a través de flagelos y otras estructuras involucradas en motilidad; 2) la adherencia a una superficie formando microcolonias agregadas; 3) la estructura madura del biofilm que adopta diferentes formas y tipos dependiendo de la especie bacteriana que se estudie y como etapa final, 4) la disgregación del biofilm (30, 47).

Todas las etapas de la estructuración del biofilm se ven influenciadas por diferentes señales provenientes del ambiente, así como de las células bacterianas que lo forman (45; Tabla 2).

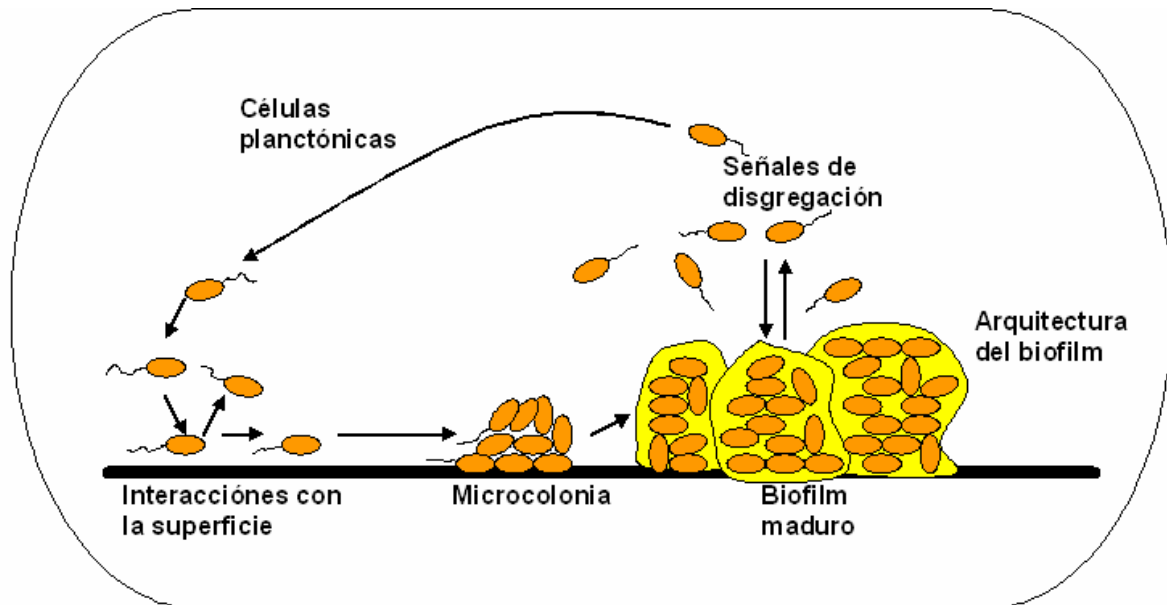


Fig. 3. Puntos de control de la expresión genética en el modelo general de las etapas de desarrollo de las biocapas bacterianas. Tomado de O'Toole *et al.* 2000.

En estudios realizados en nuestro laboratorio con la bacteria *Escherichia coli*, se reportó que el uso que medio suplementado con MOPS (3-N-morfolino propano sulfonato) 100 mM, mantiene cambios mínimos en el pH del medio por 60 horas y que favorece el establecimiento del biofilm en ensayos utilizando el método de O'Toole y Kolter (8, 32) Además se mostró evidencia que *E. coli* sólo forma biofilm bajo condiciones aeróbicas, no encontrándose moléculas extracelulares en aerobiosis y anaerobiosis que pudieran estar influyendo en la formación de biofilm, proponiéndose que el oxígeno pudiera estar participando durante su formación (6).

**Tabla 2.** Factores que influyen la formación de biofilm (Tesis de licenciatura de Maria Trinidad Colón González)

Factores genotípicos	<p>El genotipo específico del organismo.          Expresión de los genes que codifican propiedades de superficie.          Expresión de los sistemas de señalización.          Formación de sustancias poliméricas extracelulares.          Dinámica del crecimiento del microorganismo: Tasas de crecimiento específicas, periodo de latencia, afinidad por sustratos.          Expresión de factores genéticos no directamente conectados a la formación del biofilm (motilidad, quimiotaxis, genes de represión catabólica) *ver Tabla 2</p>
Factores físico-químicos	<p>Interfase (combinaciones de sólido, líquido y gaseoso).          Composición de sustratos y rugosidad.          Gradiente y concentración del sustrato.          Temperatura, pH, potencial de agua, presión demandada y suplementación de oxígeno, efectos de la radiación.</p>
Procesos al azar	<p>Colonización inicial: adherencia, disgregación.          Cambios al azar en los factores bióticos y abióticos.</p>
Fenómenos determinantes	<p>Interacciones específicas entre microorganismos: competencia, neutralismo, cooperación y depredación.</p>
Procesos mecánicos	<p>Condiciones de flujo laminar o turbulento, abrasión.</p>
Importar-exportar	<p>Adición o remoción de componentes bióticos o abióticos al sistema de biofilm.</p>
Cambios temporales	<p>Cambios diurnos o anuales periódicos en el ambiente biótico y abiótico ejemplo: luz, temperatura, pH, PO<sub>2</sub>, cambios irregulares junto con eventos imprevistos.</p>

En una biocapa, la producción de exopolisacáridos facilita las interacciones en la comunidad bacteriana y determina la forma tridimensional de un biofilm (11). Recientemente se ha demostrado que estructuras superficiales como el pili tipo IV (37) y el flagelo (31), son necesarios para los pasos iniciales en la formación de biofilms y que existen mecanismos que determinan su desarrollo y su maduración

como biofilm, como son las señales moleculares bacterianas (13). También se ha reportado diversos factores genéticos que afectan y promueven el desarrollo del biofilm (Tabla 2). Como ejemplo de estos, se ha observado que el regulador *rpoS* (que codifica para una subunidad sigma de la RNA polimerasa) participa en el control de la cantidad de biofilm formado, en determinar su iniciación y en la prevención de la síntesis de un factor extracelular que aparentemente promueve la formación de biofilm durante la fase exponencial de crecimiento (7).

La estructura de un biofilm, puede ser afectada por propiedades de la superficie donde se desarrolla y de los elementos que pueden interactuar con ella, así como de la disponibilidad de nutrientes, la composición de la comunidad microbiana, y la hidrodinámica (5, 49). Inclusive los biofilms y muy particularmente los de composición gruesa, pueden ser los que suministren a las células bacterianas un ambiente único para poder expresar completamente sus mecanismos de adaptabilidad y sobrevivencia (26).

### **1.3.3. Comunicación entre bacterias.**

La comunicación bacteriana es un elemento clave para una colonización inicial y subsecuente de la formación de biofilms. Existe comunicación entre las bacterias cuando se adhieren a una superficie, cuando se coordinan para formar la estructura tipo “hongo” del biofilm y cuando están dentro del biofilm maduro, esto

es indicativo de que es necesario conocer a las diversas moléculas que participan en la formación de estas comunidades mixtas.

**Tabla 3.** Genes involucrados en las etapas del biofilm.

Etapa	(Producto) Función	Organismo	Referencia
<b>Iniciación</b>			
<b>Gen</b>			
<i>agn43 (flu)</i>	(Ag43, antígeno 43) Media interacciones célula-célula y célula-superficie en medio mínimo suplementado con glucosa	<i>E. coli</i>	(11)
<i>cpxR</i>	(Sistema de dos componentes CpxRA, de estrés extracelular) Monitorea biogénesis de pili	<i>E. coli</i>	(33)
<i>csgA</i>	(Curlina, subunidad estructural del curli) Participa en interacciones celulares con la superficie y con otras células	<i>E. coli</i>	(39)
<i>csgD</i>	(CsgD) Regulador transcripcional de curli	<i>E. coli</i>	(38)
<i>dsbA</i>	(DsbA) Participa en el plegamiento de proteínas extracitoplásmicas que contienen puentes disulfuro y en ensamblaje de fimbria tipo I y del cuerpo basal del flagelo	<i>E. coli</i>	(16)
Grupo <i>fim</i>	(pili tipo I) Media interacciones célula-célula y célula superficie	<i>E. coli</i>	(37)
<i>flhD</i>	Regulador maestro de síntesis de flagelo	<i>E. coli</i>	(37)
<i>fliC</i>	(Flagelina) Subunidad estructural del flagelo	<i>E. coli</i>	(37)
<i>nlpE</i>	(Lipoproteína de membrana externa) Posiblemente transmite señales al dominio periplásmico de CpxA en respuesta a daño en membrana causado al momento de adhesión	<i>E. coli</i>	(33)
<i>ompR234</i>	(OmpR, parte del sistema de dos componentes EnvZ/OmpR que responde a osmolaridad) Mutantes en este gen sobreproducen curli	<i>E. coli</i>	(38)
<i>rfaG rfaP</i>	(Participan en la biosíntesis del "core" de LPS) Mutantes en estos genes están afectadas en motilidad y fimbria tipo I	<i>E. coli</i>	(16)
<i>galU</i>			
<i>aafA</i>	(AafA, subunidad de AAF/II) Participa en adherencia agregativa	EAEC	(10)
<i>flgK</i>	Proteína flagelar asociada al gancho	<i>P. aeruginosa</i>	(31)
<i>pilBCD</i>	(PilB, PilC, PilD) Síntesis de pili tipo IV	<i>P. aeruginosa</i>	(31)
<i>agfA</i>	(AgfA, subunidad de fimbria SEF17) Estabiliza el contacto intracelular y participa en adhesión a superficies	<i>S. enteritidis</i>	(2)
<i>fap1</i>	(Fap1, adhesina asociada a fimbria) Participa en biogénesis de fimbrias	<i>S. parasanguis</i>	(15)

Este proceso fue descrito por primera vez en la bacteria *Vibrio fischeri* (19, 29), éstas bacterias Gram-negativas colonizan los órganos luminosos de una variedad de peces abisales y calamares marinos. Los hospederos permiten que las bacterias crezcan en altas densidades, y como consecuencia de ello producen luz a través del quórum sensing. La señal molecular de producción de luz está



dada por la producción y acumulación de una molécula específica de la familia de las acil – homoserina lactonas, (acil – HSL; 40). Las enzimas requeridas para la producción de luz, son codificadas por los genes *luxCDABE*, que existen como parte del operón *luxICDABE*. Principalmente 2 proteínas reguladoras (LuxI y LuxR) comprenden el aparato de quórum sensing.

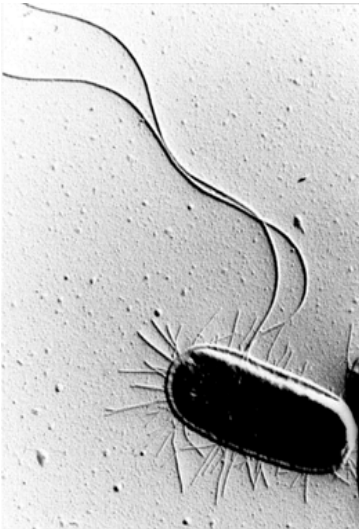
Los procesos fisiológicos regulados por quórum sensing de la acil-HSL (en el caso de bacterias Gram-negativas), son muy diversos, desde la bioluminiscencia a la síntesis de antibióticos o virulencia. Actualmente se conocen más de 50 especies que producen acil - HSL para regular diversos procesos bacterianos.

En las bacterias Gram-positivas la comunicación involucra oligopéptidos que son modificados y secretados al medio y acumulados a altas concentraciones de densidad celular como señales moleculares. Los detectores para estas señales son sistemas de 2 componentes, los cuales le permiten detectar fluctuaciones de los estímulos ambientales y manejar esta información para modificar el patrón de expresión génica. El mecanismo de transducción de señales es una vía conservada de cascada de fosforilación / defosforilación.

Además de estos sistemas, se ha descrito otro sistema de comunicación no sólo entre bacterias de la misma especie, sino entre especies distintas, indicando que un lenguaje en una sola especie no es suficiente para sentir la densidad en una bacteria que usualmente vive con otras especies. El primer sistema descrito fue el de *Vibrio harveyi*, en el cual dos moléculas (AI-1 y AI-2) de comunicación celular, uno parecido al de *V. fischeri* (una acil-HSL autoinductor AI-1), y el otro en el que se utiliza como molécula de comunicación que se propone sea una

furanona (AI-2), la cual permite “detectar”, la cantidad de células de su misma especie y la de otras especies e incluso otros géneros bacterianos. Este es conocido como circuito quórum sensing híbrido. Evidencia de universalidad del lenguaje AI-2 es mostrada con la clonación de *luxS*, cuyo producto es necesario para la producción de AI-2 en *V. harveyi*, cuyo gen, en análisis de bases de datos, muestra homólogos de *luxS* en por lo menos 30 especies de bacterias incluyendo a *E. coli*.

## **1.4 Escherichia coli**



### **1.4.1 Escherichia coli como modelo de estudio para la formación de biofilms.**

Fig. 4 Micrografía por transmisión de electrones de una célula de *Escherichia coli*. (Tomadas de <http://www.biologie.uni-erlangen.de/botanik1/photobiologie/images/kap7/abb.7.2.html>).

*E. coli*, es un bacilo Gram-negativo perteneciente a la familia de las enterobacterias, es la bacteria más abundante en el tubo digestivo del hombre y, por su facilidad de cultivo, ha sido tomada como modelo de estudio de las células procariontas, siendo probablemente el ser vivo más conocido desde el punto de vista molecular (estructura, fisiología y genética), algunas especies de *E. coli* han desarrollado factores de enteropatogenicidad, comportándose como patógenas primarias. Este microorganismo ha permitido desarrollar un estudio exhaustivo de la genética y a partir de él se conocen una gran cantidad de redes de regulación

genómica, además fue uno de los primeros organismos cuyo genoma fue secuenciado completamente, es por ello que a esta bacteria se le conoce como el pilar de la biología molecular, habiendo una gran cantidad de herramientas genéticas y metodológicas para el estudio genético-molecular de los fenómenos que desarrolla (27).

*E. coli* es una bacteria facultativa, lo cual indica que puede utilizar diferentes compuestos como último aceptor de electrones y en ausencia de ellos puede crecer mediante el metabolismo fermentativo.

Por todo esto, muchos científicos alrededor del mundo utilizan a esta bacteria para entender los fenómenos que se desarrollan en la naturaleza, siendo los biofilms uno de ellos.

En *E. coli* se han realizado estudios acerca de los biofilms (1, 39), en los cuales se identifican los patrones de desarrollo de la formación de biofilms en cepas de *E. coli* estudiando principalmente la producción de ácido colánico, el papel de los flagelos y pilis, observando que la falta de flagelo o afectación en la movilidad daña la formación de biofilm y que el ácido colánico (un exopolisacárido), no era crítico para la adherencia, sino un contribuyente en la arquitectura del biofilm (11). Además, *E. coli* no produce Acil-HSL, pero posee el sistema quórum sensing AI-2. Recientes estudios han mostrado *E.coli* O157: H7 utiliza AI-2 para controlar la expresión de factores virulentos, secreción tipo III, quimiotaxis, movilidad y síntesis flagelar y que *E.coli* K-12 utiliza AI-2 para controlar la quimiotaxis, movilidad y síntesis flagelar (42, 43, 44); *E.coli* RP37 la utiliza para controlar la agregación celular (34). Así también se ha publicado una cepa, *E.coli* DH5 $\alpha$ , la cual no produce AI-2 por una mutación en el gen *luxS* (46).

Otros determinantes genéticos que afectan la formación de biofilm son *rpoS*, *hns*, *rfa* y *dsbA* (1, 7, 16, 17, 25).

Estudios en los que se involucra factores y ambientales, los cuales afectan la formación del biofilm, entre estos: el pH (8), disponibilidad de nutrientes (8), y en condiciones anaerobias (6); además en nuestro laboratorio se mostró evidencia de que *E. coli* sólo forma biofilm bajo condiciones aeróbicas no encontrándose moléculas extracelulares en aerobiosis y anaerobiosis (6), CsrA y RpoS fueron reportados reguladores clave para la formación del biofilm (25). Reportes que indican que RpoS juega un papel clave en la formación de biofilm, en determinar su iniciación y en la prevención de la síntesis de factores extracelulares que aparentemente promueven su formación, así como proponiendo que la presencia de RpoS podría prevenir la formación durante la fase de crecimiento exponencial, han sido mostrados por nuestro grupo (7).

## **1.5 Justificación**

El estudio de éste tipo ecológico de sociedades microbianas es de especial importancia debido a sus implicaciones como problema de salud y en la industria. Se sabe que algunas bacterias que forman biofilms son inherentemente resistentes a los agentes anti-microbianos por encontrarse menos expuestas siendo por ende mas resistentes a la terapéutica (35). También se sabe que se desarrollan comunidades infecciosas latentes, en cualquier momento pueden

desencadenar una infección a partir del biofilm, siendo una causa común de infecciones persistentes (9).

La repercusión e importancia médica de la formación de biofilms es evidente debido a que los biofilms se encuentran desde la expresión más leve hasta la más grave. La placa dental bacteriana – biofilm bucal – puede desencadenar desde una gingivitis incipiente hasta una periodontitis generalizada con la subsecuente pérdida de todos los dientes, biocapas de *Candida albicans* formadas dentro de las prótesis totales bucales favorecen la formación de un tejido frágil y resiliente. En el aspecto médico podemos mencionar un sin número de entidades patológicas formadas a causa de biofilms formados no solamente sobre catéteres médicos, sino sobre las mismas estructuras corporales a consecuencia de una lesión como en el caso de la endocarditis bacteriana. La disgregación de células o de los agregados celulares, la producción de endotoxinas, el aumento de la resistencia al sistema inmune del hospedero, la provisión de un nicho para la generación de organismos resistentes son procesos del biofilm que pueden iniciar un proceso de enfermedad (14). Muchas infecciones nosocomiales como las relacionadas con el uso de catéteres venosos centrales, catéteres urinarios, válvulas cardíacas protésicas y algunos aparatos ortopédicos se encuentran asociados con los biofilms debido a la adherencia bacteriana en la superficie del biomaterial (20, 36). En la industria, los biofilms son igualmente importantes ya que muchos de los problemas actuales son ocasionados por ellos (9).

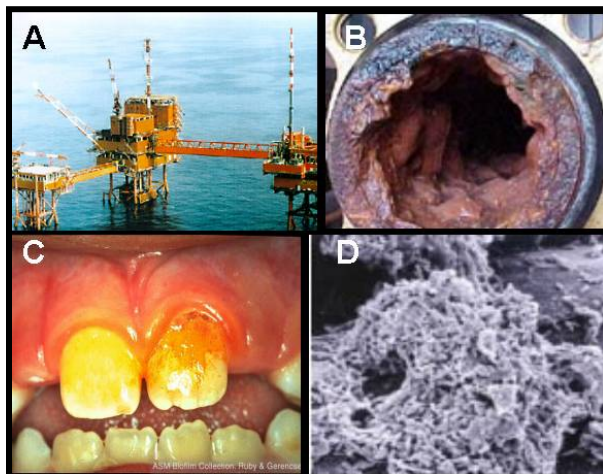


Fig. 5. Impacto de los biofilms. **A) Aplicación en biorremediación de fuentes acuíferas contaminadas, B) obstrucción de oleoductos, C) placa dentobacteriana y D) biofilms formados por *P. aeruginosa* en pulmones de pacientes con fibrosis quística** (Imagen tomada de: la Tesis presentada por Maria Trinidad Colón González para obtener el grado de licenciatura en Investigación Biomédica Básica, 2002).

La identificación de los factores extracelulares involucrados en la formación de biofilm es de vital importancia para aportar datos en la comprensión de la fisiopatología de las enfermedades, así como la formación de biofilm en diferentes superficies.

Bajo este marco teórico se sustenta el principio de nuestra **hipótesis de trabajo**:

### 1.6 Hipótesis:

Una mutante de *E. coli* que al ser incubada con hidroxapatita en ocasiones repetidas, que no se adhiere a ella estará afectada en algún gene relacionado a la adhesión en esta superficie.

## **1.7. Objetivo de ésta tesis.**

### **1.7.1. Objetivo General:**

Aumentar el conocimiento de los factores que promueven la agregación y disgregación del biofilm en superficies de hidroxiapatita.

### **1.7.2. Objetivos específicos:**

- 1- Realizar mutagénesis al azar utilizando transposones.
- 2- Seleccionar mutantes las cuales no se adhieran a hidroxiapatita mediante un ensayo de "Biopanning".
- 3- Realizar ensayos de viabilidad para confirmar si las mutantes no se adhieren a hidroxiapatita
- 4- Analizar la formación de biofilm de las mutantes que no formen biofilm mediante la técnica de Tinción con cristal violeta.
- 5- Realizar ensayos de nado de las mutantes que tengan un fenotipo diferente de formación de biofilm a la de la cepa parental.
- 6- Realizar cinéticas de crecimiento en matraz en condiciones aeróbicas y anaeróbicas de las mutantes seleccionadas.
- 7- Realizar cinéticas de crecimiento en placas de microtitulación de PVC (cloruro de polivinilo, well vynil assay plates, Costar Cambridge MA) de las mutantes seleccionadas y cepa parental.
- 8- Ejecutar cinéticas de motilidad en placas de agar suave de las mutantes.

- 9-** Realizar cinéticas de formación de biofilm en placas de microtitulación de PVC (cloruro de polivinilo, well vinyl assay plates, Costar Cambridge MA), de las mutantes.
- 10-** Analizar la unión a Rojo congo de las mutantes.
- 11-** Analizar molecularmente si las mutantes son *E.coli* mediante la secuenciación del gen 16S rRNA.
- 12-** Realizar la transducción de la mutación a un fondo genético fresco.



## CAPITULO 2.

# MATERIAL Y MÉTODOS

### 2.1 Generalidades

#### 2.1.1 Las cepas bacterianas utilizadas se encuentran descritas en la Tabla 4.

Cepa	Genotipo relevante	Fuente
C600	<i>supE44 hsdR thi-1 thr-1 leuB6 lacY1 tonA21</i>	Colección del laboratorio
W3110	<i>F<sup>-</sup> lam-In (rrnD-rrnE)1 rph-1</i>	Colección del laboratorio
ZK408	<i>flhC araD ΔlacU169 strA thi pyrC64 nslA his</i>	Roberto Kolter
JMH1754	Mutante seleccionada por su mayor formación de biofilm y menor capacidad en motilidad miniTn10 (tetra <sup>R</sup> )	Este trabajo
JMH1755	Trasductante miniTn10	Este trabajo
JMH1756	Trasductante miniTn10	Este trabajo
JMH1757	Trasductante miniTn10	Este trabajo
MC4100	<i>F<sup>-</sup> ara D139 ΔlacU 169 rpsL 150 relA1 fib-5301 deoC1 pts F25 rbsR</i>	Colección del laboratorio

#### 2.1.2 Bacteriófagos utilizados. Tabla 5.

Bacteriófagos	Referencia
P <sub>1vir</sub>	Miller, 1992
λNK1323 (λ miniTn 10)	Dr. Nancy Kleckner
λNK1098 (λ miniTn 10)	Dr. Nancy Kleckner

#### 2.1.3 Plásmidos utilizados. Tabla 6.

Plásmidos	Referencia
pACYC184	GenBank / EMBL número de acceso X06403

#### 2.1.4 Oligonucleótidos utilizadas en este trabajo. Tabla 7.

Oligonucleótidos	
Amplitet 5'	5'TCA GCC CCA TAC GAT ATA AG
Amplitet 3'	3'TGG AGT GGT GAA TCC GTT AG

515FLP	5'GCG GAT CCT CTA GAC TGC AGT GCC AGC AGC CGC GGT AA 3'
1492RLP	5'GGC TCG AGC GGC CGC CCG GGT TAC CTT TGT TAC GAC TT 3'
TcTn10 5'→	5'GCG CTC ATC GTC ATC CTC GGC ACC GTC 3'
TcTn10 3'←	5'GGC CCG GCT CCA TGC ACC GCG ACG CAA 3'

### 2.1.5 Medios de cultivo

Los medios líquidos se prepararon por disolución de los solutos indicados en agua destilada y posterior esterilización a 15 psi y 121°C por 20 min, cuando el medio estaba suplementado con MOPS (3-*N*-morfolino propano sulfonato), el tiempo de esterilización disminuyó a 15 min. Los medios sólidos se prepararon por adición de agar bacteriológico (DIFCO) 1.5% (w/v) a los medios líquidos y posterior esterilización bajo las condiciones mencionadas anteriormente.

Se utilizó medio LB (Extracto de levadura 0.5%, NaCl 1.0% y triptona 1.0%) para cultivos en medio líquido. Para los ensayos de formación de biofilm se usó medio LB suplementado con MOPS (3-*N*-morfolino propano sulfonato) 100 mM (8, 32). El pH de los medios se ajustó a 7.0 antes de esterilizar.

Los antibióticos utilizados fueron esterilizados usando filtros de membrana MF™ (Millipore Acrodisk) de 0.45 µm y adicionados al medio bajo condiciones de esterilidad a una temperatura del medio de cultivo menor a 50°C. Las concentraciones de antibiótico fueron las siguientes: ampicilina 200 µg/ml, cloramfenicol 25 µg/ml, kanamicina 100 µg/ml y tetraciclina 25 µg/ml. Cuando fue necesario, se adicionó IPTG a una concentración final de 1mM y X-gal 0.4% (w/v).

### **2.1.6 Condiciones de crecimiento.**

Los cultivos aeróbicos en medio líquido se realizaron en matraces Erlenmeyer, el volumen del cultivo no fue mayor al 20% de la capacidad del matraz. La incubación se llevó a cabo en un agitador orbital a 225 rpm con temperatura controlada. Los cultivos anaeróbicos se realizaron en tubos de ensayo con tapa de rosca llenados al máximo volumen e incubados sin agitación. Los cultivos aeróbicos en medio sólido se crecieron en cajas de Petri, las condiciones de cultivo anaeróbico en medio sólido fueron las mismas que las utilizadas en los ensayos de formación de biofilm. Para los ensayos de formación de biofilm en placas de microtitulación de PVC (cloruro de polivinilo, well vynil assay plates, Costar Cambridge MA), los cultivos aeróbicos se incubaron sin agitación. Todos los cultivos se incubaron a 37°C, a menos que se indique lo contrario.

El crecimiento fue monitoreado midiendo la DO a 600 nm utilizando el espectrofotómetro Ultrospec 3100 *pro* (Amersham Pharmacia Biotech), para ello, se utilizaron cubetas de plástico desechables de 1 ml, diluyendo 10 ó 100 veces la concentración del cultivo.

### **2.1.7 Preservación y mantenimiento de bacterias y fagos**

Las cepas bacterianas se mantuvieron en placas de agar con su respectivo antibiótico a 4°C hasta por mes y medio. Para almacenamientos a largo plazo, se guardaron 500 ul de un cultivo saturado en viales con medio y 15% de glicerol a -70°C.

## **2.2 Métodos genéticos**

### **2.2.1 Mutagénesis**

#### **2.2.1.1 Mutagénesis por inserción de un elemento transponible**

Uno de los métodos más utilizados en genética molecular en la obtención de mutantes, es la mutagénesis mediante el uso de elementos transponibles que se insertan al azar en el cromosoma, ocasionando generalmente, la pérdida total de la función del gen en el cual se insertaron. En este trabajo se utilizaron los transposones mini-Tn10 ( $\lambda$ NK1323) y mini-Tn10 ( $\lambda$ NK1098) que confieren resistencia a tetraciclina. El método que se siguió se basa en el protocolo descrito por Kleckner y colaboradores (4). La selección de mutantes se llevó a cabo aeróbicamente en un medio selectivo y la detección del fenotipo de las mutantes se realizó mediante ensayos de formación de biofilm en placas de microtitulación.

#### **2.2.1.2 Preparación del lisado con fago $\lambda$ NK**

## Protocolo

- 1) Crecer un cultivo a saturación de la cepa C600 (ésta contiene una mutación en el supresor *supE* que permite insertar glutamina en los codones de término tipo ámbar) a 37°C, 225 rpm (7 X g) en medio LB.
- 2) Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm (11 000 X g) por 5 min y resuspender en la mitad del volumen inicial de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
- 3) Mezclar 50 µl de células con 50 µl del lisado de fagos.
- 4) Incubar 10 min a TA.
- 5) Agregar 2 ml de LB MgSO<sub>4</sub> 10 mM precalentado a 37°C.
- 6) Incubar de 2-4 h a 37°C, 225 rpm (7 X g)
- 7) Una vez que el cultivo se lise agregar 2 gotas de cloroformo.
- 8) Colectar los restos celulares por centrifugación.
- 9) Remover el sobrenadante y transferir a un tubo nuevo, agregar 2 gotas de cloroformo.
- 10) Almacenar el lisado a 4°C.

### **2.2.1.3 Inserción de transposones mini-Tn10**

## Protocolo

- 1) Crecer un cultivo a saturación de la cepa W3110 a 37°C, 225 rpm (7 X g) en medio LB.

- 2) Colectar las células por centrifugación a 13,000 rpm (11 000 X g) por 5 min y resuspender en la mitad del volumen inicial de MgSO<sub>4</sub> 10 mM y CaCl<sub>2</sub> 5 mM.
- 3) Mezclar 100 µl de células con 100 µl del lisado de fagos.
- 4) Incubar 10 min a TA.
- 5) Agregar 1-2 ml de LB MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- 6) Incubar a 37°C sin agitación por 1 h.
- 7) Platear diluciones seriales en medio selectivo.
- 8) Incubar a 37°C.

### **2.2.2 Transducción generalizada mediante fago P<sub>1vir</sub>**

La transducción es un proceso por el cual se transfiere material genético de una cepa a otra utilizando como vehículo de entrega a bacteriófagos. En este trabajo se utilizó el bacteriófago P<sub>1vir</sub> que es una variedad del fago P1<sub>vir</sub> que no puede formar lisógenos.

#### **2.2.2.1 Preparación de lisados**

##### **Protocolo**

- 1) Crecer un cultivo saturado de la cepa donadora a 37°C, 225 rpm (7 X g) en medio LB suplementado con CaCl<sub>2</sub> 5 mM más el antibiótico correspondiente.

- 2) Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm (11 000 X g) por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender el pellet en la mitad del volumen inicial de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.
- 4) Mezclar 200 µl de células con 200 µl de bacteriófago P<sub>1vir</sub>, usar como control células sin fago.
- 5) Incubar a 37°C sin agitación por 20 min.
- 6) Agregar 2-3 ml de LB suplementado con CaCl<sub>2</sub> 5 mM y agitar con vortex.
- 7) Incubar a 37°C, 225 rpm (7 X g) por 2-4 h, hasta observar que el cultivo con fagos se clarifica mientras que el cultivo control llega a saturación.
- 8) Remover los restos celulares por centrifugación a 13,000 rpm (11 000 X g) por 5 min. Transferir el sobrenadante a un tubo nuevo.
- 9) Repetir el paso 8.
- 10) Adicionar al sobrenadante 2 gotas de cloroformo y agitar con vortex.  
Almacenar los lisados a 4°C.

#### **2.2.2.2 Transducción al genoma .**

##### Protocolo

- 1) Crecer un cultivo saturado de la cepa receptora a 37°C, 225 rpm (7 X g) en medio LB suplementado con CaCl<sub>2</sub> 5 mM más el antibiótico correspondiente.
- 2) Centrifugar el cultivo a 13,000 rpm (11 000 X g) por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 3) Resuspender el pellet en la mitad del volumen inicial de MgSO<sub>4</sub> 10 mM.

- 4) Diluir los lisados obtenidos con el protocolo 2.2.2.1. a diferentes diluciones de  $10^0$  a  $10^{-4}$ , en  $\text{MgSO}_4$  10 mM.
- 5) Mezclar 100  $\mu\text{l}$  de células con 100  $\mu\text{l}$  del lisado a diferentes diluciones.
- 6) Utilizar como controles muestras de sólo células y sólo fagos, para observar que las células receptoras no sean resistentes a antibiótico y que los lisados no contengan células.
- 7) Incubar a  $37^\circ\text{C}$  por 20 min.
- 8) Centrifugar a 13,000 rpm por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 9) Resuspender en LB, repetir paso 8.
- 10) Repetir el paso 9.
- 11) Agregar 1 ml de LB e incubar a  $37^\circ\text{C}$ , 225 rpm (7 X g) por 1-2 h.
- 12) Centrifugar a 13,000 rpm (11 000 X g) por 5 min y descartar el sobrenadante.
- 13) Resuspender el pellet en 80  $\mu\text{l}$  de  $\text{MgSO}_4$  10 mM.
- 14) Platear en medio selectivo.

## **2.2.3 Manipulación y análisis de ADN**

### **2.2.3.1. Obtención de ADN genómico**

La purificación del ADN genómico se llevó a cabo siguiendo el método de extracción por fenol-cloroformo, como se describe a continuación:



- 1) Inocular un cultivo de la cepa requerida en 50 ml de LB e incubar a 37°C con agitación.
- 2) Colectar las células a una  $DO_{600nm}$  entre 0.8 a 1.0.
- 3) Resuspender en 10 ml de solución amortiguadora TE (Tris-HCl 25 mM pH 8.0, EDTA 1 mM).
- 4) Adicionar 10 mg de lisozima e incubar 15 min a 30°C.
- 5) Adicionar 1 ml de SDS al 20%, mezclar por 15 seg usando una pipeta. La solución se verá viscosa.
- 6) Adicionar 10 ml de fenol (saturado con solución amortiguadora TE, tomar la fase oleosa) y 1.5 ml de NaCl 5 M. Invertir el tubo rápidamente a TA por 20 min.
- 7) Separar las fases por centrifugación a 5000 rpm (1 700 X g) durante 10 min.
- 8) Remover la fase superior con una pipeta despuntada y transferirla a un tubo limpio.
- 9) Adicionar 1 volumen de una mezcla fenol:cloroformo (1:1) y mezclar invirtiendo el tubo por 10 min.
- 10) Repetir los pasos 7 y 8.
- 11) Adicionar 1 volumen de cloroformo y mezclar invirtiendo durante 10 min.
- 12) Repetir los pasos 7 y 8.
- 13) Adicionar 1 volumen de isopropanol (agregar el isopropanol de tal manera que escurra por las paredes del tubo, se forman dos fases)

- 14) Mezclar suavemente la interfase utilizando una varilla de vidrio para recoger el ADN en forma de fibras.
- 15) Lavar el ADN en etanol 70% frío.
- 16) Secar el ADN a TA.
- 17) Resuspender el ADN en 1 ml de buffer TE, hasta disolver totalmente.
- 18) Adicionar RNasa a una concentración final de 20  $\mu\text{g/ml}$  e incubar a 50°C por 1 h.
- 19) Adicionar Proteinasa K a una concentración final de 100  $\mu\text{g/ml}$ . Incubar a 37°C por 1 h.
- 20) Adicionar buffer TE para ajustar el volumen a 5 ml.
- 21) Adicionar 1 volumen de fenol: cloroformo (1:1). Mezclar invirtiendo por 10 min.
- 22) Centrifugar y recuperar la fase superior.
- 23) Adicionar 1 volumen de cloroformo. Mezclar invirtiendo por 10 min.
- 24) Centrifugar y recuperar la fase superior.
- 25) Repetir los pasos 13, 14, 15, 16 y 17.
- 26) ADN listo para corte enzimático.

### **2.2.3.2 Manipulación enzimática del DNA**

#### **2.2.3.3 Endonucleasas de restricción**

Las endonucleasas de restricción son enzimas purificadas a partir de levaduras o bacterias, estas cortan el DNA de cadena doble mediante la hidrólisis de enlaces fosfodiéster, generando extremos 3'-OH y 5'-fosfato. La secuencia de reconocimiento generalmente es palindrómica y varía en tamaño de acuerdo a la enzima utilizada. Si el sitio de corte coincide en ambas cadenas, se generan extremos romos, mientras que si el sitio de corte no coincide en ambas cadenas se generan extremos cohesivos.

Dado que los sitios de restricción en una molécula de DNA son conservados, se puede obtener un patrón de restricción definido. Esto permite obtener mapas de restricción característicos de cada molécula. El uso de las enzimas de restricción utilizadas en este trabajo, se llevó a cabo siguiendo las indicaciones del fabricante. Los productos de digestión se purificaron siguiendo el protocolo de Purificación de productos de PCR de QIAGEN™ "*QIAquick PCR Purification Kit*".

#### **2.2.3.4 Secuenciación del DNA.**

Se utilizó el servicio de secuenciación automatizada de DNA del Instituto de Investigaciones Biomédicas. Empleando el Secuenciador ABI PRISM 310 Genetic Analyzer PE Applied Biosystems, basado en un sistema automatizado de electroforesis capilar, con una capacidad de lectura de 400-600 pb. Para este proceso se utilizaron los oligonucleótidos 515FLP y 1492RLP, cuya secuencia se describen en la Tabla 7.

### **2.2.3.5 Resolución y purificación de fragmentos de DNA**

#### **2.2.3.5.1 Separación de fragmentos de DNA en gel de agarosa**

La electroforesis en gel de agarosa es un método que permite la separación de fragmentos de DNA de acuerdo a su tamaño. La detección del DNA se realizó por visualización con bromuro de etidio, que es una molécula plana que se intercala entre las bases del DNA y que emite fluorescencia al ser irradiada con luz UV. El peso molecular de los fragmentos analizados se determinó por comparación con un marcador de fragmentos de DNA con pesos conocidos. Se utilizó el marcador de 1 kb de Invitrogen que contiene 12 fragmentos que van de 1,018 a 12,216 pb.

#### Protocolo

- 1) Pesar la agarosa necesaria para obtener una concentración final de 1%.
- 2) Disolver la agarosa por calor en solución amortiguadora TBE 1x (Trizma base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 10 mM pH 8.3).
- 3) Añadir la agarosa disuelta a un conformador de geles sin olvidar colocar el peine para formar los pozos en el gel. Permitir que gelifique.
- 4) Preparar las muestras de DNA diluyendo en H<sub>2</sub>O desionizada y solución amortiguadora de carga 6x (EDTA 1 mM, azul de bromofenol 0.25%, xilen cianol 0.25% y glicerol 30% en agua destilada) a una concentración final 1x.

- 5) Montar el gel en la cámara de electroforesis (sistema de Bio-Rad subcell GT™) utilizando solución amortiguadora TBE 1 x (Trizma base 90 mM, ácido bórico 90 mM, EDTA 10 mM pH 8.3).
- 6) Realizar la electroforesis a un voltaje constante (100 V por 45 min)
- 7) Teñir el gel en una solución de bromuro de etidio 5 µg/ ml.
- 8) Observar la separación de los fragmentos de DNA en el gel utilizando un transiluminador (Hoefler).
- 9) Las imágenes se capturaron utilizando una cámara digital DC290 ZOOM (KODAK) y se manipularon con el programa 1D versión 3.5.4.

#### **2.2.3.5.2 Purificación de fragmentos de DNA en solución**

Para limpiar los fragmentos de DNA o plásmidos digeridos de enzimas y otros reactivos que pudiesen afectar pasos subsecuentes en su manipulación, los productos de digestión fueron purificados mediante el "*QIAquick PCR Purification Kit*". Este protocolo se basa en la purificación de fragmentos de DNA de cadena sencilla o doble, provenientes de reacciones de PCR u otras reacciones enzimáticas. Mediante este método se puede purificar fragmentos de 100 pb a 10 kb por adsorción a una resina de DEAE a cierta concentración de sales y pH. Se siguieron las instrucciones del fabricante.

## Protocolo

- 1) Agregar 5 volúmenes de solución amortiguadora PB a 1 volumen de la muestra de PCR o producto de digestión y mezclar.
- 2) Colocar una columna QIAquick en un tubo de recolección de 2 ml.
- 3) Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar de 30 a 60 seg, para unir el DNA.
- 4) Descartar el flujo. Colocar la columna QIAquick en el tubo de recolección.
- 5) Lavar la columna con 750  $\mu$ l de solución amortiguadora PE y centrifugar de 30 a 60 seg.
- 6) Descartar el flujo, colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección. Centrifugar por 1 min a máxima velocidad.
- 7) Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.
- 8) Para eluir, agregar 50  $\mu$ l de solución amortiguadora EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) o H<sub>2</sub>O destilada al centro de la membrana y centrifugar por 1 min.

### **2.2.3.5.3 Purificación de fragmentos de DNA a partir de gel de agarosa**

Este proceso se llevó a cabo usando el estuche comercial “*QIAquick Gel Extraction Kit*” de QIAGEN. El método se basa en el mismo principio que el

protocolo para purificación de fragmentos de DNA en solución. Este protocolo esta diseñado para extraer y purificar DNA de 70 pb a 10 kb.

#### Protocolo

- 1) Tomar el fragmento de DNA del gel de agarosa utilizando una espátula.
- 2) Pesar el fragmento de agarosa en un tubo de centrifuga. Agregar 3 volúmenes de solución amortiguadora QG a 1 volumen del gel (100 mg ~ 100  $\mu$ l)
- 3) Incubar a 50°C por 10 min (hasta que el gel se haya disuelto por completo). Para facilitar el proceso mezclar con vortex cada 2 o 3 min durante la incubación.
- 4) Una vez que el gel se disuelva por completo, verificar que el color de la mezcla sea amarillo (similar a la solución amortiguadora QG sin agarosa disuelta).
- 5) Agregar el mismo volumen que el peso del gel de isopropanol y mezclar.
- 6) Colocar una columna QIAquick en un tubo de recolección.
- 7) Aplicar la muestra a la columna QIAquick y centrifugar por 1 min, para unir el DNA.
- 8) Descartar el flujo. Colocar la columna QIAquick en el tubo de recolección.
- 9) Lavar la columna con 500  $\mu$ l de solución amortiguadora QG y centrifugar por 1 min.

- 10) Lavar la columna con 750  $\mu$ l de solución amortiguadora PE y centrifugar por 1 min.
- 11) Descartar el flujo, colocar la columna nuevamente en el tubo de recolección. Centrifugar por 1 min a máxima velocidad.
- 12) Colocar la columna en un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml limpio.
- 13) Para eluir, agregar 50  $\mu$ l de solución EB (10 mM Tris-HCl pH 8.5) o H<sub>2</sub>O al centro de la membrana y centrifugar por 1 min.

## **2.3 Métodos bioquímicos.**

### **2.3.1 Análisis de DNA por hibridación tipo Southern.**

El ADN es digerido y los fragmentos son separados por tamaño en un gel de agarosa. El ADN es desnaturalizado y transferido del gel a una membrana de nylon. Una vez en la membrana, el ADN se hibrida a una sonda acoplada a un sistema de detección. La sonda es una secuencia de nucleótidos complementaria a una secuencia en el ADN cromosomal.

Se siguió el protocolo descrito por la casa comercial Amersham Pharmacia Biotech y se usó el estuche "*ECL direct nucleic acid labelling and detection system*", que se basa en un ensayo de quimioluminiscencia. El protocolo se detalla a continuación.



### **2.3.1.1 Procesamiento del gel de agarosa**

Previa digestión del ADN de la muestra a analizar y separación de los fragmentos en un gel de agarosa por electroforesis, se toma una fotografía del gel usando un transiluminador de luz UV, colocando una regla fluorescente a lo largo del gel, de manera que el cm 0 coincida con el inicio de los pozos.

#### Protocolo

- 1) Colocar el gel en un recipiente y cubrirlo con solución depurinizadora (HCl 250 mM).
- 2) Incubar en agitación de 10 a 12 min, hasta que el azul de bromofenol del frente de corrida torne a amarillo.
- 3) Decantar la solución depurinizadora y enjuagar el gel con agua bidestilada.
- 4) Cubrir el gel con solución desnaturalizadora (NaCl 1.5 M, NaOH 0.5 M) e incubar en agitación por 25 min hasta que el azul de bromofenol torne a azul.
- 5) Decantar la solución y enjuagar con agua bidestilada.
- 6) Cubrir con solución neutralizadora (NaCl 1.5 M, Tris-HCl 0.5 M, ajustar pH a 7.5) y agitar. Si se usa la membrana Hybond™ N<sup>+</sup>, agitar por 30 min.

### **2.3.1.2 Transferencia de ADN a la membrana**

## Protocolo

- 1) Montar un dispositivo como se indica en la Fig. 2.1. Usar pinzas y guantes al manipular la membrana. Evitar que se formen burbujas entre la membrana de nitrocelulosa y el gel. Usar solución amortiguadora SSC 20x (Citrato  $\text{Na}_3$  0.3 M, NaCl 3 M, pH 7.0) Incubar de 12-15 h.
- 2) Desmantelar el dispositivo y remover la membrana y el gel juntos. Marcar los carriles en la membrana y colocarla sobre papel Whatman 3MM.
- 3) Observar el gel con el transiluminador para verificar que el DNA ha sido transferido.
- 4) Colocar la membrana sobre una hoja de papel Whatman 3MM (con la cara que contiene el ADN hacia arriba), fijar el ADN a la membrana con luz UV a 120 mJ (UV1800 Stratalinker, Stratagene).
- 5) Preparar la solución amortiguadora de hibridación (*ECL Gold Hybridization Buffer*, preparar siguiendo instrucciones del fabricante), se requieren 0.25 ml por cada  $\text{cm}^2$  de la base del recipiente en el que se llevará a cabo la hibridación.
- 6) Incubar la membrana con solución amortiguadora de hibridación (previamente calentado a  $42^\circ\text{C}$ ) por 1 h a  $42^\circ\text{C}$ .

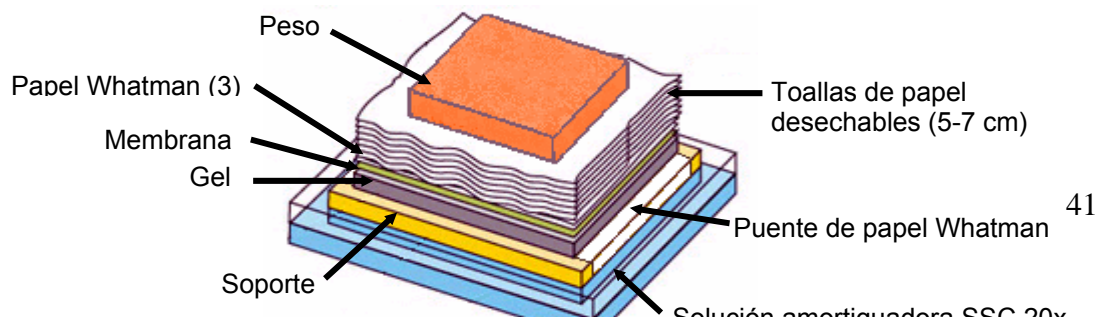


Fig. 6. Transferencia de ADN a una membrana de nitrocelulosa por capilaridad.

### 2.3.1.3 Marcado de la sonda

El ADN que fue utilizado como sonda, se obtuvo mediante amplificación del fragmento requerido del ADN del plásmido pACyC184 que contiene un cassette de tetraciclina. Los fragmentos de ADN fueron purificados mediante “*QIAquick PCR Purification Kit*”.

#### Protocolo

- 1) Ajustar la concentración del ADN usado como sonda a 10 ng/ $\mu$ l.
- 2) Desnaturalizar 100 ng de ADN por calentamiento a 100°C en un baño de agua hirviendo por 5 min.
- 3) Incubar en hielo inmediatamente por 5 min y centrifugar por 10 seg para colectar todo el contenido en el fondo del tubo
- 4) Agregar 1 volumen del agente de marcaje (estuche ECL, este contiene peroxidasa en complejos con carga positiva). Resuspender con micropipeta y centrifugar por 10 seg.

- 5) Agregar la mitad del volumen de solución glutaraldehído, mezclar y centrifugar para coleccionar el contenido. De esta forma la proporción ADN:agente de marcaje:glutaraldehido es 1:1:1.
- 6) Incubar 10 min a 37°C. Cuando se usan ácidos nucleicos menores a 300 pb, el tiempo de incubación debe aumentarse a 20 min.
- 7) Usar de inmediato o incubar en hielo por máximo 15 min.

#### **2.3.1.4 Hibridación y lavado de la membrana**

- 1) Agregar la prueba marcada por las paredes del recipiente en el que se colocó la membrana con la solución amortiguadora de hibridación. No añadir la sonda directamente sobre la membrana. Incubar a 42°C toda la noche.
- 2) Precalentar la solución amortiguadora primario de lavado a 55°C (SDS 0.4%, SSC 0.5x (Citrato de Na<sub>3</sub> 0.3M, NaCl 3M, ajustado a pH 7.0).
- 3) Colocar las membranas en un recipiente con solución amortiguadora primaria de lavado en un volumen de 2-5 ml/cm<sup>2</sup> de la membrana.
- 4) Incubar por no más de 10 min a 55°C.
- 5) Retirar la solución amortiguadora y repetir el lavado.
- 6) Colocar la membrana en un contenedor limpio y agregar solución amortiguadora secundaria de lavado en exceso (SSC 2x).
- 7) Incubar 5 min a TA. Retirar la solución amortiguadora y repetir el lavado.

### **2.3.1.5 Generación y detección de la señal luminosa**

#### Protocolo

- 1) Mezclar volúmenes iguales del reactivo de detección 1 (contiene peróxido) con el reactivo de detección 2 (luminol) en suficiente volumen para cubrir la membrana (aprox. 0.125 ml/cm<sup>2</sup>). Preparar al momento.
- 2) Eliminar el exceso de solución amortiguadora secundaria en la membrana con papel Whatman 3MM.
- 3) Colocar la membrana en un recipiente limpio, manteniendo la cara que contiene el ADN hacia arriba.
- 4) Agregar el reactivo de detección directamente sobre la membrana e incubar por 1 min a TA. La reacción que ocurre al mezclar los agentes de detección ocasiona la reducción de peróxido por peroxidasa, la cual provoca la oxidación del luminol y consecuentemente la producción de luz azul.
- 5) Colocar la membrana escurrida entre 2 acetatos al tamaño del cassette de autoradiografía utilizado, con la cara que contiene el ADN hacia arriba. Trabajar tan rápido como sea posible.
- 6) Colocar una película autoradiográfica sobre los acetatos que contienen la membrana en un cuarto oscuro. Se usó la película Hyperfilm-ECL™ que es sensible a luz azul.
- 7) Incubar toda la noche y revelar.

### 2.3.1.6 Revelado de película autoradiográfica

Las soluciones de revelado y fijadora KODAK se usaron bajo las instrucciones del fabricante.

Protocolo

- 1) Colocar la película en un recipiente con solución reveladora e incubar hasta que comiencen a aparecer bandas oscuras, agitar durante la incubación.
- 2) Lavar la película con agua.
- 3) Incubar en solución fijadora por 5 min.

## 2.4 Otros Ensayos

### 2.4.1 Ensayo de biopanning

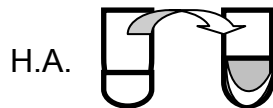
Ensayo para determinar cuantas incubaciones con hidroxapatita(H.A.), son necesarias para no observar unidades formadoras de colonias en la cepa parental.

Protocolo

- 1) Hacer un overnight (ON) de las cepa W3110 en LB-MOPS pH 7.0
- 2) Centrifugar a 14,000 rpm (13 000 X g) 5 min 2 tubos de cada cepa (uno control sin H.A.).
- 3) Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular de uno de los tubos en 500µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM (M.D.).

500µl MD      Con H.A.       Sin H.A. 

- 4) Agregar 0.01% de Hidroxapatita a un tubo eppendorf (anterior)



- 5) Incubar 10min a 37° C a 1,300 rpm (110 X g) (en termomixer).
- 6) Dejar 5min sin agitación.
- 7) Recuperar el sobrenadante y centrifugar a 14,000 rpm (13 000 X g) 5min.
- 8) Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 500µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM (M.D.), la otra pastilla celular resuspender en 500µl de LB MOPS 100mM pH 7.0. (igual que 3)
- 9) Hacer diluciones 10<sup>-4</sup> 10<sup>-6</sup> con MgSO<sub>4</sub> 10mM (MD), a partir de lo obtenido.
- 10) Platear 80 µl en cajas L1 (W3110 con y sin HA).
- 11) Agregar a 0.01% de Hidroxiapatita al sobrenadante recuperado en un tubo de eppendorf (2<sup>do</sup>)
- 12) Incubar 10min a 37° C a 1,300 rpm (110 X g) (en termomixer).
- 13) Dejar 5 min sin agitación.
- 14) Recuperar el sobrenadante y centrifugar a 14,000 rpm (13 000 X g)5min.
- 15) Decantar el sobrenadante y resuspender la pastilla celular en 500µl de MgSO<sub>4</sub> 10 mM (M.D.), la otra pastilla celular resuspender en 500µl de LB MOPS 100mM pH 7.0 (igual que el paso 8).
- 16) Hacer diluciones 10<sup>-4</sup> 10<sup>-6</sup> con MgSO<sub>4</sub> 10mM (MD), a partir de lo obtenido.

- 17) Platear 80  $\mu$ l en cajas L1 (W3110 con y sin H.A.).
- 18) Agregar a 0.01% de hidroxiapatita al sobrenadante recuperado en un tubo eppendorf (3<sup>ro</sup> )
- 19) Incubar 10 min a 37°C a 1300 rpm (110 X g) (en termomixer).
- 20) Dejar 5 min sin agitación.
- 21) Recuperar el sobrenadante y hacer diluciones  $10^{-4}$   $10^{-6}$  con MgSO<sub>4</sub> 10mM (MD), a partir de lo obtenido.
- 22) Platear 80  $\mu$ l en cajas L1 (W3110) y repetir desde paso 18 hasta completar 15 incubaciones con H.A.

## **2.4.2 Ensayos de formación de biofilm**

### **2.4.2.1. Condiciones de Crecimiento**

Para los ensayos de formación de biofilm se utilizó el método descrito por O'Toole y Kolter con ciertas modificaciones (8, 9).

- 1) Diluir un cultivo saturado de la cepa W3110 a una DO<sub>600nm</sub> de 0.1 en LB suplementado con MOPS 100 mM pH 7.0.
- 2) Inocular 150  $\mu$ l por pozo en placas de cloruro de polivinilo (PVC, 96-*well vinyl assay plates* de fondo redondo, Costar, Cambridge MA)
- 3) Incubar a 37°C en presencia de oxígeno. Colocar las placas de microtitulación en cajas plásticas en un ambiente húmedo para prevenir la evaporación.



#### **2.4.2.2 Detección y cuantificación del biofilm mediante tinción con cristal violeta.**

##### Protocolo

- 1) Después del tiempo de incubación indicado, lavar los pozos 3 veces con agua para remover las células que no se adhirieron.
- 2) Detectar el biofilm formado mediante una tinción con cristal violeta al 1.0% e incubar por 20 min.
- 3) Lavar los pozos con H<sub>2</sub>O para remover el cristal violeta no adherido a superficies bióticas.
- 4) Cuantificar la cantidad de biofilm formado en cada pozo posterior al secado del H<sub>2</sub>O.
- 5) La cantidad de biofilm formado se observa como un anillo de coloración azul, en donde la ausencia de este anillo indica la no formación de biofilm.

#### **2.4.3 Ensayos de nado.**

Los ensayos de nado se llevaron a cabo en placas de agar suave (agar, 0.3%; triptona, 1.3% y NaCl, 0.7%). Se utilizó un cultivo saturado de la cepa a analizar, se inocularon 2 µl del cultivo en una placa de agar suave y se incubó por 8 h

aeróbicamente a 30°C. Las células que nadan forman un halo alrededor del punto de inoculación.

#### **2.4.4 Ensayos de unión a rojo congo.**

Los ensayos de unión a rojo congo se llevan a cabo en cajas de agar LRC (triptona 1%, Extracto de levadura 0.5%, agar 2%, rojo congo 40µg/ml, azul de Coomassie 20µg/ml). Se estriaron los controles: las cepas MC4100 color café indica unión a fimbria, TOB1 color rojo indica unión a fimbria y celulosa, W3110 color rosa indica unión a celulosa), en la misma caja se estrió a la mutante y a las transductantes.

### **3.1. Búsqueda de una mutante afectada en la adhesión a hidroxiapatita.**

*E. coli* es capaz de adherirse a hidroxiapatita como ya se describió anteriormente (3), posiblemente esto se deba a que el producto de un gen participe en este proceso de adhesión, si esto fuera cierto, entonces, al mutagenizar este gen, posiblemente se obtendrían mutantes que no se adhieran a hidroxiapatita. Para tratar de aislar una mutante que no se adhiriera a esta superficie, se siguió la estrategia de mutagénesis al azar utilizando elementos transponibles como se describe en el capítulo de Material y Métodos.

#### **3.1.1. Mutagénesis usando mini-transposones.**

La cepa W3110 fue mutagenizada al azar utilizando los minitransposones miniTn10 ( $\lambda$ NK1098) y miniTn10 ( $\lambda$ NK1323) reportados por Kleckner y colaboradores (Kleckner *et al.*, 1991), los cuales llevan consigo un cassette de resistencia a tetraciclina, por lo que la selección de las mutantes se llevó a cabo en medio sólido suplementado con tetraciclina 25  $\mu$ g/ml bajo condiciones aeróbicas. La selección de mutantes se llevó a cabo en medio selectivo con el antibiótico correspondiente.

### **3.2 Selección de las mutantes que no se adhirieron a hidroxiapatita (H.A.).**

La detección de mutantes que no se adhirieron a hidroxiapatita se realizó utilizando la metodología descrita en los ensayos de biopanning. En primer lugar se determinó cuantas incubaciones con hidroxiapatita serían necesarias para considerar que la

cepa parental se ha adherido en su totalidad cuantificando el número de unidades formadoras de colonias por mililitro de cultivo (CFU / ml), en placas de LB-agar, antes y después de incubar con hidroxiapatita. Por lo que después de observar la disminución de colonias posterior a 15 incubaciones, se consideró mutantes en adhesión a esta superficie a las colonias que se observaron posterior a este número de incubaciones.

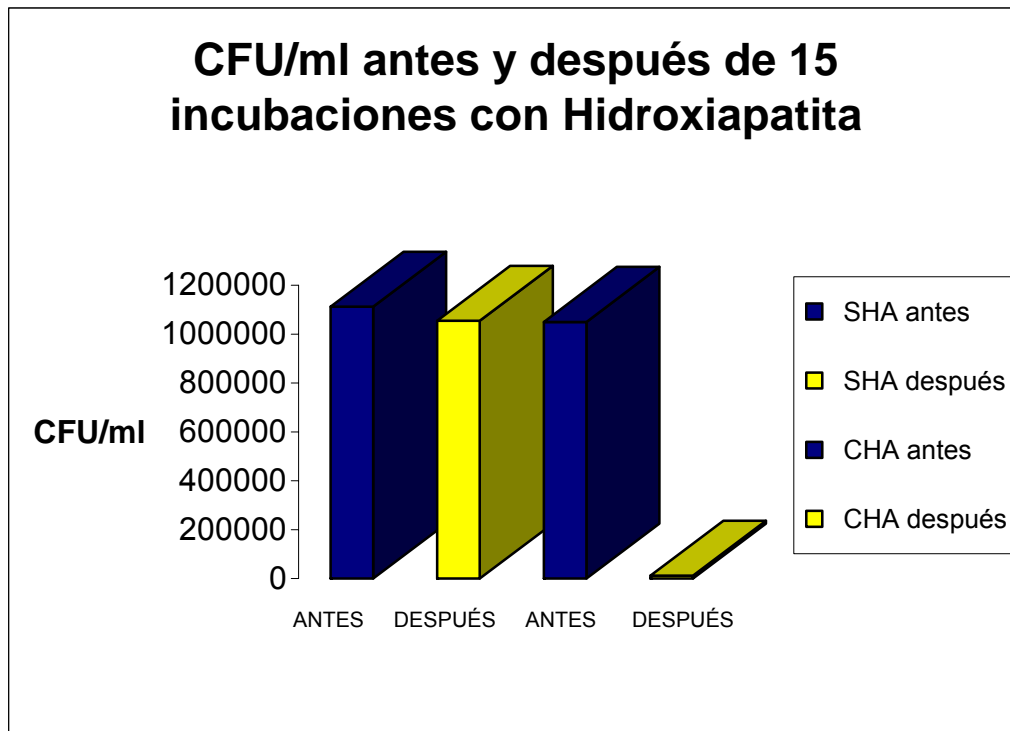


Fig. 7 En esta gráfica se observan las CFU / ml presentes en el sobrenadante de experimentos con la cepa parental a la cual no se le agregó hidroxiapatita (barras en azul) y antes y después de agregar H.A. (15 incubaciones, barras beige).

### 3.3 Formación de biofilm.

### 3.3.1 Ensayos de formación de biofilm.

Con el banco de mutantes obtenido de la mutagénesis al azar se realizó el mismo procedimiento considerando mutantes en adhesión a superficies de H.A., a aquellas que se observaron después de las 15 incubaciones con H.A.

Se analizó la capacidad de formar biofilm de las mutantes obtenidas por medio de la técnica de cristal violeta descrita en material y métodos para observar el fenotipo y realizar una primera selección.

Se seleccionaron 5 mutantes, 4 mutantes que perdieron la capacidad de formar biofilm aeróbicamente y no se adhirieron a HA y 1 de ellas la cual formaba una mayor cantidad de biofilm con respecto a la cepa parental (Fig.8).

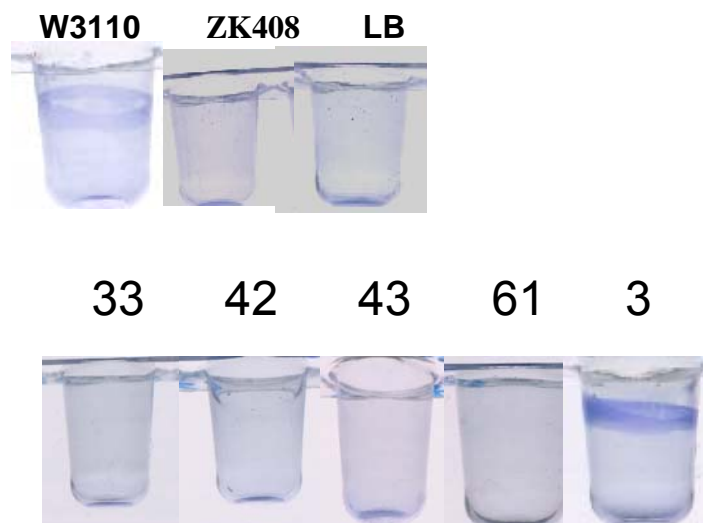


Fig.8. Utilizando la técnica de cristal violeta se identificó a las mutantes que presentaron diferencias en la formación de biofilm con respecto a la cepa parental W3110. La cepa ZK408 (*fhIC*, deficiente en la síntesis de flagelo y en la formación de biofilm) se utilizó como control negativo. En la parte inferior se muestran los pozos de cultivos de las mutantes 33, 42, 43, 61 las cuales no formaron biofilm y la mutante #3 en la cual se observa mayor formación de biofilm.

Como ya se mencionó en los antecedentes de este trabajo, la mayoría de las mutantes deficientes en la formación de biofilm hasta ahora reportadas están afectadas en síntesis de flagelo o motilidad (41), por lo que se realizaron ensayos de nado de estas mutantes.

### **3.4 Papel de la motilidad en la formación de biofilm**

Para determinar si la ausencia de biofilm en condiciones aeróbicas se debía a un defecto o capacidad diferente en motilidad, se realizaron ensayos de nado en placas de agar suave. Se inocularon 2  $\mu$ l de un cultivo saturado de la cepa W3110 sobre la placa de agar, se utilizó como control una cepa deficiente en síntesis de flagelo (ZK408). El nado se observa como un halo alrededor del punto de inoculación (Fig. 9).

### 3.4.1 Ensayo de nado de las mutantes que no se adhirieron a hidroxipatita.

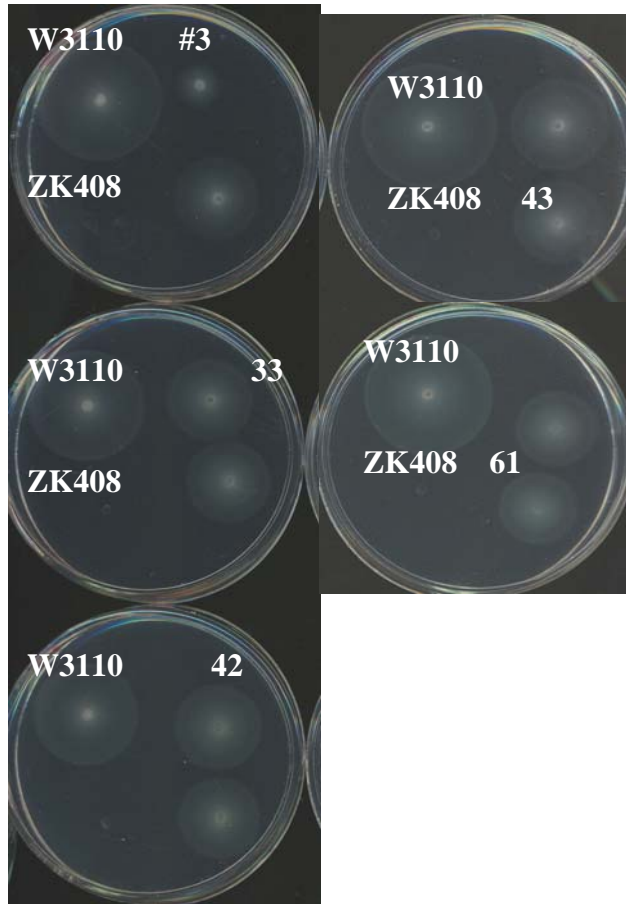


Fig. 9. Ensayos de motilidad en condiciones aeróbicas. Los cultivos saturados de la cepa parental W3110, ZK408 (*fhlC*; deficiente en nado) y de las cepas mutantes.

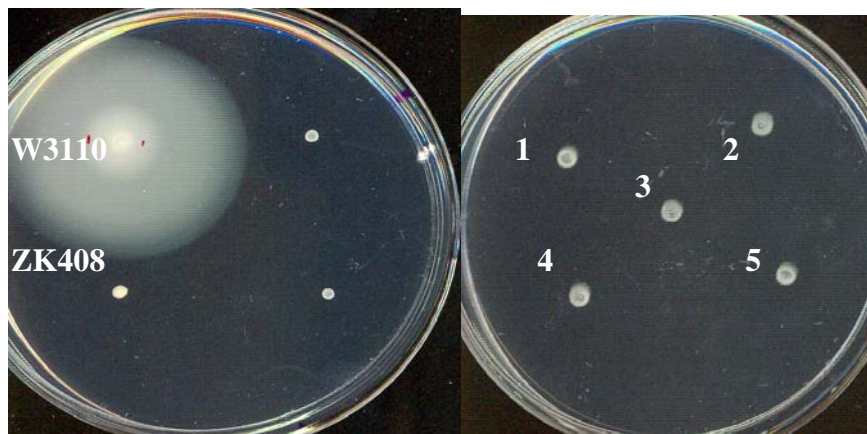


Fig. 10. Ensayos de motilidad en condiciones aeróbicas. Los cultivos saturados de variantes de la cepa parental W3110, ZK408 (*fhlC*) y de las cepas mutantes. Variantes de la cepa W3110 (1,2,3,4,5,) que no se adhirieron a la hidroxipatita.

### **3.5 Selección de la mutante 3 para su caracterización.**

En la figura 10 podemos observar la carencia de motilidad de cepas mutantes obtenidas después de 15 incubaciones con hidroxiapatita. Estas variantes parece perdieron la capacidad móvil, posiblemente por la fallas funcionales del flagelo o la carencia del mismo. Esto podría ser la razón por la estas variantes no se adhirieron a hidroxiapatita durante las incubaciones.

La mutante #3 que presentó una mayor formación de biofilm aeróbicamente a las 24h de incubación a 37°C en placas de microtitulación de PVC presentó una disminución de 5 veces en la motilidad a 30°C, indicándonos que la mutante podría estar afectada en un gen involucrado a la adherencia a hidroxiapatita, sin embargo, presenta características que indican que podrían estar relacionado otros factores que participan en la formación de biofilm en superficies de PVC. Por estas características se seleccionó a esta mutante para su caracterización fisiológica y genética.

### **3.6 Cinéticas de crecimiento y de formación de biofilm**

#### **3.6.1 Cinética de crecimiento de la cepa mutante y la cepa parental W3110 bajo condiciones aeróbicas**

Las cinéticas de crecimiento fueron realizadas como se describe en los métodos en medio LB-MOPS 100mM pH 7.0 a 37°C.

Para caracterizar a la mutante #3 y evaluar si la mutación pudiera estar afectando su velocidad de crecimiento, se llevaron a cabo curvas de crecimiento en medio LB – MOPS 100mM pH 7.0.



La mutante presentó un patrón de crecimiento similar a la de la cepa parental como se puede observar en la figura 11.

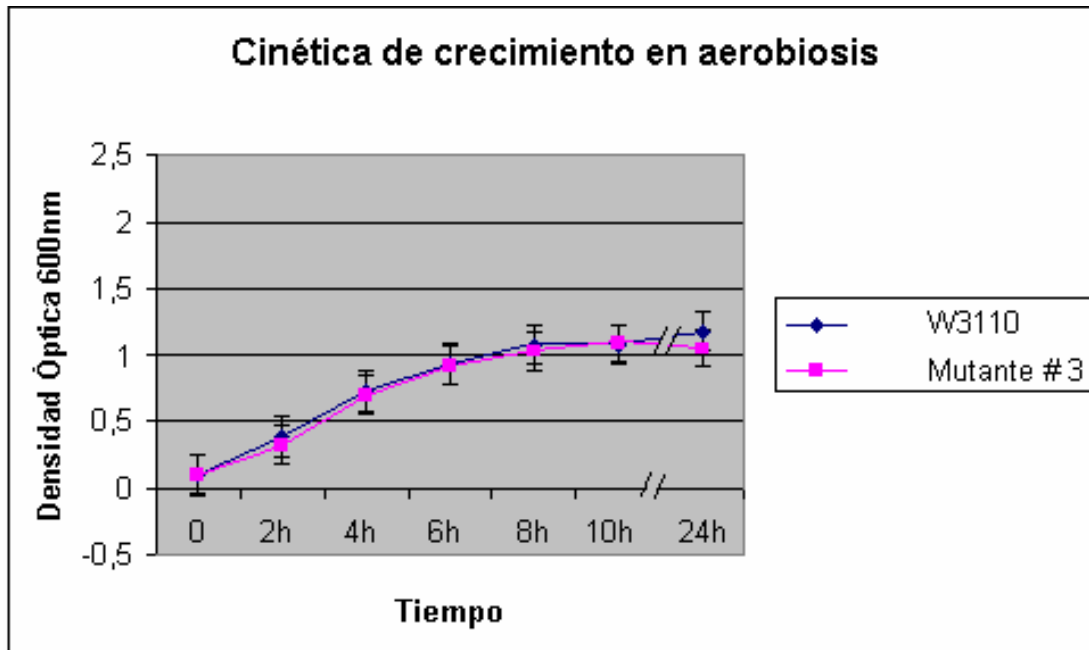


Fig. 11. Cinética de crecimiento en condiciones aeróbicas de la mutante #3 y la cepa parental W3110 en medio LB-MOPS 100mM pH 7.0 a 37°C.

### 3.6.2 Cinética de crecimiento en placas de microtitulación de PVC en aerobiosis.

Los ensayos de formación de biofilm se llevaron a cabo como se describe en material y métodos, se utilizó un cultivo de la cepa *E. coli* W3110 en medio LB suplementado con MOPS 100 mM pH 7.0 y se inocularon placas de microtitulación que se incubaron

a 37°C bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. Se cuantificó en intervalos de 2h durante 24h. Los datos obtenidos se muestran en la Fig. 12.

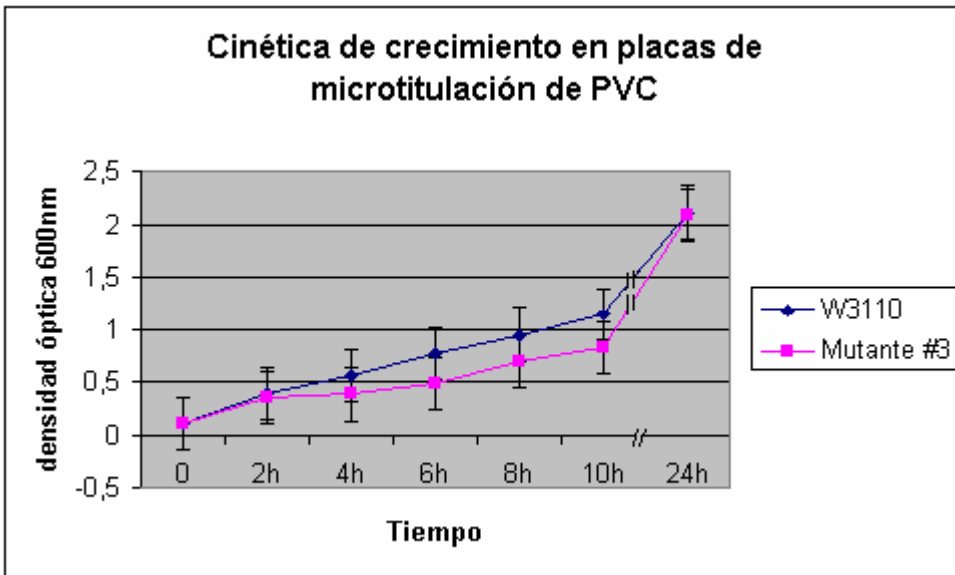


Fig.12. Cinética de crecimiento en placas de microtitulación de PVC en condiciones aeróbicas de la mutante #3 y la cepa parental W3110 en medio LB-MOPS 100mM pH 7.0 a 37°C. En la línea color azul la cepa W3110 y en la línea color rosa la mutante #3.

Al analizar la velocidad del crecimiento en diferentes tiempos de monitoreo, se observó un patrón de crecimiento similar entre la mutante #3, y la cepa parental W3110 en las placas de microtitulación.

### 3.6.6 Cinética de formación de biofilm en aerobiosis.

Los ensayos de formación de biofilm se llevaron a cabo como se describe en material y métodos, se utilizó un cultivo de la cepa *E. coli* W3110 en medio LB suplementado con MOPS 100mM pH 7.0 y se inocularon placas de microtitulación que se incubaron a 37°C bajo condiciones aeróbicas o anaeróbicas. La detección del

biofilm se llevó a cabo mediante la tinción con cristal violeta y la cantidad del biofilm formado se valoró cualitativamente al secarse los pozos después del lavado. Los datos obtenidos se muestran en la Fig.13.

W3110	3	W3110	3	W3110	3	W3110	3	W3110	3	W3110	3
2h		4h		6h		8h		10h		12h	



W3110	3	W3110	3
24h		48h	



Fig.13. Visualización de la cinética de formación de biofilm en diferentes tiempos de incubación de la cepa W3110 y la mutante 3 en medio LB-MOPS 100mM pH 7.0 a 37°C.

Como se puede observar en la figura 13, en condiciones aeróbicas el biofilm se forma como un anillo alrededor de la interfase aire-medio; estos resultados concuerdan con estudios previos. La cantidad de biofilm formado por la mutante #3, fue mayor que la de la cepa parental W3110, siendo esto más evidente a las 48h de incubación.

### 3.7. Transducción de la mutación a un fondo genético fresco.

Para determinar si la mutación causada por el transposón era la responsable del fenotipo observado se realizó la transducción de la mutación, a un fondo genético fresco utilizando el método del bacteriófago P<sub>1</sub>vir descrito en el capítulo de Material y Métodos. Todas las transductantes que se analizaron, como por ejemplo las cepas: JMH1755 (#5), JMH1756 (#6) y JMH1757 (#24), conservaron el fenotipo de mayor formación de biofilm y disminución en la capacidad de motilidad observado en la cepa mutante original, la mutante #3 (Figuras 14 y 15).

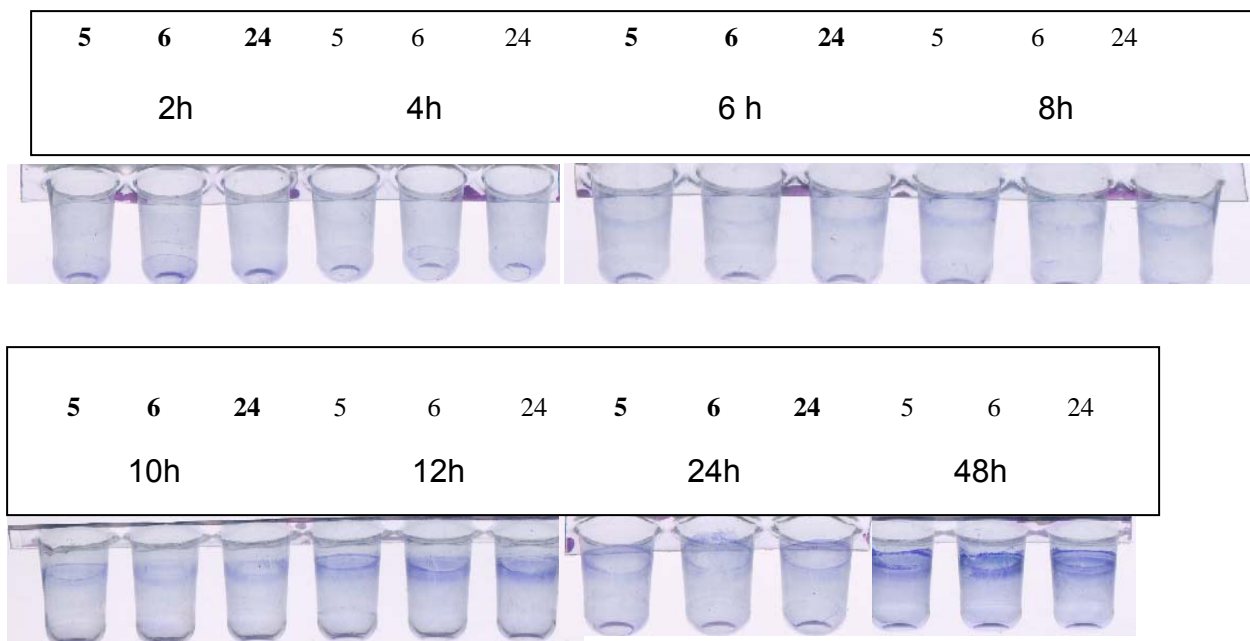


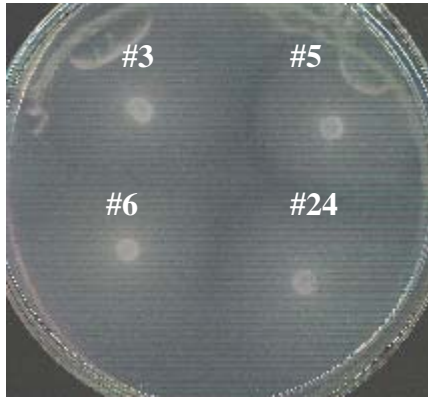
Figura 14. Cinética de formación de biofilm de cultivos de las transductantes (5, 6 y 24).

### 3.8 Cinética de motilidad

Se estudió la capacidad motil de las cepas transductantes 5, 6 y 24. Para observar si estas conservaban el fenotipo de motilidad de la mutante #3.



Fig. 15. Cinética de motilidad de las transductantes #5, #6 y #24 muestran un patrón similar al de a la cepa mutante #3.



Al transducir la mutación de la cepa #3 (JMH11754) a un fondo genético fresco, se observó que la mutación está ligada al fenotipo de disminución en la capacidad de nado y mayor formación de biofilm.

### **3.9 Ensayo de unión a rojo congo.**

Este ensayo fue realizado como se describe en la sección de métodos, en cajas suplementadas con rojo congo y azul de Coomassie.

En las placas de rojo congo se identifican componentes de la matriz extracelular, incluyendo a polisacáridos como la celulosa, así como a estructuras de membrana. En este ensayo se estriaron como controles: la cepa MC4100 la cual presenta la coloración café característica de fimbria, TOB1 la cual presenta la coloración café característica de fimbria y celulosa, y la cepa

W3110 que presenta una coloración rosa indicativa de la presencia de celulosa.

Los resultados se muestran en la tabla 8.

**Tabla 8.** Ensayo de unión a rojo congo.

Controles	Color	Característica
W3110	Rosa	Celulosa
TOB1	Rojo	Celulosa y fimbria
MC4100	Café	Fimbria
Mutante #3	Café	Fimbria
5 (transductante)	Café	Fimbria
6 (transductante)	Café	Fimbria
24(transductante)	Café	Fimbria

Estos resultados nos muestran la presencia de fimbria en la cepa mutante y en las transductantes, conservando estas el fenotipo de las mutantes, siendo esta característica diferente a la de la cepa parental W3110, la cual muestra unión a celulosa. Esto sugiere que tal vez fimbria sea una de las estructuras que permite la adherencia a la superficie de PVC, y que ésta estructura posiblemente no es suficiente para la adhesión a hidroxapatita.

### **3.10 Secuenciación del gen 16S rRNA de la mutante.**

Para identificar la identidad de la especie de la mutante y/o verificar que ésta fuera *E. coli* se purificó ADN cromosomal de la mutante para amplificar el

gen 16S rRNA por medio de PCR. Las secuencias de los oligos utilizados se encuentran en la tabla 7. Los resultados obtenidos de la amplificación del gen 16S rRNA se examinaron mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% y posteriormente visualizado al teñir con bromuro de etidio mediante luz UV. El fragmento resultante se purificó mediante el método de purificación descrito anteriormente en la sección de métodos (ver cromatograma, Fig. 17).

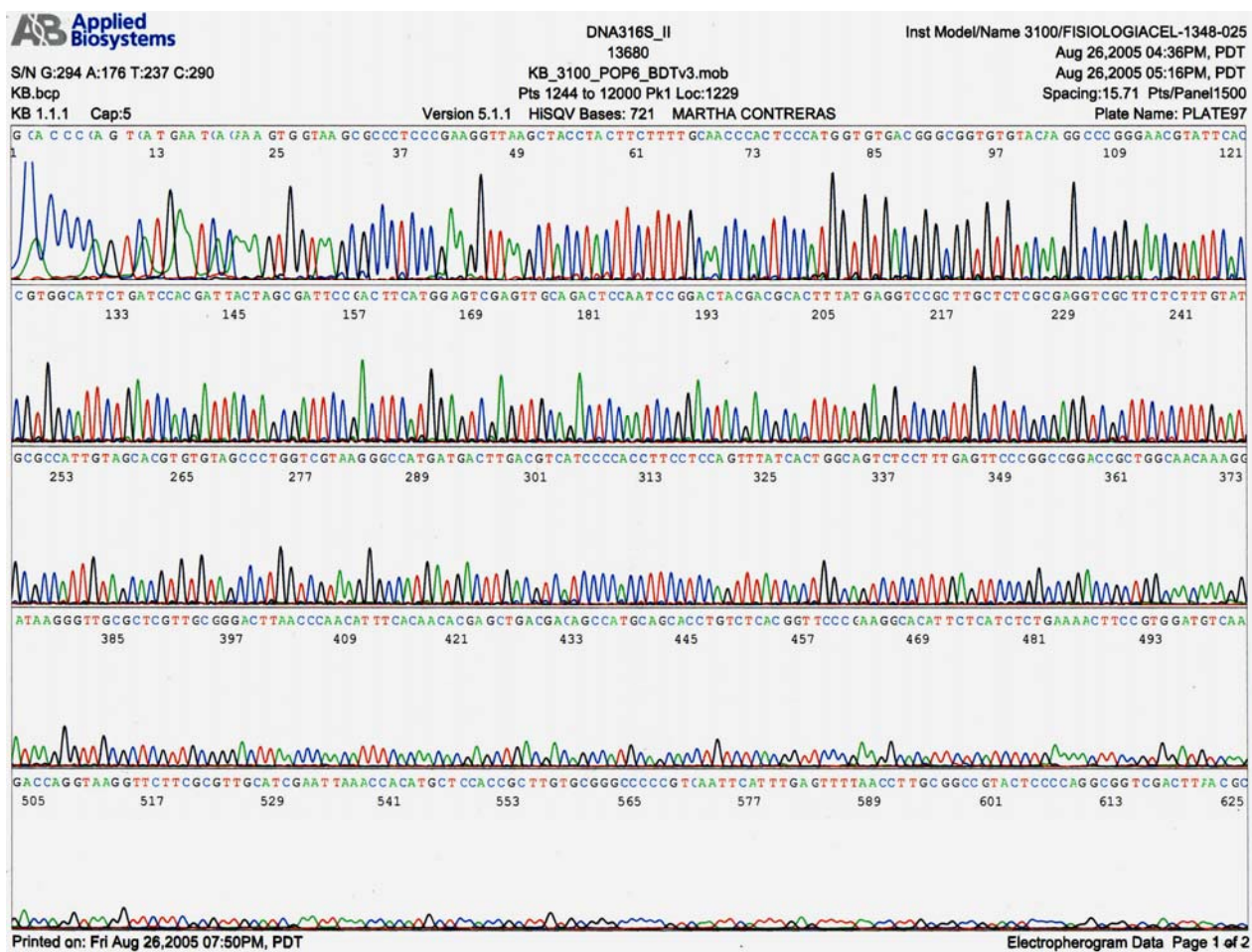


Fig. 17. Secuencia obtenida con el oligonucleótido 515FLP.

La secuencia obtenida fue la siguiente:

```
>13680 sequence exported from chromatogram file
GCACCCAGTCATGAATCACAAGTGGTAAGCGCCCTCCCGAAGGTTAAGCTACCTACTT
CTTTTGCAACCCACTCCCATGGTGTGACGGCGGTGTGTACAAGGCCCGGAACGTATTC
ACCGTGGCATTCTGATCCACGATTACTAGCGATTCCGACTTCATGGAGTCGAGTTGCAGA
```



CTCCAATCCGGACTACGACGCACTTTATGAGGTCCGCTTGCTCTCGCGAGGTCGCTTCTC  
 TTTGTATGCGCCATTGTAGCACGTGTGTAGCCCTGGTCGTAAGGGCCATGATGACTTGAC  
 GTCATCCCCACCTTCCCTCCAGTTTATCACTGGCAGTCTCCTTTGAGTTCCCGGCCGGACC  
 GCTGGCAACAAAGGATAAGGGTTGCGCTCGTTGCGGGACTTAACCCAACATTTCAACA  
 CGAGCTGACGACAGCCATGCAGCACCTGTCTCACGGTTCCCGAAGGCACATTTCTCATCTC  
 TGAAAACCTCCGTGGATGTCAAGACCAGGTAAGGTTCTTCGCGTTGCATCGAATTAACC  
 ACATGCTCCACCGCTTGTGCGGGCCCCCGTCAATTCATTTGAGTTTTAACCTTGCGGCCG  
 TACTCCCCAGGCGTTCGACTTAACGCGTTAGCTCCGGAAGCCACGCCTCAAGGGCACAAC  
 CTCCAAGTCGACATCGTTACgGGCGTGGnACTACCAnGGnTATCTAATCCTGTTTGCTC  
 CCCACGCTTTTCGCACCTGAGCGTCAGTCTTCGTCCAGGGGGnCG

Al analizar la secuencia obtenida mediante un BLAST (Basic Local Arrangement Tool) en la base de datos del NCBI, obtenida con el oligonucleótido 515FLP, se estableció que posee un 99% de identidad con la cepa MG1655, la cual es una de las cepas de *E. coli* K-12 cuyo genoma ha sido completamente secuenciado, la cual presenta identidad con la cepa W3110.

### 3.10.1 Alineamiento tipo BLAST.

Fig. 18 Alineamientos de la secuencia en BLAST del NCBI.

Score	E		(Bits)	Value
Sequences producing significant alignments:				
<a href="#">gi 55607457</a>	<a href="#">gb AY804014.1</a>	Escherichia coli strain T10 16S ri...	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 48994873</a>	<a href="#">gb U00096.2</a>	Escherichia coli K-12 MG1655 complete g	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 21591410</a>	<a href="#">gb AF403733.1</a>	Escherichia coli C2 16S ribosomal RNA	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 47118301</a>	<a href="#">dbj BA000007.2</a>	Escherichia coli O157:H7 DNA, comple	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 2073407</a>	<a href="#">emb V00348.1</a>	<a href="#">ECRRNBZ</a> E. coli ribosomal operon rrnB...	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 26111017</a>	<a href="#">gb AE016770.1</a>	Escherichia coli CFT073 section 16 of	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 7110561</a>	<a href="#">gb AF233451.1</a>	<a href="#">AF233451</a> Escherichia coli 16S ribosomal	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 606010</a>	<a href="#">gb U18997.1</a>	<a href="#">ECOOW67</a> Escherichia coli K-12 chromosom...	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 836656</a>	<a href="#">gb M87049.1</a>	<a href="#">ECOOW85</a> E. coli genomic sequence of the...	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 409785</a>	<a href="#">gb U00006.1</a>	<a href="#">ECOOW89</a> E. coli chromosomal region from 89	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 56384585</a>	<a href="#">gb AE005174.2</a>	Escherichia coli O157:H7 EDL933, comp	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 174375</a>	<a href="#">gb J01859.1</a>	<a href="#">ECORRD</a> E.coli 16S ribosomal RNA	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 147581</a>	<a href="#">gb J01695.1</a>	<a href="#">ECORGNB</a> E.coli rRNA operon (rrnB) codin...	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 33357879</a>	<a href="#">pdb 1P6G</a>	<a href="#">A</a> Chain A, Real Space Refined Coordinate...	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 1799991</a>	<a href="#">dbj D90887.1</a>	E.coli genomic DNA, Kohara clone #437(5	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 1799980</a>	<a href="#">dbj D90886.1</a>	E.coli genomic DNA, Kohara clone #436(5	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 7415862</a>	<a href="#">dbj AB035925.1</a>	Escherichia coli O157:H7 clpB, rrs...	<a href="#">1443</a>	0.0
<a href="#">gi 26110054</a>	<a href="#">gb AE016767.1</a>	Escherichia coli CFT073 section 13 of	<a href="#">1439</a>	0.0
<a href="#">gi 56407796</a>	<a href="#">gb AY831405.1</a>	Escherichia coli strain AB1157 16S...	<a href="#">1437</a>	0.0

### 3.11 Mapeo de la inserción de la mutación en la cepa mutante JMH1754.

Se purificó el DNA cromosomal de las cepas W3110 (cepa parental: control negativo), MC4100 *adhE::Tn10* (control positivo), mutante #3 y las transductantes

#5, #6 y #24 mediante la técnica de fenol – cloroformo descrita en la sección de Material y Métodos para determinar el sitio de inserción del transposón. Se realizó un análisis de restricción con diferentes enzimas que no cortan al transposón con el fin de obtener un fragmento que pudiera clonarse en un plásmido para su posterior secuenciación.

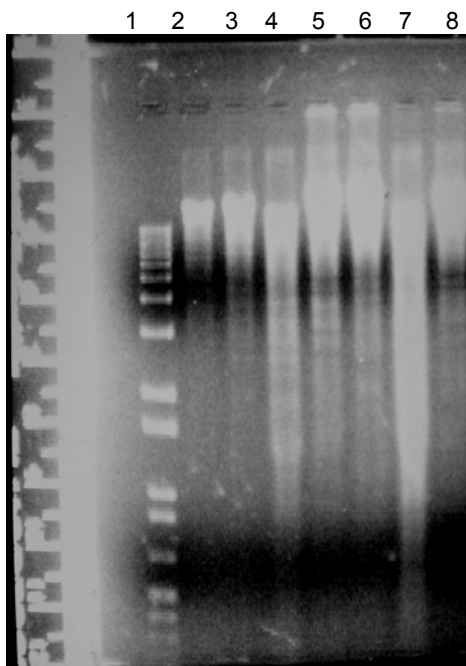


Fig.19 Digestión enzimática del DNA

- 1.- Marcador de pesos de un kb
- 2.- ADN (W3110) digerido con EcoRI
- 3.- ADN (W3110) digerido con HindIII
- 4.- ADN (#3) digerido con EcoRI
- 5.- ADN (#3) digerido con HindIII
- 6.- ADN (MC4100 *adhE*::Tn10) digerido con EcoRI
- 7.- ADN (MC4100 *adhE*::Tn10) digerido con HindIII
- 8.- ADN (#5) digerida con EcoRI

Para tratar de verificar si uno de los fragmentos digeridos contenía al transposón, se llevó a cabo un experimento tipo Southern.

La primera sonda utilizada se obtuvo mediante la amplificación mediante PCR el gen de resistencia a tetraciclina del plásmido pACYC184 con los oligos Tet 5 y Tet 3 (Tabla 7), con el cual se obtuvo un fragmento de aproximadamente 1.2 kb. Purificado para su utilización como sonda.

Al realizar la detección de la señal se observó inespecificidad en el reconocimiento. Al analizar los sitios donde alinean los oligos se observó que

estos alineaban en regiones adyacentes al gen de resistencia a tetraciclina. Por lo que esto podría explicar la inespecificidad (Fig 20).

```

LOCUS   PACYC184           4245 bp    DNA        circular SYN 17-FEB-1997
DEFINITION Cloning vector pACYC184.  ACCESSION   X06403 VERSION   X06403.1
GI:58255
KEYWORDS   chloramphenicol resistance; cloning vector; plasmid;
tetracycline           resistance.SOURCE      synthetic construct

1201 agaggagtta gtcttgaagt catgcccgg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg
1261 tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt
1321 cgaaaaaccg ccctgcaagg cggttttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc
1381 aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tttcagtgca
1441 atttatctct tcaaattgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc
1501 atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct
      aacgcagtca ggcaccgtgt atgaaatcta acaatgcgct catcgtcatc ctcggcaccg
1621 tcaccctgga tgctgtaggc ataggcttgg ttatgccggt actgccgggc ctcttgccgg
1681 atatcgcca ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgcgt
1741 tgatgcaatt tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgcgcgc
1801 cagtctctgt cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac
1861 ccgtctctgt gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacaggtg
1921 cggttgctgg cgcctatata gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttctg
1981 ggctcatgag cgcttgcttc ggcgtgggta tgggtggcagg ccccgtggcc gggggactgt
2041 tgggcgccat ctcttgcgat gcaccattcc ttgcggcggc ggtgctcaac gccctcaacc
2101 tactactggg ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga ccgatgccct
2161 tgagagcctt caaccagtc agctccttc cgtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg
2221 cacttatgac tgtcttctt acatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg
2281 tcattttcgg cgaggaccgc tttcgctgga gcgacgat gatcggcctg tcgcttgcgg
2341 tattcggaat cttgcacgcc ctgcctcaag ccttcgtcac tgggtcccgc accaaacggt
2401 tcggcgagaa gcaggccatt atcgccggca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc
2461 tggcgcttgc gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattctctc gcttcggcg
2521 gcatcgggat gcccgcgctt caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gaccatcagg
2581 gacagcttca aggatcgctc gcggctctta ccagcctaac ttcgatcaact ggaccgctga
2641 tcgtcacggc gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cgggttggca tggattgtag
2701 gcgcgcctct atacctgtc tgccctcccg cgttgcgtcg cgggtgatgg agccgggcca
2761 cctcgacctg aatggaagcc ggcggcacct cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg
2821 agccaatcaa ttcttgcgga gaactgtgaa tgcgcaaacc aacccttggc agaacatctc

```

Fig. 20. Secuencia del gen de resistencia a tetraciclina en color rojo se observa las regiones donde alinean los oligos: **Ampli Tet 5' y Ampli Tet 3'**.

Se diseñaron nuevos oligos los cuales alineaban dentro de la secuencia del gen de resistencia del plásmido pACYC184 en regiones ricas en guaninas y citosinas para que el fragmento fuera más específico (Fig. 21).

LOCUS PACYC184 4245 bp DNA circular SYN 17-FEB-1997  
 DEFINITION Cloning vector pACYC184. ACCESSION X06403VERSION  
 X06403.1 GI:58255  
 KEYWORDS chloramphenicol resistance; cloning vector; plasmid;  
 tetracycline resistance.

```

1201 agaggagtta gtcttgaagt catgcccggg ttaaggctaa actgaaagga caagttttgg
1261 tgactgcgct cctccaagcc agttacctcg gttcaaagag ttggtagctc agagaacctt
1321 cgaaaaaccg cctcgcaagg cggttttttc gttttcagag caagagatta cgcgcagacc
1381 aaaacgatct caagaagatc atcttattaa tcagataaaa tatttctaga tttcagtgca
1441 atttatctct tcaaatgtag cacctgaagt cagccccata cgatataagt tgtaattctc
1501 atgtttgaca gcttatcatc gataagcttt aatgcggtag tttatcacag ttaaattgct
1561 aacgcagtca ggcaccgtgt atgaaatcta acaatgcgct catcgtcatc ctcggcaccg
1621 taccctgga tgctgttaggc ataggccttg ttatgccggg actgccgggc ctcttgccgg
1681 atatcgtcca ttccgacagc atcgccagtc actatggcgt gctgctagcg ctatatgctt
1741 tgatgcaatt tctatgcgca cccgttctcg gagcactgtc cgaccgcttt ggccgcccgc
1801 cagtctctgt cgcttcgcta cttggagcca ctatcgacta cgcgatcatg gcgaccacac
1861 ccgtcctgtg gatcctctac gccggacgca tcgtggccgg catcaccggc gccacagggt
1921 cggttgctgg cgcctatatc gccgacatca ccgatgggga agatcgggct cgccacttcg
1981 ggctcatgag cgcttgtttc ggcgtgggta tgggtggcagg ccccgtggcc gggggactgt
2041 tggggcccat ctcccttgcg gcaccattcc ttgcccgggc ggtgctcaac ggctcaacc
2101 tactatggg ctgcttccta atgcaggagt cgcataaggg agagcgtcga cccgatgccct
2161 tgagagcctt caaccagtc agtccttcc ggtgggcgcg gggcatgact atcgtcgccg
2221 cacttatgac tgtcttcttt atcatgcaac tcgtaggaca ggtgccggca gcgctctggg
2281 tcattttcgg cgaggaccgc tttcgctgga gcgcgacgat gatcggcctg tcgcttgggg
2341 tattcggaat cttgcacgcc ctcgctcaag ccttcgtcac tgggtccgcc accaaacggt
2401 tcggcgagaa gcaggccatt atcgcccgca tggcggccga cgcgctgggc tacgtcttgc
2461 tggcgcttcgc gacgcgaggc tggatggcct tccccattat gattcttctc gcttccggcg
2521 gcatcgggat gcccgcttg caggccatgc tgtccaggca ggtagatgac gccatcagg
2581 gacagcttca aggatcgctc gcggctctta ccagcctaac ttcgatcact ggaccgctga
2641 tcgtcacggc gatttatgcc gcctcggcga gcacatggaa cggggtggca tggattgtag
2701 gcgcgcacct ataccttgtc tgctcccccg cgttgcgtcg cgggtgatgg agccgggcca
2761 cctcgacctg aatggaagcc ggcggcactc cgctaacgga ttcaccactc caagaattgg
  
```

Fig.21 En color azul se muestra la secuencia del gen de resistencia a tetraciclina, en color rojo se observa las regiones donde alinean los oligos:

TcTn10 5'→  
 5'GCG CTC ATC GTC ATC CTC GGC ACC GTC 3'  
 TcTn10 3'←  
 5'GGC CCG GCT CCA TGC ACC GCG ACG CAA 3'

Al utilizarse de nuevo la detección con la nueva sonda se continuó observándose inespecificidad en la detección (Fig. 22).

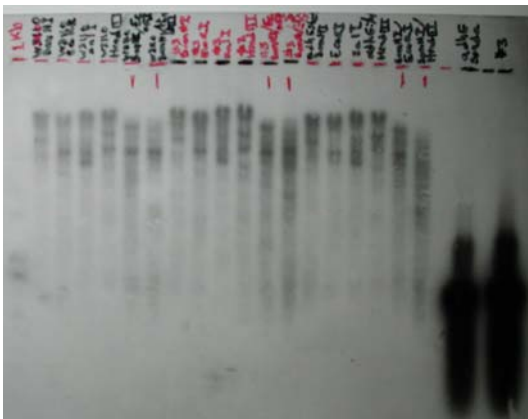


Fig. 22. Autoradiografía que muestra un patrón de reconocimiento similar en los carriles, aún en controles negativos, indicándonos la falta de especificidad de la sonda utilizada.

Al realizar una búsqueda más extensiva en la bibliografía sobre los mini transposones  $\lambda$  NK1098 y  $\lambda$  NK1323 los cuales son derivados del transposón Tn10 (Fig 23 y 24.), y contienen 2 genes transcritos divergentemente: *tetA* (gen estructural) y *tetR* (gen represor) los cuales conforman el determinante de resistencia a tetraciclina, encontré la secuencia de esta región y realicé un alineamiento en la base de datos EMBL con el programa CLUSTAL W, obteniendo que las secuencias analizadas, la secuencia del gen de resistencia a tetraciclina del plásmido pACYC184 (Gen Bank X06403) y la secuencia del transposón TRN10TETR (Gen Bank J01830), presentan una identidad del 49% en su secuencia con un 30% de Gaps. Esto nos indica que la razón de la inespecificidad de la sonda utilizada, se podría deber a que la región de donde se obtuvieron los oligos no presenta una identidad que esté conservada en esas regiones en el gen de resistencia a tetraciclina (Fig. 25).

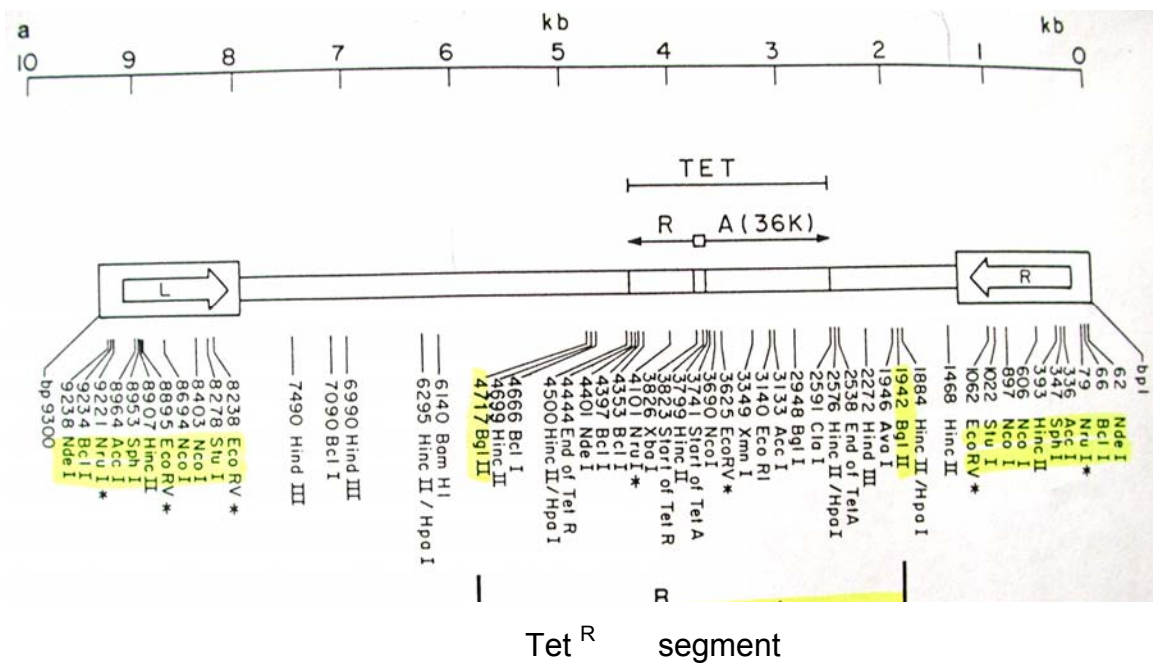


Fig. 23. Mapa de los sitios de restricción en el transposón y de los genes transcritos divergentemente: *tet A* (gen estructural) y *tet R* (gen represor) los cuales conforman el determinante de resistencia a tetraciclina.

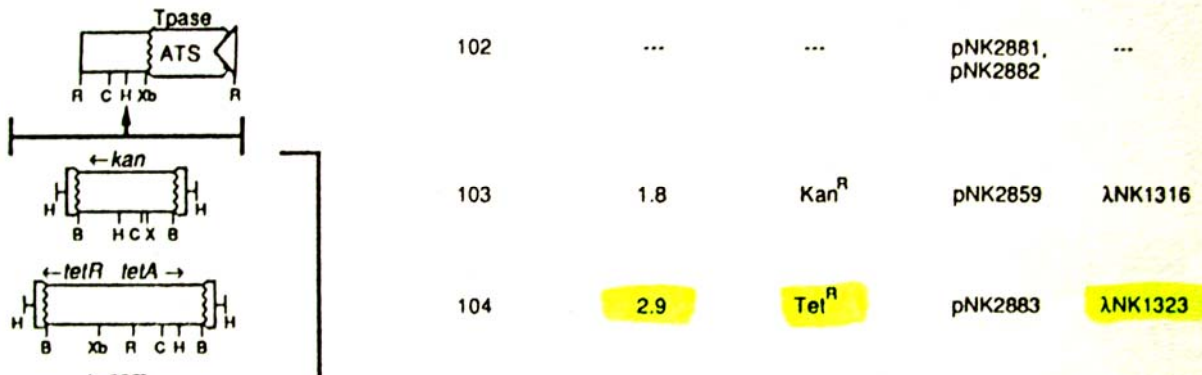


Fig. 24. Mini-transposones *Tn10* derivados del transposón *Tn10*, el utilizado para mutagenizar a la mutante fue el derivado 104, con el vehículo de entrega el fago λNk1323. La sonda utilizada se obtuvo amplificando, desde el plásmido pACYC184, el gen que confiere resistencia a tetraciclina, el cual se obtuvo del derivado 102 para este vector de clonación.

### 3.12 Alineamiento de las secuencias del gen que confiere resistencia a tetraciclina, del plásmido pACYC184 y TRN10TETR.

Los alineamientos de secuencias nos proveen una herramienta para la inferencia de la homología entre ellas. Los valores de los gaps (espacios) pequeños incrementan el número de secuencias no homólogas con altos puntajes de similitud. En nuestro análisis, la secuencia del gen de resistencia a tetraciclina del plásmido pACYC184 (Gen Bank X06403) y la secuencia del transposón TRN10TETR (Gen Bank J01830), presentan una identidad del 49% en su secuencia con un 30% de Gaps como se muestra en la figura 25.







1608-2813 724 AATAGC---ATGATGGTTGGCTTTTCATTAGCGGGTCTTGG---TCTTTT  
767

1581-2771 776 ACGCCC-----TCGCTCAAGCCTTCGTCACTGG-----TCCCGCCACCAA  
815

1608-2813 768 ||.|.| || |||||.|.|..|.|| | .|||.|.  
812 AACTCAGTATTC---CAAGCCTTTGTGGCAGGAAGAAT--AGCCACTAA

1581-2771 816 ACGTTTCGGCGAGAA----GCAG-----GCCATTATCGCCG-----  
847

1608-2813 813 | |..|||.|. ||| |...|||.|||. |  
859 A---TGGGGCGAAAAACGGCAGTACTGCTCGAATTTATTGCAGATAGTA

1581-2771 848 --GCATGGCGGCCGACGCGCTGGGCTACGTCTTGC-----TGGCGT----  
886

1608-2813 860 |||| | ||| |.|||  
884 GTGCAT-----TTGCCTTTTATAGCGTTTAT

1581-2771 887 -TCGCGACGCGAGGCTGGATGGCCTTCCCCATTATGATTCTTCTCGCTTC  
935

1608-2813 885 || .|| |||.|||.|.|.|||..|.|.|||.|.|.|||.||..  
929 ATC-TGA----AGGTTGGTTAGATTTCCCTGTTTTAATTTTATTGGCTGG

1581-2771 936 CGGCGGCATCGGGATGCCCGCGTTGCAGGCCATG----CTGTCCAGGCAG  
981

1608-2813 930 .|||.||.||||..|.|||.||.||||..|| |.||||..||  
978 TGGTGGGATCGCTTTACCTGCATTACAGGGAGTGATGTCTATCCAAACA-

1581-2771 982 GTAGA-TGACGACCATCAGGGACAGCTT--CAAGGATCGCTCGCG-GCTC  
1027

1608-2813 979 .||| |.|.|||.|| ||| .||| |.|.||||..|.|.|| | |  
1021 -AAGAGTCATGAGCA--AGG---TGCTTTACAGGGATTATTGGTGAGC-C

1581-2771 1028 TTACCA--GCCTAACTTCG--ATCACTGGACCGCTGATCGTCACGGCGAT  
1073

1608-2813 1022 ||||| || ||| || .|.|.|||.||..|.||..|.|||.||..||  
1067 TTACCAATGC--AAC--CGGTGTTATTGGCCATTACTGTTTACTGTTAT

1581-2771 1074 TTATGCCGCCTCGGCGAGCA--CATGGA--AC-----GGGTTGGC----  
1109

1608-2813 1068 |||| | |||..| || |.||||  
1102 TTAT-----AATCATTCACTACCAATTTGGGATGGCTGGA

1581-2771 1110 -ATGGATTGTAGGCGCCGCCCTATACCTTGTCTGCCTCCCCGCGTTGCGT  
1158

1608-2813 1103 .|||||.||.||||..|.||| |||.||..|.|| | || |  
1145 TTTGGATTATTGGTTTAGCGTTTTAC--TGTATTATTATCC----TGC-T

```

1581-2771      1159 CGCGGTG-----CATG-GAGCCGGGCCACCTCGACCTGA
1191
                ..|||.||      |||| .|.||      |||||.|.|||.|
1608-2813      1146 ATCGATGACCTTCATGTTAACC-----CCTCAAGCTCAGGGGAGTAAAC
1189

1581-2771      1192                                1191
1608-2813      1190 AGGAGACAAGTGCTTAG      1206

```

Fig. 25. Alineamiento pareado de las secuencias del gen que confiere resistencia a tetraciclina del derivado 104 y de la obtenida del plásmido pACYC184.

Como perspectiva se plantea el diseño de oligos más específicos que puedan ser utilizados como sonda, en los diferentes derivados del transposón Tn10. Por lo que se plantea realizar alineamientos múltiples de secuencias de los diferentes genes de resistencia reportados en el GenBank de las bases de datos del NCBI y de la EMBL.

## **Discusión:**

La motilidad y el flagelo se han asociado con los estadios iniciales de la formación de biofilm, promoviendo o acelerando la unión de las bacterias a superficies en *Pseudomonas sp.* (31), en *V. cholerae* (47) y en *E. coli* (37). En el caso de la mutante 3, el desarrollo del biofilm sobre las placas de microtitulación de PVC no se ve influenciada por la motilidad, y no le confiere ninguna ventaja con respecto a la cepa parental W3110.

La cepa mutante #3 logra un nivel mayor de adherencia a superficies de poliestireno, sin embargo, fue seleccionada después de realizar 15 incubaciones con hidroxiapatita, lo cual nos indica que existen otros mecanismos para la adhesión a esta superficie.

Al determinar la presencia de fimbria y/u otras estructuras extracelulares mediante el estriado en cajas de rojo congo existió una diferencia clara entre la cepa parental y la cepa mutante #3, indicando diferencias con respecto a la presencia de fimbria con respecto a la cepa parental W3110. Estos resultados sugieren que tal vez fimbria sea una de las estructuras que permite la adherencia a PVC, pero que quizás no es una estructura que participe en la adherencia a H.A.

La motilidad no parece ser el factor que promueve la mayor formación de biofilm en la cepa #3, sin embargo en ambientes naturales puede incrementar la oportunidad de las bacterias para encontrar una superficie potencial para su unión. En *E. coli* K-12 se ha descrito que la expresión de pili tipo I es fase variable, con células oscilando en estados fimbriados y afimbriados, dependiendo de las condiciones ambientales. Por lo que se podría proponer que sea la fimbria curli la que este favoreciendo la adherencia a PVC, sugiriendo que la mutación de la #3

pueda estar afectando reguladores transcripcionales, que estén favoreciendo una mayor formación de biofilm, tal como es el caso de los reguladores CsgD, Crl, H-NS, CpxR y OmpR (39). Esta compleja regulación a nivel molecular está asociada a una regulación estrecha de la biogénesis de curli por un amplio rango de señales ambientales. Curli se ha descrito como una estructura importante en la adherencia a superficies, requerida en la adherencia inicial y en las interacciones célula – célula que son esenciales en la formación de microcolonias (38, 39).

### **Perspectivas:**

- 1.- Identificación del sitio de inserción del transposón.
- 2.- Clonación del gen identificado en un vector.
- 3.- Transformación del plásmido en una cepa que no produce curli u/otras estructuras fimbriales.
- 4.- Analizar la participación de estas estructuras membranales en la adhesión a H.A.

## **Conclusiones:**

La selección de las mutantes que no se adhirieron a hidroxiapatita nos permitió seleccionar una mutante la cual podría tener afectado un gen que participa como un factor promotor de adherencia a superficies de PVC, sin embargo también podría estar involucrado mediante algún mecanismo en la no adhesión a hidroxiapatita. La motilidad no parece estar involucrada en la formación de biofilm de la mutante #3, en placas de microtitulación de PVC en condiciones aeróbicas. Sin embargo, podría ser un factor importante en la adhesión a hidroxiapatita. El factor que promueve la formación de biofilm en aerobiosis en placas de microtitulación de PVC en la mutante #3 podría estar relacionado algún regulador transcripcional que esté favoreciendo la formación de biofilm. Este regulador transcripcional podría estar relacionado a la biogénesis de la fimbria curli involucrada en procesos de adhesión a superficies, promoviendo la adhesión a PVC. La no adhesión a hidroxiapatita podría involucrar algún represor de la producción de la fimbria curli en ésta superficie.

## Referencias

1. **Adams, J. L. and R. J. McLean.** 1999. Impact of *rpoS* deletion on *Escherichia coli* biofilms. *Appl Environ Microbiol* **65**:4285-4287.
2. **Austin, J. W., G. Sanders, W. W. Kay, and S. K. Collinson.** 1998. Thin aggregative fimbriae enhance *Salmonella enteritidis* biofilm formation. *FEMS Microbiol Letter* **162**:295-301.
3. **Berry, E. D. and G. R. Siragusa.** 1997. Hydroxyapatite adherence as a means to concentrate bacteria. *Appl Environ Microbiol.* **63**:4069-4074.
4. **Burne, R. A., Y. Y. Chen, and J. E. Penders.** 1997. Analysis of gene expression in *Streptococcus mutans* in biofilms *in vitro*. *Adv Dent Res.* **11**:100-109.
5. **Busscher, H. J. and H. C. Van Der Mei.** 1997. Physico-chemical interacciones in inicial microbial adhesion and relevance for biofilm formation. *Adv Dent Res* **11**:24-32.
6. **Colón-González, M., Méndez-Ortíz, M. M., and Membrillo-Hernández, J.** 2004. Anaerobic growth does not support biofilm formation in *Escherichia coli*. *Res Microbiol* **155**: 514-521.
7. **Corona-Izquierdo, F. P. and J. Membrillo-Hernández.** 2002. A mutation in *rpoS* enhances biofilm formation in *Escherichia coli* during exponential phase of growth. *FEMS Microbiol Letter* **211**:105-110.
8. **Corona-Izquierdo, F. P. and J. Membrillo-Hernández.** 2002. Biofilm formation in *Escherichia coli* is affected by 3-(N-morpholino) propane sulfonate (MOPS). *Res Microbiol.* **153**:181-185.
9. **Costerton, J. W., P. S. Stewart, and E. P. Greenberg.** 1999. Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* **284**:1318-1322.
10. **Czczulin, J. R., S. Balepur, S. Hicks, A. Phillips, R. Hall, M. H. Kothary, F. Navarro-Garcia, and J. P. Nataro.** 1997. Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun* **65**:4135-4145.
11. **Danese, P. N., L. A. Pratt, and R. Kolter.** 2000. Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *J Bacteriol* **182**:3593-3596.
12. **Darveau, R. P., A. Tanner, and R. C. Page.** 1997. The microbial challenge in periodontitis. *Periodontol 2000* **14**:12-32.

13. **Davies, D. G., M. R. Parsek, J. P. Pearson, B. H. Iglewski, J. W. Costerton, and E. P. Greenberg.** 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* **280**:295-298.
14. **Donlan, R. M. and J. W. Costerton.** 2002. Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin Microbiol Rev* **15**:167-193.
15. **Froeliger, E. H. and P. Fives-Taylor.** 2001. *Streptococcus parasanguis* fimbria-associated adhesin *fap1* is required for biofilm formation. *Infect Immun* **69**:2512-2519.
16. **Genevaux, P., P. Bauda, M. S. DuBow, and B. Oudega.** 1999. Identification of Tn10 insertions in the *dsbA* gene affecting *Escherichia coli* biofilm formation. *FEMS Microbiol Lett* **173**:403-409.
17. **Genevaux, P., P. Bauda, M. S. DuBow, and B. Oudega.** 1999. Identification of Tn10 insertions in the *rfaG*, *rfaP*, and *galU* genes involved in lipopolysaccharide core biosynthesis that affect *Escherichia coli* adhesion. *Arch Microbiol* **172**:1-8.
18. **González, F. and F. Cameros.** 1993. *Microbiología bucal*, p. 5-10. Méndez, Editores.
19. **Hastings, J. W. and K. H. Nealson.** 1977. Bacterial bioluminescence. *Annu Rev Microbiol* **31**:549-595.
20. **Hyde, J. A., R. O. Darouiche, and J. W. Costerton.** 1998. Strategies for prophylaxis against prosthetic valve endocarditis: a review article. *J Heart Valve Dis* **7**:316-326.
21. **Kolenbrander, P. E.** 2000. Oral microbial communities: biofilms, interactions, and genetic systems. *Annu Rev Microbiol.*2000 **54**:413-437.
22. **Kolenbrander, P. E. and J. London.** 1993. Adhere today, here tomorrow: oral bacterial adherence. *J Bacteriol* **175**:3247-3252.
23. **Kolter, R. and R. Losick.** 1998. One for all and all for one. *Science* **280**:226-227.
24. **Lamont, R. J. and H. F. Jenkinson.** 2000. Subgingival colonization by *Porphyromonas gingivalis*. *Oral Microbiol Immunol* **15**:341-349.
25. **Landini, P. and A. J. Zehnder.** 2002. The global regulatory *hns* gene negatively affects adhesion to solid surfaces by anaerobically grown *Escherichia coli* by modulating expression of flagellar genes and lipopolysaccharide production. *J Bacteriol* **184**:1522-1529.

26. **Li, Y. H., M. N. Hanna, G. Svensater, R. P. Ellen, and D. G. Cvitkovitch.** 2001. Cell density modulates acid adaptation in *Streptococcus mutans*: implications for survival in biofilms. *J Bacteriol* **183**:6875-6884.
27. **Liebana, U.** 1996. *Microbiología Oral*, p. 12-15. Ed. Manual Moderno.
28. **Marsh, P. D.** 1999. Microbiologic aspects of dental plaque and dental caries. *Dent Clin North Am* **43**:599-614.
29. **Nealson, K. H. and J. W. Hastings.** 1979. Bacterial bioluminescence: its control and ecological significance. *Microbiol Rev* **43**:496-518.
30. **O'Toole, G. A., H. B. Kaplan, and R. Kolter.** 2000. Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol* **54**:49-79.
31. **O'Toole, G. A. and R. Kolter.** 1998. Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Mol Microbiol* **30**:295-304.
32. **O'Toole, G. A., L. A. Pratt, P. I. Watnick, D. K. Newman, V. B. Weaver, and R. Kolter.** 1999. Genetic approaches to study of biofilms. *Methods Enzymol* **310**:91-109.
33. **Otto, K. and T. J. Silhavy.** 2002. Surface sensing and adhesion of *Escherichia coli* controlled by the Cpx-signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**:2287-2292.
34. **Park, S., P. M. Wolanin, E. A. Yuzbashyan, P. Silberzan, J. B. Stock, and R. H. Austin.** 2003. Motion to form a quorum. *Science* **301**:188.
35. **Parsek, M. R. and P. K. Singh.** 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol* **57**:677-701.
36. **Passerini, L., K. Lam, J. W. Costerton, and E. G. King.** 1992. Biofilms on indwelling vascular catheters. *Crit Care Med* **20**:665-673.
37. **Pratt, L. A. and R. Kolter.** 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol* **30**:285-293.
38. **Prigent-Combaret, C., E. Brombacher, O. Vidal, A. Ambert, P. Lejeune, P. Landini, and C. Dorel.** 2001. Complex regulatory network controls initial adhesion and biofilm formation in *Escherichia coli* via regulation of the *csgD* gene. *J Bacteriol* **183**:7213-223.
39. **Prigent-Combaret, C., G. Prensier, T. T. Le Thi, O. Vidal, P. Lejeune, and C. Dorel.** 2000. Developmental pathway for biofilm formation in curli-



producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environ Microbiol* **2**:450-464.

40. **Schauder, S. and B. L. Bassler.** 2001. The languages of bacteria. *Genes Dev* **15**:1468-1480.
41. **Schembri, M. A., K. Kjaergaard, and P. Klemm.** 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol* **48**:253-267.
42. **Sperandio, V., J. L. Mellies, W. Nguyen, S. Shin, and J. B. Kaper.** 1999. Quorum sensing controls expression of the type III secretion gene transcription and protein secretion in enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:15196-15201.
43. **Sperandio, V., A. G. Torres, J. A. Giron, and J. B. Kaper.** 2001. Quorum sensing is a global regulatory mechanism in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *J Bacteriol* **183**:5187-5197.
44. **Sperandio, V., A. G. Torres, B. Jarvis, J. P. Nataro, and J. B. Kaper.** 2003. Bacteria-host communication: the language of hormones. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**:8951-8956.
45. **Stanley, N. R. and B. A. Lazazzera.** 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. *Mol Microbiol* **52**:917-924.
46. **Surette, M. G., M. B. Miller, and L. Bassler.** 1999. Quorum sensing in *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, and *Vibrio harveyi*: a new family of genes responsible for autoinducer production. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**:1639-1644.
47. **Watnick, P. I. and R. Kolter.** 2000. Biofilm, city of microbes. *J Bacteriol* **182**:2675-2679.
48. **Whittaker, C. J., C. M. Klier, and P. E. Kolenbrander.** 1996. Mechanisms of adhesion by oral bacteria. *Annu Rev Microbiol* **50**:513-552.
49. **Wimpenny, J., W. Manz, and U. Szewzyk.** 2000. Heterogeneity in biofilms. *FEMS Microbiol Rev* **24**:661-671.

## APÉNDICE.

Revisión Bibliográfica publicada en: Memorias de Biología bucal.  
ISBN: 970-32-2261-7. Titulada: “**Biología molecular de biocapas bacterianas**” en colaboración con la Biol. Tecilli Cabellos Avelar y la supervisión del Dr. Jorge Membrillo Hernández.