



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA
DE MÉXICO**

FACULTAD DE CIENCIAS

**“Efecto de la sobreexpresión de dos diguanilato ciclasas y
dos fosfodiesterasas sobre la expresión de genes de
virulencia y formación de biopelícula en *Escherichia coli*
enteropatógena E2348/69”**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:

B I Ó L O G A

P R E S E N T A :

PAOLA GUADALUPE VÁZQUEZ BUENO



**DIRECTOR DE TESIS:
Dr. Ricardo Oropeza Navarro
Ciudad Universitaria, CD.MX. 2019**



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.

1. Datos del alumno

Vázquez

Bueno

Paola Guadalupe

Universidad Nacional Autónoma de México

Facultad de Ciencias

Biología

311304541

2. Datos del tutor

Dr.

Ricardo

Oropeza

Navarro

3. Datos del sinodal 1

Dra.

Laura

Kawasaki

Watanabe

4. Datos del sinodal 2

Dr.

Luis Felipe

Jiménez

García

5. Datos del sinodal 3

Dr.

Enrique

Rudiño

Piñera

6. Datos del sinodal 4

Dra.

Rosa Laura

Camarena

Mejía

7. Datos del trabajo escrito

Efecto de la sobreexpresión de dos diguanilato ciclasas y dos fosfodiesterasas sobre la expresión de genes de virulencia y formación de biopelícula en *Escherichia coli* enteropatógena E2348/69.

65 pág.

2019

El presente trabajo se realizó en el laboratorio #2 a cargo del Dr. José Luis Puente García del Departamento de Microbiología Molecular del Instituto de Biotecnología de la UNAM, bajo la asesoría del Dr. Ricardo Oropeza Navarro.

Durante el desarrollo de esta tesis recibí apoyo económico por parte del laboratorio y por parte del proyecto DGAPA IN209216 y CONACyT 252895, otorgados a RON.

“Nada en la vida debe ser temido, sólo comprendido”

Marie Curie.

AGRADECIMIENTOS

Principalmente a la UNAM, por haber sido mi casa de estudios durante toda la formación y brindarme los recursos necesarios para desempeñarme como bióloga.

A cada uno de mis profesores quienes sin recibir nada a cambio, trabajaron arduamente para transmitir a mi y a mis compañeros, sus diversos conocimientos.

A mis sinodales: Dra. Laura Kawasaki, Dr. Luis Felipe Jiménez, Dra. Rosa Laura Camarena y Dr. Enrique Rudiño, por haber tenido el tiempo y paciencia para revisar y corregir este trabajo. ¡Gracias por sus aportaciones!

Al Dr. Ricardo Oropeza, quién pese a todo siempre se mostró de mi lado apoyándome y animándome, confiando en mí y en mi trabajo, compartiendo conocimientos, dándome un ejemplo a seguir para mi carrera y tenerme una gran paciencia a lo largo de la realización de este trabajo.

Al apoyo técnico que me brindaron Dra. Lucía Perezgasga, Dra. Alejandra Vázquez y Biol. Francisco J. Santana Estrada en la realización de este proyecto.

Al Dr. José Luis Puente, por abrirme las puertas de su laboratorio, escucharme, aconsejarme y apoyarme durante mi estancia. Así como a los integrantes del laboratorio: Ale Vázquez, Álvaro, Carmen, Claudia Paredes, Doña Rebe, Haydeé “mamá postiza”, Inés, Ismael, Jess “mi compi”, Lili, Lucy, Marcos, Mario, Panchito y Stephanie. Especialmente a Haydeé y Stephanie por brindarme su amistad sincera, su apoyo incondicional en todo momento y tanta alegría al estar en su compañía.

A mis queridos “rumianos” Abraham y Juan, por volverse una familia, por todas esas locuras y momentos compartidos. Por ser tan únicos e irremplazables para mí, por siempre apoyarnos en los momentos más duros y hacer de cada instante una aventura singular.

A los demás tallerines: Raúl, Adrián, Uriel, Emilio, y una mención honorífica para los amixes Raquel Neri y Alfredo Arteaga.

A mis primeros amigos de la facultad Febe, Cinthia e Isa y a los que perduraron a lo largo de esta aventura: Alessandro, Brisa y Noemí.

A los demás chicos del coro: Gina bebé, Diana Vázquez, Óscar, Eduardo Ángeles “bocho”, Julián Pineda, Alan Valencia y Cinthia Giselle (foránea).

A mis eternas amigas Getsemani y Xoxhiquetzal por siempre estar conmigo y brindarme su apoyo pese a las distancias ♥, las quiero mucho.

A mis bebés que alentaron mis sueños: Karla, Ethel y Esme, gracias por todo su apoyo y por contagiarme de su buena vibra siempre ... ¡ah! y a Arely, que, aunque no la conocí antes, hoy forma parte de esta bandita chula.

A toda mi familia, porque de todos he aprendido un poco y sin ellos no sería nada.

A mi abue María por sus sabios consejos, a mis hermanos Luis y Julián por todas las aventuras, conversaciones amenas y compañía, a mi mamá Julia por siempre apoyarme en todo, confiar en mí y ser parte activa de todas mis metas.

A Bernardo e Irving Bueno, quienes se fueron demasiado pronto, gracias por la huella que dejaron en mi vida y por todas las cosas que aprendimos juntos, siempre estarán en mi corazón.

Finalmente agradezco a Eduardo, la persona que cambió el argumento de mi vida. Gracias por alentarme a superarme diariamente, por permanecer conmigo en cualquier situación, por hacer tuyas mis metas y por seguir inspirándome.

ABREVIATURAS

µg	Microgramo
µL	Microlitro
µm	Micrómetro
A/E	Adherencia y esfacelamiento (<u>A</u> tta <u>ch</u> ing and <u>E</u> ffacing)
aa	Aminoácidos
Ap	Ampicilina
BFP	Pili formador de la agregación (<u>B</u> undle <u>F</u> orming <u>P</u> ili)
BCA	Ácido bicinconínico (<u>B</u> icin <u>ch</u> oninic <u>a</u> cid)
°C	Grado centígrado
CAT	<u>C</u> loranfenicol <u>A</u> cetil- <u>T</u> ransferasa
c-di-GMP	Bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico
DGC	Diguanilato ciclasa
DMEM	Medio Eagle Modificado de Dulbecco (<u>D</u> ulbecco's <u>M</u> odified <u>E</u> agle <u>M</u> edium)
DNA	Ácido desoxirribonucleico (Desoxiribonucleic acid)
DNTB	5,5'-ditio-bis 2 ácido nitrobenzónico
DO	Densidad óptica
EAF	Factor de adherencia de EPEC (<u>E</u> PEC <u>A</u> dherence <u>F</u> actor)
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena
Esc	Genes de secreción de <i>E. coli</i> (<u>E</u> . <u>c</u> oli <u>s</u> ecretion genes)
Esp	Proteína secretada por <i>E. coli</i> (<u>E</u> . <u>c</u> oli <u>s</u> ecretion protein)
G	Gramo
GrlA	Regulador global activador de LEE (<u>G</u> lobal <u>r</u> egulator of <u>L</u> EE <u>A</u> ctivator)
GrlR	Regulador global represor de LEE (<u>G</u> lobal <u>r</u> egulator of <u>L</u> EE <u>R</u> epressor)
H	Horas
Kb	Kilobases
kDa	Kilodalton
Km	Kanamicina
kV	Kilovolts
L	Litro
LB	Luria Bertani
LEE	Locus de eliminación del enterocito (<u>L</u> ocus of <u>E</u> nterocyte <u>E</u> ffacement)
mA	Miliampere
Mg	Miligramo
Min	Minuto
mL	Mililitro
mM	Milimolar
NCBI	Centro Nacional de Información Biotecnológica (<u>N</u> ational <u>C</u> enter of <u>B</u> io <u>t</u> echnology <u>I</u> nformation)
Ng	Nanogramo
Nm	Nanómetro
ON	Toda la noche (<u>O</u> ver <u>N</u> ight)

Orf	Marco de lectura abierto (<u>o</u> pen <u>r</u> eading <u>f</u> rame)
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa (<u>P</u> olymerase <u>C</u> hain <u>R</u> eaction)
PDE	Fosfodiesterasa
pg	Picogramos
PGA	Poli N-acetil glucosamina
pH	Potencial de hidrógeno
PM	Peso molecular
R	Resistente
rpm	Revoluciones por minuto
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (<u>S</u> odium <u>D</u> odecyl <u>S</u> ulfate <u>P</u> oly <u>A</u> crylamide <u>G</u> el <u>E</u> lectrophoresis)
Seg	Segundos
S	Sensible
SOC	Medio súper óptimo con represión catabólica (<u>S</u> uper <u>O</u> ptimal broth with <u>C</u> atabolite repression)
SST3	Sistema de secreción tipo 3
St	Estreptomina
tm	Temperatura dentro de PCR donde el 50% de los cebadores están unidos a la secuencia blanco
Tc	Tetraciclina
TDDT	<u>T</u> ris- <u>H</u> Cl <u>D</u> itio <u>t</u> reitol
Tir	Receptor translocado de intimina (<u>T</u> ranslocated <u>i</u> ntimin <u>r</u> eceptor)
V	Volts
wt	Cepa silvestre (<u>W</u> ild <u>T</u> ype)

CONTENIDO

RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1 <i>Escherichia coli</i>	2
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteropatógena	2
1.1.2 Modelo de infección de EPEC	3
1.1.3 Isla de patogenicidad LEE	5
1.2 Biopelícula bacteriana	7
1.2.1 Características de biopelículas bacterianas	7
1.2.2 Formación y desarrollo de biopelículas bacterianas	8
1.2.3 Biopelícula y virulencia	9
1.2.4 Biopelícula en EPEC	10
1.3 Bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico	12
1.3.1 Proteínas encargadas en la síntesis de di-GMP cíclico.....	12
1.3.2 di-GMP cíclico en EPEC	14
2. ANTECEDENTES	15
2.1 <i>dgcJ</i> (<i>yeaJ</i>)	17
2.2 <i>dgcZ</i> (<i>ydeH</i>)	17
2.3 <i>pdeB</i> (<i>ylaB</i>)	17
2.4 <i>pdeL</i> (<i>yahA</i>)	17
3. HIPÓTESIS	18
4. JUSTIFICACIÓN	18
5. OBJETIVOS	19
5.1 Objetivo general	19
5.2 Objetivos particulares	19
5.3 Objetivos específicos	19

6. MÉTODOS	20
6.1 Plásmidos y cepas	20
6.2 Condiciones de crecimiento	22
6.3 Extracción de DNA	22
6.4 Condiciones de PCR	22
6.5 Electroforesis en gel de agarosa (1.5%)	23
6.6 Clonación	23
6.7 Preparación de células electrocompetentes y transformación.....	25
6.8 Cuantificación de actividad CAT de fusiones reporteras	25
6.9 Western-blot	26
6.10 Perfil de secreción de proteínas	28
6.11 Cuantificación de biopelícula	28
6.12 Análisis estadístico	29
7. RESULTADOS	30
7.1 La expresión de DgcZ favorece la expresión de BFP en medio DMEM.....	30
7.2 La sobreexpresión de DGCs y PDEs no afectan al SST3 y Tir.....	33
7.3 Las proteínas secretadas por EPEC no se afectan por la sobreexpresión de DGCs y PDEs	34
7.4 DgcJ participa en la formación de biopelícula en EPEC.....	36
8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES	38
8.1 DgcZ aumenta la transcripción de BFP	39
8.2 El SST3 y sus proteínas translocadas no se afectan por la expresión de DgcJ, DgcZ, PdeL y PdeB	39
8.3 DgcJ está involucrada en la formación de biopelícula	40
9. PERSPECTIVAS	43
10. BIBLIOGRAFÍA	44
11. ANEXOS	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Micrografía de la lesión de Adherencia y Esfacelamiento.....	3
Figura 2. Modelo esquemático de la infección por EPEC	5
Figura 3. Organización de la isla de Patogenicidad LEE en EPEC 2348/69	6
Figura 4. Etapas de formación de biopelículas	8
Figura 5. Formación de biopelícula en EPEC E2348/69	11
Figura 6. Síntesis de di-GMP cíclico	13
Figura 7. Expresión diferencial de algunos genes en EPEC entre medio LB y DMEM	16
Figura 8. Expresión diferencial de algunos genes en EPEC entre células HeLa y medio DMEM.	16
Figura 9. Modelo hipotético de la relación entre di-GMP cíclico y virulencia ó formación de biopelícula en EPEC E2348/69	18
Figura 10. Construcciones	24
Figura 11. Western-blot en medio LB y DMEM.....	34
Figura 12. Perfil de secreción de proteínas en LB	35
Figura 13. Perfil de secreción de proteínas en DMEM	35
Figura 14. Modelo esquemático del papel de DgcZ sobre la expresión de BFP en EPEC.	42
Figura 15. Modelo esquemático del papel de DgcJ sobre la formación de biopelícula en EPEC	42

ÍNDICE DE GRÁFICAS

Gráfica 1. Actividad específica de CAT de la fusión <i>bfpA</i> en LB	31
Gráfica 2. Actividad específica de CAT de la fusión <i>bfpA</i> en DMEM	31
Gráfica 3. Actividad específica de CAT de la fusión pLEE2 en LB	32
Gráfica 4. Actividad específica de CAT de la fusión pLEE2 en DMEM	32
Gráfica 5. Formación de biopelícula en EPEC- <i>dgcJ</i>	37

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Plásmidos y cepas utilizadas	20
Tabla 2. Oligonucleótidos empleados	21
Tabla 3. Mezcla para reacción de PCR	22
Tabla 4. Preparación de gel desnaturalizante de poliacrilamida 12%	27
Tabla 5. Anticuerpos utilizados	27

RESUMEN

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un agente causal de diarrea aguda en niños menores de dos años principalmente en países en vías de desarrollo.

Hasta ahora no se conocen todas las señales externas e internas que inducen la patogénesis de EPEC, pues la bacteria como todas las demás, ha desarrollado varios mecanismos de transducción de señales. Recientemente se ha observado la participación del segundo mensajero bis-(2'-5')-monofosfato de guanosina cíclico (c-di-GMP) en el desarrollo de virulencia en cepas patógenas como *Salmonella sp.*, por otra parte, en cepas de *E. coli* se ha relacionado con cambios en la motilidad, formación de biopelícula y biosíntesis de polímeros como celulosa. Los niveles de c-di-GMP son controlados por proteínas específicas con actividad de diguanilato ciclasa (DGC), en la síntesis, y fosfodiesterasa (PDE) en la degradación (Hengge, *et al.*, 2009).

Povolotsky y Hengge (2015) realizaron un análisis comparativo de genes que codifican los dominios para DGCs y PDEs, GGDEF y EAL/HD-GYP respectivamente, en 61 cepas de *E. coli*, reportando genes específicos en las cepas patógenas que podrían relacionarse con los diferentes mecanismos de adherencia a la célula huésped. Dentro del transcriptoma de EPEC (Hazen, *et al.*, 2015) se observó una expresión diferencial de DGCs y PDEs bajo condiciones de represión de virulencia (LB) y de expresión de factores de virulencia (medio DMEM, células HeLa). Todo lo anterior sugiere que la presencia del c-di-GMP puede estar involucrado en la señalización de la expresión de genes de virulencia.

De acuerdo a la investigación de Hazen *et al.*, (2015) decidimos trabajar con las DGCs y PDEs que presentaban una expresión diferencial a DO= 0.2 en LB/DMEM *dgcJ*, *pdeB* y *pdeL* y en HeLa/DMEM *dgcZ*.

El presente trabajo tuvo como objetivo evaluar si la sobreexpresión de *dgcJ*, *dgcZ*, *pdeB* y *pdeL* tienen un efecto tanto en la formación de biopelícula como en la expresión de genes de virulencia en EPEC. Mediante la cuantificación de biopelícula en diferentes medios utilizados en el laboratorio, así como el análisis de expresión de ciertos genes involucrados en la virulencia de EPEC utilizando fusiones transcripcionales, ensayos de western-blot y perfiles de proteínas secretadas.

Observamos que DgcZ favorece la expresión de la fimbria BFP en medio DMEM. Por otra parte, DgcJ fomenta la formación de biopelícula en medio LB a 37° C.

1. INTRODUCCIÓN

1.1 *Escherichia coli*.

Escherichia coli es una bacteria Gram negativa perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es la bacteria anaerobia facultativa más abundante de la microbiota intestinal humana en donde, generalmente, mantiene una relación de comensalismo (Kaper, *et al.*, 2004).

Algunas cepas de *E. coli* pueden adquirir la capacidad de ser virulentas debido a mutaciones o la adquisición de componentes genómicos como plásmidos e islas genómicas (GEIs), así como mecanismos necesarios para la supervivencia y la capacidad de propagación entre huéspedes (Dobrindt *et al.*, 2004; Kaper, *et al.*, 2004; Garmendia, *et al.*, 2005).

Entre los patotipos de *E. coli* asociados a enfermedades gastrointestinales se incluyen: *E. coli* adherentedifusa (DAEC), enteroagregativa (EAEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC) y enterotoxigénica (ETEC), consideradas un problema mundial de salud debido a su alto índice de infección en los humanos (Nataro & Kaper, 1998; WHO, 2017).

1.1.1 *Escherichia coli* enteropatógena

E. coli enteropatógena, fue el primer patotipo descrito de *E. coli* y uno de los seis patógenos entéricos identificados en 1980 en un brote diarreico en niños menores de 2 años en Inglaterra (Natarro & Kapper, 1998). Las infecciones por EPEC presentan una tasa de mortalidad que va del 30 al 50% (Senerwa *et al.*, 1989; Natarro & Kapper, 1998) centrándose en países subdesarrollados como México (Vidal *et al.*, 2007), y en lugares de aglomeración infantil, como guarderías y parques (Spears, *et al.*, 2006).

Tal como las cepas diarreicas EHEC y *Citrobacter rodentium*, EPEC genera la lesión de adherencia y esfacelamiento (A/E) de los enterocitos (Croxen, *et al.*, 2013), por lo que se les agrupa dentro de la familia A/E.

Esta lesión se caracteriza principalmente por la destrucción de las microvellosidades de los enterocitos, la adherencia íntima a estos y la formación de una estructura tipo pedestal rica en actina, justo debajo de la bacteria (**Fig. 1**).

Entre los signos que presentan los pacientes infectados por EPEC son el vómito, fiebre y diarrea aguda (Ochoa & Contreras, 2011). Generalmente los niños se enferman vía oral-fecal principalmente por agua y alimentos contaminados (Senerwa *et al.*, 1989).

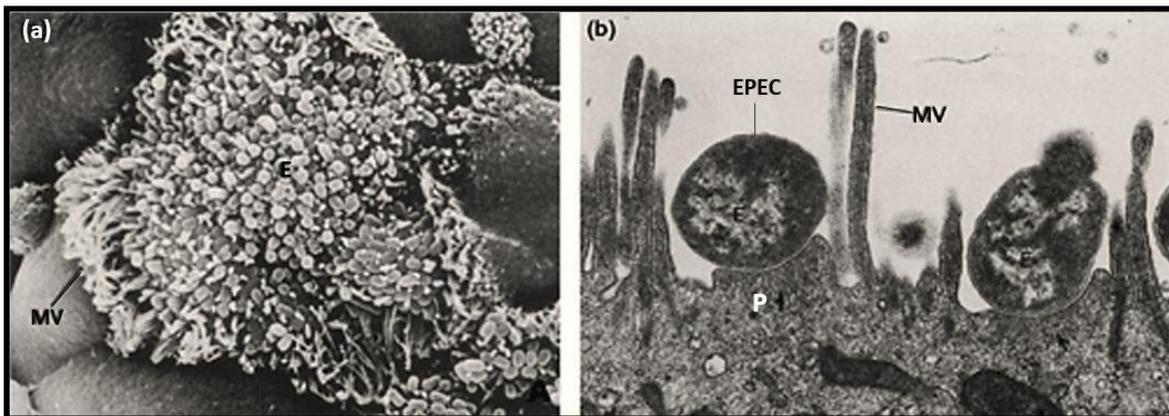


Figura 1. Micrografía de la lesión de Adherencia y Esfacelamiento. Se muestra la lesión A/E provocada por EPEC en la mucosa intestinal humana. A la izquierda (a) se observan enterocitos infectados por EPEC donde las microvellosidades señaladas (MV) no presentan atrofia en ausencia de EPEC, en contraste a cuando la bacteria se adhiere al hospedero (E). En la derecha (b) se presenta la infección por EPEC donde se destruyen las microvellosidades del enterocito (MV) y se presenta la formación de la estructura tipo pedestal (P). Modificado de Deborah & Frankel (2005).

EPEC es utilizado como modelo para la investigación de patógenos humanos en el desarrollo de las lesiones A/E, por lo que su estudio nos da información sobre el mecanismo de virulencia de la familia A/E.

1.1.2 Modelo de infección

La lesión A/E es inducida por un mecanismo de patogenicidad que se presenta en tres etapas: a) adherencia inicial, b) transducción de señales y c) anclaje íntimo (**Fig. 2**).

La etapa de adherencia inicial en EPEC, esta mediada por la fimbria BFP (bundle forming pili) (Deborah & Frankel, 2005), que permite la unión entre las bacterias formando microcolonias (fenotipo de autoagregación) y posteriormente la unión localizada con las células del huésped. La fimbria BFP está codificada en el plásmido de virulencia EAF (EPEC

adherence factor), donde también se encuentran codificados los genes del operón *perABC* (plasmid encoded regulator), particularmente *perA* es un activador transcripcional de *bfp*. No todos los serotipos de EPEC presentan el plásmido EAF (Whittam & McGraw, 1996), por lo que no presentan el fenotipo de agregación en el tejido hospedero. Las cepas carentes de EAF se les agrupa como EPEC atípicas (Scaletsky, *et al.*, 1984).

La segunda etapa (**Fig. 2**), se caracteriza por el ensamblaje del inyectisoma codificado en la isla LEE que le permite a la bacteria transportar proteínas efectoras a través de su propia membrana a otra célula (Coburn, *et al.*, 2007).

El inyectisoma es un complejo supramolecular parecido a una jeringa, que se encuentra en diversas bacterias patógenas como EHEC, *Salmonella sp.* y *Pseudomonas aeruginosa*.

La estructura de este sistema depende de diversas proteínas que se agrupan en: componentes de cuerpo basal, sistema de exportación, apéndice extracelular y efectores citoplasmáticos (Hueck, 1998). Entre las que destacan encontramos a: EscD, EscJ, EscL, EscN, EscR, EscS, EscT, EscU, EscV que forman un anillo interno en la membrana, EscI conecta al anillo interno con EscC que forma el anillo externo, y en la parte exterior EscF forma una estructura tipo aguja (Deng, *et al.*, 2005; Gaytán, *et al.*, 2016). El SST3 que constituye el inyectisoma permite translocar diversas proteínas, llamadas efectores bacterianos al huésped eucariótico, permitiéndole a la bacteria desarrollar infecciones exitosas.

Por último, la adherencia íntima ocurre cuando Tir (translocated intimin receptor) es translocado al enterocito, este receptor se une a una adhesina bacteriana llamada intimina. Además de esto Tir se involucra en la eliminación de las microvellosidades y el reclutamiento de proteínas del citoesqueleto para formar el pedestal (estructuras formadas por la polimerización dinámica de actina del hospedero) (Ruchaud-Sparagano, *et al.*, 2011)

Entre las proteínas que se translocan y participan en la lesión A/E se encuentran: EspF y EspG afectando la localización de acuaporinas, EspH participa en la señalización de la polimerización de actina en el huésped y junto con EspB inhibe la fagocitosis por macrófagos y Map que estimula la formación de filopodios de membrana y disfunción mitocondrial (Deng, *et al.*, 2005; Croxen, *et al.*, 2013; Gaytán, *et al.*, 2016).

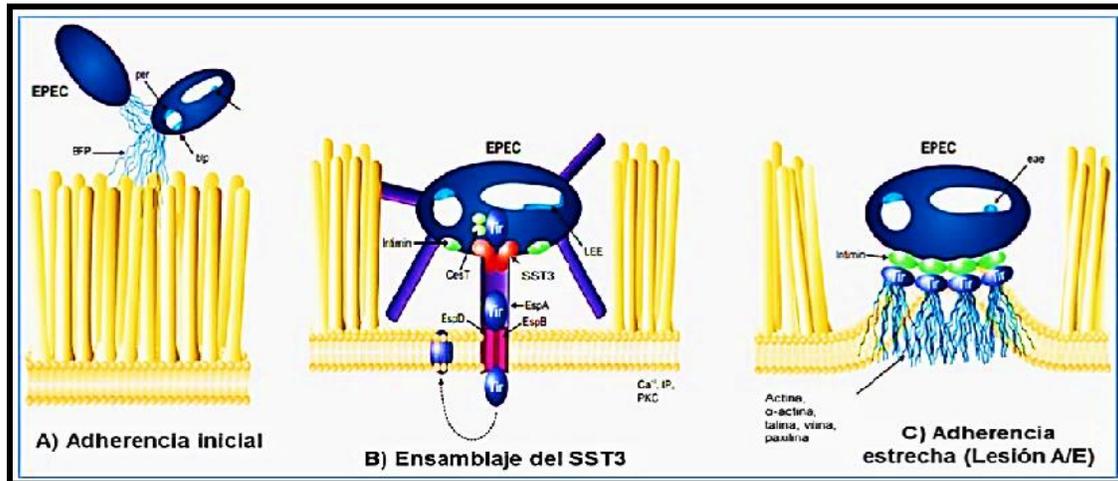


Figura 2. Modelo esquemático de la infección por EPEC. A) La fimbria BFP media la adherencia inicial entre las bacterias y el enterocito. B) Mediante el sistema de secreción tipo tres (SST3) que funciona como inyectisoma, la bacteria transloca proteínas efectoras, así como Tir al enterocito. C) Tir se ancla en la membrana de la célula blanco y se une a la adhesina bacteriana intimina, generando la adherencia estrecha, el rearreglo del citoesqueleto en el enterocito y la lesión A/E. (<http://fernness.com/science-01.html>)

1.1.3 Isla de patogenicidad LEE

La mayoría de los genes involucrados en la formación del inyectisoma y que codifican para proteínas efectoras se encuentran en el cromosoma bacteriano, dentro de una isla de patogenicidad (Pathogenicity islands) de 35.6 Kb llamada LEE (locus de eliminación del enterocito) (Elliot, *et al.*, 2000; Croxen, *et al.*, 2013). LEE presenta 41 marcos de lectura abiertos (Open Reading Frame, ORF) organizados en cinco operones policistrónicos (LEE1, LEE2, LEE3, LEE4 y LEE5), dos bicistrónicos (LEE6 y LEE7) y 4 monocistrónicos (**Fig. 3**).

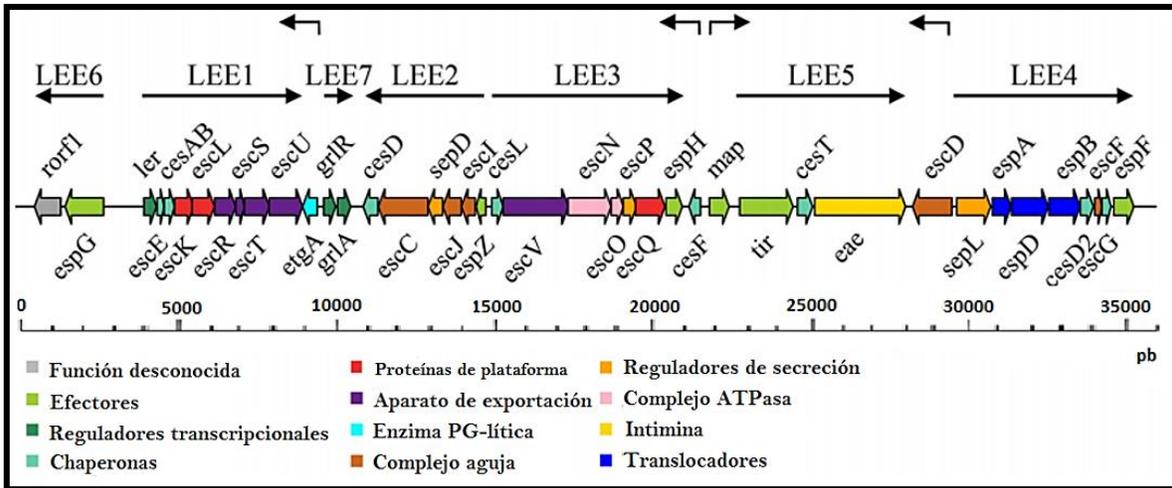


Figura 3. Organización de la Isla de Patogenicidad LEE en EPEC E2348/69. Modificado de Gaytán, *et al.* (2016)

La regulación de la expresión de LEE a nivel de activación transcripcional está dada principalmente por Ler, codificada dentro del primer operón de la isla. Ler activa la transcripción de los operones LEE2, LEE3, LEE4, LEE5 y LEE7 (Elliot, *et al.*, 2000; Sperandio, *et al.*, 2000; Haack, *et al.*, 2003). Dentro del séptimo operón de la isla se encuentran codificadas otras dos proteínas claves en la regulación de LEE: GrlA (Global regulator of LEE Activator) y GrlR (Global regulator of LEE repressor).

GrlA es capaz de activar la transcripción de Ler, creando un circuito de activación Ler-GrlA (Barba, *et al.*, 2005) por otra parte GrlR se une a GrlA suprimiendo su función (Padavannil, *et al.*, 2013).

Ler también es capaz de contrarrestar el silenciamiento que ejerce H-NS sobre la activación de LEE, uniéndose cerca de las regiones donde se une H-NS (Bustamante, *et al.*, 2001). H-NS es un silenciador global de genes adquiridos por transferencia horizontal (Navarre, *et al.*, 2007), sobre la isla LEE forma un complejo con el DNA impidiendo la unión de la RNA polimerasa con la secuencia promotora (Bustamante, *et al.*, 2001).

1.2 Biopelícula bacteriana

Como todos los organismos, las bacterias se enfrentan a condiciones ambientales que pueden interferir o ser perjudiciales tanto para su supervivencia como su desarrollo en un nicho ecológico. Entre los factores adversos se encuentran la disponibilidad de nutrientes, presencia de antibióticos, cambios en pH, concentración de oxígeno, entre muchos otros (Goller & Romeo, 2008).

Algunos microorganismos responden ante estos cambios agrupándose sobre una superficie, recubiertas de una matriz polimérica extracelular, presentando diferentes estados metabólicos y de expresión génica dependiendo de su ubicación dentro de la conglomeración, a esta comunidad se le conoce como biopelícula (Flemming, *et al.*, 2016).

1.2.1 Características de biopelículas bacterianas

Dentro de las biopelículas podemos encontrar ciertos rasgos muy llamativos por la manera en que se coordinan todos los integrantes. Aunque generalmente se cree que los miembros pertenecen a la misma especie bacteriana, la realidad muestra que también pueden conformarse por diversas especies (Flemming, *et al.*, 2016).

Todas las bacterias que conforman la biopelícula están unidas a la superficie o entre ellas por sustancias poliméricas extracelulares (EPS) compuestas por diversas moléculas como: ácidos nucleicos, lípidos, proteínas y, en mayor abundancia, polisacáridos (Gupta, *et al.*, 2016). Las EPS son producidas por las propias bacterias y les proporcionan soporte, capacidad para comunicarse, retener nutrientes y protección ante el ambiente (Vila, *et al.*, 2008; Flemming, *et al.*, 2016).

Dentro de la biopelícula encontramos pequeños nichos con características particulares de: pH, concentración de iones, oxígeno, carbono y nitrógeno (Costerton, *et al.*, 1994; Vroom, *et al.*, 1999), mejor conocidos como microambientes, que desarrollan diferentes roles metabólicos que permiten la persistencia de las bacterias en cualquier ambiente.

Otra de las características de las biopelículas es la presencia de sistemas de canales que permiten el flujo de nutrientes y desechos de todas las células, además de la tolerancia a antimicrobianos posibilitada por la impermeabilidad de las EPS (Stewart, *et al.*, 2001).

1.2.2 Formación y desarrollo de biopelículas

La formación de las biopelículas (**Fig. 4**) se ha dividido en 5 etapas generales (Flemming, *et al.*, 2016). Inicialmente las bacterias fundadoras se adhieren a una superficie por medio de fimbrias o flagelos, esta adherencia se le conoce como adherencia reversible debido a que las células no se encuentran unidas de manera estrecha a la superficie, y por lo tanto aún pueden migrar a otro nicho. En esta etapa las células perciben las condiciones ambientales que permitirán la constitución de la biopelícula (Vila, *et al.*, 2008; Flemming, *et al.*, 2016).

Posteriormente, la población celular aumenta y se inicia la secreción de EPS de manera moderada, conllevando una adherencia más sólida a la superficie (Gupta, *et al.*, 2016). La expresión de fimbrias y flagelos bacterianos se interrumpe para permitir un cambio de vida planctónica a una asociada (Flemming, *et al.* 2016).

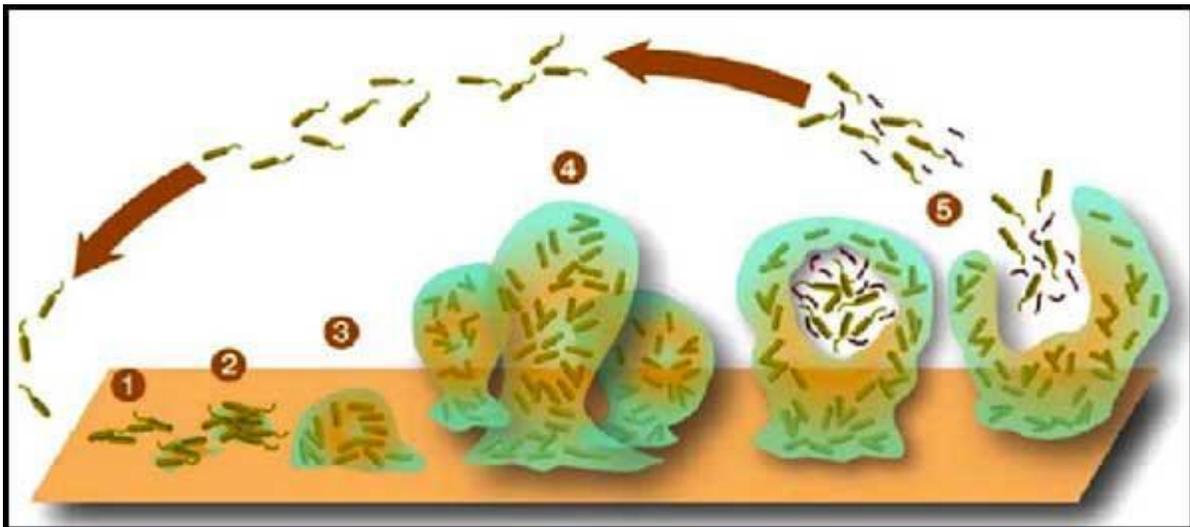


Figura 4. Etapas de formación de biopelículas. (1) Las células individuales se adhieren a una superficie. (2) Una vez que se establecen comienzan a adherirse a la superficie de manera irreversible. (3) La población crece, se forman microcolonias y por medio de la comunicación celular se incrementa la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

En la tercera etapa, las bacterias adheridas forman microcolonias, aumentan su población y permiten que nuevos organismos puedan agregarse (Vila, *et al.*, 2008; Gupta, *et al.*, 2016; Flemming, *et al.*, 2016), proporcionando un incremento en la producción de EPS (Flemming, *et al.*, 2016).

Después se desarrolla una estructura organizada dada por el crecimiento tridimensional de la biopelícula y la delimitación espacial de las interacciones bacterianas (Vila, *et al.*, 2008), creando compartimentos heterogéneos en composición fisicoquímica que afectan y contribuyen a la diferenciación fisiológica y expresión génica diferencial de los organismos (Flemming, *et al.*, 2016).

Finalmente, mediante enzimas capaces de degradar la matriz exopolimérica, algunas células se desprenden de la biopelícula y se dispersan para colonizar un nuevo nicho, y si es posible, formar una nueva biopelícula (Vila, *et al.*, 2008; Gupta, *et al.*, 2016; Flemming, *et al.*, 2016). Dentro de las causas que determinan que las células se liberen de la biopelícula, encontramos principalmente a las condiciones nutricionales, esto lo detectan las bacterias por medio de moléculas señaladoras propias del quórum sensing o por sistemas de dos componentes (Ramírez-Mata, *et al.*, 2014)

1.2.3 Biopelículas y virulencia

Actualmente, algunos estudios hacen hincapié en la relación biopelícula-virulencia, donde la formación de estas comunidades contribuye al incremento de la patogenicidad, tolerancia a antibióticos y/o la permanencia dentro del hospedero (Parsek & Sing, 2003; Reisner *et al.*, 2006).

Entre algunas bacterias donde se ha encontrado la relación biopelícula-virulencia destacan *Pseudomonas aeruginosa* (Phillips & Schultz, 2012), *Staphylococcus aureus* (Archer, *et al.*, 2011), *Salmonella enterica* Typhimurium (Xu, *et al.*, 2010) y *E. coli* uropatógena (Mittal, *et al.*, 2015). Pese a las relaciones encontradas, no es posible concluir que la formación de biopelícula conlleva patogenicidad y viceversa (Flemming, *et al.*, 2016).

1.2.4 Biopelícula en EPEC

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

Aunque no se ha estudiado a profundidad el proceso de formación de biopelícula en EPEC, se sabe que el mecanismo difiere con el que presenta *E. coli* K-12, esto es debido a que el genoma de *E. coli* K-12 es diferente en un 25% con serotipos relacionados a EPEC (Luckjanceko, *et al.*, 2010). EPEC presenta 1 Mb más en su genoma y no presenta genes relacionados con la producción de poli- β -1,6-*N*-acetilglucosamina que en *E. coli* K-12 son necesarios para la formación de biopelículas (Reisner, *et al.*, 2006; Iguchi, *et al.*, 2009).

Existen otros ejemplos en los que diversos serotipos de la misma especie utilizan estrategias y apéndices diferentes para la formación biopelícula (Yildiz & Vilsick, 2009).

E. coli enterohemorrágica (EHEC) es una cepa relacionada genéticamente con EPEC, algunos estudios han demostrado que cepas EHEC son capaces de adherirse, colonizar y formar biopelículas en las que participan adhesinas, pili de tipo 1, flagelos, curli (proteínas fibrosas extracelulares), entre otros factores (Cookson, *et al.*, 2002). Pese a que EPEC forma microcolonias e infecciones persistentes, no se conoce mucho respecto a la formación de biopelícula y cómo sobrevive fuera del hospedero.

En el primer estudio sobre la formación de biopelícula de EPEC E2348/69 (Moreira, *et al.*, 2006), se obtuvo la formación de una biopelícula robusta bajo condiciones de flujo continuo independientemente de la superficie que colonizan y se encontró la participación de algunas estructuras bacterianas como fimbrias tipo 1, Ag43, BFP y EspA (proteína estructural del filamento del SST3) en las etapas iniciales de la formación de la biopelícula bacteriana (**Fig. 5**).

Posteriormente se evaluó la formación de biopelícula en cepas atípicas de EPEC (aquellas que no poseen el plásmido EAF), en donde se encontró que algunas cepas formaban biopelículas sólo a cierta temperatura en superficies abióticas interfase aire-líquido (Weiss-Muzkat, *et al.*, 2010). En otro estudio de cepas atípicas (Nascimento, *et al.*, 2014) se reportaron mutantes incapaces de formar biopelícula y adherirse a superficies abióticas, las mutaciones se encontraron en genes de fimbrias tipo 1 (*fimC*, *fimD* y *fimH*), la diguanilato ciclase DgcZ, ATP sintetasa F1 y el gen no caracterizado *yjiC*.

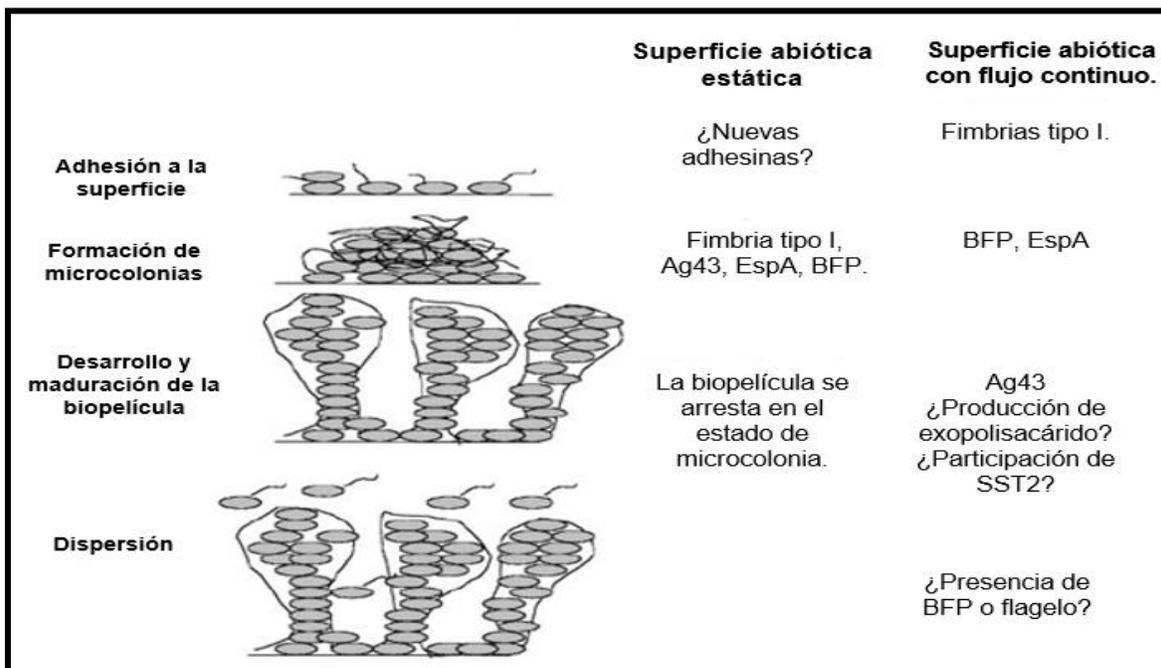


Figura 5. Formación de biopelícula en EPEC E2348/69. Se presentan los dos modelos de formación de biopelícula en superficies abióticas bajo condiciones estáticas y de flujo continuo. Bajo condiciones estáticas, la adherencia inicial podría estar modulada por la participación de nuevas adhesinas, posteriormente en la formación de microcolonias participan fimbrias de tipo I, Ag43, EspA y BFP donde por condiciones desconocidas, la formación de la biopelícula se detiene. Por otro lado, bajo flujo continuo la adherencia inicial está mediada por fimbrias de tipo I, la formación de microcolonias depende al menos de BFP y EspA, el desarrollo de la biopelícula madura requiere del antígeno 43 y tal vez exopolisacárido y secreción de tipo II. Esta biopelícula más tarde se dispersa, probablemente utilizando flagelos, que se expresan solo a las 24 h (Modificado de Moreira, *et al.*, 2006).

Se conoce muy poco sobre la capacidad de EPEC para formar biopelícula. Debido a que las bacterias formando biopelículas son tolerantes a los antimicrobianos, la investigación sobre formación de biopelículas de EPEC puede ayudarnos a comprender su posible relación con las infecciones persistentes.

1.3 Bis-(2',5')-monofosfato de guanosina cíclico

Tanto la formación de biopelícula como la virulencia son respuestas celulares a ciertas señalizaciones ambientales. Los segundos mensajeros son moléculas de bajo peso molecular que participan en la señalización celular para potenciar o retransmitir una señal en la célula. Generalmente en las bacterias el segundo mensajero más conocido es el monofosfato de adenosina cíclico (AMP cíclico) relacionado con la utilización de fuentes de carbono de la bacteria (DiPilato & Zhang, 2008). El tetrafosfato de guanosina ((p)ppGpp) es otro segundo mensajero relacionado a la limitación de nutrientes, crecimiento y estrés (DiPilato & Zhang, 2008). Además de los dos segundos mensajeros mencionados, existe un tercero que es único en bacterias (Hengge, et al., 2009; 2016) denominado bis-(3',5')-ácido diguanílico cíclico (di-GMP cíclico).

El di-GMP cíclico es una molécula formada por dos unidades de riboguanosina unidas por enlaces 3'-5'fosfodiéster (Hengge, *et al.*, 2009). Inicialmente el di-GMP cíclico se describió como un activador alostérico de la producción de celulosa en *Gluconacetobacter xillynus* (Ross, *et al.*, 1987); actualmente se le ha involucrado en varios procesos celulares como la producción de exopolisacáridos, cambio de vida planctónica, motilidad, formación de biopelícula, expresión de fimbrias y virulencia (Hengge, *et al.*, 2009).

1.3.1 Síntesis de di-GMP cíclico

La regulación de la concentración de di-GMP cíclico está determinado por la acción antagonica de dos clases de enzimas: diguanilato ciclasas y fosfodiesterasas (**Fig. 6**) (Hengge, *et al.*, 2009; 2016).

Las diguanilato ciclasas (DGCs) son enzimas encargadas de la síntesis del di-GMP cíclico, forman un homodímero donde cada unidad toma una molécula de guanosín trifosfato (GTP) y, mediante la unión del intermediario diguanosín-tetrafosfatado (pppG3'p5'G), se forma el di-GMP cíclico (Paul, *et al.*, 2004; Hengge, *et al.*, 2009; 2016). Por otra parte, las fosfodiesterasas (PDEs) catalizan la hidrólisis del di-GMP cíclico al nucleótido lineal 5'-

fosfoguanilil-(3'-5')-guanosina (pGpG) que posteriormente se transforma a GMP (Christen, *et al.*, 2005; Hengge, *et al.*, 2009; 2016).

Tanto las DGCs como las PDEs, presentan dominios funcionales en su extremo carboxilo terminal, característicos de su actividad (Hengge, *et al.*, 2009), las DGCs presentan un dominio conocido como GG(D/E)EF por los residuos de aminoácidos que presenta (Gly-Gly-(Asp/Glu)-Glu-Phe), por su parte las PDEs también poseen uno de dos dominios específicos, conocidos como EAL (Glu-Ala-Leu) ó HD-GYP (His-Asp-Gly-Tyr-Pro). Algunas proteínas con dominios de DGC o PDE, cuentan con otros dominios asociados a fosforilaciones, unión a DNA, unión a proteínas, etc. (Hengge, *et al.*, 2009; 2016). Debido a la presencia de los dominios conservados, se ha establecido una nomenclatura general para nombrarlas, de acuerdo con la función que desempeñen (Hengge, *et al.*, 2016).

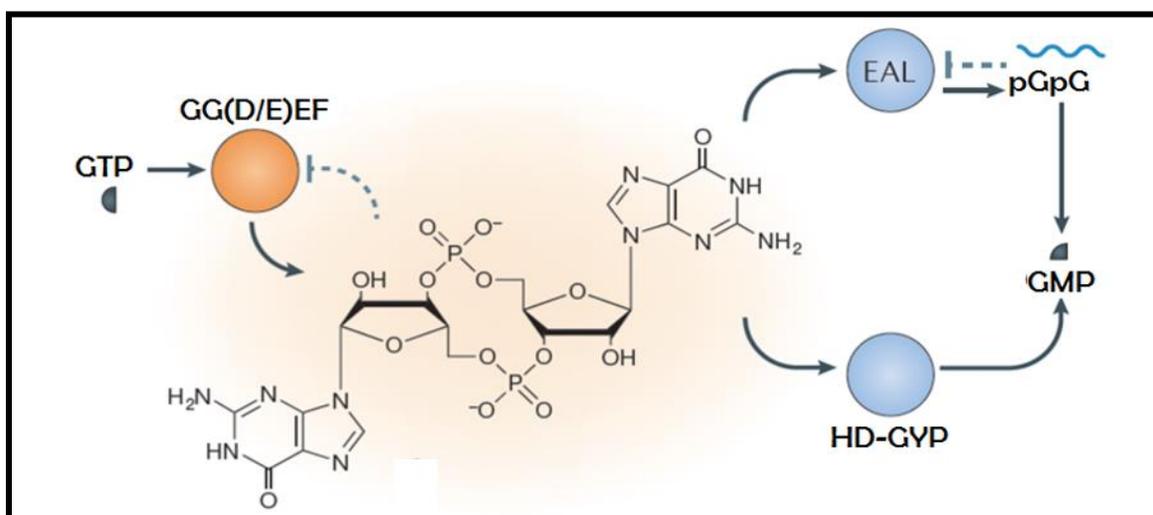


Figura 6. Síntesis de di-GMP cíclico. Las diguanilato ciclasas con dominio GGDEF catalizan la síntesis del di-GMP cíclico por medio de la unión de dos moléculas de GTP. Las fosfodiesterasas con dominios EAL o HD-GYP hidrolizan al di-GMP cíclico hasta formar GMP (Modificado de Jenal, *et al.*, 2017)

Aunque las DGCs y PDEs se encuentran en casi todas las bacterias, las vías de señalización de este segundo mensajero no son igualmente abundantes en las bacterias, donde algunas cepas aún dentro de la misma especie presentan cantidades diferentes de genes que codifican para DGCs o PDEs (Hengge, *et al.*, 2016). La presencia o ausencia de algunos de estos genes

podría indicar que no poseen una actividad redundante; a lo largo del ciclo de vida de la bacteria, se ha reportado la expresión diferencial y específica de DGCs y PDEs que conlleva a una producción de di-GMP cíclico diferente en concentración y ubicación dentro de la célula, por lo que se sugiere que dependiendo del lugar y gradiente de concentración, ciertos efectores se activan o reprimen, es decir la señalización por di-GMP cíclico es específica (Hengge, *et al.*, 2009 ; 2016).

1.3.2 di-GMP cíclico en EPEC

Aunque en la década de los 90 se describió al di-GMP cíclico (Ross, *et al.*, 1987), aún no se ha estudiado a profundidad su papel en bacterias. En *E. coli* K-12 se encuentran codificados 29 genes relacionados a dominios de DGC o PDE, en donde 12 corresponden al dominio GG(D/E)F, 13 a dominios EAL y 4 presentan ambos dominios (Hengge, 2010; Povolotsky & Hengge, 2012). Aunque se han estudiado algunas de las enzimas de di-GMP cíclico en *E. coli*, quedan otras por ser estudiadas (Povolotsky & Hengge, 2015).

Retomando la idea de que al parecer no existe redundancia funcional en DGCs y PDEs, podemos encontrar que ciertas cepas de *E. coli*, de acuerdo con su hábitat, tengan ausentes algunas de estas proteínas. Un estudio reciente refuerza esta idea (Povolotsky & Hengge, 2015), ya que al realizar un análisis bioinformático de 61 cepas de *E. coli* tanto patógenas como ambientales, se encontró que algunos patotipos tienden a poseer ciertas DGCs o PDEs, como ejemplo tenemos que EPEC no comparte todas las DGCs y PDEs con otras cepas A/E como EHEC. Por lo que la adecuación a los hábitats y los mecanismos presentes en las cepas, están en función con la presencia o ausencia de estas proteínas.

EPEC presenta 10 genes de DGC: *dgcC*, *dgcE*, *dgcF*, *dgcI*, *dgcJ*, *dgcM*, *dgcN*, *dgcP*, *dgcQ* y *dgcZ*; donde *dgcE* tiene una inserción ISEc13 que suprimen sus actividades como catalizadoras de la síntesis de di-GMP cíclico, *dgcM* posee una delección en el nucleótido 88 que codifica para una proteína con una delección en el carboxilo terminal perdiendo el dominio de DGC por lo que no es funcional y *dgcQ* tiene una delección de un nucleótido después de los nucleótidos 1282 que da a lugar a un corrimiento del marco de lectura por lo que no es funcional.

Por otra parte, posee 12 genes relacionados a PDEs: *pdeA*, *pdeB*, *pdeC*, *pdeD*, *pdeF*, *pdeH*, *pdeI*, *pdeK*, *pdeL*, *pdeN*, *pdeO* y *pdeR*. En el que *pdeC* presenta un codón de término en los nucleótidos 414 dando lugar a una proteína tuncada pero aparentemente funcional, ya que conserva su dominio EAL.

Y, finalmente presenta 4 genes que codifican para proteínas con dominios de DGC y PDE: *csrD*, *cdgI*, *rflP* y *bluF* (Povolotsky & Hengge, 2015; NCBI, 2017).

Se han estudiado algunas DGCs o PDEs que *E. coli* y EPEC comparten, aunque no se han investigado propiamente en EPEC, por lo que la función del di-GMP cíclico, por medio de la regulación de DGCs y PDEs, aún debe investigarse en EPEC.

2. ANTECEDENTES

Hazen y colaboradores (2015) publicaron el transcriptoma de EPEC E2348/69 bajo condiciones de represión y expresión de genes de virulencia (medio LB y DMEM/ células HeLa respectivamente) en tres fases de crecimiento.

La comparación del transcriptoma global, por medio de RNA seq, se utilizó para identificar diferencias en la expresión de genes entre estas condiciones (Hazen, *et al.*, 2015).

Algunos de los genes expresados diferencialmente son *dgcJ*, *pdeB* y *pdeL* los cuales se expresan preferentemente en medio LB a DO=0.2 (**Fig. 7**), por lo que podrían estar siendo reprimidos cuando se expresan factores de virulencia en DMEM. Además, en esta condición, se observó la transcripción de factores de virulencia conocidos, como: *ler*, *tir* o *bfpA*,.

Por otra parte, *dgcZ* se expresó preferentemente cuando se infectaron células HeLa con EPEC, en comparación a cuando la bacteria creció en medio DMEM a DO=0.2 (**Fig. 8**), lo cual contrasta con el perfil transcriptómico de *ler*, que fue mayor en medio DMEM que en células HeLa.

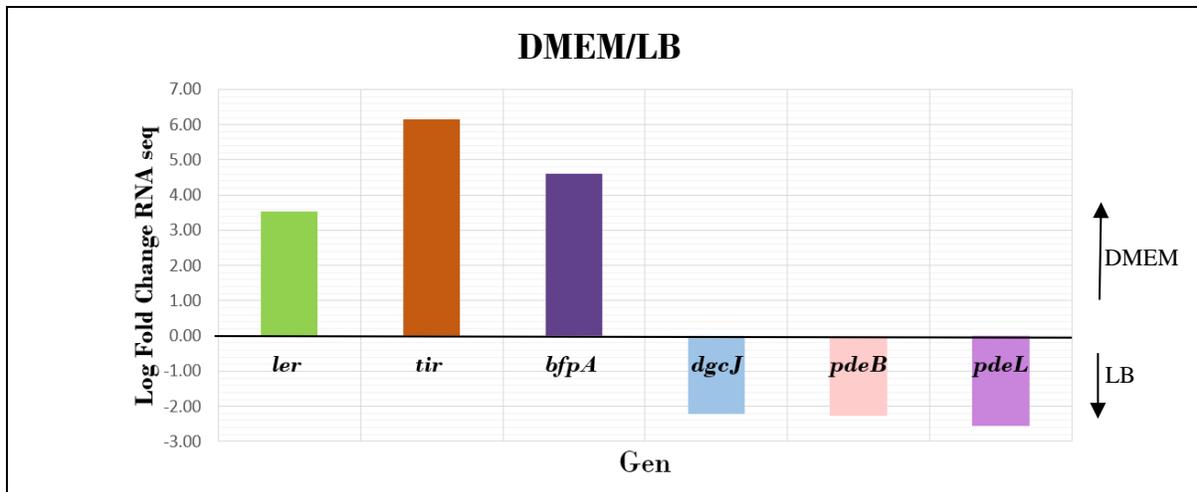


Figura 7. Expresión diferencial de algunos genes de EPEC entre medio DMEM y LB. La expresión de *dgcJ*, *pdeB* y *pdeL* es mayor en medio LB comparada con DMEM; lo anterior contrasta con los transcritos de *ler*, *tir* y *bfpA* en medio DMEM.

Debido a los pocos estudios de DGCs y PDEs en EPEC, y tomando en cuenta la expresión diferencial de los genes, decidimos trabajar con estas DGCs y PDEs para conocer su participación en la expresión de virulencia o formación de biopelícula.

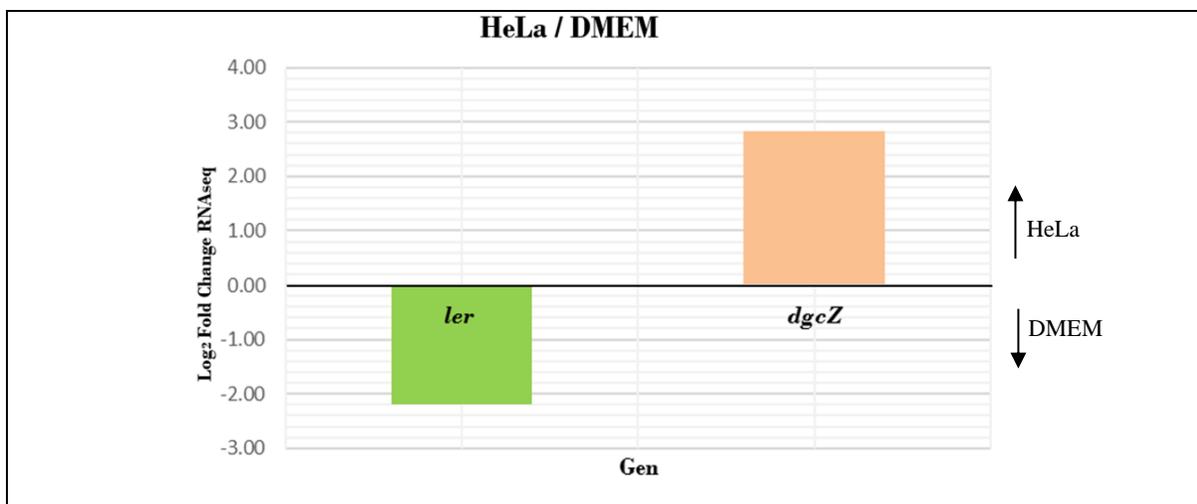


Figura 8. Expresión diferencial de algunos genes de EPEC entre células HeLa y medio DMEM. La expresión de *dgcZ* es mayor en células HeLa comparada con DMEM. Ello contrasta con la transcripción de *ler* que se favorece en medio DMEM comparado con células HeLa.

2.1 *dgcJ* (*yeaJ*)

Es una DGC que posee dominio GGDEF, además presenta otro dominio cuya función no ha sido caracterizado denominado GAPES (Gammaproteobacterial Periplasmic Sensory). Su expresión en *E. coli* K-12 reduce la motilidad y regula la formación de biopelícula (Sommerfeldt, *et al.*, 2009; Sánchez-Torres, *et al.*, 2011; Hengge, *et al.*, 2016)

2.2 *dgcZ* (*ydeH*)

Además de presentar el dominio GGEEF, posee un dominio CZB (cofactor zinc binding) que regula alostéricamente con Zn^{2+} su actividad. En *E. coli* K-12 esta participa en la producción de PGA (Bohem, *et al.*, 2009) y se ha observado que al interactuar con el complejo FRD (fumarato reductasa) la bacteria es capaz de desprenderse de la superficie a la cual está adherida, cuando desarrolla biopelícula (Jonas, *et al.*, 2008; Römling, *et al.*, 2013; Lacanna, *et al.*, 2016).

2.3 *pdeB* (*ylaB*)

Es una fosfodiesterasa con dominio EAL anclada a la membrana interna, actualmente se conoce que está involucrada en la regulación de formación de biopelícula en *E. coli* K-12 (Herbst, *et al.*, 2018).

2.4 *pdeL* (*yahA*)

Es una fosfodiesterasa que presenta los dominios EAL y uno tipo LuxR que le permite unirse al DNA (Reinders, *et al.*, 2015). Para su funcionamiento requiere como cofactor Mg^{2+} principalmente, aunque puede utilizar Mn^{2+} y su actividad se reprime con Ca^{2+} .

En *E. coli* adherente-invasiva (AIEC), la mutante en *pdeL* restaura parcialmente los defectos asociados a la pérdida del gen de filamento $\Delta filA$. En la cepa doble mutante se observó la restauración de la adhesión, invasión y síntesis de pili tipo I, factores clave para el desarrollo de virulencia (Schmidt, 2005; Claret, 2007).

3. HIPÓTESIS

Las actividades de las proteínas: DgcJ y DgcZ (DGC), PdeB y PdeL (PDE) son relevantes en la expresión de los genes de virulencia y la formación de biopelícula en EPEC E2348/69 (Fig. 9).

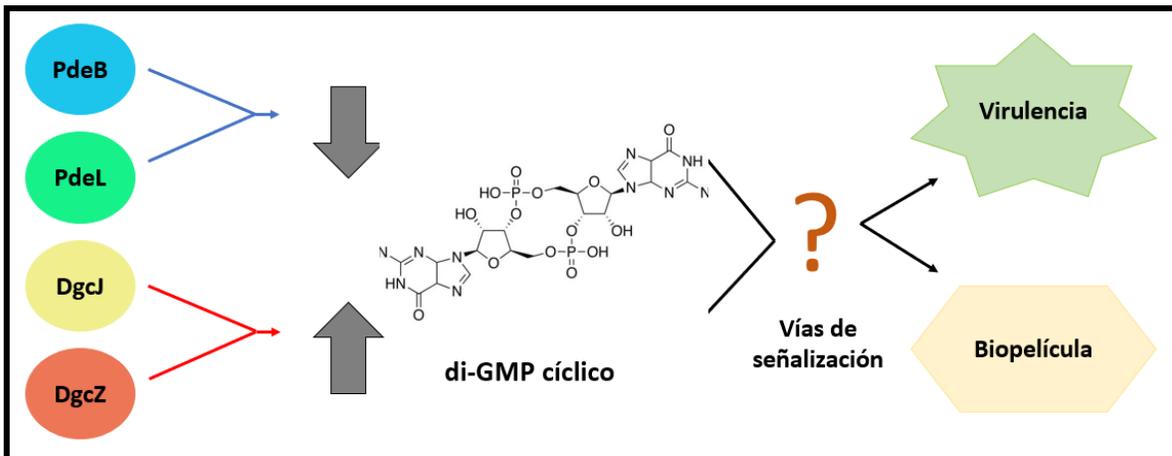


Figura 9. Modelo hipotético de la relación entre di-GMP cíclico y virulencia ó formación de biopelícula en EPEC E2348/69.

4. JUSTIFICACIÓN

Debido al impacto sobre la salud humana que presentan los agentes enteropatógenos, especialmente los patógenos A/E, es necesario estudiar las bases moleculares que favorecen la infección en el hospedero. Aunado a lo anterior se desconoce la participación del segundo mensajero, di-GMP cíclico, en los procesos de patogénesis en estas cepas.

Por lo cual, nuestro interés radica en conocer si las DGCs y PDEs codificadas en el genoma de EPEC participan en procesos que le permiten establecer una infección exitosa y, por otra parte, encontrar nuevos blancos farmacéuticos para su tratamiento.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Determinar el papel que juegan dos DGCs y dos PDEs en la expresión de los factores de virulencia y la formación de biopelícula en la cepa típica de *Escherichia coli* enteropatógena E2348/69.

5.2 Objetivos particulares

Evaluar en EPEC el efecto de la sobreexpresión de los genes *dgcJ*, *dgcZ*, *pdeB* y *pdeL* sobre:

- 1- La expresión de BFP y algunos de los componentes del inyector codificado en la isla LEE (EspA, EspB/D, EspC, EscJ, Tir).
- 2- La formación de biopelícula.

5.3 Objetivos específicos

- 1- Clonar los genes *dgcJ*, *dgcZ*, *pdeB* y *pdeL* de EPEC en el vector de expresión pMPM-T6.
- 2- Analizar el efecto de la sobreexpresión individual de estos genes en la regulación de los factores de virulencia mediante:
 - 2.1- Visualizar el perfil de secreción de las proteínas EspA, EspB/D y EspC por SDS-PAGE.
 - 2.3- Detectar por western blot las proteínas Tir, EspB y EscJ, todas ellas codificadas en el LEE
 - 2.4- Determinar mediante fusiones con el gen reportero *cat* la actividad transcripcional de los promotores de los operones *bfpA* y *LEE2*.
- 3- Determinar el efecto de la sobreexpresión individual de estos genes en la formación de biopelícula sobre una superficie abiótica (placas de poliestireno de 96 pozos), evaluando en 5 medios utilizados en el laboratorio, a 30 y 37° C por 12, 24 y 36 horas.

6. MÉTODOS

6.1 Plásmidos y cepas

En este trabajo se emplearon las cepas, plásmidos y oligonucleótidos descritos en la **Tabla 1** y **Tabla 2**, respectivamente.

Tabla 1. Plásmidos y cepas utilizados.

Plásmido	Descripción	Referencia
pMPMABD	Plásmido que lleva subdominio ABD de RcsC bajo un promotor inducible con arabinosa. Derivado de PMPM T6	Oropeza, et al. (2015)
pMPM T6	Plásmido de bajo número de copias, Tc ^R , posee un promotor inducible con arabinosa.	Mayer, P. (1995)
pMPM T6- <i>dgcJ</i>	Derivado de pMPM T6 que expresa DgcJ.	Este trabajo.
pMPM T6- <i>dgcZ</i>	Derivado de pMPM T6 que expresa DgcZ.	Este trabajo.
pMPM T6- <i>pdeB</i>	Derivado de pMPM T6 que expresa PdeB.	Este trabajo.
pMPM T6- <i>pdeL</i>	Derivado de pMPM T6 que expresa PdeL.	Este trabajo.
pCAT232	Fusión transcripcional con la región promotora (-232 a +76) de <i>bfpA</i> unido al gen reportero cloranfenicol acetil transferasa. Ap ^R	Puente, et al. (1996)
pKK232-8+LEE2-cat	Fusión transcripcional de la región -469 a +121 a partir del inicio de LEE2 unido al gen reportero cloranfenicol acetil transferasa. Ap ^R	Bustamante, et al. (2001)
Cepa	Descripción	Referencia
<i>E. coli</i> K-12	Silvestre	Cepa de laboratorio
EPEC	Silvestre, Sm ^R . EPEC E2348/69	Levine, et al. (1978)
Δ <i>perA</i>	EPEC mutante en <i>perA</i> Sm ^R , Km ^R	Bustamante, et al. (2001)
Δ <i>ler</i>	EPEC mutante en <i>ler</i> , Sm ^R	Puente, et al., (1996)
EPEC-T6	EPEC Sm ^R , transformada con pMPMT6, Tc ^R	Este trabajo
EPEC- <i>dgcJ</i>	EPEC transformada con pMPMT6 - <i>dgcJ</i> .	Este trabajo
EPEC- <i>dgcZ</i>	EPEC transformada con pMPMT6 - <i>dgcZ</i> .	Este trabajo
EPEC- <i>pdeB</i>	EPEC transformada con pMPMT6 - <i>pdeB</i> .	Este trabajo

EPEC- <i>pdeL</i>	EPEC transformada con pMPMT6 - <i>pdeL</i> .	Este trabajo
K-12-pABD	<i>E. coli</i> K-12 transformada con pMPMABD.	Oropeza, <i>et al.</i> (2015)
EPEC E2348/69- pCAT232	EPEC transformada con pCAT232.	Puente, <i>et al.</i> (1996)
Δ <i>perA</i> -pCAT232	EPEC Δ <i>perA</i> transformada con pCAT232.	Este trabajo
EPEC-T6- pCAT232	EPEC-T6 transformada con pCAT232.	Este trabajo
EPEC- <i>dgcJ</i> - pCAT232	EPEC- <i>dgcJ</i> transformada con pCAT232.	Este trabajo
EPEC- <i>dgcZ</i> - pCAT232	EPEC- <i>dgcZ</i> transformada con pCAT232.	Este trabajo
EPEC- <i>pdeB</i> - pCAT232	EPEC- <i>pdeB</i> transformada con pCAT232.	Este trabajo
EPEC- <i>pdeL</i> - pCAT232	EPEC- <i>pdeL</i> transformada con pCAT232.	Este trabajo
EPEC-pLEE2	EPEC transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo
Δ <i>ler</i> -pLEE2	EPEC Δ <i>ler</i> transformada con pKK232-8+LEE2-cat .	Este trabajo
EPEC-T6-pLEE2	EPEC-T6 transformada con pKK232-8+LEE2-cat .	Este trabajo
EPEC- <i>dgcJ</i> / pLEE2	EPEC- <i>dgcJ</i> transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo
EPEC- <i>dgcZ</i> / pLEE2	EPEC- <i>dgcZ</i> transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo
EPEC- <i>pdeB</i> / pLEE2	EPEC- <i>pdeB</i> transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo
EPEC- <i>pdeL</i> / pLEE2	EPEC- <i>pdeL</i> transformada con pKK232-8+LEE2-cat.	Este trabajo

Tabla 2. Oligonucleótidos empleados

Nombre	Secuencia	TM
DgcJ SaII	TGGCTGTCGACTTGGCTCAG	45° C
DgcJ XbaI	CTTTATCTAGATTTCTCGTTTC	45° C
DgcZ NcoI	GAGTGGCCATGGTCAAGAAGAC	48° C
DgcZ SaII	CAAATGGGTCGACTAATGAACG	48° C
PdeB XbaI	TCCACATCTAGATATACTTTCCC	48° C
PdeB XhoI	CCATTGTTTCTCGAGTTTGGC	48° C
PdeL NcoI	GGTGTGTCATGGATTCATGTG	48° C
PdeL SaII	CAGGAGTTCGACTCTGGTGCC	48° C

Los nucleótidos subrayados indican el sitio de reconocimiento para las enzimas de restricción utilizadas (en negrita).

6.2 Condiciones de crecimiento

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

6.3 Extracción de DNA

Para la extracción de DNA genómico y plasmídico se utilizó el kit Wizard® Genomic DNA Purification y el Zippy™ Plasmid Miniprep Kit, respectivamente, siguiendo al pie de la letra los instructivos.

6.4 Condiciones de PCR

Con el fin de amplificar y verificar las construcciones se utilizó la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con los siguientes volúmenes:

Tabla 3. Mezcla para reacción de PCR

Reactivo	Cantidad (µL)
DNA (100 ng/mL)	2
Oligo Forward (10 pmol/µL)	0.625
Oligo Reverse (10 pmol/µL)	0.625
dNTPs (10 mM)	2
MgCl ₂ (50 mM)	0.75
Buffer 10x	2.5
H ₂ O	16.35
Taq polimerasa (5U/µL)	0.15

Las temperaturas de alineamiento en el termociclador variaron de acuerdo a la T_m de los oligonucleótidos (X), con las siguientes condiciones:

5 minutos ----- 94° C
1 minuto ----- 94° C
45 segundos ----- X
1:30 minuto ----- 72° C
3 minutos ----- 72° C

} 30 ciclos

6.5 Electroforesis en gel de agarosa 1.5 %

Todas las muestras derivadas de las extracciones genómicas, plasmídicas, digestiones enzimáticas y productos de PCR se separaron por medio de una electroforesis en gel de agarosa al 1.5% con amortiguador TAE 1X a 100V, 40A por 40 minutos. Terminada la corrida, el gel se tiñó con una solución rebajada de bromuro de etidio por 15 minutos en agitación, y finalmente se observaron sobre luz ultravioleta.

6.6 Clonación

Para clonar los genes de DGCs y PDEs, decidimos utilizar el plásmido pMPM T6 porque presenta un promotor inducible con arabinosa (Mayer, 1995). Los mapas de las construcciones se presentan en la **Figura 10**.

Una vez que se amplificaron los genes a clonar, se purificaron las bandas del gel de agarosa 1.5% utilizando Zymoclean™ Gel DNA Recovery Kit siguiendo el instructivo al pie de la letra.

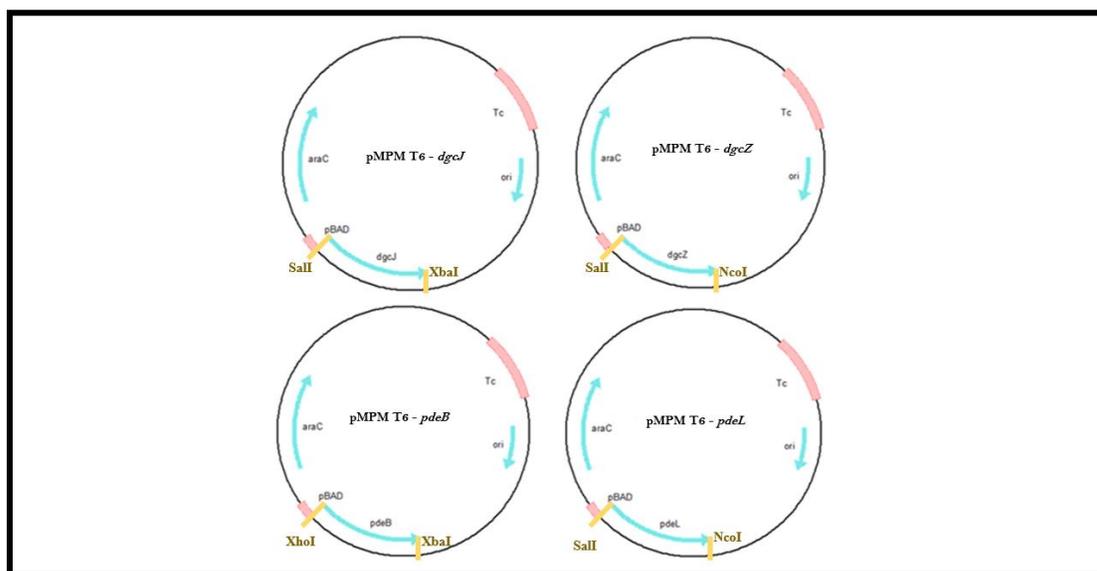


Figura 10. Construcciones. Con base en el plásmido pMPM T6, se diseñaron las construcciones para clonar *dgcJ* (arriba izq.), *dgcZ* (arriba der.), *pdeB* (abajo izq.) y *pdeL* (abajo der.)

Cuando se tuvieron purificados los productos de PCR y el plásmido, se procedió a realizar las digestiones correspondientes:

Digestión	Enzima de restricción
pMPM T6	*NcoI / SalI
	*XbaI / SalI
	*XbaI / XhoI
<i>dgcJ</i>	XbaI / SalI
<i>dgcZ</i>	NcoI / SalI
<i>pdeB</i>	XbaI / XhoI
<i>pdeL</i>	NcoI / SalI

Para las digestiones se utilizó: 25.5 µL de producto de PCR (2.5 µg/µL) + 3 µL de Buffer correspondiente + 1.5 µL de enzima y 28 µL de plásmido (2.5 µg/µL) + 4.5 µL de Buffer correspondiente + 2 µL de enzima, los volúmenes se llevaron a 30 y 45 µL finales con agua. Las digestiones se realizaron utilizando una enzima, purificando y cortando con la segunda enzima, las mezclas se incubaron a 37° C por 3 horas.

Los insertos y los vectores digeridos se ligaron utilizando: 50 ng de vector y 100 ng de inserto correspondiente + 2 µL de Buffer 5x (Invitrogen) + 1 µL de T4 DNA ligasa (1 U/ µL). Esta mezcla se incubó O.N. a 4° C.

Posteriormente, se transformaron células electrocompetentes de *E. coli* K-12, se seleccionaron al menos dos candidatas de cada transformación, se les extrajo DNA plasmídico y se mandaron a secuenciar (utilizando oligonucleótidos flanqueantes a los genes clonados) a la Unidad de Síntesis y Secuenciación de DNA, IBt UNAM. Una vez que las secuencias no mostraron cambios en los nucleótidos, se procedió a transformas células de EPEC E2348/69 con cada construcción.

6.7 Preparación de células electrocompetentes y transformación

De un ON en 5 mL de LB, se reinocularon 500 μ L en 50 mL de medio LB con sus respectivos antibióticos, hasta que la población bacteriana llegó a una DO cercana a 0.6 a 600nm. El cultivo se centrifugó por 10 minutos a 8,000 rpm y se desechó el sobrenadante. Posteriormente, la pastilla se lavó 3 veces con agua fría y estéril, bajando el volumen de agua (50 mL, 25 mL y 10 mL), la pastilla final se resuspendió en 1mL de glicerol al 10% frío y estéril, y se hicieron alícuotas de 80 μ L.

Tomando una alícuota, se le agregó 5 μ L de la construcción y se transfirió a una celda de electroporación de 0.2 cm (Bio-Rad), donde se les dio un pulso eléctrico E2 de Micropulser Biorad. Posteriormente se recolectaron las células en 1 mL de medio SOC y se incubaron a 37° C por una hora. Cuando terminó la incubación, los tubos se centrifugaron por 3 minutos a 8,000 rpm, se desechó aproximadamente 900 μ L del sobrenadante y con el resto se suspendió la pastilla para plaquearla en una caja de LB agar con su respectivo antibiótico, para incubarlo por 24 hs a 37° C.

6.8 Cuantificación de actividad de fusiones reporteras CAT

De un ON de cada cepa, se inoculó 50 μ L en 5 mL de medio LB y DMEM con 10% de LB, cada uno con sus respectivos antibióticos, el ensayo se realizó induciendo el promotor pBAD con 0.005% de arabinosa

Tomando muestras por duplicado de las cepas con las fusiones indicadas (pCAT232 y pKK232-8+*LEE-cat*), a una $DO_{600nm} = 1$, se centrifugaron 1.5 mL por 3 min a 14, 000 rpm y el sobrenadante se desechó. Las pastillas se lavaron con 800 μ L de PBS, posteriormente las pastillas limpias se resuspendieron con 300 μ L de TDTT (Tris-HCl 50 mM [Tris-HCl 1 M 50 mL pH 7.8 por litro], Ditiotreitól 30 μ M [DDT 1M 30 μ L por litro]) y se sonicaron por 3 minutos en intervalos de 10 segundos, posteriormente se centrifugaron 15 minutos a 14, 000 rpm y se recolectó el sobrenadante manteniéndose frío en todo el proceso.

Para medir la concentración de proteínas, se cargaron 15 μ L de muestra por duplicado en una placa de poliestireno de 96 pozos. A cada pozo se le añadió 200 μ L de reactivo BCA y se incubaron a 37° C por 30 minutos, transcurrido el tiempo se leyó en el lector de microplaca a una absorbancia de 562 nm.

Para determinar la actividad de *cat*, se cargó 5 μ L de cada muestra por duplicado dejando dos pozos blancos (con TDTT), posteriormente se les agregó 200 μ L de la solución de reacción CAT (Acetil CoA 0.1 mM, cloranfenicol 0.1 mM, DTNB sigma 1 mM disuelto en buffer Tris-HCl 0.1 M a pH 7.8). Inmediatamente se leyeron las placas a una absorbancia de 412 nm cada 5 segundos por 5 minutos.

Los valores de proteína y *cat* se ajustaron automáticamente por el software con base a una curva estándar de concentración previamente establecida. Posteriormente las actividades de las fusiones se obtuvieron dividiendo la actividad enzimática *cat* entre la cantidad de proteína.

6.9 Western-blot

De un ON de cada cepa, se inoculó 50 μ L en 5 mL de medio LB y DMEM con 1% de LB, cada uno con sus respectivos antibióticos, el ensayo se realizó induciendo el promotor pABD con 0.005% de arabinosa.

Los cultivos se dejaron crecer hasta alcanzar una $DO_{600nm} = 1$, se centrifugaron 1.5 mL a 13,000 rpm por 3 minutos y se guardó la pastilla formada por las células.

Las pastillas se resuspendieron con 80 μ L de urea y 20 μ L de amortiguador de carga (5 mL glicerol 100% + 2 mL SDS 20% + 1 mL β -mercaptoetanol 10% v/v + 2.5 mL Tris HCl 1M pH 6.8 + 0.02 g azul de bromofenol). Posteriormente se calentaron a 95° C por 10 min. Las mezclas se homogenizaron y se analizaron por electroforesis en un gel desnaturizante de poliacrilamida-SDS al 12% (**Tabla 4**).

Tabla 4. Preparación de gel desnaturalizante de poliacrilamida 12%.

Reactivos	Gel separador	Gel concentrador
H ₂ O	7 mL	6 mL
Acrilamida 30% - Bisacrilamida 0.8%	8 mL	1.5 mL
1.5 M Tris pH 8.8, 0.4% SDS	5 mL	-
0.5 M Tris pH 6.8, 0.4% SDS	-	2.5 mL
PSA 10%	100 µL	50 µL
TEMED	14 µL	10 µL

Los geles se corrieron en una cámara vertical de electroforesis por 12h a 10 mA por cada gel. Una vez terminada la corrida, se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa por medio de otra electroforesis, colocando 3 papeles filtro sobre la base de la cámara, la membrana de nitrocelulosa, el gel de poliacrilamida y 3 papeles filtro, todo lo anterior previamente humedecidos con buffer de transferencia (5.82 g Tris 100% + 2.93 g Glicina 100% + 1.72 mL SDS 20% + 200 mL Metanol 20% + 789.53 mL H₂O). La transferencia se realizó por 43 minutos a 17V.

Una vez que las proteínas se transfirieron, se bañó la membrana con rojo de Ponceau y se lavó tres veces con H₂O destilada, luego la membrana de nitrocelulosa se bloqueó con PBS 1X- Tween 0.1% (PBS 1X [NaCl 80 g/L, Na₂HPO₄, KH₂PO₄ 2g/L, KCl 2 g/L, pH 7.4], Tween-20 0.1% v/v) mezclado con leche en polvo comercial sin grasa al 5% durante 3 horas a temperatura ambiente. Cuando terminó el bloqueo se procedió a lavar la membrana 3 veces con PBS 1X-Tween 0.1%. Seguido de esto, las membranas se incubaron con los anticuerpos primarios (**Tabla 5**), por 2 horas a temperatura ambiente en agitación. Después, las membranas se volvieron a lavar 3 veces por 10 minutos con PBS 1X-Tween 0.1% y se incubaron con el anticuerpo secundario acoplado a peroxidasa por 1 hora a temperatura ambiente.

Tabla 5. Anticuerpos utilizados

Anticuerpos primarios	Concentración
α-GroEL	1:50,000
α-Tir	1:10, 000
α-EspB	1:10, 000
α-EscJ	1:10, 000
Anticuerpos secundarios	
α-Ratón	1:10, 000

De nuevo se lavaron las membranas 3 veces por 10 minutos con PBS 1X-Tween 0.1% y se les añadió reactivo oxidante y luminol 1:1 por 2 minutos. Las membranas se revelaron sobre películas Kodak X-omat en un cuarto oscuro; el tiempo de exposición varió de acuerdo a la intensidad de la reacción con el anticuerpo secundario. Posteriormente las películas se revelaron y fijaron, se enjuagaron a chorro de agua y se dejaron secar.

6.10 Perfil de secreción de proteínas

De los cultivos usados para colectar muestras para western-blot (5.8), se colectaron 4.5 mL de sobrenadante (repartidos en 3 tubos de 1.5 mL) y se les agregó 200 μ L de ácido tricloroacético al 100% a cada tubo, las muestras se dejaron a 4° C por 12 hrs. Posteriormente se centrifugaron por 30 minutos a 14, 000 rpm, y se colectaron en un mismo tubo.

Una vez que se colectó la pastilla de los 4.5 mL, se resuspendió en 80 μ L de buffer de amortiguador de carga (western-blot) donde las densidades ópticas de las cepas se ajustaron a una $DO_{600nm} = 1$. Posteriormente las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida desnaturizante (**Tabla 4**), en una cámara vertical por 12 horas a 10mA por cada gel en amortiguador Tris-Glicina (Tris base 2.5 mM, glicina 19.2 mM, SDS 0.1% pH 8.3). Terminada la corrida los geles se colocaron en moldes cubriéndolos con azul de Coomassie ON en agitación, después se destiñeron con una solución de ácido acético-metanol.

6.11 Cuantificación de biopelícula

A partir de un ON de las cepas, se inocularon 1:100 células en cada medio a probar (LB, LB 50%, LBNS, DMEM, DMEM incubando con CO₂ al 5% a 37°C) a 30 y 37° C, induciendo los plásmidos con 0.005, 0.01 y 0.05% de arabinosa. De la preparación de estos inóculos, se llenaron por cuadruplicados pozos con 200 μ L del cultivo en una placa de poliestireno de 96 pozos. De cada condición se muestrearon a las 12, 24 y 36 hrs.

Para evitar que la arabinosa proporcionada en el medio afectara el fenotipo, se utilizó como control de fuente de carbono a la glucosa (a las mismas concentraciones que la arabinosa). Así mismo para conocer que la inducción del promotor fuera correcta, se utilizó una cepa K-12 con el vector pMPMABD.

Posterior al tiempo de incubación, las placas se leyeron a una absorbancia de 620 nm, para conocer la DO celular, después se retiró el medio de los pozos y se realizaron tres lavados con PBS 1X. Se agregó 200 μ L de metanol a cada pozo por 10 min, se desechó el metanol y la placa se dejó secar a temperatura ambiente, después cada pozo se tiñó con 200 μ L de cristal violeta al 0.2 % durante 10 minutos. Se retiró el cristal violeta y se realizaron tres lavados con agua, la placa se dejó secando ON y se le añadió 200 μ L de ácido acético al 33% para solubilizar los restos de cristal violeta, se agitó durante 10 minutos a 250 rpm y la placa se leyó a una absorbancia de 570 nm (Stepanovic, *et al.*, 2000)

Los datos de biopelícula se correlacionaron entre la DO del cultivo celular para obtener la formación de biopelícula.

6.12 Análisis estadístico

Para evaluar, si los datos obtenidos en la formación de biopelícula y en la expresión de fusiones reporteras son estadísticamente significativos, se realizó una prueba de t de Student para las muestras que presentaran visualmente un efecto en su fenotipo.

En todos los casos comparando la media de una cepa problema contra la media poblacional, con una $P < 0.05$.

7. RESULTADOS

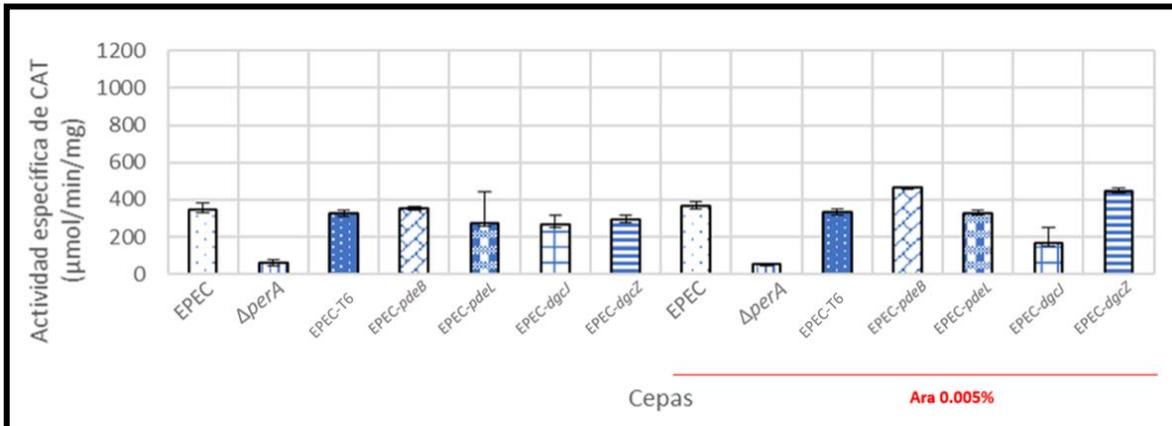
7.1 La expresión de DgcZ favorece la expresión de BFP en medio DMEM.

Se sabe que al crecer a EPEC en medio LB el fenotipo de virulencia disminuye significativamente con respecto al fenotipo observado en DMEM (Puente, et al., 1996; Rosenshine, et al., 1996). Al observar, según los datos de transcriptómica, una correlación inversa entre la expresión de DGCs y PDEs en medio LB y DMEM con respecto a algunos factores de virulencia (Fig. 7 y 8) se evaluó el efecto de la sobreexpresión de cada DGC o PDE elegidas sobre algunos factores de virulencia.

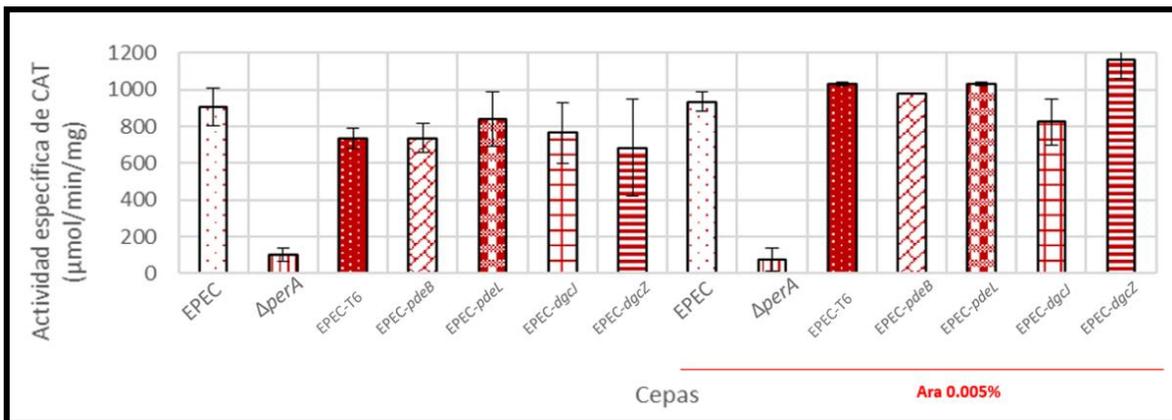
Como parte inicial de la estrategia, se realizó un primer ensayo utilizando el gen reportero *cat* (cloranfenicol acetil transferasa), bajo el control del promotor de *bfp*, el cual codifica para la proteína estructural de la fimbria BFP (pCAT-232) (Puente, et al., 1996), y del promotor del operón LEE2 (pLEE2/pkk232-8+LEE2-cat) donde se encuentran codificados genes del SST3 de la isla LEE (Bustamante, et al., 2001).

Los controles de los ensayos fueron: la cepa EPEC, EPEC/ pT6 para verificar que el plásmido no presentara por sí mismo un efecto y las cepas EPEC con mutaciones en: *perA*, gene donde se encuentra codificado el activador transcripcional de BFP y *ler*, gene del antisilenciador del LEE, como controles negativos. Cada ensayo se realizó sin arabinosa, y con arabinosa al 0.005% para inducir la expresión de cada DGC y PDE.

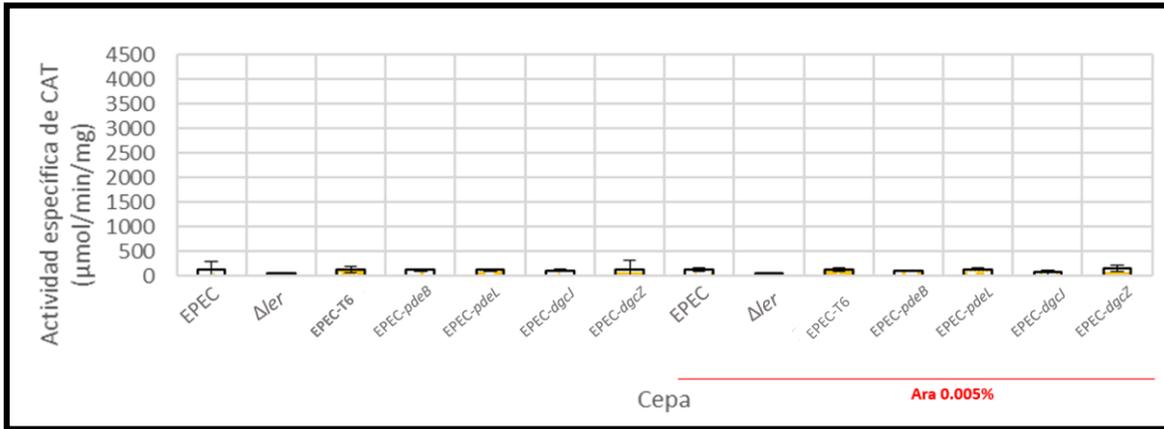
En las gráficas 1 y 2, se observa que, al expresar DgcJ la fusión reportera disminuye su expresión tanto en medio LB como en medio DMEM, sin embargo, esta disminución no es estadísticamente significativa ($P > 0.05$, $n=2$). Del mismo modo, al sobreexpresar a PdeB y PdeL, no existe un cambio significativo en la expresión de *bfpA-cat* en ambos medios. Por otra parte, la sobreexpresión de DgcZ aumenta la actividad de la fusión reportera pCAT-232, en medio DMEM ($P > 0.05$, $n=2$) pero no en medio LB. Para la fusión reportera pLEE2, no se encontraron cambios significativos al sobreexpresar las DGCs y PDEs en ambos medios (Gráfica 3 y 4).



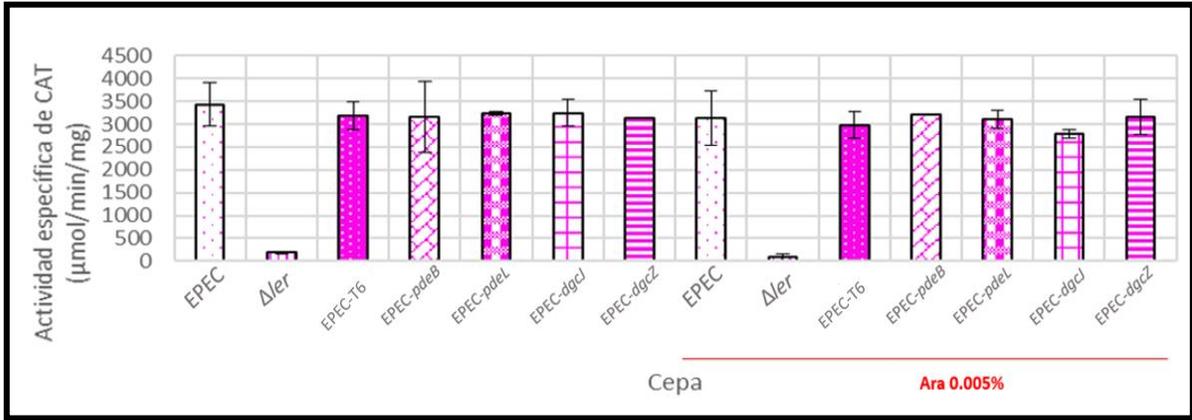
Gráfica 1. Actividad específica de CAT de la fusión *bfpA* en LB. Se muestra la actividad promovida por la fusión pCAT-232 (*bfpA*) en diferentes fondos genéticos. Sin inducir las construcciones e induciéndolas (barra roja) con arabinosa 0.005%. Como control negativo se utilizó EPEC Δ *perA*.



Gráfica 2. Actividad específica de CAT de la fusión *bfpA* en DMEM. Se muestra la actividad promovida por la fusión pCAT-232 (*bfpA*) en diferentes fondos genéticos. Sin inducir las construcciones e induciéndolas (barra roja) con arabinosa 0.005%. Como control negativo se utilizó EPEC Δ *perA*.



Gráfica 3. Actividad específica de CAT de la fusión pLEE2 en LB. Se muestra la actividad de cada fondo genético, sin inducir las construcciones e induciéndolas (barra roja) con arabinosa 0.005%. Como control negativo se utilizó EPEC Δler .



Gráfica 4. Actividad específica de CAT de la fusión pLEE2 en DMEM. Se muestra la actividad de cada fondo genético, sin inducir las construcciones e induciéndolas (barra roja) con arabinosa 0.005%. Como control negativo se utilizó EPEC Δler .

7.2 La sobreexpresión de DGCs y PDEs no afecta al SST3 de la isla LEE o a Tir.

Para evaluar si la expresión de las DGCs o PDEs afectan la síntesis de los factores de virulencia de la isla LEE, se realizó un western-blot para determinar algún efecto del di-GMP cíclico sobre las proteínas de la isla LEE, inmunodetectando a: Tir, EspB y EscJ.

En la Figura 11 se observa como la concentración de Tir disminuye en medio LB al sobreexpresar PdeL, aunque Tir no se ve afectado por la sobreexpresión de PdeB, DgcJ o DgcZ en medio LB y DMEM. Por otra parte, la cantidad de EspB no se ve modificada por alguna de las DGCs o PDEs en ninguno de los dos medios.

La inmunodetección de EscJ mostró que la sobreexpresión de DgcJ, DgcZ, PdeL y PdeB no alteran su presencia en comparación al control, independientemente del cultivo. También podemos observar que el control de carga (α -GroEL) permanece similar en todas las cepas, por lo que los fenotipos observados son comparables.

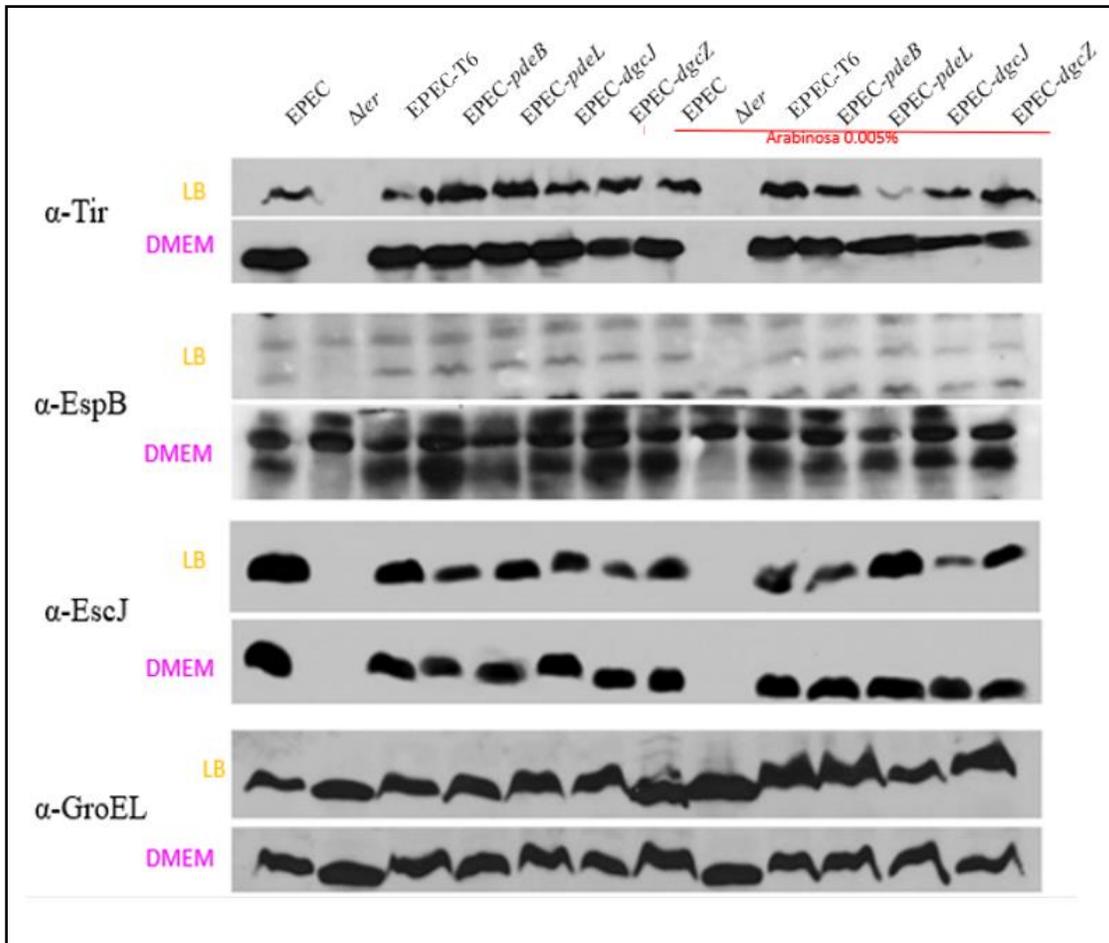


Figura 11. Western-blot en medio LB y DMEM. Bajo la barra roja se muestran las cepas incubadas con 0.005% de arabinosa, las cepas control son aquellas que se incubaron sin arabinosa (sin barra). La detección de factores de virulencia se realizó con anticuerpos α -Tir, α -EspB y α -EscJ, como control de carga proteínica se utilizó α -GroEL, tanto en medio de LB como de DMEM.

7.3 Las proteínas secretadas por EPEC no se afectan por la sobreexpresión de DGCs y PDEs

Continuando con la determinación del papel del di-GMP cíclico sobre algunos factores de virulencia, se realizó un gel SDS-PAGE para poder identificar las proteínas que EPEC secreta a través del SST3 codificado en la isla LEE, como: EspC, EspB/D y EspA. Este experimento se realizó colectando muestras de cultivos crecidos en medio LB y DMEM.

En medio LB (**Figura 12**), se muestra la síntesis basal de las proteínas EspC, EspB/D y EspA. La sobreexpresión de las DGCs y PDEs no alteran su translocación de la bacteria al medio.

De igual manera, en medio DMEM (**Figura 13**), observamos que el fenotipo no se afecta cuando se induce la expresión de las DGCs y PDEs.

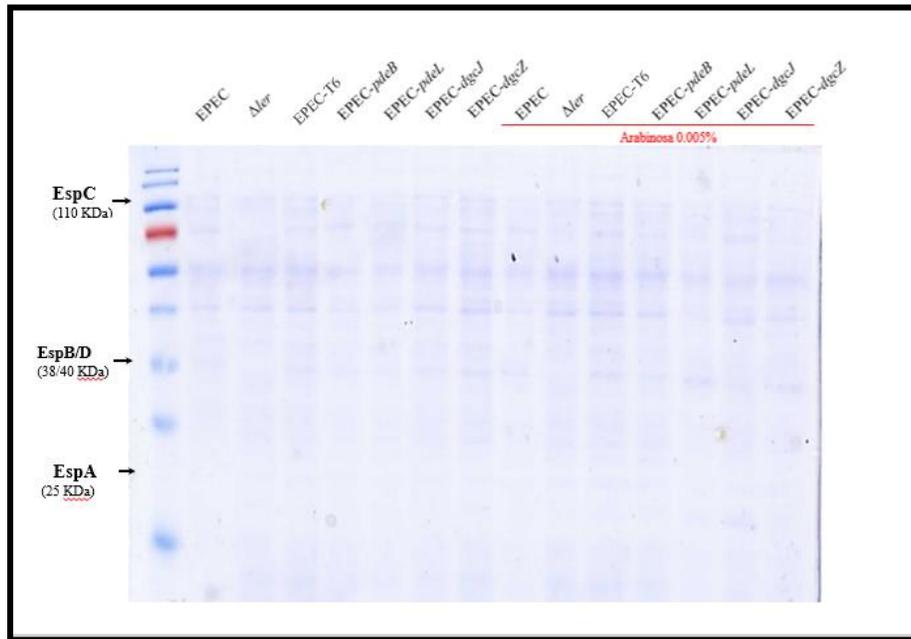


Figura 12. Perfil de secreción de proteínas en LB. Se muestran bajo barra roja, las cepas con arabinosa 0.005%.

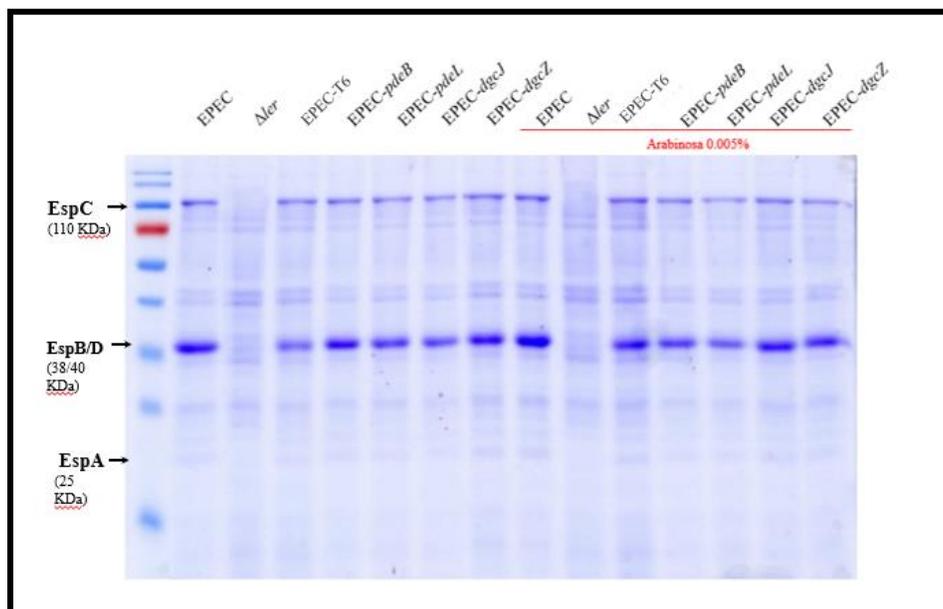


Figura 13. Perfil de secreción de proteínas en DMEM. Se muestran bajo barra roja, las cepas con arabinosa 0.005%.

7.4 DgcJ participa en la formación de biopelícula en EPEC.

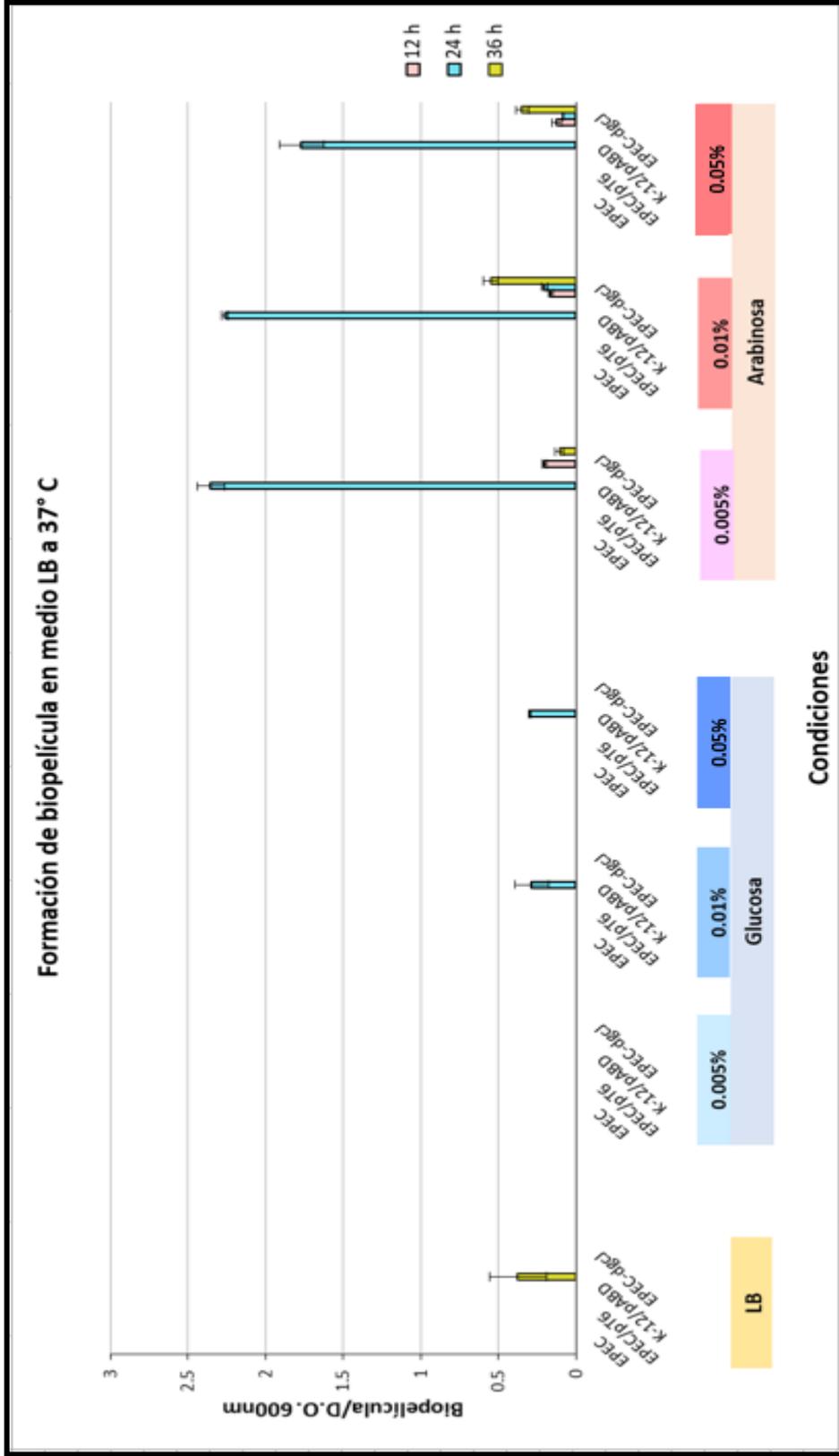
Debido a que no se conocía mucho respecto a la formación de biopelícula por EPEC, se evaluó la capacidad de EPEC E2348/69 para formar biopelícula a 30 y 37° C , en 5 medios de cultivo distintos: LB, LB 50%, LBNS (LB sin sal), DMEM y DMEM+5%CO₂. En cada experimento se midió la formación de biopelícula a 12, 24 y 36 h. Con base en los estudios de biopelícula en *E. coli* K-12 (Stepanovic et al., 2000) se decidió abordar la formación de biopelículas de EPEC en cajas de poliestireno.

Analizando el efecto de la sobreexpresión de las dos DGCs y las dos PDEs, sólo DgcJ presentó un fenotipo positivo sobre la formación de biopelícula en medio LB a 37° C (**Gráfica 5**), los datos de biopelícula que no presentaron efecto no los presentamos.

Entre los mismos ensayos se evidenció una amplia variación de los resultados cuando inducimos la expresión de los genes de DGCs y PDEs, por ello se decidió comprobar la inducción con 0.01% y 0.05% de arabinosa. La expresión de DgcJ con arabinosa 0.005% produce la formación de biopelícula a las 12 y 36 horas, mientras que cuando se induce con 0.01 y 0.05% de arabinosa se observa biopelícula a las 12, 24 y 36 hs. Las condiciones que favorecieron una mayor formación de biopelícula se obtuvo a las 36 horas con 0.01% de arabinosa.

Las variaciones obtenidas a través del tiempo dentro del experimento representa las diferentes etapas de la biopelícula, es decir cuando la biopelícula estaba formándose o disgregándose.

Comparando la biopelícula formada en presencia del inductor (arabinosa) entre 0.005 y 0.01%, observamos que su formación es dosis dependiente. Sin embargo, cuando comparamos los niveles de entre 0.01 y 0.05%, observamos lo contrario, esto puede deberse a que al inducir la expresión de DgcJ, esta puede agregarse y por ello no mostrar un fenotipo igual o mayor que el que observamos con 0.01% de inductor.



Gráfica 5. Formación de biopelícula en EPEC-dgcJ. Se presenta la formación de biopelícula de las cepas: EPEC, EPEC/pT6, K-12/pABD y EPEC-dgcJ, a 37° C durante 12, 24 y 36 horas en medio LB sólo, LB con glucosa (0.005, 0.01, 0.05 %) y arabinosa (0.005,

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

Escherichia coli enteropatógena (EPEC) es un patógeno intestinal que infecta a niños menores de dos años utilizando diversos factores de virulencia como adhesinas o un SST3 codificado en la isla de patogenicidad LEE. Actualmente la OMS la enlista dentro del grupo de patógenos de prioridad crítica, para los que se debe investigar y desarrollar nuevos tratamientos medicinales (WHO, 2017).

Los factores moleculares involucrados en la activación de los genes de virulencia aún no se conocen completamente en EPEC. Recientemente se ha descrito en cepas relacionadas con EPEC, *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), la participación del segundo mensajero di GMP cíclico sobre el desarrollo de infecciones a sus hospederos (Hall & Lee, 2018).

El di GMP cíclico es una molécula señalizadora que regula la adaptación de las bacterias a diferentes ambientes. Es sintetizado a partir de dos moléculas de GTP por las enzimas diguanilato ciclasas (DGCs) y degradado a pGpG por fosfodiesterasas específicas (PDEs). Dentro de las vías de señalización que regula se encuentran aquellas relacionadas con la formación de biopelícula, expresión de fimbrias, progresión del ciclo celular, patogenicidad, entre otros (Hengge, 2010; Römling, 2013).

Retomando a las cepas relacionadas a EPEC, en UPEC la infección en modelos murinos se abate en una doble mutante de YfiR y la diguanilato ciclasa YfiN, este fenotipo de avirulencia se debe a un incremento en la producción de celulosa y curli, demostrando que el di GMP cíclico activa la síntesis de celulosa y curli, y que estos actúan como factores antivirulentos (Cherisse, et al., 2018). Por otra parte, en ETEC, la adherencia bacteriana con su hospedero se relaciona con un incremento de la expresión de ciertas DGCs y, por lo tanto, de di GMP cíclico (Cherisse, et al., 2018).

Debido a la importancia de EPEC como patógeno y al poco entendimiento de regulación de su virulencia, decidimos investigar si los niveles de di GMP cíclico afectan la virulencia de EPEC, esto por medio de la expresión de DGCs y PDEs.

8.1 DgcZ aumenta la transcripción de BFP.

Basados en que *dgcZ* se expresa preferencialmente en células HeLa que en medio DMEM (Hazen, et al, 2015), que favorece la adhesión a superficies (Jonas, 2008; Römling, 2013; Lacana, 2013) y, ahora, que beneficia la expresión de BFP, tenemos argumentos para suponer que DgcZ participa en la adherencia a hospederos, en donde, BFP participa de manera activa.

Por otra parte, al no existir un efecto sobre la expresión del promotor del LEE2 (**Gráficas 3 y 4**) por parte de DgcJ, DgcZ, PdeL y PdeB, concluimos que de manera individual, los niveles de di GMP cíclico controlados por estas enzimas no se relacionan en el fenotipo de virulencia de EPEC E2348/69 a través de la isla LEE, en las condiciones probadas.

8.2 El SST3 de la isla LEE y sus proteínas translocadas no se afectan por la expresión de DgcJ, DgcZ, PdeB y PdeL.

De acuerdo con lo observado en el western-blot realizado, sólo cuando se sobreexpresó PdeL ocurrió una reducción del receptor bacteriano Tir en el ensayo del medio LB (**Figura 11**), este resultado en particular no coincide con los resultados vistos anteriormente en el mismo ensayo, y esta aparente reducción puede deberse a la técnica, ya que PdeL no afecta a las proteínas EspB o EscJ (**Figura 11**). PdeL tampoco afectó en la actividad de la fusión reportera pLEE2 (**Gráfica 3 y 4**), ni la secreción de las proteínas dependientes del SST3 codificado en la isla LEE, como se aprecia en el gel SDS-PAGE (**Figura 12 y 13**) donde se observan a las proteínas EspA, EspB/D y EspC idénticas al control, por lo que PdeL no afecta la síntesis de los factores de virulencia analizados.

Luego de la sobreexpresión de DgcJ, DgcZ y PdeB, no se observó cambio alguno entre las proteínas observadas tanto en el western-blot (**Figura 11**), como en el perfil de secreción de proteínas por el SST3 de EPEC (**Figura 12 y 13**) y la fusión reportera pLEE2, por lo que se concluye que la expresión de forma individual de estas DGCs y PDEs no ocasiona un efecto sobre el fenotipo de virulencia evaluado a través de la transcripción del operón LEE2 y la traducción o secreción de algunas de las proteínas codificadas en la isla LEE de EPEC E2348/69 en las condiciones ensayadas.

8.3 DgcJ está involucrada en la formación de biopelícula

De acuerdo con el ensayo colorimétrico de cristal violeta (Stepanovic, et al., 2000) la inducción del gen *dgcJ* aumenta la formación de biopelícula en EPEC (n=3, $P < 0.05$). Este fenotipo se ha observado en *E. coli* K-12, donde además de regular la formación de biopelícula reduce la motilidad de la bacteria (Sommerfeldt, 2009; Sánchez-Torres, 2011; Hengge, et al., 2016).

Los niveles de biopelícula en EPEC-*dgcJ* comparada con *E. coli* K-12-pABD son menores debido a que la cepa K-12 expresa las subunidades ABD de la cinasa sensora RcsC requerida para la formación de biopelícula en *E. coli* K-12 (Oropeza et al, 2015) que no representa el mismo fenotipo en EPEC, esto es debido a las diferencias genéticas que EPEC presenta respecto a *E. coli* K-12 como: tener 1 Mb más en su genoma y la ausencia de algunos de los genes involucrados en la formación de biopelícula que *E. coli* K-12 presenta (Reisner, et al., 2006).

La formación de biopelícula en EPEC-*dgcJ* en LB parece no correlacionar entre 30 (**Gráfica 6, Anexo 1**) y 37° C (**Gráfica 5**), este efecto se ha observado en estudios de formación de biopelícula en cepas atípicas de EPEC donde existe un rango de temperatura óptimo para desarrollar las biopelículas, esto puede deberse a que en EPEC la formación de biopelícula depende de algunos genes termosensibles, tal como Weiss y colaboradores han observado (2010).

Se ha descrito que DgcJ está involucrado en el cambio de vida planctónica a sésil (biopelícula) en *E. coli* K-12 (Sommerfeldt, 2009), sin embargo, no se han identificado fimbrias que podrían regular este proceso de manera directa o indirecta. De acuerdo con los ensayos realizados y con una $P < 0.05$, DgcJ no afecta la expresión de BFP (**Gráfica 1 y 2**), por lo que en la formación de la biopelícula coordinada por DgcJ no participa BFP, contrario a lo que Moreira y colaboradores (2006) presentan en sus ensayos. La discordancia entre los datos presentados aquí con los de Moreira depende probablemente de las diferentes condiciones utilizadas en ambos estudios.

También observamos que la formación de biopelícula dependía de la expresión de DgcJ a diferentes concentraciones de arabinosa, cuando comparamos las concentraciones 0.005% contra 0.01% de arabinosa (**Gráfica 5**), aunque al inducir la expresión con mayor concentración de arabinosa (0.01 vs 0.05 %) la formación de la biopelícula disminuye (**Gráfica 5**), esto podría deberse a que la cantidad de DgcJ, y a su vez de di-GMP cíclico, llegue a concentraciones tan altas que la célula lo degrade por medio de alguna fosfodiesterasa que no conocemos o que DgcJ forme agregados que disminuyen su actividad. Por otra parte, también queda estudiar cuál es el papel del segundo dominio presente DgcJ, ya que su función molecular no ha sido elucidada.

Al parecer la formación de biopelícula en EPEC no se restringe a las condiciones en las que expresa factores de virulencia como lo propone Moreira (2006). No obstante, aún queda mucho por conocer de las biopelículas formadas por bacterias entéricas, sobre todo aquellas que son patógenas, así que aún queda por establecer si estas se involucran en la persistencia de infecciones o en la diseminación epidemiológica de patotipos como EPEC.

El di-GMP cíclico se ha relacionado con la producción de celulosa por medio de la unión al dominio PilZ del receptor BcsA (Morgan, *et al.*, 2014), en EPEC aún se desconoce el mecanismo de activación de la biosíntesis de celulosa, aunque con los datos obtenidos se tiene que estudiar si la formación de biopelícula en nuestras condiciones de cultivo depende de la unión del di-GMP cíclico, sintetizado por DgcJ, a BcsA. También queda por determinar si la celulosa es un constituyente de la biopelícula producida en las condiciones experimentales empleadas.

Finalmente, tal y como se ha descrito, la regulación de di-GMP cíclico es específica dentro de la bacteria, formando pozas de este segundo mensajero (Hengge, 2009; Hengge, 2010). Por eso al ver que la sobreexpresión de las PDEs no presenta algunos de los fenotipos inversos a la sobreexpresión de DGCs, creemos que la poza de di-GMP cíclico que regulan cada una es diferente a las que regulan DgcJ y DgcZ, y que posiblemente tengan un efecto sobre otras vías de señalización celular involucradas en expresión de fimbrias, progreso del crecimiento poblacional, etc.

En este trabajo iniciamos el estudio del efecto del di-GMP cíclico sobre el patotipo EPEC E2348/69; nuestros resultados sugieren que el aumento de la expresión de DgcZ afecta positivamente la transcripción de la fimbria BFP en medio DMEM (**Figura 14**). También nos permiten sugerir que DgcJ favorece la formación de biopelícula probablemente al aumentar la poza de di-GMP cíclico en medio LB (**Figura 15**). En ambos casos, desconocemos las vías de señalización involucradas en los dos fenotipos, por lo que se abren las puertas a futuras investigaciones.

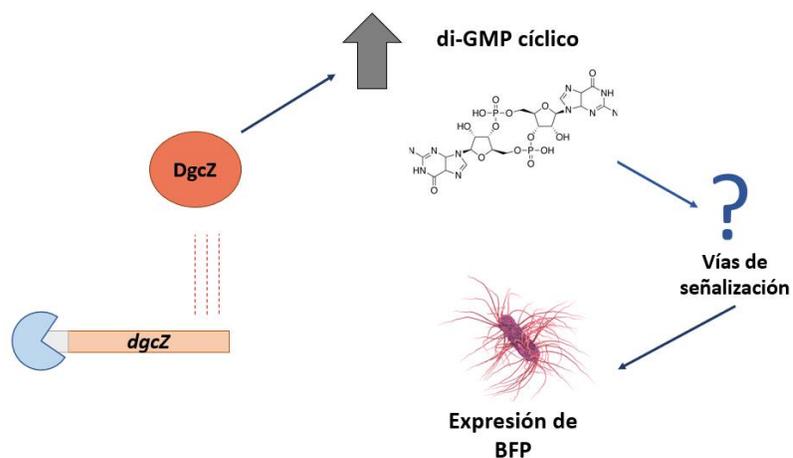


Figura 14. Modelo esquemático del papel de DgcZ sobre la expresión de BFP en EPEC.

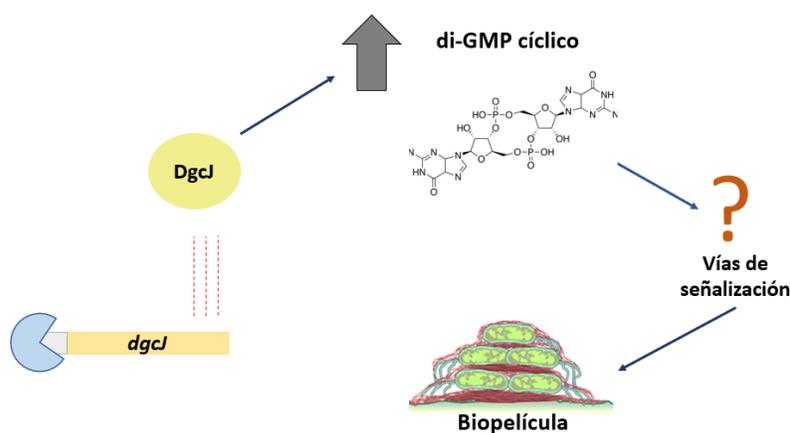


Figura 15. Modelo esquemático del papel de DgcJ sobre la formación de biopelícula en EPEC.

9. PERSPECTIVAS

*De manera general, queda conocer el papel de las construcciones evaluadas en este trabajo, con relación a su efecto sobre la expresión de fimbrias, flagelo y resistencia a antibióticos.

* Caracterizar el papel de DgcJ y DgcZ para corroborar los resultados obtenidos, tanto sobre la virulencia como en la formación de biopelícula; esto podría ser realizado obteniendo las mutantes sencillas en *dgcJ* y *dgcZ*.

*Estudiar la relación de la expresión de DgcJ con el receptor BcsA.

*Sobreexpresar *dgcJ* en cepas de EPEC mutantes en fimbrias, para conocer las fimbrias a las que afecta.

*Comprobar si la sobreexpresión de DgcZ afectan la adhesión en células HeLa, para obtener más evidencia del efecto del di-GMP cíclico sobre la adhesión a células eucariotas.

*Diseñar y construir un biosensor de di-GMP cíclico que nos permita conocer las diferentes concentraciones de este segundo mensajero, para relacionarlo con la sobreexpresión o con mutaciones en DGCs y PDEs. Lo anterior es necesario para establecer una correlación entre la concentración de este segundo mensajero con los diferentes fenotipos.

10. BIBLIOGRAFÍA

1. Archer, N., Mazaitis, M., Costerton, J., Leid, J., Powers, M. & Shirtliff, M. 2011. **Staphylococcus aureus biofilms: Properties, regulation and roles in human disease.** Virulence 2(5): 445-459.
2. Barba, J., Bustamante, V., Flores-Valdez, M., Deng, W., Finlay, B. & Puente, J. 2005. **A positive regulatory loop controls expression of the locus of enterocyte effacement-encoded regulators Ler and GrlA.** J Bacteriol. 87: 7918-7930.
3. Bohem, A., Steiner, S., Zaehring, F., Casanova, A., Hamburguer, F., Ritz, D., Keck, W., Ackerman, M., Schirmer, J. & Jenal, U. 2009. **Second Messenger signaling governs Escherichia coli biofilm induction upon ribosomal stress.** Mol Microbiol, 72(6): 1500-1516.
4. Bustamante, V., Santana, F., Calva, E. & Puente, J. 2001. **Transcriptional regulation of type III secretion genes in enteropathogenic Escherichia coli: Ler antagonizes H-NS-dependent repression.** Mol Microbiol. 39: 664-678.
5. Christen, M., Christen, B., Folcher, M., Schauerte, A. & Jenal, U. 2005. **Identification and characterization of a cyclic di-GMP specific phosphodiesterase and its allosteric control by GTP.** J Biol Chem 280: 30829–30837.
6. Claret, L., Miguel, S., Vieille, N., Ryjenkov, D., Gomelsky, M. & Darfeuille-Michaud, A. 2007. **The flagellar sigma factor FliA regulates adhesion and invasion of Crohn's disease-associated Escherichia coli via a cyclic dimeric GMP-dependent pathway.** J Biol Chem 282(46):33275-33283.
7. Coburn, B., Sekirov, I. & Brett Finlay, B. 2007. **Type III Secretion Systems and Disease.** Clin Microbiol Rev, 20(4): 535-549.
8. Cookson, A., Cooley, W. & Woodward, M. 2002. **The role of type 1 and curli fimbriae of Shiga-toxin-producing Escherichia coli in adherence to abiotic surfaces.** Int. Med. Microbiol. 292: 195-205.
9. Costerton, J., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D. & James, G. 1994. **Biofilms the customized microniche.** J Bacteriol 176: 2173-2242.
10. Croxen, M., Law, R., Scholz, R., Keeney, K., Wlodarska, M. & Finlay, B. 2013. **Recent advances in understanding enteric pathogenic Escherichia coli.** Clin. Microbiol. Rev. Canadá 4:822-879.
11. Danese P., Pratt L. & Kolter, R. **Exopolysaccharide production is required for development of Escherichia coli K-12 biofilm architecture.** J Bacteriol, 182:3593–3596
12. Deborah, H. & Frankel, G. 2005. **Enteropathogenic Escherichia coli: unravelling pathogenesis.** Microbiol. Rev. 29:83-98.
13. Deng, W., et al. 2005. **Regulation of Type III Secretion Hierarchy of Translocators and Effectors in Attaching and Effacing Bacterial Pathogens.** Infection and Immunity. 73(4):2135-2146.
14. DiPilato, L. & Zhang, J. 2008. **Second Messengers in Cellular Signaling.** Wiley Encyclop Chem Biol, publicado en línea.
15. Dobrindt, U., Hochhut, B., Hentschel, U. & Hacker, J. 2004. **Genomic islands in pathogenic and environmental microorganisms.** Nat Rev Microbiol 2: 414-24.

16. Elliott, S., Sperandio, V., Giron, J., Shin, S., Mellies, J., Wainwright, L., Hutcheson, S., Mcdaniel, T. & Kaper, J. 2000. **The locus of enterocyte effacement (LEE)-encoded regulator controls expression of both LEE- and non-LEE-encoded virulence factors in enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli*.** Infect Immun. 68: 6115-6126.
17. Encuesta Nacional de Salud y Nutrición 2012: **Evidencia para la política pública en salud.** Consultado en noviembre de 2016, en: http://ensanut.insp.mx/doctos/analiticos/EDA_EnfDiarAgu.pdf.
18. Ettinger, M. 2009. **Dr. Ettinger's Biofilm Protocol for Lyme and Gut Pathogens.** Consultado el: 16 de Octubre de 2017, en: <http://www.advancedhealing.com/biofilm-protocol-for-lyme-and-gut-pathogens/>
19. Ferrieres, L. & Clarke, D. 2003. **The RcsC sensor kinase is required for normal biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 and controls the expression of a regulon in response to growth on a solid surface.** Mol. Microbiol. 5:1665-1682.
20. Flemming H., Wingender J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S. & Kjelleberg, S. 2016. **Biofilms: an emergent form of bacterial life.** Nat Rev Micro 114: 563-575.
21. Garmendia, J., Frankel, G. & Crepin V. 2005. **Enteropathogenic and enterohemorrhagic *Escherichia coli* infections: translocation, translocation, translocation.** Infect Immun 73: 2573-85.
22. Gaytán, M., Martínez-Santos, V., Soto, E. & González-Pedrajo B. 2016. **Type Three Secretion System in Attaching and Effacing Pathogens.** Front. Cell. Infect. Microbiol. 6: 129-154.
23. Goller, C. & Romeo, T. 2008. **Environmental influences on biofilm development.** In: **Bacterial biofilms.** Romeo T, Ed. Curr Top Microbiol Immun :37-66
24. Gupta, P., Sarkar, S., Das., B., Bhattacharjee, S. & Tribedi, P. 2016. **Biofilm, pathogenesis and prevention- a journey to break the Wall: a review.** Arch of Microbiol, 198: 1-15.
25. Hall, C. & Lee, V. 2018. **Cyclic-di-GMP regulation of virulence in bacterial pathogens.** WIREs RNA, 9:e1454.
26. Haack, K., Robinson, C., Miller, K., Fowlkes, J. & Mellies, J.2003. **Interaction of Ler at the LEE5 (tir) operon of enteropathogenic *Escherichia coli*.** Infect Immun. 71: 384-392
27. Hazen, T., Daugherty, S., Shetty, A., Mahurkar, A., White, O., Kaper, J. & Rasko, D. 2015. **RNA-Seq analysis of isolate- and growth phase-specific differences in the global transcriptomes of enteropathogenic *Escherichia coli* prototype isolates.** Front Microbiol 6: 569-588.
28. Hengge, R. 2009. **Principles of cyclic-di-GMP signaling.** Nat Rev Microbiol 7: 263-273.
29. Hengge, R. 2010. **Role of cyclic di-GMP in the regulatory networks of *Escherichia coli*,** 230-252. En: Wolfe, A. & Visick, K. (ed) The second Messenger cyclic di-GMP. ASM Press, Washington, D.C.
30. Hengge, R., Galperin, M., Ghigo, J-M., Gomelsky, M., Green, J., Hughes, K., Jenal, U. & Landini, P. 2016. **Systematic nomenclature for GGDEF and EAL domain-containing cyclic di-GMP turnover proteins of *Escherichia coli*.** J Bacteriol 198: 7-11
31. Herbst, S., Lorkowski, M., Sarenko, O., Loan Nguyen, T., Jaenizke, T. & Hengge, R. 2018. **Transmembrane redox control and proteolysis of PdeC, a novel type of c-di-GMP phosphodiesterase.** The EMBO journal (2018) e97815.

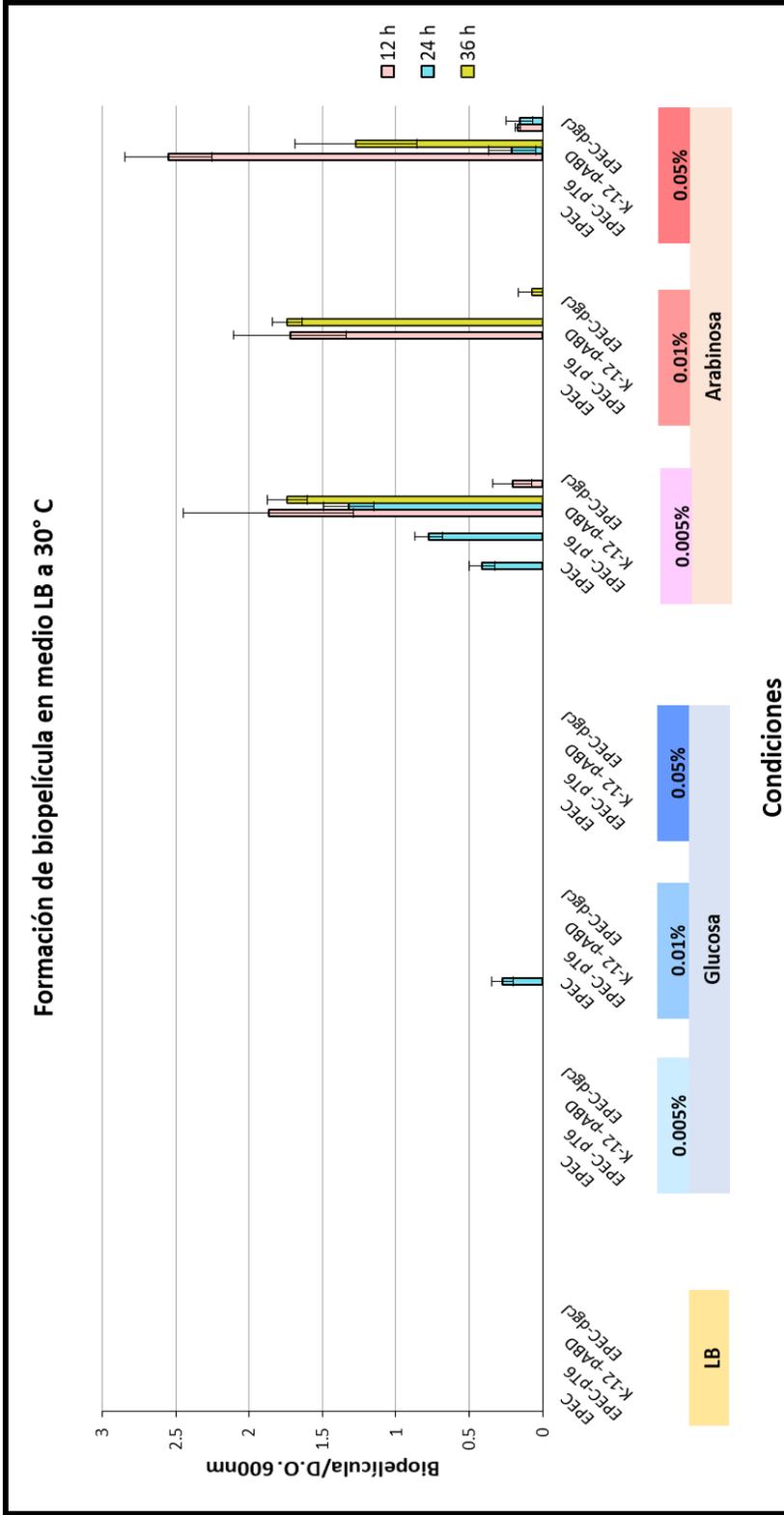
32. Hueck C. 1998. **Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants.** *Microbiol Mol Biol Rev* 62: 379-433-
33. Iguchi, A., Thomson, N., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I., Harris, D., Asadulghani, M., Kurokawa, K., Dean, P., Kenny, B., Quail, M., Thuston, S., Dougan, G., Hayashi, T., Parkhill, J. & Frankel, G. 2009. **Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127:H6 Strain E2348/69.** *J Bacteriol*, 191(1): 347-354
34. Jacobsen, S., Stickler, D., Mobley, H. & Shirliff, M. 2008. **Complicated catheter associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*.** *Clin Microbiol Rev*, 21: 26-58.
35. Jenal, U., Reinders, A. & Lori, C. 2017. **Cyclic di-GMP: second Messenger extraordinaire.** *Nat Rev Microbiol* 15.
36. Jonas, K., Edwards, A., Simm, R., Romeo, T., Römling, U. & Melefors, Ö. 2008. **The RNA binding protein CsrA controls cyclic di-GMP metabolism by directly regulating the expression of GGDEF proteins.** *Mol Microbiol*, 1(70): 236-257.
37. Lacanna, E., Bigosch, C., Kaefer, V., Boehm, A. & Becker, A. 2016. **Evidence for *Escherichia coli* Diguanilate Cyclase DgcZ Interlinking Surface Sensing and Adhesion via Multiple Regulatory Routes.** *J Bacteriol* 198(18):2524-2535.
38. Levine, M., Bergquist, E., Nalin, D., Waterman, D., Hornick, R., Young, C. & Sotman, S. 1978. ***Escherichia coli* Strains that Cause Diarrhea but do not Produce Heat-labile or Heat-stable Enterotoxins and are Non-invasive.** *Lancet*. I: 1119-1122.
39. Luckjancenko, O., Wassenaar, T. & Ussery, D. 2010. **Comparison of 61 Sequenced *Escherichia coli* genomes.** *Microb Ecol*. 60(4): 708-720.
40. Mayer, M. P. 1995. **A new set of useful cloning and expression vectors derived from pBlueScript.** *Gene* 163:41-46
41. Mittal, S., Sharma, M. & Chaudhary, U. 2015. **Biofilm and multidrug resistance in uropathogenic *Escherichia coli*.** *Pathog Glob Health* 109(1): 26-29.
42. Moreira, C., Palmer, K., Whiteley, M., Sircili, M., Trabulsi, L., Castro, A. & Sperandio, V. 2006. **Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*.** *J Bacteriol*, 188:3952-3961.
43. Morgan, J., McNomera, J. & Zimmer, J. 2014. **Mechanism of activation of bacterial cellulose synthase by cyclic-di-GMP.** *Nat. Struct. Mol. Biol*. 21(5): 489-496.
44. Nascimento, H., Silva, L., Souza, R., Silva, N. & Scaletsky, I. 2014. **Phenotypic and genotypic characteristics associated with biofilm formation in clinical isolates of atypical enteropathogenic *Escherichia coli* (aEPEC) strains.** *BMC Microbiology* 14: 184-190.
45. Nataro, J. & Kapper, J. 1998. **Diarrheagenic *Escherichia coli*.** *Clin Microbiol*, 11(1): 142-201.
46. Navarre, W., McClelland, M., Libby, S. & Fang, F. 2007. **Silencing of xenogeneic DNA by H-NS-facilitation of lateral gene transfer in bacteria by a defense system that recognizes foreign DNA.** *Genes Dev*. 21: 1456u-1471.
47. Ochoa, T. & Contreras, C. 2011. **Enteropathogenic *E. coli* (EPEC) infection in children.** *Curr Opin Infect Diss*. 24(5): 478-483.

48. Oropeza, R., Salgado-Bravo, R. & Calva, E. 2015. **Deletion analysis of RcsC reveals a novel signalling pathway controlling poly-N-acetylglucosamine synthesis and biofilm formation in *Escherichia coli*.** *Microbiology* 161: 903-913.
49. Padavannil, A., Jobichen, C., Mills, E., Velazquez-Campoy A., Li, M., Leung, Y., Mok, K., Rosenshine, I. & Sivaraman, J. 2013. **Structure of GrlR-GrlA complex that prevents GrlA activation of virulence genes.** *Nat Com* 4: 2546.
50. Paul, R., Weiser, S., Amiot, N. C., Chan, C., Schirmer, T. & Giese, B. 2004. **Cell cycle-dependent Dynamic localization of a bacterial response regulator with a novel diguanylate cyclase output domain.** *Genes Dev*, 18(6): 715-727.
51. Parsek, M. & Singh P. 2003. **Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis.** *Ann. Rev. Microb.*, 57: 677-701.
52. Phillips, P. & Schultz, G. 2012. **Molecular Mechanisms of Biofilms Infection: Biofilm Virulence Factors.** *Adv Wound Care* 1(3); 109-114.
53. Povolotsky, T. & Hengge, R. 2012. **“Life-style” control networks in *Escherichia coli*: signaling by the second Messenger cyclic di-GMP.** *J Biotechnol* 160: 10-16.
54. Povolotsky, T. & Hengge, R. 2015. **Genome-Based Comparison of Cyclic Di-GMP Signaling in Pathogenic and Commensal *Escherichia coli* Strains.** *J Bacteriol*, 198(1): 111-126.
55. Pringent-Combaret, C., Prensier, G., Thi T., Vidal, O., Lejeune, P. & Dorel, C. 2000. **Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colonic acid.** *Environ Microbiol*, 2:450–464.
56. Puente, J., Bieber, D., Ramer, S., Murray, W. & Schoolnik, G. 1996. **The bundle-forming pili in enteropathogenic *Escherichia coli*: transcriptional regulation by environmental signals.** *Mol Microbiol* 20(1); 87-100.
57. Ramírez-Mata, A., Fernández-Domínguez, I., Núñez-Reza, K., Xiqui-Vázquez, M & Baca, B. 2014. **Networks involving quorum sensing, cyclic-di-GMP and nitric oxide on biofilm production in bacteria.** *Rev Argen de Microbio*, 46(3): 242-255.
58. Reinders, A., Hee, C., Ozaki, S., Mazur, A., Bohem, A., Schirmer, J. & Jenal, U. 2015. **Expression and Genetic Activation of Cyclic Di-GMP Specific Phosphodiesterases in *Escherichia coli*.** *J Bacteriol*, 198(3): 448-462.
59. Reisner, A., Krogfelt, K., Klein, B., Zechner, E. & Molin S. 2006. **In Vitro Biofilm Formation of Commensal and Pathogenic *Escherichia coli* Strains: Impact of Environmental and Genetic Factors.** *J. Bacteriol*, 188(10): 3572-3581.
60. Ross, P., Weinhouse, H., Aloni, Y., Michaeli, D., Weinberger-Ohana, P., Mayer, R., Braun, S., de Vroom, E., van der Marel G., van Boom, J. & Benziman, M. 1987. **Regulation of cellulose synthesis in *Acetobacter xylinum* by cyclic diguanylic acid.** *Nature* 325: 279-281.
61. Römling, U., Galperin, M. & Gomelsky, M. 2013. **Cyclic-di-GMP: the first 25 years of a universal bacterial second Messenger.** *Microb Mol Biol Rev* 77: 1-52.
62. Rosenshine, L., Ruschkowski, S. & Finlay, B. 1996. **Expression of attaching/effacing activity by enteropathogenic *Escherichia coli* depends on growth phase, temperature and protein synthesis upon contact with epithelial cells.** *Infect Immun.* 64: 966-973.

63. Sánchez-Torres, V., Hu, H., Wood, T. 2011. **GGDEF proteins YeaI, YedQ and YfiN reduce early biofilm formation and swimming motility in *Escherichia coli***. Appl Microbiol Biotechnol, 90(2): 651-658.
64. Scaletsky, I., Silva, M. & Trabulsi, L. 1984. **Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells**. Infect Immun, 45:534–536.
65. Schmidt, A., Ryjenkov, D. & Gomelsky, M. 2005. **The ubiquitous protein domain EAL is a diguanylate-specific phosphodiesterase: enzymatically active and inactive EAL domains**. J Bacteriol 187(14): 4774-4781.
66. Senerwa, D. Olsvik, O., Mutanda, L., Lindqvist, K., Gathuma, J., Fossum, K. & Wachsmuth, K. 1989. **Enteropathogenic *Escherichia coli* Serotype O111:HNT Isolated from Preterm Neonates in Nairobi, Kenya**. Jour Clin Microbiol, 27(6): 1307-1311.
67. Sommerfeldt, N., Possling, A., Becker, G., Pesavento, C., Tschowri, N., Hengge, R. 2009. **Gene expression patterns and differential input into curli fimbriae regulation of all GGDEF/EAL domain proteins in *Escherichia coli***. Microbiol. 155:1318-1331.
68. Spears, K., Roe, A. & Gally, D. 2006. **A comparison of enteropathogenic and enterohaemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis**. FEMS Microbiol Lett, 255(2): 187-202.
69. Sperandio, V., Mellies, J., Delahay, R., Frankel, G., Crawford, J., Nguyen, W. & Kaper, J. 2000. **Activation of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) LEE2 and LEE3 operons by Ler**. Mol Microbiol. 200;38: 781-793.
70. Stepanovic, S., Vukovic, D., Dakic, J., Savic, B., Svabic-Vlahovic, M. 2000. **A modified microtiter-plate test for quantification of *Staphylococcal* biofilm formation**. J Microbiol Methods, 40(2): 175-179.
71. Stewart P. & Costerton, J. 2001. **Antibiotic resistance of bacteria in biofilms**. Lancet 14: 358: 135-138.
72. Vidal, J., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J. & Navarro-García, F. 2007. **Molecular pathogenesis, epidemiology and diagnosis of enteropathogenic *Escherichia coli***. Salud Púb. Mex., 49(5): 376-386.
73. Vila, J., Soriano, A. & Mensa, J. 2008. **Bases moleculares de la adherencia microbiana sobre los materiales protésicos. Papel de las biocapas en las infecciones asociadas a los materiales protésicos**. Enferm Infecc Microbiol Clin. 26: 48-55.
74. Vroom, J., De Grauw, K., Gerritsen, H., et al. 1999. **Depth penetration and detection of pH gradients in biofilms by two photon excitation microscopy**. Appl Environ Microbiol 65: 3502-3511.
75. Weiss-Muzkat, M., Shakh, D., Zhou, Y., Pinto, P., Belausov, E., Chapman, M. & Sela, S. 2010. **Biofilm formation and multicellular behavior in *Escherichia coli* O55:H7, an atypical enteropathogenic strain**. Appl Environ Microbiol, 76:1545–1554.
76. Whittam, T. & McGraw, E. 1996. **Clonal Analysis of EPEC Serogroups**. Rev Microbiol.Sao Pablo. 27(1): 7-16.
77. World Health Organization. 2017. **Global priority list of antibiotic resistant bacteria to guide research, Discovery and development of new antibiotics**. February, 2017.
78. Xu, H., Zan, Y., Lee, H. & Ann, J. 2010. **Effect of NaCl on the biofilm formation by foodborne pathogens**. J Food SC, 75: M580-M585.

79. Xu, H., Yong, H. & Ahn, J. 2010. **Growth and Virulence Properties of Biofilm-Forming *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium under Different Acidic Conditions.** Appl Environ Microbiol 76(24): 7910-7917.
80. Yildiz, F. & Vilsick, K. 2009. ***Vibrio* biofilms: so much the same yet so different** Trends Microbiol. 17(3): 109-118.

11. ANEXO



Gráfica 6. Formación de biopelícula en EPEC-*dgcJ*. Se presenta la formación de biopelícula de las cepas: EPEC, EPEC/pT6, K-12/pABD y EPEC-*dgcJ*, a 30° C durante 12, 24 y 36 horas en medio LB sólo, LB con glucosa (0.005, 0.01, 0.05 %) y arabinosa (0.005, 0.01 y 0.05 %)

