

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE CHIHUAHUA
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE
CHIHUAHUA

**Efecto de la alarmona ppGpp en la expresión de factores de virulencia
de *Escherichia coli* enterotoxigénica**

POR:

Q.B.P. Eduardo Rodríguez Reynosa

**TESIS PRESENTADA COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
MAestrÍA EN CIENCIAS EN BIOTECNOLOGÍA**

Chihuahua, Chih., México

Julio de 2021

CARTA DE LIBERACIÓN DEL COMITÉ DE TESIS

Chihuahua, Chih., a 1º de junio de 2021.

Oficio: 53/CA/SIP/21

Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado
Facultad de Ciencias Químicas
Universidad Autónoma de Chihuahua
P r e s e n t e:

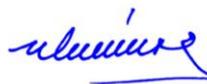
Los integrantes del comité, informamos a Usted que efectuamos la revisión de la tesis intitulada: **“Efecto de la alarmona ppGpp en la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica”**, presentada por el **Q.B.P. Eduardo Rodríguez Reynosa**, alumno del programa de Maestría en Ciencias en Biotecnología.

Después de la revisión, indicamos al tesista las correcciones que eran necesarias efectuar y habiéndolas realizado, manifestamos que la tesis, de la cual adjuntamos un ejemplar, ha cumplido con los objetivos señalados por el Comité de Tesis, por lo que puede ser considerada como adecuada para que se proceda con los trámites para la presentación de su Examen de Grado.

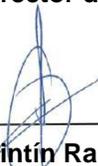
A t e n t a m e n t e
“Por la ciencia para bien del hombre”



Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas
Co-director de tesis



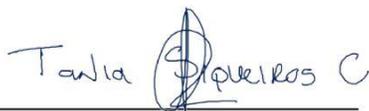
Dr. Miguel Ángel Ares Jiménez
Asesor de tesis



Dr. Quintín Rascón Cruz
Asesor de tesis



Dr. Edward Alexander Espinoza Sánchez
Asesor de tesis



M.C. Tania Samanta Siqueiros Cendón
Co-directora de tesis



Dr. Ildebrando Pérez Reyes
Secretario de Investigación y Posgrado



***El que suscribe certifica que las firmas que aparecen en esta acta, son auténticas, y las mismas que utilizan los C. Profesores mencionados.



El presente trabajo titulado “**Efecto de la alarmona ppGpp en la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica**” se realizó en conjunto con la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias (UIMEIP) de la Unidad Médica de Alta Especialidad (UMAE) del Hospital de Pediatría del Centro Médico Nacional Siglo XXI (CMNSXXI) del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) bajo la dirección del Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas.

CARTA DE LIBERACIÓN DEL DIRECTOR DE TESIS

Chihuahua, Chihuahua a 31 de mayo de 2021

pHD Jaime Raúl Adame Gallegos
Coordinador Académico de Posgrado
FCQ UACH
P R E S E N T E . –

Aprovecho para saludarlo e informarle que se llevó a cabo la revisión de la tesis titulada “EFECTO DE LA ALARMONA ppGpp EN LA EXPRESIÓN DE FACTORES DE VIRULENCIA DE *Escherichia coli* ENTEROTOXIGÉNICA” presentada por el alumno **Q.B.P. Eduardo Rodríguez Reynosa** con número de matrícula 271869 del programa de Maestría en Biotecnología.

Concluido el trabajo experimental, se realizó la revisión del trabajo escrito y después de hacer las correcciones necesarias, manifestamos que se han cumplido los objetivos señalados para proceder a la revisión del escrito por el Comité de Tesis y posteriormente con los trámites necesarios para la presentación del Examen de Grado.

ATENTAMENTE



M.C. Tania S. Siqueiros Cendón
Directora interna de Tesis



Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas
Director externo de Tesis

DEDICATORIAS

A Dios, primero, por darnos salud a mi familia y a mí en estos tiempos donde nos damos cuenta que la salud es lo más importante. Además, por darme la oportunidad de vivir esta experiencia.

A mis padres por haberme forjado como la persona que soy hoy en día, por darme los valores y la educación necesaria para llegar hasta aquí y por supuesto, por todo el apoyo incondicional que siempre me han brindado. Todos mis logros son suyos también.

A mi familia y amigos por darme los ánimos que me impulsaban a seguir. Hasta con la simple pregunta: ¿Cómo vas con la tesis? me demostraban el interés y la preocupación en mí lo cual me seguía motivando.

A Dení, por todo el apoyo, consejos, ayuda y amor que me has dado. Las estancias fueron mejores contigo a mi lado. Gracias por animarme y escucharme, por ser mis oídos cuando necesitaba desahogarme y por siempre emocionarte y tener interés en todo lo hago.

A mi perrito Goyito que estuvo conmigo en esas noches de desvelo. Aunque él no se diera cuenta hacía que se me olvidará el estrés por al menos un momento.

A mis compañeras de maestría, que nos tocó una pandemia la cual nos cambió los planes de cómo sería seguir estudiando un posgrado, pero aprendimos a adaptarnos. Por las risas, quejas y ánimos, por hacer las clases más divertidas, gracias.

A mi directora de tesis, la M.C. Tania Siqueiros, gracias por ensañarme y guiarme en este camino de la ciencia que era nuevo para mí. Gracias por la oportunidad de trabajar con usted y por todos los consejos.

A mi director externo, el Dr. De la Cruz, gracias por la oportunidad de estar en su grupo de trabajo, por sus consejos, sugerencias y por todas las nuevas técnicas que aprendí.

Al resto del comité de tesis, al Dr. Quintín Rascón y Dr. Edward Espinoza, gracias por todos los consejos, sugerencias y por siempre resolver mis dudas. Además, al Dr. Ares, muchas gracias por nunca dejarme solo, por todas las enseñanzas y por siempre asegurarse que me quedarán las cosas claras. Sin duda me han hecho crecer como investigador.

A Diana (Dii), muchas gracias por todas las técnicas que me enseñaste, por la paciencia, por estar pendiente de mí, por esas pláticas, por ir conmigo al laboratorio hasta en fines de semana, por siempre resolver mis dudas. En fin, gracias por toda la ayuda que me brindaste. Estoy muy agradecido contigo.

A mis compañeros de laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, por ayudarme en lo que necesitaba. Aunque no convivimos mucho, gracias por los momentos agradables durante los días de trabajo.



ÍNDICE

DEDICATORIAS.....	i
ÍNDICE DE TABLAS.....	v
ÍNDICE DE FIGURAS.....	vi
LISTA DE ABREVIATURAS.....	vii
ABSTRACT.....	2
I. INTRODUCCIÓN.....	3
II. ANTECEDENTES.....	6
2.1. Enfermedades diarreogénicas.....	6
2.2 <i>Escherichia coli</i>	8
2.3 <i>Escherichia coli</i> patogénica.....	8
2.3.1 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.....	11
2.3.1.1 Factores de virulencia de ETEC.....	13
2.3.1.1.1 Factores de colonización.....	16
2.3.1.1.2 Toxina Termolábil (LT).....	19
2.3.1.1.3 Toxina Termoestable (ST).....	21
2.4 Alarmonas y respuesta estricta.....	23
2.4.1. Metabolismo de las alarmonas.....	25
2.4.2. Mecanismo de acción de las alarmonas.....	27
2.4.3. Regulación de procesos celulares por alarmonas.....	28
2.4.3.1. Regulación del inicio de la transcripción.....	29
2.4.3.2. Regulación no transcripcional.....	30
2.4.3.2.1. Replicación del ADN.....	30
2.4.3.2.2. Traducción.....	31
2.4.3.2.3. Metabolismo celular.....	31
2.4.4. Importancia de las alarmonas.....	32
2.4.4.1. Supervivencia y adaptación.....	32
2.4.4.2. Tolerancia y resistencia a los antibióticos.....	33
2.5 <i>Escherichia coli</i> y alarmonas.....	33
2.5.1 Arquitectura del dominio sintetasa.....	34
2.5.2 Arquitectura del dominio hidrolasa.....	36
2.6 Antecedentes particulares.....	38
III. JUSTIFICACIÓN.....	41
IV. HIPÓTESIS.....	42
V. OBJETIVO GENERAL.....	43



VI.	OBJETIVOS PARTICULARES	43
VII.	MATERIALES Y MÉTODOS	44
7.1.	Cepas bacterianas y plásmidos.....	44
7.2.	Equipo de laboratorio	45
7.3.	Metodología	46
7.3.1.	Cultivo de cepas de <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	46
7.3.2.	Construcción de mutantes isogénicas	47
7.3.2.1.	Amplificación del gen de resistencia a kanamicina por PCR punto final	47
7.3.2.2.	Elaboración de células competentes	49
7.3.2.3.	Transformación de células competentes con los productos de PCR	50
7.3.3.	Extracción de ARN total	51
7.3.3.1.	Lisis celular.....	51
7.3.3.2.	Precipitación del ARN total	52
7.3.3.3.	Purificación del ARN total	52
7.3.3.4.	Electroforesis del ARN total en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturalizantes	52
7.3.4.	Síntesis de ADN complementarios (ADNc) mediante retrotranscripción (RT).....	53
7.3.5.	Amplificación de los genes en estudio por PCR en tiempo real (qPCR)	53
7.3.5.1.	Elaboración de curvas estándar y curvas de expresión de los genes objetivo	54
7.3.5.2.	Cuantificación absoluta de los genes objetivo por medio de qPCR	55
7.3.6.	Análisis estadístico de los resultados	55
VIII.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
8.1.	Construcción de mutantes isogénicas.....	56
8.2.	Extracción e integridad del ARN.....	58
8.3.	Construcción de curvas estándar	60
8.4.	Expresión genética de las toxinas termolábil y termoestable.....	64
8.5.	Expresión genética de CS3, Longus y CfaA.....	65
IX.	CONCLUSIONES.....	69
X.	RECOMENDACIONES	70
XI.	REFERENCIAS.....	71



ÍNDICE DE TABLAS

Tabla I. Iniciadores utilizados en este estudio	48
Tabla II. Preparación de la solución de lisis (solución A)	51
Tabla III. Valores de curvas estándar de ETEC H10407 y E9034A	62

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo general de patogenicidad de los patotipos de <i>E. coli</i> diarreogénica.....	11
Figura 2. Áreas de riesgo de contraer diarrea del viajero.....	13
Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de ETEC	15
Figura 4. Prevalencia de toxinas LT y ST por diferentes regiones	16
Figura 5. Esquemización del ensamblaje de los factores de colonización de ETEC	18
Figura 6. Estructura y organización de las subunidades A y B de LT en ETEC	20
Figura 7. Estructura de los subtipos de la toxina <i>Stx</i> de ETEC y alineación de secuencias de ligandos del receptor de guanilato ciclasa C	23
Figura 8. Estructura química de (p)ppGpp	25
Figura 9. Metabolismo de (p)ppGpp.....	26
Figura 10. Estructura cristalina del complejo ARN polimerasa-ppGpp en <i>E. coli</i>	27
Figura 11. Regulación directa de la transcripción mediada por (p)ppGpp.....	30
Figura 12. Dominios de las enzimas involucradas en la síntesis e hidrólisis de (p)ppGpp en <i>E. coli</i>	34
Figura 13. Estructura cristalina del complejo RelA-ribosoma bacteriano	37
Figura 14. Esquema ilustrativo de la regulación de la actividad de SpoT por interacciones con la ACP	38
Figura 15. Mapa del plásmido de expresión Lambda Red pKD46	45
Figura 16. Amplificación del gen <i>kan^R</i> a partir del plásmido pKD4.....	56
Figura 17. Generación mutante $\Delta relA$	57
Figura 18. Integridad del ARN	59
Figura 19. Curvas de amplificación para los genes en estudio de ETEC H10407 y E9034A	61
Figura 20. Curvas estándar para los genes en estudio de ETEC H10407 y E9034A.	62
Figura 21. Curvas de desnaturalización de los productos de amplificación de los genes en estudio de ETEC H10407 y E9034A.....	63
Figura 23. Expresión genética de CS3, Longus y CfaA en cepas silvestre y mutante de ETEC E9034A y H10407.....	66



LISTA DE ABREVIATURAS

Abreviatura	Definición
$\Delta relA$	Mutante en el gen <i>relA</i>
$\Delta relA\Delta spoT$	Doble mutante en los genes <i>relA</i> y <i>spoT</i>
AAF	Fimbrias de adherencia agregativa
ACP	Proteína transportadora de acil
ACT	Aspartato quinasa, corismato y TyrA
ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AMPc	Adenín monofosfato cíclico
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ARNr	Ácido ribonucleico ribosomal
ARNt	Ácido ribonucleico de transferencia
ATP	Adenosín trifosfato
BFP	Pilus formadores de haces
CC	Cisteína conservada y dedos de zinc
CFA	Antígeno de factor de colonización
CFB	Caldo de Factor de colonización
CFRT	Canal regulador transmembranal de fibrosis quística
CS	Antígeno de superficie de coli
Ct	Cycle threshold; ciclo donde se detecta la florescencia
CTD	Dominio carboxilo terminal
DAEC	<i>Escherichia coli</i> difuso adherente
DAF	Factor de aceleración de descomposición
DNAG	Ácido desoxirribonucleico primasa
dNTP	Nucleósido trifosfato
DPBB	Dominio de barril β de doble psi
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EAST1	Toxina termoestable de <i>E. coli</i> enteroagregativa
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
EIEC	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva
EPEC	<i>Escherichia coli</i> enteropatógena
ETEC	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica
GDP	Guanosina difosfato
GMK	Guanilitado cinasa
GMP	Guanosina monofosfato
GMPc	Guanosina monofosfato cíclico
GTP	Guanosina trifosfato
h	Hora
HD	Dominio hidrolasa
<i>kan</i> ^R	Gen de resistencia a la kanamicina
kV	Kilovoltios
LB	Caldo Luria-Bertani



LT	Toxina Termolábil
mg	Miligramos
min	Minuto
mL	Mililitro
ng	Nanogramo
nm	Nanometro
NMEC	<i>Escherichia coli</i> meningitis neonatal
nt	Nucleótido
NTD	Dominio amino terminal
OD	Densidad Óptica
OMG	Organización Mundial de Gastroenterología
pb	Pares de bases
PCF	Factor de colonización putativo
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
ppGpp	Alarmona
PPLO	Caldo de organismo similar a pleuropneumonie
qPCR	Reacción en cadena de la polimerasa cuantitativa
RelQ	Sintetasa de tipo RSH
RPD	ARN polimerasa
rpm	Revoluciones por minuto
RSH	Proteínas largas homólogas RelA/SpoT
RT	Retrotranscripción
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa acoplada a retrotranscripción
s	Segundo
SAS	Pequeñas sintetetasas de alarmona
SD	Dominio sintetasa
SDS	Dodecil sulfato de sodio
ShET1	Enterotoxina 1 de <i>Shigella</i>
SPATE	Autotransportadores de serin proteasa de <i>Enterobacteriaceae</i>
SRL	Bucle de sarcina-ricina
SST3	Sistema de secreción tipo III
ST	Toxina Termoestable
Stx	Toxina Shiga
TGS	Treonil ARNt sintetasa
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
μL	Microlitro



RESUMEN

Las enfermedades diarreicas causadas por la ingestión de agua y alimentos contaminados con enteropatógenos continúan siendo causa de importante morbilidad en los países con escaso nivel de desarrollo. *Escherichia coli enterotoxigénica* (ETEC) es un patógeno bacteriano que se asocia con frecuencia con enfermedades diarreicas las cuales son una causa importante de mortalidad y morbilidad en todo el mundo. ETEC produce diferentes factores de colonización (CFAs), las cuales se encargan de la adhesión de la bacteria a las células del intestino delgado y también produce dos enterotoxinas (LT y ST). Para llevar a cabo la infección, ETEC debe adherirse al epitelio del intestino delgado por medio de sus CFAs. Una vez que ETEC se adhiere a estas células la infección se da por medio de las enterotoxinas, las cuales son liberadas al interior de las células y desencadenan la salida de agua y electrolitos al lumen intestinal provocando una diarrea acuosa. La infección causada por ETEC se presenta en su mayoría en niños menores de cinco años y en turistas que viajan a otros países que no poseen la misma sanidad que su país de origen, en la llamada enfermedad del viajero. Las bacterias producen pentafofato y tetrafofato de guanósina, denominados colectivamente (p)ppGpp, en respuesta a una variedad de tensiones ambientales. La sintetasa RelA es la encargada de producir alarmonas junto con SpoT, aunque esta última en menor medida. Se construyó una mutante isogénica en las cepas ETEC E9034A y ETEC H10407 mediante la sustitución del gen *relA* por un gen de resistencia a kanamicina. Se midió la expresión de los genes que codifican para las toxinas (*eltA* y *sta3*), para las subunidades principales de pilina (*cstH* y *IngA*) y para la chaperona de la fimbria CS1 (*cfaA*) usando RT-PCR en tiempo real en las cepas silvestre y mutante $\Delta relA$ de ETEC E9034A y ETEC H10407. La expresión de los genes *eltA*, *sta3*, *cstH*, *IngA* y *cfaA* disminuyó significativamente en la cepa mutante $\Delta relA$ en comparación con la cepa silvestre en ambas cepas; sin embargo, se observó una mayor disminución en la cepa E9034A. Estos resultados indican que la proteína RelA regula positivamente la expresión de ambas enterotoxinas y de los genes involucrados en la producción de fimbrias en las dos cepas de ETEC estudiadas.



ABSTRACT

Diarrheal diseases caused by ingestion of water and food contaminated with enteropathogens continue being the cause of significant morbidity in countries with a low level of development. Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is a bacterial pathogen that is frequently associated with diarrheal diseases and is a major cause of mortality and morbidity throughout the world. ETEC produces different colonization factors (CFAs), which are responsible for the adhesion of the bacteria to the cells of the small intestine and also produces two enterotoxins (LT and ST). To infect, ETEC must adhere to the epithelium of the small intestine through its CFAs. Once adhered to these cells, the infection occurs through enterotoxins, which are released into the cells and trigger the leakage of water and electrolytes into the intestinal lumen causing watery diarrhea. The infection caused by ETEC occurs mostly in children under five years of age and in tourists who travel to other countries that do not have the same health as their country of origin, in the so-called traveler's disease. Bacteria produce guanosine pentaphosphate and tetraphosphate, collectively referred to as (p)ppGpp, in response to a variety of environmental stresses. RelA synthetase is responsible for producing alarms together with SpoT, although in the latter to a lesser extent. An isogenic mutant was constructed in strain ETEC E9034A and ETEC H10407 by replacing the *relA* gene with a kanamycin resistance gene. The expression of the genes coding for the toxins (*eltA* and *sta3*), for the main pilin subunits (*cstH* and *IngA*) and for the fimbria chaperone CS1 (*cfaA*) was measured using real-time RT-PCR in the strains wild-type and mutant $\Delta relA$ from ETEC E9034A and ETEC H10407. The expression of the *eltA*, *sta3*, *cstH*, *IngA* and *cfaA* genes was significantly decreased in the $\Delta relA$ mutant strain compared to the wild strain in both strains; a greater decrease was observed in strain E9034A. These results indicate that the RelA protein positively regulates the expression of both enterotoxins and of the genes involved in the production of fimbriae in the two ETEC strains studied.



I. INTRODUCCIÓN

Las enfermedades diarreicas presentan una importante tasa de morbilidad en los países en desarrollo. *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC) es una de las causas más importantes de diarrea bacteriana, especialmente en países en desarrollo con una sanidad deficiente (Rios-Muniz *et al.*, 2019). Las áreas con mayor riesgo de contraer la diarrea del viajero, una enfermedad causada por esta bacteria, se encuentran en los países de África, Asia y América Latina, incluido México (Mirhoseini *et al.*, 2018). ETEC tiene diferentes factores de virulencia, destacando las fimbrias, también conocidas como factores de colonización, responsables de la adhesión de las bacterias a las células del intestino delgado. Además, ETEC produce dos enterotoxinas: la toxina termolábil (LT) y la toxina termoestable (ST), estas toxinas conducen a la secreción de líquidos y electrolitos que provocan diarrea acuosa, lo que conduce a una pérdida de electrolitos y una deshidratación severa (Gomes *et al.*, 2016).

La unión de ETEC al epitelio intestinal es el primer paso de la infección por esta bacteria, la cual está mediada por fimbrias o pili adhesivos de la superficie bacteriana (Gaastra y Svennerholm, 1996). Las fimbrias de las bacterias patógenas comprenden subunidades de pilina polimerizadas y son esenciales para el inicio de infecciones. Entre los diferentes tipos de fimbrias expresadas en la superficie de ETEC, se encuentran CS3 y el antígeno del factor de colonización I o CFA /I, siendo este último el más prevalente en las cepas de ETEC aisladas (Wolf, 1997). Los pili ensamblados por la vía chaperona-usher requieren proteínas chaperonas periplásmicas que ayudan al plegamiento de las subunidades, mantienen su estabilidad y las dirigen a la membrana externa para su correcto ensamblaje y salida al exterior (Bao *et al.*, 2014).

La toxina LT es un homólogo de la toxina del cólera (producida por *Vibrio cholerae*), la cual se denomina así debido a que su actividad se elimina al incubarla a 60°C durante 15 min. La toxina LT de ETEC es una proteína multimérica (AB₅), es decir, está compuesta por una subunidad A monomérica y una subunidad B pentamérica, donde la subunidad A es la parte catalítica de la toxina. Aunque la actividad catalítica de la toxina LT está presente en la subunidad A, el pentámero B es necesario para



que la toxina reconozca su receptor de superficie celular y entre en los enterocitos del intestino delgado (Dubreuil *et al.*, 2016).

La toxina ST es un péptido de bajo peso molecular y resiste a altas temperaturas que pueden llegar a los 100°C. Su inactivación se logra a 121°C, además de resistir a la acción de tripsina, quimotripsina y ácidos gástricos (Dubreuil *et al.*, 2016). Hay dos tipos de ST que se pueden distinguir: la STa soluble en metanol, que se une a guanilil ciclasa C y resistente a proteasas y la STb insoluble en metanol y sensible a proteasas. Se han aislado en humanos dos tipos de STa de ETEC: STp y STh (Weiglmeier *et al.*, 2010). STp se ha encontrado en ETEC aislado de muestras de origen bovino, porcino y humano, mientras que STh solo se encuentra en ETEC aislado de humanos (Joffré *et al.*, 2016).

La producción de factores de virulencia en bacterias puede ocurrir bajo el control del as alarmonas, también llamadas (p)ppGpp, que son nucleótidos tetra y pentafosfato que se encargan de regular la expresión de ciertos genes (Dalebroux *et al.*, 2010; Hüttener *et al.*, 2018). Esto ayuda a las bacterias a conservar energía y les permite sobrevivir en condiciones adversas. Las alarmonas tienen una gran influencia en la fisiología bacteriana, ya que son responsables de regular muchos procesos celulares críticos para las bacterias, como la replicación, transcripción, traducción y su metabolismo (Liu *et al.*, 2015). En *E. coli* las alarmonas son sintetizadas principalmente por la enzima RelA seguido por la enzima SpoT la cual tiene una actividad sintetasa menor que RelA, además de poseer actividad de hidrolasa para las alarmonas (Steinchen y Bange, 2016). Se ha demostrado que las alarmonas regulan los factores de virulencia de algunas bacterias, por ejemplo, en *Helicobacter pylori*, *Brucella* spp, *Mycobacterium tuberculosis* y *Pseudomonas aeruginosa*. Particularmente en cepas de *E. coli*, las alarmonas afectan la adherencia de *E. coli* enterohemorrágica a células Caco-2 y de *E. coli* uropatógena y *E. coli* enteroagregativa afecta su capacidad de producción de biopelículas (Dalebroux *et al.*, 2010; Hüttener *et al.*, 2018). Actualmente, no hay publicaciones que indiquen que la alarmona ppGpp tenga efectos sobre factores de virulencia en *E. coli* enterotoxigénica.



En este trabajo se utilizaron las cepas de ETEC E9034A y ETEC H10407 y se evaluó la expresión de los genes *st3*, *eltA*, *cstH*, *IngA* y *cfaA* en las cepas mutantes en el gen *relA* y se comparó con la expresión genética observada en la cepa silvestre. Se presentan datos que indican que las alarmonas están involucradas en la regulación de la expresión de los genes *eltA* y *sta3*, los cuales codifican para las toxinas LT y ST, respectivamente, y para los genes *cfaA*, *cstH* y *IngA*, los cuales codifican para la proteína chaperona de la fimbria CS1, la subunidad principal de la fimbria CS3 y la subunidad principal del pilus Longus, respectivamente. Las cepas mutantes en *relA* mostraron una disminución en la expresión genética de dichos genes en comparación con las cepas silvestre indicando que la alarmona ppGpp está involucrada en la expresión de estos factores de virulencia de ETEC.



II. ANTECEDENTES

2.1. Enfermedades diarreogénicas

El tracto intestinal, en condiciones normales, es el encargado de regular tanto la absorción como la secreción de agua y electrolitos para satisfacer las necesidades fisiológicas del cuerpo. De los 10 litros por día de líquido que ingresa a un intestino adulto más del 98% se reabsorbe en el intestino, demostrando la gran importancia del tracto intestinal (Keusch, 2002). El agua que no se reabsorbe se utiliza en las heces, relacionada principalmente con el contenido de fibra no digerible, esto es lo que determina la consistencia de las heces normales, donde pueden ser desde gránulos duros y secos hasta heces blandas y voluminosas, esto variando de persona a persona y la dieta que estas lleven (Keusch *et al.*, 2016).

El concepto de diarrea se define como la deposición mínima de tres veces al día, o con una frecuencia mayor a la normal, de heces sueltas o líquidas. No es diarrea la frecuente deposición de heces de consistencia sólida, ni tampoco la deposición, por bebés amamantados, de heces de consistencia suelta y pastosa (Organización Mundial de la Salud [OMS], s.f.). Estas definiciones permiten a los analistas llevar un registro de la incidencia, las recaídas y las nuevas infecciones. Es por esto, que los trabajos realizados en este ámbito se centran en los principales agentes etiológicos, vías de transmisión y posibles causas, todo esto enfocándose en el grupo más vulnerable de contraer alguna enfermedad diarreica, los niños menores de cinco años.

La diarrea es un síntoma ocasionado por una infección del tracto digestivo, esta infección puede ser causada por diversos microorganismos como los parásitos, las bacterias y los virus (Venkatesan y Van De Verg, 2015). La Organización Mundial de Gastroenterología (OMG) en 2012 informó que en los países en vías de desarrollo las bacterias y parásitos entéricos tienen una mayor prevalencia que los virus, teniendo su más alto índice de morbilidad en la temporada de verano. Ejemplos de estos son: cepas diarreogénicas de *E. coli*, *Shigella* spp., *V. cholerae* y *Salmonella* spp. en el caso de las bacterias; ejemplos de parásitos son *Entamoeba histolytica*, *Entamoeba coli* y *Giardia intestinalis*; y de virus son adenovirus y rotavirus (Keusch *et al.*, 2006).



La vía de transmisión es fecal-oral resultado de una higiene deficiente o por medio del consumo de alimentos y/o agua contaminados con heces. Las rutas de transmisión y la cantidad de microorganismos necesarios para causar infección pueden variar. Las características que presente el microorganismo infectante le darán la capacidad de infectar a su hospedero más fácilmente o tendrá más dificultad para hacerlo. Por ejemplo, las bacterias del género *Shigella* tienen la capacidad de sobrevivir al ácido estomacal y esto les ayuda a la disminución de la cantidad de inóculo requerido para causar la enfermedad, además de que se transfieren fácilmente por contacto directo de persona a persona o por la contaminación de objetos inanimados (Keusch *et al.*, 2006)

Las enfermedades diarreicas afectan a toda la población independientemente del estrato socioeconómico o la edad y se presentan en países desarrollados y en vías de desarrollo. A pesar de esto, hay una gran relación entre la pobreza, las condiciones sanitarias deficientes y la cantidad y gravedad de eventos diarreogénicos, especialmente en niños menores de cinco años. En ellos, son la segunda causa de mortalidad, ocasionando la muerte de 525 000 niños cada año (OMS, 2017). Los niños que presentan malnutrición o que están inmunodeprimidos son los más susceptibles de presentar enfermedades diarreicas potencialmente mortales (Keusch *et al.*, 2016).

La pobreza se relaciona con varios factores que predisponen a enfermedades diarreicas, estos factores son: viviendas pobres, pisos de tierra, falta de acceso a agua limpia suficiente o para la eliminación sanitaria de desechos fecales, convivencia con animales domésticos que pueden transportar patógenos humanos y falta de almacenamiento refrigerado para alimentos (Venkatesan y Van De Verg, 2015). El desarrollo e implementación de formas simples y efectivas de producir agua limpia, el control de los desechos humanos, diagnósticos específicos rápidos, nuevas estrategias de tratamiento y vacunas son primordiales para disminuir la tasa de morbilidad y mortalidad ocasionadas por las enfermedades diarreogénicas (Keusch *et al.*, 2016).



2.2 *Escherichia coli*

Escherichia coli (*E. coli*) es una bacteria Gram negativa en forma de bacilo, anaerobia facultativa miembro del orden *Enterobacterales* y dentro de la clase *Gammaproteobacteria* (Mcadam, 2020). El género *Escherichia*, lleva su nombre gracias al doctor alemán Theodor Escherich (Jang *et al.*, 2017) quien aisló esta bacteria en 1885 durante su investigación sobre la microbiota en las deposiciones de niños y neonatos. Se denominó inicialmente como *Bacterium coli commune* (la bacteria común del colon). Posteriormente, fue nombrada como *Escherichia coli* en honor a su descubridor (López *et al.*, 2018).

E. coli es una bacteria móvil debido a que contiene flagelos peritricos, lactosa positiva, lisina descarboxilasa negativo e indol positivo. *E. coli* puede crecer en presencia y ausencia de oxígeno; bajo condiciones anaerobias crecerá por la vía de la fermentación, produciendo ácidos mixtos y gas como producto final. También es capaz de crecer mediante respiración anaeróbica, ya que es capaz de utilizar nitrato (NO_3), dióxido de nitrógeno (NO_2) o fumarato como aceptores finales de electrones en el proceso de transporte. Debido a lo anterior, *E. coli* tiene la capacidad de adaptarse a su hábitat del intestino (anaeróbico) y fuera del intestino (aeróbico) (López *et al.*, 2018).

2.3 *Escherichia coli* patogénica

E. coli es el principal anaerobio facultativo que habita inofensivamente el intestino grueso de humanos y animales de sangre caliente (Conway, 1995). A pesar de esto, existen varias cepas patógenas de *E. coli*, las cuales pueden causar enfermedades intestinales y extraintestinales tanto en individuos inmunocomprometidos como sanos. Las principales enfermedades extraintestinales causadas por *E. coli* son las infecciones de vías urinarias, la meningitis y la sepsis, siendo la primera producida por *E. coli* uropatógena (UPEC) y las otras por *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC) (Clements *et al.*, 2012).

La diarrea es la enfermedad gastrointestinal más común en países en vías de desarrollo y particularmente en niños menores de cinco años, siendo las cepas diarreogénicas de *E. coli* las responsables de la mayoría de estos casos en todo el mundo. Con base en sus diferentes tipos de antígenos y mecanismos de patogenicidad existen seis patotipos diarreogénicos: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* difuso adherente (DAEC). Cada una de las seis categorías reconocidas de *E. coli* diarreogénica tiene características únicas en su interacción con las células eucariotas causando una enfermedad diarreica a través de distintos mecanismos que inducen diferentes síntomas en el huésped (Madhavan y Sakellaris, 2015). La interacción de cada patotipo con el enterocito se representa esquemáticamente en la Figura 1. EPEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado formando microcolonias por medio del pilus BFP, e induce, por medio de su sistema de secreción tipo III (SST3), una lesión de adherencia y borrado caracterizada por la eliminación de las microvellosidades y la formación de un pedestal (Figura 1a). EHEC se adhiere a los enterocitos del colon y al igual que EPEC, por medio de su SST3 induce una lesión de adherencia y borrado. Además, secreta la toxina Shiga (Stx), la cual es absorbida sistémicamente y puede conducir a complicaciones mortales como colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico (Figura 1b). ETEC se adhiere a los enterocitos del intestino delgado por medio de factores de colonización (CFAs) y secreta una toxina termoestable (ST) y una toxina termolábil (LT). Ambas toxinas ocasionan diarrea secretora (Figura 1c). EAEC se adhiere al enterocito del intestino delgado y grueso por medio de fimbrias AAFs formando una biopelícula con un patrón característico de agregación o "ladrillos apilados", para después secretar diferentes citotoxinas y enterotoxinas ocasionando diarrea crónica (Figura 1d). EIEC se adhiere al enterocito e induce la formación de una vacuola endocítica invadiendo a dicha célula. Una vez que la vacuola se lisa, la bacteria se multiplica y mediante la acumulación polar de actina migra hacia células adyacentes. La destrucción de las células provoca un proceso de inflamación y la aparición de la diarrea acuosa con moco y sangre, muy similar a la producida por la *Shigella* (Figura 1e). DAEC provoca un efecto de transducción de señales característico en los enterocitos del intestino



delgado que se manifiesta como el crecimiento de proyecciones celulares largas en forma de dedos, las cuales confieren protección a las bacterias ocasionando diarrea acuosa sin sangre (Figura 1f) (Kaper *et al.*, 2004; Mirhoseini *et al.*, 2018).

Algunos patotipos aislados de *E. coli* combinan las principales características de virulencia de diferentes patotipos y, por esto, se consideran cepas patógenas híbridas potencialmente más virulentas. Además, que las cepas de *E. coli* involucradas en enfermedades diarreicas han evolucionado por la adquisición de características específicas que le permiten permanecer con éxito en el hospedero, esto a través de procesos genéticos de transferencia horizontal, tales como: conjugación, transducción y transformación (Croxen *et al.*, 2013).

La prevalencia de *E. coli* diarreogénica en personas mayores de cinco años alcanzó los 44 millones de casos, siendo mayor que los seis millones de casos de fiebre tifoidea y los tres millones de cólera (Lanata *et al.*, 2013). Estos resultados demuestran que *E. coli* diarreogénica afecta en gran medida a personas mayores de cinco años comparado con otros patógenos recurrentes causantes de diarrea.

Los países de mediano y bajo ingreso provenientes de África, Asia y América son los más afectados por los patotipos diarreogénicos de *E. coli*. Esto se debe, principalmente, a las malas condiciones de vida que presentan, siendo el suministro de agua inadecuado, el saneamiento deficiente, la higiene ambiental y la educación insuficiente algunos de los factores que contribuyen a ello (Croxen *et al.*, 2013).

El desarrollo de técnicas para identificar genes de virulencia y sus productos han aportado nuevos enfoques moleculares para la epidemiología y el diagnóstico y sin duda darán lugar a nuevas medidas para prevenir y tratar la diarrea. Con métodos moleculares se puede hacer la identificación y separación de los patotipos diarreogénicos de *E. coli*, ya que la identificación de genes o factores de virulencia distingue a los cinco patotipos de *E. coli* causantes de enfermedades que van desde diarrea acuosa parecida al cólera hasta diarrea neonatal, diarrea persistente y diarrea con sangre (Nataro y Kaper, 1998).

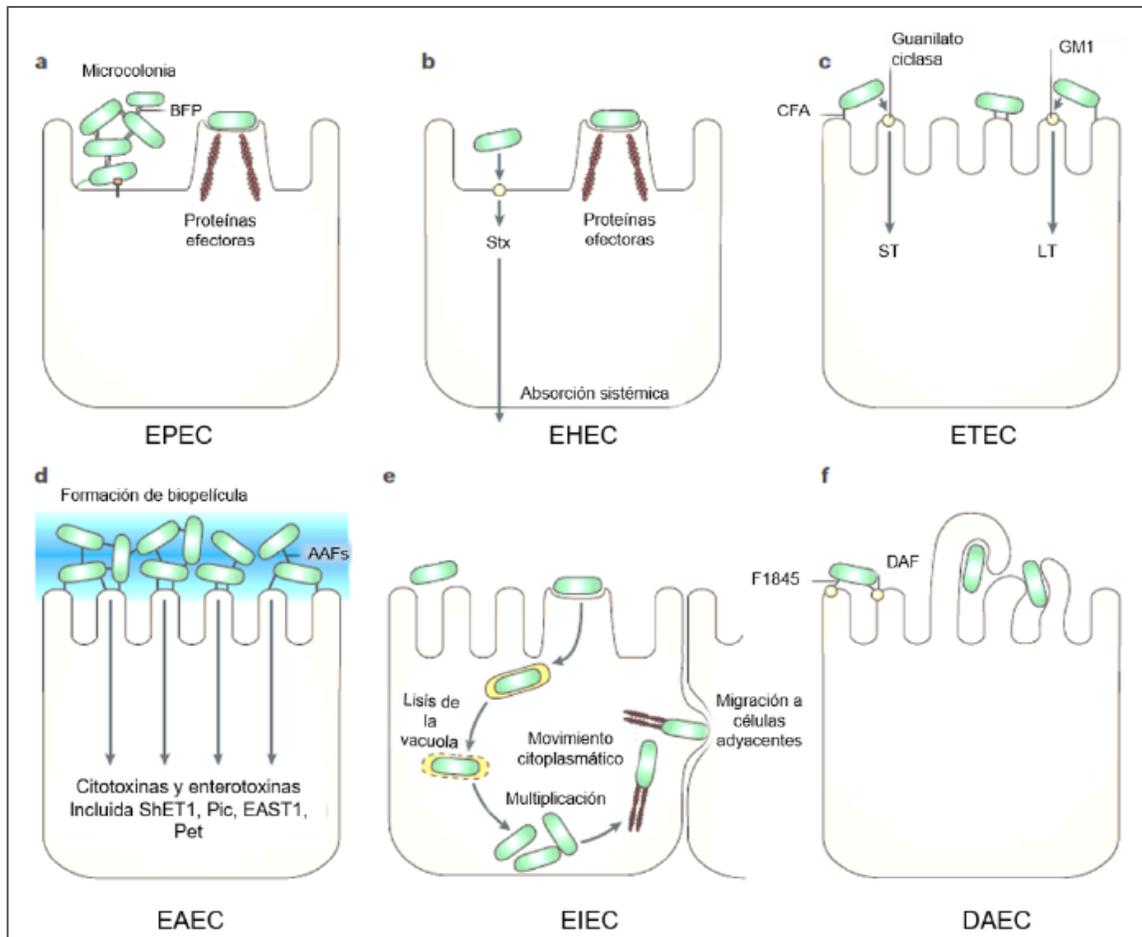


Figura 1. Mecanismo general de patogenicidad de los patotipos de *E. coli* diarreogénica

AAF, fimbrias de adherencia agregativa; **BFP**, pilus formadores de haces; **CFA**, factores de colonización; **DAF**, factor de aceleración de descomposición; **EAST1**, ST1 de *E. coli* enteroagregativa; **LT**, enterotoxina termolábil; **ShET1**, enterotoxina 1 de *Shigella*; **ST**, enterotoxina termoestable. Modificado de Kaper *et al.*, 2004.

2.3.1 *Escherichia coli* enterotoxigénica

ETEC, por sus siglas en inglés, se descubrió cuando se intentó aislar a la bacteria *V. cholerae* de heces de pacientes con signos y síntomas de cólera. ETEC representa un patotipo muy diverso de *E. coli* diarreogénico, ya que alberga elementos genéticos móviles como plásmidos y fagos (Gomes *et al.*, 2016). Debido a la adquisición de estos plásmidos, ETEC contiene los genes que codifican para las enterotoxinas y la mayoría de los factores de colonización (Sahl y Rasko, 2012).



La frecuencia de aislamiento de este grupo patógeno de *E. coli* en niños con diarrea es de 10 a 30% alrededor del mundo (Rodríguez, 2002). Según reportes de la OMS en 2017 el número de muertes por diarrea causada por ETEC es de aproximadamente 157,000 personas al año, aproximadamente el 9% de las muertes por diarrea. Un promedio de 42,000 muertes reportadas por diarrea causada por ETEC en niños menores de cinco años en 2013 ha sido punto de alarma. Así, en el mismo año, en los continentes de África y Asia del Sur se registraron 89,000 muertes también para personas mayores de cinco años (Mirhoseini *et al.*, 2018).

La infección por ETEC, en niños en edad escolar y en adultos, puede ser asintomática y poco frecuente o producir la diarrea del viajero. La diarrea del viajero es un término que se creó a partir de la década de 1950 ya que se produjo un aumento de los viajes a zonas exóticas del planeta en donde se presentaron frecuentes apariciones de cuadros diarreicos en las personas que visitaban estas regiones (Alonso *et al.*, 2006). En la Figura 2 se muestra el nivel de riesgo para contraer la diarrea del viajero, siendo mayor en los países que se encuentran en África, Asia y Latinoamérica incluyendo México.

En un estudio realizado en México para la búsqueda de patógenos causantes de diarrea aguda en niños que requirieron hospitalización, se observó que los patotipos diarreogénicos de *Escherichia coli* (30.9 %) son los patógenos más frecuentemente identificados en los casos de diarrea, por arriba de rotavirus (22.6 %), *Salmonella enterica* (11.4 %), *Shigella* spp. (10.8 %), *Campylobacter* spp. (5.6 %), parásitos (4.2 %) y *V. cholerae* (1.1 %). ETEC y EAEC está entre los agentes causales más importantes de diarrea e infecciones, principalmente en niños pertenecientes a regiones de ingresos bajos e intermedios (Rios-Muniz *et al.*, 2019).

Tal y reportó Rodríguez en 2002, el cuadro clínico causado por ETEC se caracteriza por presentar diarrea aguda, generalmente sin sangre, sin moco, sin pus y en pocos casos se presentan fiebre y vómito. La diarrea producida por ETEC puede ser leve, breve y autolimitada pero también puede ser grave. La enfermedad tiene un periodo de incubación de 14 a 50 h. En el riesgo de padecer el cuadro clínico interviene el sistema inmunológico del huésped. De esta manera, los viajeros de países no

desarrollados tienen una tasa de infección inferior, cuando visitan otros países no desarrollados, que los viajeros de países desarrollados (Alonso *et al.*, 2006).

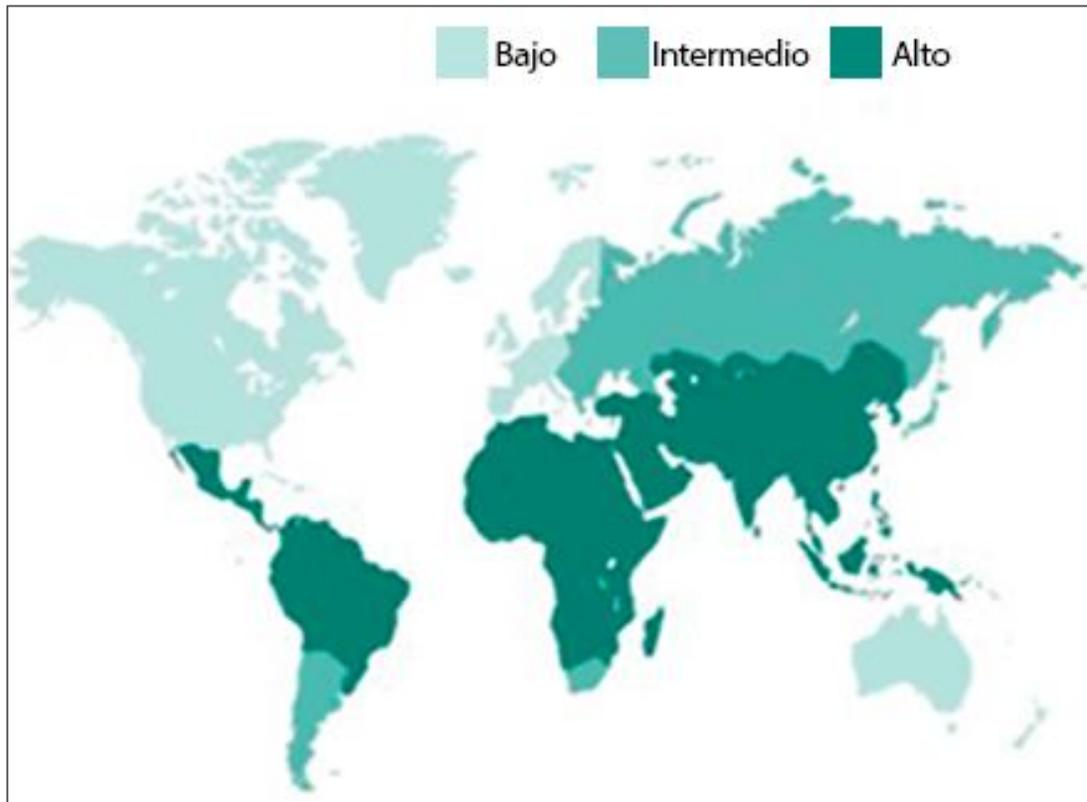


Figura 2. Áreas de riesgo de contraer diarrea del viajero

En color azul de prusia, azul acero y azul claro se encuentran las áreas con un nivel alto, intermedio y bajo de contraer la enfermedad del viajero, respectivamente. Tomada del Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 2006.

2.3.1.1 Factores de virulencia de ETEC

Tras el descubrimiento inicial de la asociación de ETEC con enfermedades diarreicas en humanos en la década de 1950, hubo un intenso esfuerzo para identificar los rasgos asociados a la virulencia de ETEC que pudieran ayudar a comprender la fisiología del proceso patológico y conducir al desarrollo de métodos de diagnóstico específicos (Gomes *et al.*, 2016).

La enfermedad provocada por ETEC es atribuida a sus factores de virulencia, los cuales son las fimbrias denominadas factores de colonización (CFAs) y las enterotoxinas termolábil (LT) y termoestable (ST) siendo estas últimas su principal mecanismo de patogenicidad. El mecanismo de patogenicidad de ETEC se muestra en la Figura 3, el cual consiste primeramente en la ingesta del microorganismo en agua o alimentos contaminados. El equilibrio entre los factores de virulencia del microorganismo infectante y el sistema inmune del huésped dicta la posibilidad de una infección (Mirhoseini *et al.*, 2018). Una vez ingerido, ETEC se adhiere al enterocito del intestino delgado por medio de la exoproteína de adherencia denominada EtpA, la cual está localizada en el extremo terminal del flagelo. Una vez que la bacteria alcanza la luz del intestino delgado, EtpA interactúa con glicanos presentes en las mucinas intestinales estableciendo un anclaje inicial. Posteriormente, los factores de colonización (CFAs), se adhieren con mayor fuerza sobre la membrana citoplasmática del enterocito mediante el reconocimiento de componentes de la matriz extracelular como la fibronectina y de receptores sobre la superficie celular como glicoesfingolípidos y glicoproteínas. A continuación, el autotransportador A de ETEC (EatA), el cual es una proteasa perteneciente a la familia de los autotransportadores de serin proteasa de *Enterobacteriaceae* (SPATE), degrada a EtpA y finalmente la adhesión íntima es mediada por la proteína de la membrana externa Tia y el autotransportador glicosilado TibB (Clements *et al.*, 2012; Kumar *et al.*, 2016).

Después de la adherencia a la mucosa intestinal, ETEC secreta las toxinas LT y ST por medio del sistema de secreción tipo II. La LT consta de dos subunidades, donde la subunidad A es un monómero y la subunidad B un pentámero. LT se une al enterocito por la interacción de la subunidad B con el gangliósido GM1 que se encuentra sobre la superficie celular. Posteriormente, se forma una vacuola que ingresa al citoplasma por endocitosis para después dirigirse al aparato de Golgi en donde se separan las dos subunidades de la LT. La subunidad B es degradada por proteasas y la subunidad A, que es la subunidad activa, alcanza su objetivo en la membrana basolateral para unirse a las proteínas G mediante ribosilación del ADP, lo cual inhibe la actividad de GTPasa de las proteínas G. Esto conlleva a una activación constitutiva de la adenilatociclase produciendo un aumento del AMP cíclico y la

activación de la proteína cinasa A, la cual fosforila al canal regulador transmembranal de fibrosis quística (CFTR), estimulando su apertura y la secreción excesiva de cloro, sodio y agua ocasionando una diarrea secretora aguda. La ST se une y activa al receptor de la enzima guanilato ciclasa C (GC-C) en la superficie del enterocito. Esto ocasiona el aumento de GMP cíclico (GMPc) activando a la proteína cinasa dependiente de GMPc lo que origina la fosforilación del CFRT y, por lo tanto, genera el mismo efecto que LT: un aumento de la secreción de cloro, sodio y agua (Clements *et al.*, 2012; Mirhoseini *et al.*, 2018).

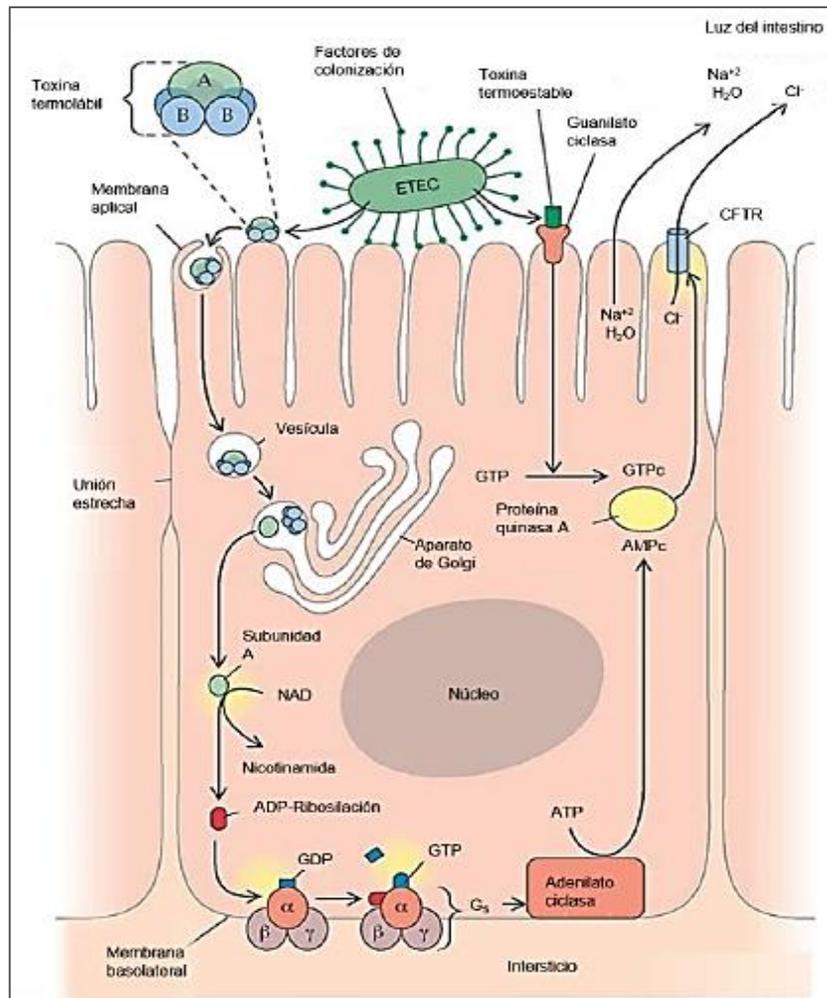


Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de ETEC

Inicialmente se lleva a cabo la adhesión y colonización de las microvellosidades del enterocito a través de sus factores de colonización. Posteriormente, las toxinas termolábil y termoestable son secretadas para activar a la enzima adenilato ciclasa y guanilato ciclasa, respectivamente. Finalmente, la producción descontrolada de AMPc y GMPc estimula la apertura del CFRT, lo cual conlleva a la secreción de agua y electrolitos hacia el lumen intestinal originando una diarrea secretora intensa en el hospedero. Modificada de Mirhoseini *et al.*, 2018.

Estudios en líneas celulares y en modelos animales, incluidos humanos, revelaron que tanto la LT como la ST contribuyen a la infección por ETEC (Wang *et al.*, 2019). La producción de cualquiera de estas dos toxinas es suficiente para causar diarrea severa y los estudios epidemiológicos han mostrado que las cepas de ETEC pueden producir la toxina LT, la toxina ST o ambas (Rios-Muniz *et al.*, 2019). La prevalencia de producción de toxina LT, ST o ST/LT varía notablemente entre las diferentes regiones del mundo (Figura 4) (Mirhoseini *et al.*, 2018).

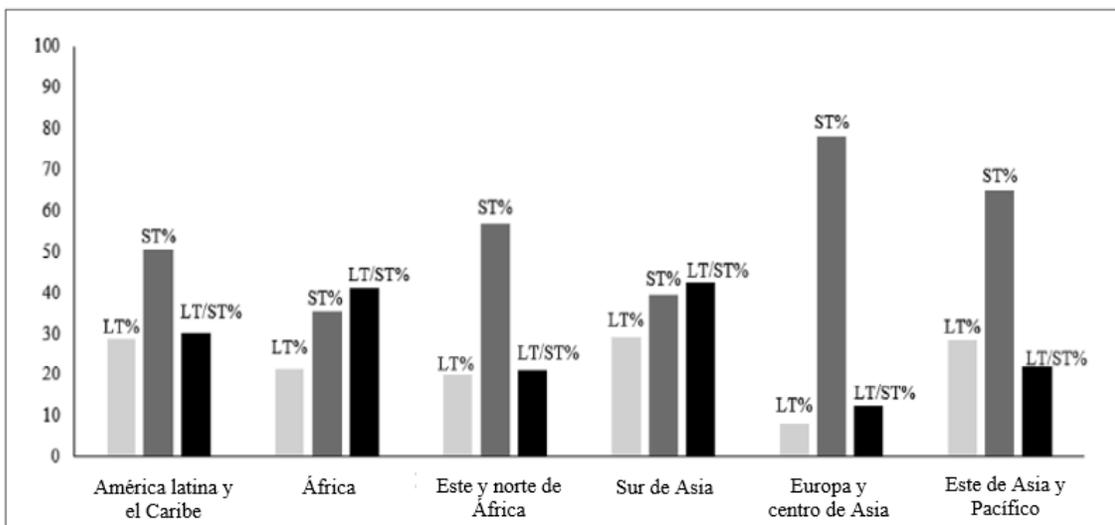


Figura 4. Prevalencia de toxinas LT y ST por diferentes regiones

Modificada de Mirhoseini *et al.*, 2018.

2.3.1.1.1 Factores de colonización

Antes de que ETEC pueda iniciar una infección, primero debe colonizar el intestino delgado del huésped. A diferencia de las cepas comensales de *E. coli*, que generalmente se limitan al colon. ETEC se adhiere y permanece en la superficie epitelial del intestino delgado, a diferencia de otros enteropatógenos que invaden tejidos más profundos. (Swidsinski *et al.*, 2005). La colonización del intestino delgado está mediada por adhesinas proteicas localizadas en la superficie de la célula bacteriana. La mayoría de estas adhesinas son fimbrias llamadas factores de

colonización proteicos fimbriales o fibrilares que se designan como CFA (antígeno del factor de colonización), CS (antígeno de superficie de coli) o PCF (factor de colonización putativo) seguido de un número (Kaper *et al.*, 2004). Estas proteínas de superficie son algunos de los primeros factores de virulencia bien conocidos en ETEC y se consideran un objetivo para la producción de vacunas (Mirhoseini *et al.*, 2018).

Se han identificado al menos 25 factores de colonización distintos en las cepas de ETEC que propician la adhesión a las células epiteliales, los cuales en su mayoría, son codificados plásmidos (Clements *et al.*, 2012). Los factores de colonización se dividen en tres grupos: i) el grupo similar a CFA/I, el cual incluye a CFA/I, CS1, CS2, CS4, CS14 y CS17, ii) el grupo similar a CS5, el cual incluye CS5, CS7, CS18 y CS20 y iii) el grupo especial, el cual incluye CS3, CS6 y CS10-12 (Madhavan y Sakellaris, 2015).

La mayoría de los factores de colonización de ETEC se ensamblan a través de la vía chaperona-usher por medio de la cual se translocan y se anclan sobre la superficie de las bacterias (Figura 5) (He *et al.*, 2020). CS3 es de los factores de colonización más comunes en ETEC (Levine *et al.*, 1984). La producción de CS3 está codificada por el grupo de genes *cstA*, *cstB*, *cstG* y *cstH* donde el gen *cstA* codifica para una proteína chaperona, el gen *cstB* codifica para una proteína usher y los genes *cstG* y *cstH* codifican para subunidades de pilina (Jalajakumari *et al.*, 1989), siendo *cstH* el gen que codifica para la subunidad principal de pilina que conforma a la fimbria CS3. Otro CS característico de ETEC, identificado en la cepa E9034A, es CS21 o Longus el cual es un pilus tipo IV codificado en un operón localizado en un plásmido (Girón *et al.*, 1994) El nombre de Longus es debido a la longitud inusual del pilus que puede extenderse por más de 20 μm desde la superficie de la bacteria, mientras que la mayoría de los pili bacterianos tienen una longitud de alrededor de 0-5 μm (Madhavan y Sakellaris, 2015). El operón *Ing* está constituido por seis genes: *IngA*, *IngB*, *IngC*, *IngD*, *IngH* y *IngP*, los cuales están involucrados en la síntesis y el ensamblaje de Longus o CS21 (Saldaña *et al.*, 2016). El gen *IngA* codifica para la subunidad principal de Longus y se estima que está codificado o expresado por el 10 al 35% de las cepas de ETEC (Gomez-Duarte *et al.*, 2007). Otro miembro representativo de las fimbrias en ETEC es el antígeno del factor de colonización I (CFA/I). CFA/I propicia la unión

bacteriana a las células epiteliales intestinales del huésped y consta de una subunidad adhesiva menor localizada en la punta, CfaE, y miles de copias de la subunidad principal CfaB polimerizadas en una varilla helicoidal ordenada. La síntesis de las fimbrias CFA/I requiere la ayuda de la proteína chaperona periplásmica CfaA y de la proteína de membrana externa CfaC (He *et al.*, 2020). Cabe resaltar que los genes involucrados en la síntesis y el ensamblaje de la fimbria CFA/I los tiene la cepa ETEC H10407 mientras que la cepa E9034A no los tiene.

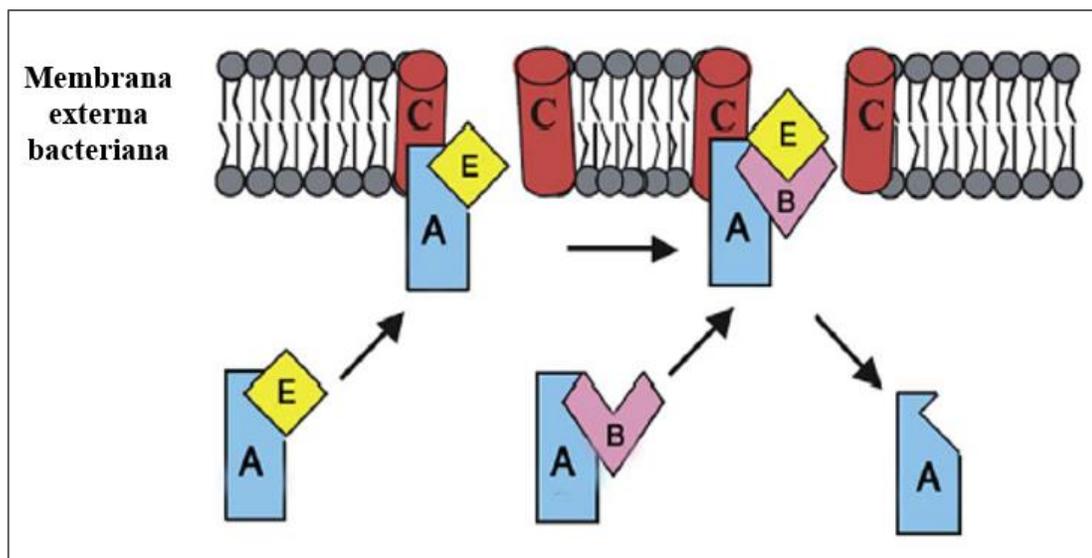


Figura 5. Esquemización del ensamblaje de los factores de colonización de ETEC

A| Proteína chaperona. **B|** Subunidad mayor de pilina. **C|** Proteína de membrana externa bacteriana. **E|** Subunidad menor de pilina. La proteína chaperona cataliza el plegado adecuado de las subunidades de pilina y las transporta a la membrana externa bacteriana para su correcto ensamblaje. Modificado de Mirhoseini *et al.*, 2018.

Interesantemente, ETEC expone simultáneamente una serie de factores de colonización sobre la superficie de la célula bacteriana, por ejemplo, CS5+CS6, CS4+CS6, CS1+CS3 y CS2+CS3 en algunas cepas. Según informes, del 30 al 50% de todas las cepas de ETEC aisladas de pacientes, presentan más de un solo agente específico de colonización (Mirhoseini *et al.*, 2018).

2.3.1.1.2 Toxina Termolábil (LT)

La LT es homóloga a la toxina del cólera producida por *V. cholerae*. Tiene un peso molecular de 84 kDa y su actividad se elimina al incubarse a 60°C durante 15 min. Estas toxinas comparten aproximadamente un 78% de identidad a nivel de nucleótidos y sus estructuras y funciones son muy similares (Dubreuil *et al.*, 2016). Las dos toxinas son multiméricas AB₅; es decir, se componen de una subunidad A monomérica y de una subunidad B pentamérica, donde la subunidad A está formada por dos dominios (A1 y A2), los cuales están unidos por un enlace disulfuro. El dominio A1 de 22 kDa (194 aminoácidos) contiene el sitio enzimático activo y el dominio A2 de 5.5 kDa (46 aminoácidos) es una α -hélice que une a la subunidad A con la subunidad B colocándose dentro del pentámero (Dubreuil *et al.*, 2016). El extremo amino de la subunidad B es una α -hélice que está implicada en la estabilización de la toxina, ya que sirve como protección contra la degradación proteolítica, los monómeros de la subunidad B forman una estructura pentamérica en forma de anillo con un poro central que tiene un diámetro promedio de 13 Å (Fleckenstein *et al.*, 2010). Se lleva a cabo una escisión en la unión entre los dos dominios A para la consecuente liberación del fragmento A1 catalíticamente activo (Figura 6). A pesar de que la actividad catalítica de la LT está presente en la subunidad A, se requiere del pentámero B para que la toxina pueda reconocer a su receptor de superficie celular y entrar en los enterocitos del intestino delgado. Por lo tanto, el complejo proteico hexamérico es necesario para el efecto tóxico de la LT (Dubreuil *et al.*, 2016).

Las subunidades A (240 aminoácidos) y B (103 aminoácidos) de la LT se sintetizan en el citoplasma y poseen una secuencia señal en el extremo amino que permite su transporte a la membrana interna y su translocación al periplasma después de que se escinde la secuencia señal. La enzima oxidoreductasa disulfuro periplásmica (DsbA) ayuda en la formación de un enlace disulfuro y la peptidil *cis-trans* isomerasa asegura la formación de una *cis*-prolina lo cual facilitan el plegado correcto de la LT. Las subunidades A y B se ensamblan y permanecen ensamblados establemente a un pH de 2.0 a 11.0 (Chung *et al.*, 2006).

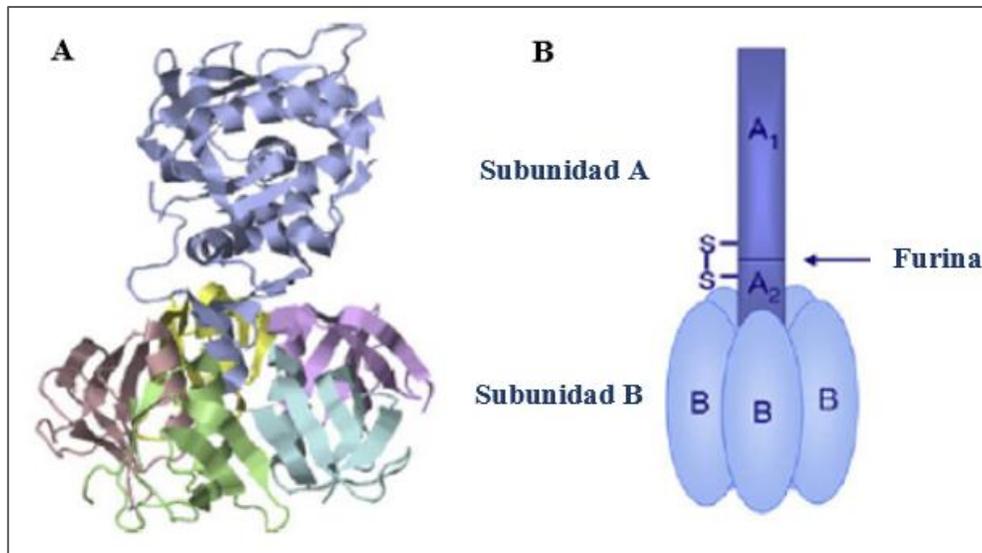


Figura 6. Estructura y organización de las subunidades A y B de LT en ETEC

A| Estructura cristalina de la LT. El dominio globular A₁ y el péptido helicoidal A₂ se muestran en azul, junto con un anillo de cinco subunidades B. **B|** Organización de las subunidades de LT. Se muestra el sitio de escisión de la proteasa furina, el cual está sostenido por un enlace disulfuro. Modificado de Mirhoseini *et al.*, 2018.

Los genes que codifican para la toxina termolábil están ubicados en un operón bicistrónico localizado en un plásmido extracromosómico llamado pEnt (Ochi *et al.*, 2009). El operón que codifica para las subunidades A y B (*eltAB*) está flanqueado por regiones altamente conservadas seguidas de secuencias variables (Dubreuil *et al.*, 2016). Los genes que codifican para la LT se adquirieron por transferencia horizontal hace aproximadamente 130 millones de años de *V. cholerae*, de acuerdo a estudios evolutivos y filogenéticos (Yamamoto *et al.*, 1987).

ETEC produce dos tipos de enterotoxinas termolábiles: tipo I (LTI) y tipo II (LTII), las cuales se diferencian por sus propiedades genéticas, bioquímicas e inmunológicas. Estas diferencias se deben en gran medida a su subunidad B. LTI se puede dividir en LTIh y LTIp, los cuales muestran ligeras diferencias en su composición. Estos subtipos son producidos por ETEC humana y ETEC porcina y humana, respectivamente (Dubreuil *et al.*, 2016).

LTII se compone de tres variantes, LTIIa, LTIIb y LTIIc, las cuales solo difieren con LTI en la secuencia de aminoácidos de sus subunidades B. LTII no tiene reactividad



cruzada con la toxina del cólera debido a que la similitud de la secuencia de aminoácidos de esta toxina con la secuencia de aminoácidos de la toxina del cólera y LTI alcanza menos del 14%, a pesar de esto posee actividades biológicas similares (Mirhoseini *et al.*, 2018). Las variantes antigénicas de LTII se unen a varios gangliósidos, mientras que LTI se une preferentemente al gangliósido GM1 (Dubreuil *et al.*, 2016). La información genética de esta toxina se encuentra codificada en un profago en el cromosoma bacteriano (Mirhoseini *et al.*, 2018).

2.3.1.1.3 Toxina Termoestable (ST)

Además de la toxina LT, ETEC produce toxinas termoestables (STs), que son péptidos de bajo peso molecular (2kDa) constituido por 18 o 19 aminoácidos ricos en cisteína (Rios-Muniz *et al.*, 2019). Su pequeño tamaño y estructura son los responsables de la resistencia a altas temperaturas las cuales pueden alcanzar los 100°C. Su inactivación se logra a los 121°C, además de que también resiste a la acción de la tripsina, quimiotripsina y de los ácidos gástricos (Dubreuil *et al.*, 2016).

Las STs producidas por ETEC son péptidos secretados que pueden dividirse en dos tipos, STa y STb. Mientras que este último es más virulento en animales y particularmente en cerdos después del destete, la enterotoxina STa es más relevante en la inducción de diarrea en humanos, lechones recién nacidos y terneros (Wang *et al.*, 2019). Estos péptidos están codificados por dos genes, *estA* y *estB*, localizados en plásmidos y se pueden distinguir entre sí por su solubilidad en metanol y su sensibilidad a proteasas. La toxina STa es soluble en metanol y resistente a proteasas, mientras que STb es insoluble en metanol y sensible a proteasas. Según la especie hospedadora, STa se clasifica además en dos subtipos, conocidos como STp y STh, que se aislaron originalmente de cepas de ETEC porcinas y humanas, respectivamente (Bölin *et al.*, 2006). Mientras que STp se encuentra ampliamente en cepas de ETEC porcinas, bovinas y humanas, STh solo es producida por cepas de ETEC humanas (Wang *et al.*, 2019). Ambos péptidos comparten 14 aminoácidos del extremo carboxilo, los cuales son suficientes para la enterotoxicidad, razón por la cual

dicho fragmento es conocido como dominio tóxico. Este dominio tóxico presenta homología a nivel de aminoácidos y de estructura tridimensional con la guanilina y uroguanilina de mamíferos (figura 7); sin embargo, los cuatro o cinco aminoácidos del extremo amino no son homólogos en las dos especies de ST ni son necesarios para la actividad biológica (Weiglmeier *et al.*, 2010).

El gen *sta* codifica para un propéptido compuesto por un péptido señal de 19 aminoácidos, seguido de una región pro de 34 aminoácidos y el péptido STa maduro. El péptido STa maduro se escinde después de la translocación desde la membrana interna hacia el periplasma, en péptidos de 19 y 18 aminoácidos para STh y STp, respectivamente (Weiglmeier *et al.*, 2010). En el periplasma, la oxidoreductasa DsbA forma tres enlaces disulfuro intramoleculares entre los residuos de cisteína Cys5-Cys10, Cys6-Cys14 y Cys9-Cys17 en STp o Cys6-Cys11, Cys7-Cys15 y Cys10-Cys18 en STh. Estos puentes disulfuro intramoleculares aseguran el plegamiento correcto del péptido STa maduro, que se parece mucho al de dos péptidos de mamíferos, guanilina y uroguanilina, y son importantes para su función (Wang *et al.*, 2019).

Existen seis variantes alélicas de *sta*, que difieren en su región pro: *stA1*, *stA5* y *stA6* de origen porcino (STp) y *stA2*, *stA3/4* y *stA7* de origen humano (STh). La variante *stA5* es la más común en los aislamientos que inducen diarrea en animales y adultos. Mientras que las cepas con la variante *stA3/4* es la más común en diarreas presentadas en niños (Joffré *et al.*, 2016).

En contraste, el gen *stb*, que codifica para la enterotoxina termoestable STb, se encuentra altamente conservado en aislados clínicos de ETEC en todo el mundo (Wang *et al.*, 2019). Al igual que STa, STb se sintetiza como un propéptido de 71 aminoácidos, que comprende un péptido señal y la enterotoxina STb madura de 48 aminoácidos (5.2 kDa). Una vez liberado en el periplasma, este péptido señal se escinde para formar el péptido STb maduro. La oxidoreductasa DsbA, cataliza la formación de dos enlaces disulfuro en la posición Cys10-Cys48 y Cys21-Cys36 para el correcto plegamiento de este péptido en el periplasma. A pesar de que se ha informado esporádicamente cepas de ETEC humanas, el papel de la enterotoxina STb en la enfermedad diarreica humana sigue siendo un tema de debate (Dubreuil, 2012).

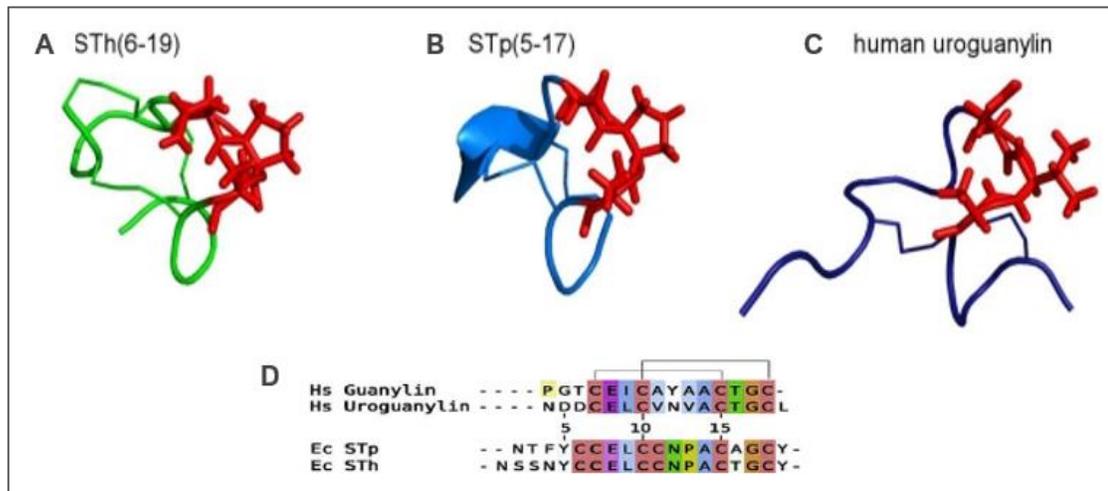


Figura 7. Estructura de los subtipos de la toxina Sta de ETEC y alineación de secuencias de ligandos del receptor de guanilato ciclasa C

A| Estructura del subtipo STh **B|** Estructura del subtipo STp. **C|** Estructura de la uroguanylina humana y el dominio tóxico de STp. La región hidrófoba implicada en la unión del receptor se representa como barras rojas en cada estructura. **D|** Alineación de secuencia de los ligandos GC-C humanos (arriba) y ligandos GC-C bacterianos (abajo). Modificado de Mirhoseini *et al.*, 2018 y Weiglmeier *et al.*, 2010.

2.4 Alarmonas y respuesta estricta

Se ha demostrado que las señales ambientales y químicas regulan los factores de virulencia en varios patógenos entéricos (Sahl y Rasko, 2012). Al estar ante una infección, las bacterias son eliminadas por el sistema inmune y por la terapia antimicrobiana específica. Sin embargo, algunos de ellas sobreviven y conducen a una infección persistente. Los patógenos persistentes aplican varios mecanismos para garantizar su supervivencia durante un período prolongado, entre estos mecanismos se incluyen la respuesta estricta, el sistema de toxina-antitoxina, la respuesta al estrés oxidativo y la respuesta SOS (Kushwaha *et al.*, 2019).

La respuesta estricta tiene un rol crucial en la patogénesis y virulencia bacteriana, por lo tanto, podría ser un objetivo potencial para verificar la virulencia y la formación de persistencia. La respuesta estricta ayuda a los patógenos a sobrevivir en varias etapas de la infección (Kushwaha *et al.*, 2019). El rol de una respuesta estricta en la patogénesis bacteriana ha sido respaldado por un estudio en donde una mutante $\Delta reIA$

de *M. tuberculosis* no pudo persistir en los ratones durante un período prolongado. Además, también la persistencia se redujo drásticamente en el pulmón del ratón durante la fase crónica de la infección. Por lo tanto, la respuesta estricta parece ser un mecanismo crucial durante las infecciones bacterianas persistentes (Primm *et al.*, 2000).

Las alarmonas se conocen como metabolitos reguladores de la "respuesta estricta". La respuesta estricta se caracteriza por la detención del crecimiento y la modulación de la expresión genética durante el estrés, principalmente nutricional (Atkinson *et al.*, 2011). La respuesta estricta les ayuda a las bacterias a conservar energía y permitir su supervivencia en condiciones adversas (Steinchen y Bange, 2016).

Las alarmonas son segundos mensajeros basados en nucleótidos que responden a los cambios ambientales en bacterias, cloroplastos de plantas y algas (Steinchen y Bange, 2016). Los nucleótidos guanosina tetrafosfato (ppGpp) y guanosina pentafofosfato (pppGpp) se denominan alarmonas, conocidos colectivamente como (p)ppGpp donde se utilizan como sustrato GDP y GTP para sintetizarlos, respectivamente. A parte de estas dos alarmonas, se descubrió que la sintetasa tipo RSH (RelQ) de *Enterococcus faecalis* también puede utilizar eficientemente GMP como sustrato para formar GMP-3'-difosfato (pGpp) (Gaca *et al.*, 2015). En la figura 8 se muestra la estructura química correspondiente a estas alarmonas.

La función de las alarmonas es reprogramar globalmente la fisiología durante el estrés celular (déficit de nutrientes, especies reactivas de oxígeno, entre otras). (p)ppGpp se identificó por primera vez como un inhibidor clave de la síntesis de ARN estable durante la inanición de aminoácidos, lo que se denomina respuesta estricta. Posteriormente, se ha demostrado el papel de (p)ppGpp más allá de la respuesta a la inanición, mostrando que (p)ppGpp es inducida por diferentes situaciones de estrés, donde regula muchos objetivos celulares y ejerce su influencia incluso en concentraciones mucho más bajas que las inducidas durante la respuesta estricta (Liu *et al.*, 2015).

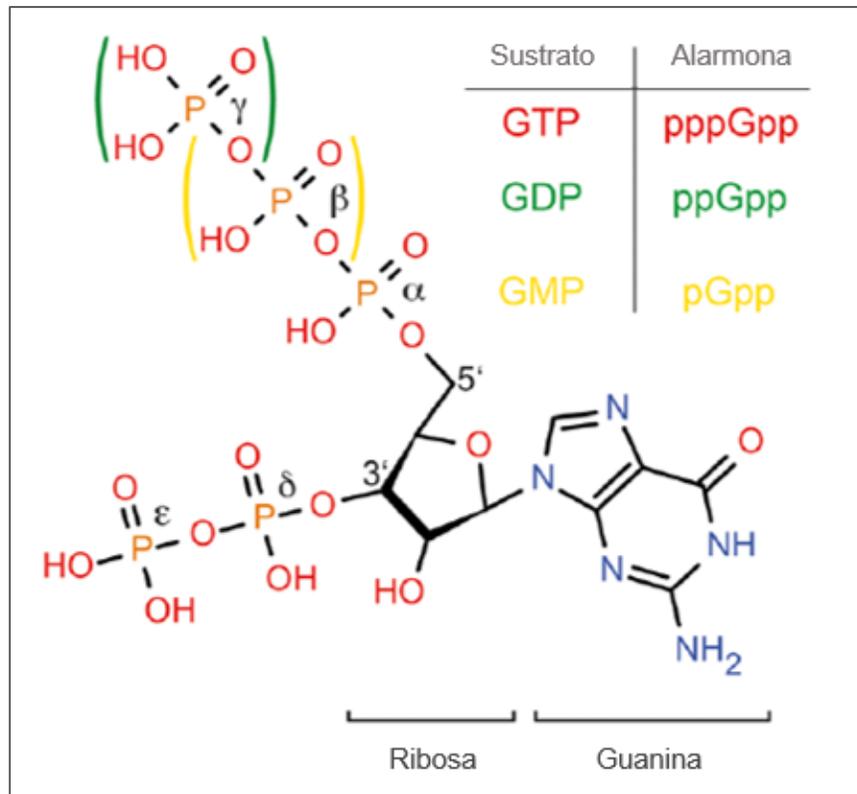


Figura 8. Estructura química de (p)ppGpp

Los fosfatos ausentes en ppGpp y pGpp se indican en verde y en verde y amarillo respectivamente. Modificado de Steinchen y Bange, 2016.

2.4.1. Metabolismo de las alarmonas

El metabolismo de (p)ppGpp se basa en enzimas que pueden sintetizar y degradar (p)ppGpp (figura 9), las cuales se pueden dividir en tres grupos principales: proteínas largas homólogas RelA/SpoT (RSH) que contienen los dominios de sintetasa e hidrolasa, pequeñas sintetisas de alarmona (SAS) e hidrolasas (Sahl y Rasko), que contienen solo el dominio de sintetasa o el dominio de hidrolasa, respectivamente (Liu *et al.*, 2015). Las alarmonas son sintetizadas por enzimas (sintetasas) que están ampliamente distribuidas en bacterias y pueden coexistir en varias combinaciones dentro de una especie. Por ejemplo, *Bacillus subtilis* tiene un RSH y dos SAS: RelA, RelP (YwaC) y RelQ (YjbM) (Liu *et al.*, 2015).

Las sintetetasas del tipo RSH producen ppGpp y pppGpp transfiriendo el pirofosfato proveniente de una molécula de ATP al grupo OH en el carbono 3' (figura 8) de una molécula de GDP y GTP respectivamente (Figura 9I). La sintetetasa RelQ de tipo (RSH) de *E. faecalis* utiliza eficientemente GMP para formar GMP-3'-difosfato (pGpp) (Figura 9II). En *E. coli*, el fosfato- γ (Figura 8) es eliminado hidrolíticamente por la enzima GppA para convertir pppGpp en ppGpp (Figura 9III). Las hidrolasas de tipo RSH se encargan de la degradación de las alarmonas mediante la eliminación del motivo pirofosfato δ y ϵ (figura 8) para generar GMP, GDP o GTP (Figura 9IV). Esta reacción se basa en el manganeso, el cual coordina el sustrato de (p)ppGpp y contribuye a la catálisis. Se desconoce si existe una enzima que convierta ppGpp a pGpp. Finalmente, (p)ppGpp actúa modificando la actividad de muchos blancos celulares, incluyendo la replicación, transcripción, traducción, ensamblaje de ribosomas y metabolismo (Steinchen y Bange, 2016).

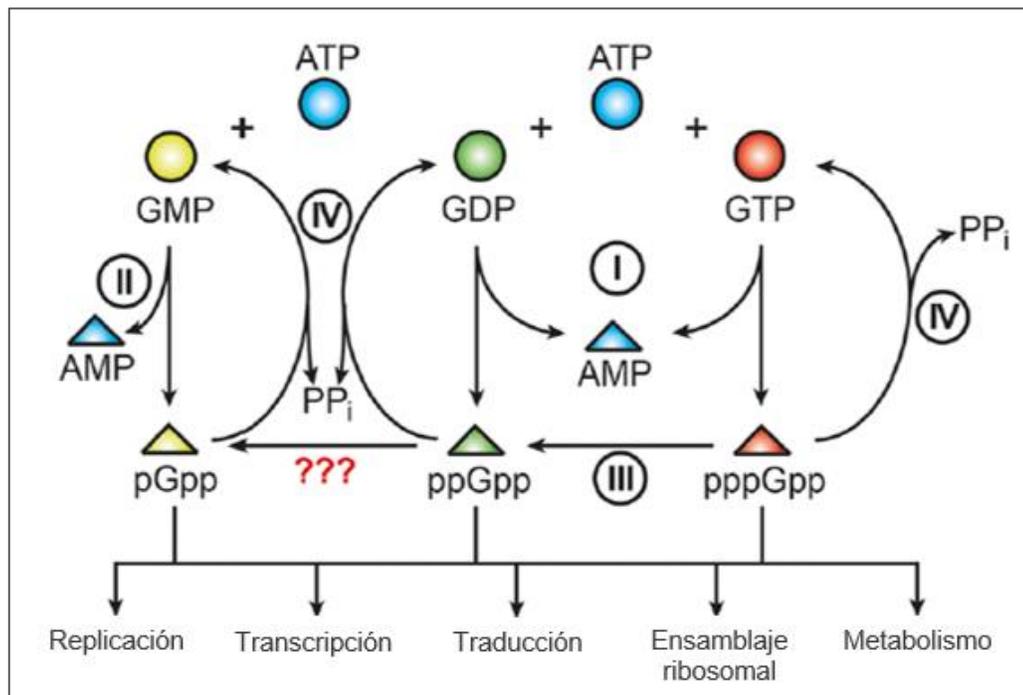


Figura 9. Metabolismo de (p)ppGpp

Se muestran los sustratos de las alarmonas ATP, GMP, GDP y GTP como esferas azul, amarilla, verde y roja, respectivamente. Las alarmonas pGpp, ppGpp y pppGpp se muestran en triángulos amarillo, verde y rojo, respectivamente. Los AMP resultantes de la hidrólisis de ATP por la eliminación de un pirofosfato se muestran en triángulos azules. PP_i significa pirofosfato. Los números Romanos se explican en el texto. Modificado de Steinchen y Bange, 2016.

2.4.2. Mecanismo de acción de las alarmonas

La alarmona se une a las subunidades ω y β' de la ARN polimerasa (Figura 10), produciendo un cambio conformacional en ella y reduciendo su habilidad para formar el complejo abierto y, por lo tanto, reduce la transcripción en bacterias que presentan algún tipo de estrés. También puede favorecer la estabilización de este complejo abierto por un cambio conformacional en la ARN polimerasa y así, favorecer la transcripción de ciertos genes que ayudarán a la supervivencia de la bacteria frente a condiciones adversas (Hauryliuk *et al.*, 2015).

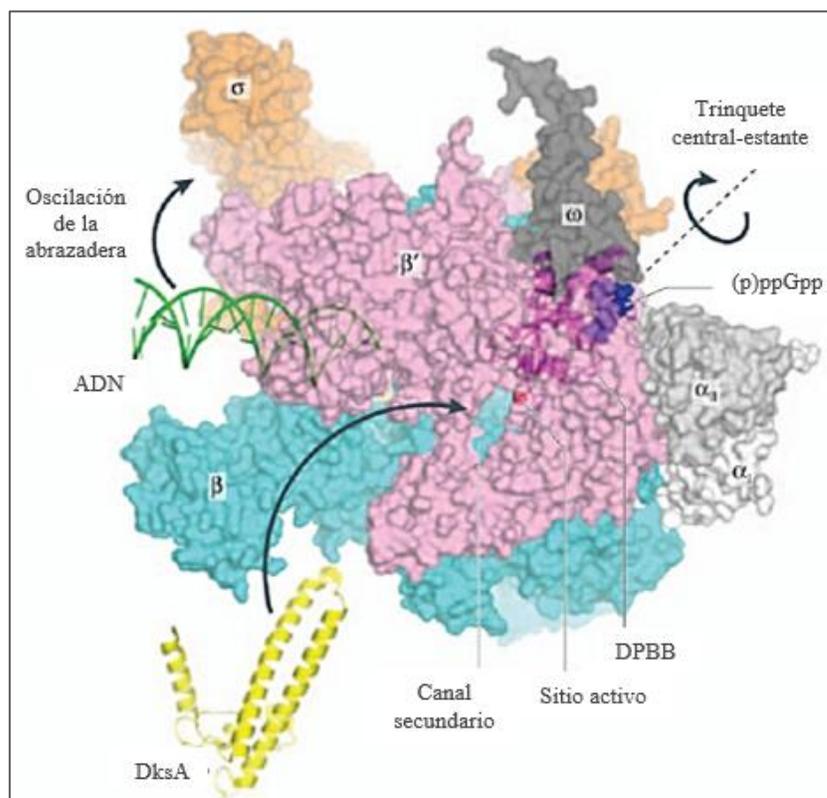


Figura 10. Estructura cristalina del complejo ARN polimerasa-ppGpp en *E. coli*

Las subunidades de la holoenzima: α_I , blanco; α_{II} , gris claro; β , cian; β' , rosa; ω , gris oscuro; σ^{70} , naranja y el promotor de ADN (verde) muestran la interacción de la ARN polimerasa con DksA (amarillo) y (p)ppGpp (azul). Mg^{2+} , esfera roja. La línea punteada negra indica el eje de trinquete central-estante y las flechas negras muestran las direcciones del trinquete y la oscilación de la abrazadera de unión al ADN. DPBB, dominio de barril β de doble psi. Modificado de Hauryliuk *et al.*, 2015.

El sitio de unión de ppGpp en la ARN polimerasa se encuentra en el dominio DPBB de la subunidad β' y en el extremo amino de la subunidad ω , el cual se encuentra



aproximadamente a 30 Å del sitio activo de la ARN polimerasa. pppGpp se une en el mismo sitio que ppGpp, pero con menor potencia. El otro lado del dominio DPBB se enfrenta a la hendidura del centro activo de la polimerasa y coordina al Mg^{2+} catalítico, que es fundamental para la actividad de la ARN polimerasa. La regulación de (p)ppGpp en la ARN polimerasa puede ser explicado por dos modelos. El primero se basa en que la unión de (p)ppGpp a la superficie del dominio DPBB induce una señal alostérica que se transmite al otro lado del dominio DPBB que coordina al Mg^{2+} , regulando así la eficiencia catalítica de ARN polimerasa (Mechold *et al.*, 2013). En el segundo modelo se sugiere que la unión de (p)ppGpp influye en los dominios de estante y central de la ARN polimerasa ya que se une en la interfaz de estos dos módulos móviles. El movimiento coordinado de estos módulos, que se conoce como "trinquete central-estante", provoca cambios conformacionales globales y locales en la ARN polimerasa incluido el balanceo de la abrazadera de unión al ADN (Tagami *et al.*, 2011). Por lo tanto, la unión de (p)ppGpp en la unión de estos módulos móviles de la ARN polimerasa determinan la apertura o cierre de la abrazadera de unión de ADN, lo que afecta la estabilidad de los complejos ARN polimerasa-promotor y, por lo tanto, la estabilidad del complejo abierto.

El factor de transcripción de unión a la ARN polimerasa, denominado DksA, se une al canal secundario de la ARN polimerasa de *E. coli* e inserta su dominio en espiral en este canal para llegar al sitio activo. DksA ensancha este canal secundario, lo que influye en la orientación de los módulos central y estante. La interacción ARN polimerasa y DksA hace que la polimerasa sea más sensible al "trinquete central-estante" inducido por (p)ppGpp, amplificando así el accionar de (p)ppGpp durante la regulación transcripcional (Ross *et al.*, 2016).

2.4.3. Regulación de procesos celulares por alarmonas

(p)ppGpp tiene una profunda influencia en la fisiología bacteriana al regular directa o indirectamente muchos procesos celulares críticos, como la replicación, la transcripción, la traducción, el ensamblaje ribosomal y el metabolismo (Liu *et al.*, 2015).

Por ello, se mencionarán los mecanismos moleculares por los cuales (p)ppGpp ajusta estas actividades celulares para adaptar las células al estrés.

2.4.3.1. Regulación del inicio de la transcripción

La alarmona regula muchos de sus efectos fisiológicos mediante el control transcripcional por mecanismos directos o indirectos. Si un promotor es directamente activado o reprimido está dictado por la secuencia de ADN que se encuentra en la “región discriminadora”, la cual está situada entre la caja -10 al nucleótido +1 (sitio de inicio de la transcripción). Los objetivos reprimidos suelen ser ricos en guanosina y citosina mientras que los objetivos activados son típicamente ricos en adenina y timina en esta posición (Figura 11) (Dalebroux *et al.*, 2010).

El control transcripcional indirecto ocurre a través de un proceso conocido como competencia de factor sigma. Durante la respuesta estricta en *E. coli*, la alarmona inhibe promotores dependientes de σ^{70} , como promotores de ARN ribosomal (ARNr), aumentando así la disponibilidad de la ARN polimerasa por factores σ alternativos. Ejemplo de ellos son el factor σ^S (inanición/fase estacionara), σ^{54} (asimilación del nitrógeno), σ^{28} (expresión de genes flagelares y quimiotaxis), σ^{32} (choque térmico) y σ^E (estrés de calor citoplasmático y extremo). De esta manera, (p)ppGpp promueve indirectamente la regulación genética alternativa dependiente del factor sigma reprimiendo la transcripción de operones de ARNr. Juntos, los mecanismos directos e indirectos se integran para mediar las adaptaciones fisiológicas globales de la célula bacteriana que comprenden la respuesta estricta (Dalebroux *et al.*, 2010).

Al presentarse un estado de estrés, principalmente (p)ppGpp funciona como un represor de la expresión de genes que no estén involucrados en la perduración de la bacteria ante este escenario, de esta manera la bacteria detiene su crecimiento y puede enfocarse en producir solamente las proteínas necesarias para su supervivencia (Liu *et al.*, 2015).

2.4.3.2. Regulación no transcripcional

Aunque a menudo se asume que la ARN polimerasa es su principal objetivo, (p)ppGpp también controla muchos otros procesos celulares adicionales, lo que le permite funcionar como un regulador maestro para ajustar la fisiología celular y facilitar la supervivencia y adaptación al estrés (Ross *et al.*, 2016).

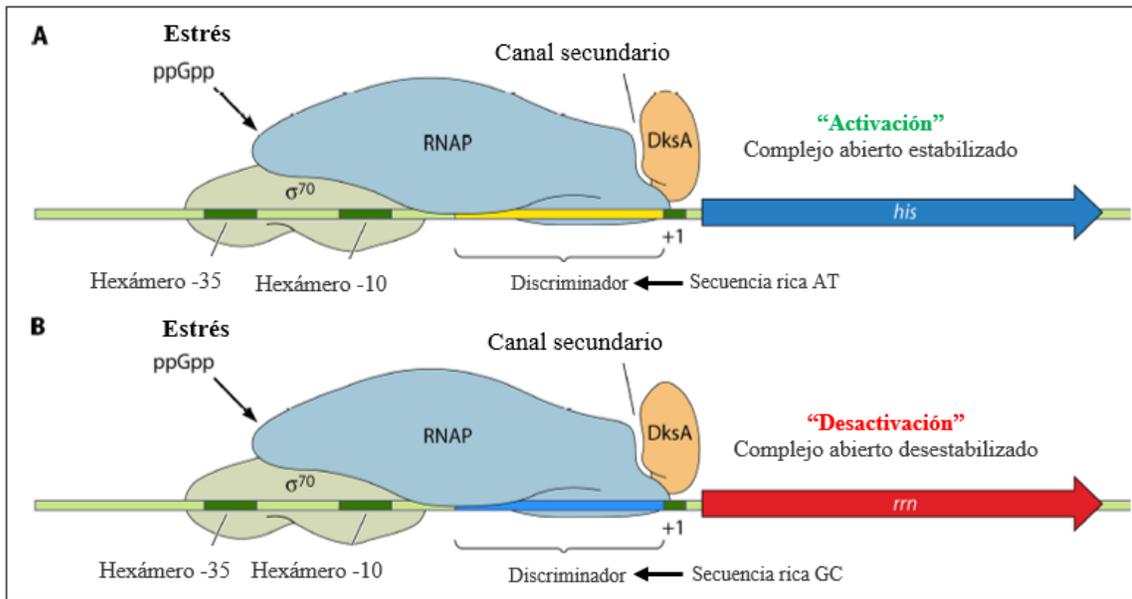


Figura 11. Regulación directa de la transcripción mediada por (p)ppGpp

La transcripción puede activarse o desactivarse en presencia de ppGpp y DksA. El hecho de que la transcripción sea estimulada o reprimida depende de las propiedades intrínsecas del promotor. **A|** Las dianas activadas como el promotor de *E. coli* para el operón biosintético de histidina (*his*) típicamente tienen una secuencia de ADN rica en AT en la región discriminadora. **B|** Los objetivos reprimidos, como el promotor P1 de los operones de ARNr (*rrn*), suelen tener una secuencia discriminadora rica en GC. Los promotores controlados directamente por ppGpp y DksA generalmente dependen del factor σ^{70} . Modificado de Dalebroux *et al.*, 2010.

2.4.3.2.1. Replicación del ADN

El complejo de replicación utiliza una ARN polimerasa especializada dependiente de ADN, denominada primasa, para llevar a cabo la replicación del ADN. La primasa sintetiza iniciadores de ARN cortos que sirven como puntos de partida indispensables para las ADN polimerasas para que lleven a cabo la replicación del ADN (Steinchen y Bange, 2016). (p)ppGpp se une sobre el sitio activo de la primasa bacteriana DnaG



interfiriendo con su actividad para ralentizar o detener el alargamiento de la replicación en respuesta a diversas tensiones, inhibiendo así, la replicación del ADN durante la respuesta estricta (Maciąg-Dorszyńska *et al.*, 2013). DnaG consiste en un dominio de unión a zinc seguido por el dominio de ARN polimerasa (RPD) y un dominio de interacción de helicasa C-terminal. El análisis estructural de DnaG-RPD en *Staphylococcus aureus* en complejo con varios sustratos, reveló que ppGpp y pppGpp inhiben a DnaG. Ambas alarmonas están estrechamente coordinadas por DnaG-RPD (Rymer *et al.*, 2012).

2.4.3.2.2. Traducción

(p)ppGpp regula la traducción indirectamente a través de la inhibición de la transcripción de genes codificadores para el ARN ribosómico y proteínas. Las alarmonas ppGpp/pppGpp y GDP/GTP, respectivamente, son moléculas muy similares y solo difieren en el pirofosfato unido al grupo OH del carbono 3' de la ribosa (figura 8). Varios estudios mostraron que (p)ppGpp afecta a las GTPasas involucradas en el inicio (por ejemplo; IF2), elongación (por ejemplo; EF-Tu, EF-G) y la terminación de la traducción (por ejemplo; RF3) (Steinchen y Bange, 2016). Además de afectar todo el proceso de traducción, (p)ppGpp también afecta a las GTPasas involucradas en el ensamblaje de subunidades ribosómicas pequeñas y grandes (por ejemplo; Obg, BipA) y consecuentemente, afectan su maduración y su funcionalidad (Liu *et al.*, 2015).

2.4.3.2.3. Metabolismo celular

(p)ppGpp inhibe la actividad *in vitro* e *in vivo* de la lisina descarboxilasa inducible de *E. coli*, regulando así el metabolismo de la lisina durante el estrés ácido (Kanjee *et al.*, 2011). También inhibe la actividad de la exopolifosfatasa para regular el metabolismo del polifosfato, que controla la tolerancia a los antibióticos, las respuestas al estrés oxidativo y al estrés general (Kushwaha *et al.*, 2019). Además, (p)ppGpp regula directamente los depósitos de nucleótidos de purina intracelulares (Liu *et al.*, 2015).



En la bacteria *B. subtilis*, (p)ppGpp no afecta a la ARN polimerasa, pero regula indirectamente el inicio de la transcripción a través de la reserva de GTP celular. La regulación de la concentración celular de GTP por las alarmonas se produce a través del consumo de GDP y GTP durante la biosíntesis de alarmona y la inhibición directa de las enzimas involucradas en la biosíntesis de nucleótidos de guanosina (Kriel *et al.*, 2014). Un ejemplo es la enzima guanilato cinasa esencial que cataliza la formación de guanosina-difosfato a partir de guanosina monofosfato. La actividad de varias GMK del filo Firmicutes (por ejemplo; *B. subtilis*, *S. aureus* y *Listeria monocytogenes*) está regulada por (p)ppGpp (Liu *et al.*, 2015).

2.4.4. Importancia de las alarmonas

Debido a que (p)ppGpp participa en la regulación de tantos procesos celulares esenciales, las células que carecen de (p)ppGpp, aunque siguen siendo viables, exhiben defectos graves y pleiotrópicos durante algún periodo de estrés (Liu *et al.*, 2015).

2.4.4.1. Supervivencia y adaptación

El fenotipo canónico de las células que carecen de (p)ppGpp, al menos en *E. coli* y *B. subtilis*, es la poliauxotrofia de aminoácidos. En ambos organismos, la regulación transcripcional por (p)ppGpp es importante para adaptarse a la falta de aminoácidos (Liu *et al.*, 2015). Además, parece que la supervivencia durante la inanición también implica una compensación con la tasa de crecimiento ya que la producción de alarmonas se correlaciona negativamente con la tasa de crecimiento en *E. coli*. Esto sugiere que (p)ppGpp actúa primero como un freno de los procesos celulares durante el estrés, lo que podría requerir la inhibición de la replicación, traducción, transcripción de ARNr y/o metabolismo celular. Las células luego se adaptarían a las nuevas condiciones modulando la transcripción de genes de respuesta al estrés y de otros genes necesarios para el crecimiento, así como para la biosíntesis de aminoácidos (Potrykus *et al.*, 2011).

2.4.4.2. Tolerancia y resistencia a los antibióticos

La falta de (p)ppGpp a menudo conduce a una sensibilidad mayor frente a los antibióticos, lo que sugiere un papel crítico de las alarmonas en la resistencia frente a dichas moléculas (Kushwaha *et al.*, 2019). Además, la fuerte inducción de (p)ppGpp por inanición o el aumento de los niveles basales de (p)ppGpp a través de la mutación conduce a una mayor tolerancia a los antibióticos en *P. aeruginosa*, *E. faecalis* y *B. subtilis* (Khakimova *et al.*, 2013; Nguyen *et al.*, 2011).

Los aislados clínicos de *S. aureus* que muestran altos niveles de resistencia a la metilina tienen mutaciones puntuales en *relA* (gen que codifica para sintetasa (p)ppGpp) que conducen a niveles aumentados de alarmona. La inducción de la producción de (p)ppGpp con mupirocina también aumenta la resistencia de *S. aureus* a los antibióticos β -lactámicos (Kim *et al.*, 2013).

2.5 *Escherichia coli* y alarmonas

Las alarmonas tienen una gran influencia en la fisiología bacteriana, ya que se encargan de regular directa o indirectamente muchos procesos celulares críticos para la bacteria, como la replicación, transcripción, traducción y el metabolismo (Liu *et al.*, 2015).

Las sintetetas RelA (744 aminoácidos) y SpoT (702 aminoácidos), pertenecientes a la familia RSH, son las enzimas encargadas del metabolismo de (p)ppGpp en la bacteria *E. coli* (Figura 12). Estas enzimas están codificadas por los genes *relA* (2,235 pares de bases) y *spoT* (2,109 pares de bases) ubicados en el ADN cromosómico de la bacteria (Steinchen y Bange, 2016).

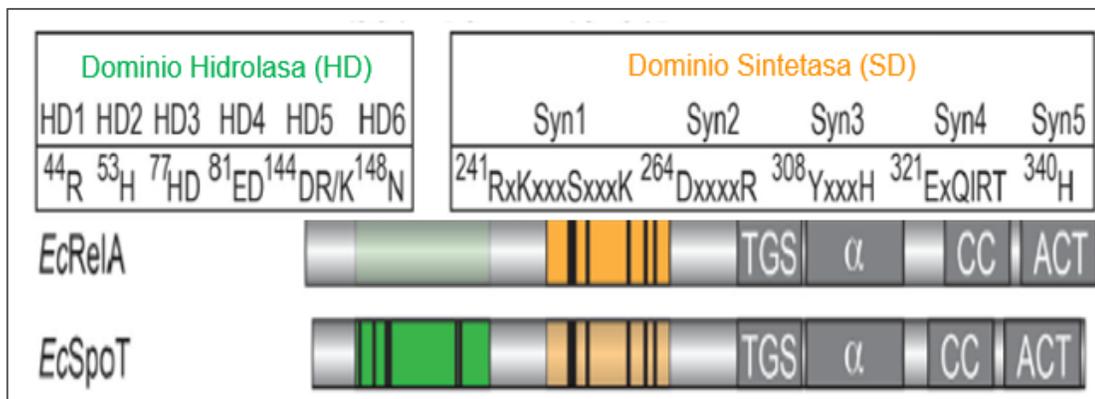


Figura 12. Dominios de las enzimas involucradas en la síntesis e hidrólisis de (p)ppGpp en *E. coli*

Se muestran en color verde el dominio hidrolasa y en color amarillo el dominio sintetasa, localizados en la región catalítica del extremo amino de cada enzima. La intensidad del color es proporcional a la actividad del dominio. Los motivos catalíticos se muestran como líneas negras. En la región reguladora ubicada en el extremo carboxilo se encuentran los dominios conservados: TGS; treonil ARNt sintetasa; α , α hélices; CC, cisteína conservada y dedos de zinc; ACT, aspartato quinasa, corismato y TyrA. Modificado de Steinchen y Bange, 2016.

La síntesis la realizan transfiriendo un grupo pirofosfato proveniente de una molécula de ATP al carbono 3' de la pentosa que se encuentra en una molécula de GDP o GTP para formar ppGpp y (p)ppGpp, respectivamente (Steinchen y Bange, 2016). La hidrólisis se lleva a cabo mediante la eliminación del pirofosfato ubicado en los carbonos δ y ϵ de la ribosa para generar GMP, GDP o GTP. En comparación con RelA, SpoT tiene una actividad sintetasa débil para (p)ppGpp y una actividad hidrolítica. RelA no posee la actividad hidrolasa debido a que no cuenta con los residuos catalíticos correspondientes del dominio hidrolasa. La actividad hidrolasa de SpoT es crucial para equilibrar las concentraciones celulares de (p)ppGpp en presencia de RelA y, por lo tanto, la interrupción del gen *spoT* en *E. coli* es letal (Hauryliuk *et al.*, 2015).

2.5.1 Arquitectura del dominio sintetasa

Las sintetisas tipo RSH son proteínas de múltiples dominios que se pueden dividir en un dominio catalítico (RSH-NTD) seguido de un dominio carboxilo-terminal (RSH-CTD). RSH-NTD consta de un dominio hidrolasa (HD) seguido de un dominio sintetasa



(SD). RSH-CTD consta de los siguientes dominios conservados: treonil ARNt sintetasa (TGS), α hélices (α), cisteína conservada y dedos de zinc (CC), aspartato quinasa, corismato y TyrA (ACT) (figura 12).

El dominio sintetasa está estructuralmente conservado y consta de cinco hojas β antiparalelas rodeadas de cuatro α hélices. Contiene cinco motivos de secuencia conservados (Syn 1-5). Los aminoácidos de Syn1 coordinan el sustrato de ATP. El aspartato y la arginina de Syn2 coordinan magnesio y ATP respectivamente. La tirosina y la histidina de Syn3 coordinan el resto de guanosina de GDP/GTP. El glutamato de Syn4 coordina el magnesio, mientras que la glutamina contribuye a la unión de ATP. La histidina de Syn5 interactúa con el resto ribosa del ATP (Steinchen y Bange, 2016). Aún no se comprende cómo contribuye el CTD a la regulación de la actividad de las alarmonas sintetasa largas a nivel molecular. Aunque todavía no se ha resuelto estructuralmente, se ha descrito un mecanismo de retroalimentación a través de la unión de ppGpp a CTD, lo que permite a la proteína detectar y ajustar el nivel de (p)ppGpp en la célula (Syal *et al.*, 2015).

El déficit de aminoácidos conduce a la acumulación de ARNt deacilados en el citosol que se unen al sitio A del ribosoma. Este estado ribosómico es reconocido por RelA, que se une a la subunidad 50S y adopta una conformación activa (figura 13). La activación de RelA y la consiguiente síntesis de (p)ppGpp conduce a su disociación del ribosoma, seguida de numerosas rondas de síntesis de alarmonas en el estado disociado del ribosoma. Los niveles elevados de (p)ppGpp dirigen los recursos metabólicos celulares a la síntesis de aminoácidos, lo que restablece los niveles normales de aminoacilación del ARNt. El ARNt aminoacilado se entrega al ribosoma mediante el factor de elongación Tu (EF-Tu) en competencia directa con la unión de RelA y ARNt deacilado (Haurlyuk *et al.*, 2015). Además de los ARNt deacilados, se ha demostrado que (p)ppGpp estimula la actividad de RelA *in vitro*, como un nuevo ejemplo de retroalimentación alostérica positiva (Liu *et al.*, 2015).

El dominio sintetasa de SpoT es activado en respuesta a una serie de eventos estresantes que incluyen el déficit de ácidos grasos, el déficit de fuente de carbono, los cambios diaúxicos, la limitación de fósforo, la limitación de hierro, choque

hiperosmótico y estrés oxidativo. La actividad de SpoT está regulada a través de interacciones con la proteína transportadora de acilo (ACP) como se muestra en la figura 14. En condiciones de déficit de ácidos grasos, y de fuente de carbono, la ACP se une a SpoT y aparentemente induce un cambio conformacional favoreciendo la síntesis de alarmonas sobre la hidrólisis (Ronneau y Hallez, 2019). La ACP transfiere cadenas de acilo graso a enzimas dedicadas a la biosíntesis de fosfolípidos y metabolitos secundarios. SpoT interactúa con la ACP unida a un acilo en una región no enzimática conocida como dominio TGS. Durante el déficit de ácidos grasos, las señales metabólicas se transducen a través de una interacción ACP-SpoT, lo que resulta en un aumento de las reservas de ppGpp celulares (Hauryliuk *et al.*, 2015). El hecho de que la actividad sintetasa de SpoT sea estimulada o no, depende de la longitud de los ácidos grasos unidos a la ACP (Ronneau y Hallez, 2019). La regulación de SpoT por parte de la ACP parece estar restringida a las bacterias que poseen proteínas RelA y SpoT, como *E. coli* y *P. aeruginosa* (Battesti y Bouveret, 2009).

2.5.2 Arquitectura del dominio hidrolasa

Se pueden definir seis motivos catalíticos conservados (HD1 - 6) en el dominio hidrolasa (Figura 12). Los motivos HD2, HD3 y HD5 son necesarios para la coordinación del manganeso como se deduce del análisis estructural (Hogg *et al.*, 2004). Los residuos de HD1 y HD6 coordinan la base de guanina y se ha implicado que HD4 está involucrado en la hidrólisis de (p)ppGpp (Steinchen y Bange, 2016). El dominio hidrolasa de la proteína SpoT se ubica en el extremo amino de esta proteína de múltiples dominios. La HD consta de diez α hélices y dos hojas β que crean un sitio activo con un sitio de unión al manganeso, el cual es crucial para su actividad. En el caso de las enzimas Rel bifuncionales, las actividades hidrolasa y sintetasa se separan en dos sitios activos que están separados por aproximadamente 30 Å. Ambas actividades antagónicas son mutuamente excluyentes por una regulación recíproca que parece implicar la transmisión de señales inducidas por ligando (los sustratos de HD y SD respectivamente) entre los dos dominios (Hogg *et al.*, 2004). Rsd es un regulador directo de SpoT en *E. coli*. De manera similar a la ACP, Rsd también

interactúa con el dominio TGS. Sin embargo, a diferencia de la ACP, que estimula la actividad sintetasa de SpoT, Rsd estimula su actividad hidrolasa (Lee *et al.*, 2018).

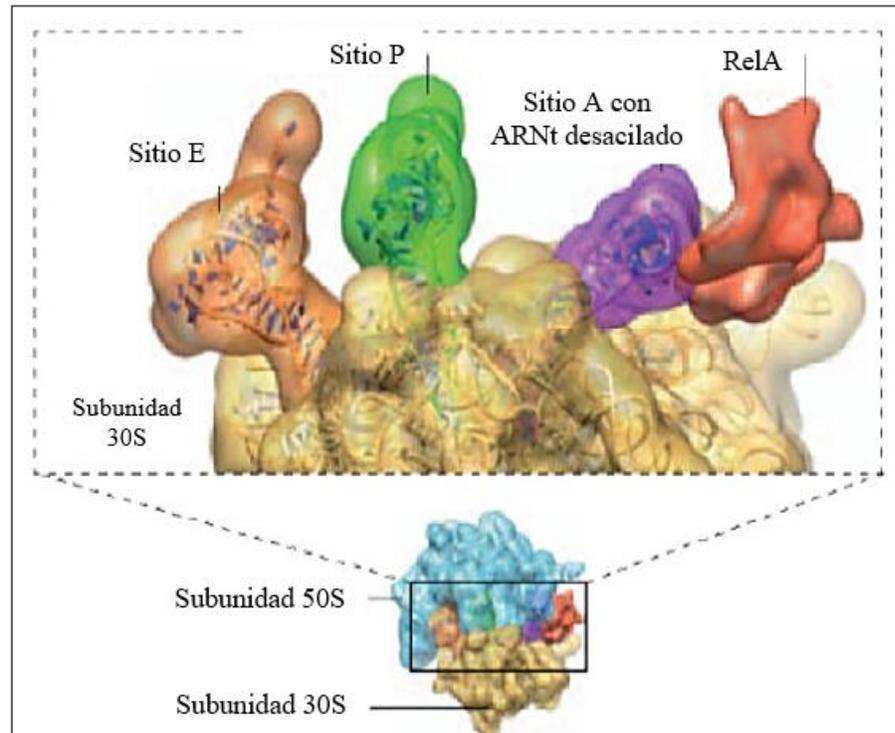


Figura 13. Estructura cristalina del complejo RelA-ribosoma bacteriano

Al unirse al sitio ribosómico A, RelA interactúa con el bucle de sarcina-ricina (SRL) y la proteína ribosómica L11, así como con el ARNt desacilado en el sitio A, que adopta una conformación muy distorsionada. Modificado de Haurlyuk *et al.*, 2015.

En ambientes ricos en nutrientes, es decir, cuando la reserva de GTP es alta, CgtA se asocia transitoriamente con el ribosoma y actúa como un factor de ensamblaje 50S que favorece la traducción. Por el contrario, se convierte en un factor anti asociación 50S cuando aumenta la concentración intracelular de (p)ppGpp, es decir, cuando los nutrientes escasean. En tales condiciones, la GTPasa está fuertemente ligada a ppGpp y se adhiere a la subunidad 50S, evitando así su asociación con la subunidad 30S (Feng *et al.*, 2014). Además de los ribosomas, CgtA también interactúa con SpoT en *E. coli* y *V. cholerae*. El agotamiento de CgtA en ambas especies conduce a la acumulación de alarmonas en la fase exponencial, esto sugiere que CgtA es crucial

para mantener la actividad hidrolasa de SpoT, al menos en ambientes ricos en nutrientes (Ronneau y Hallez, 2019).

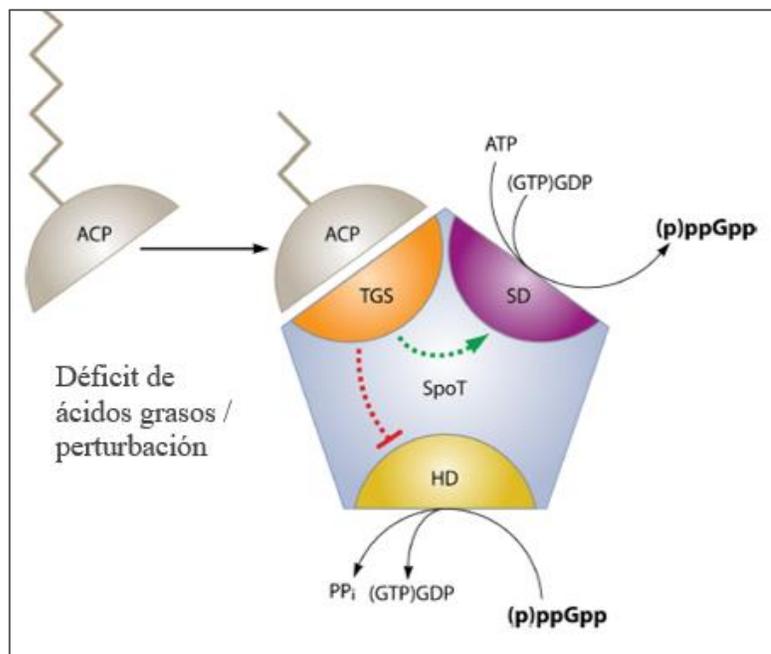


Figura 14. Esquema ilustrativo de la regulación de la actividad de SpoT por interacciones con la ACP

La ACP interactúa en dominio TGS de SpoT, activando su dominio sintetasa y aparentemente reprimiendo su actividad hidrolasa.

2.6 Antecedentes particulares

Tras años de experimentación se ha demostrado que las acciones de (p)ppGpp abarcan aspectos fundamentales de la biología bacteriana, como la adaptabilidad, la supervivencia, las respuestas al estrés, la producción de biopelículas, la capacidad de evolución, la patogénesis, entre otros (Montero *et al.*, 2014).

Los niveles de señalización de (p)ppGpp están controlados por las actividades equilibradas de la sintetasa RelA y la sintetasa SpoT de doble función hidrolasa/sintetasa las cuales comparten alrededor del 31% de la identidad en su secuencia de aminoácidos (Montero *et al.*, 2014).



Se utilizan diferentes procedimientos para investigar la participación reguladora de (p)ppGpp en un proceso dado. Debido a la gran importancia de RelA, al ser la principal fuente de las alarmonas, usualmente se realizan procedimientos de déficit de nutrientes en cepas *relA+* para un aminoácido dado (Durfee *et al.*, 2008). Resultando en aumentos rápidos y grandes en los niveles de (p)ppGpp los cuales se pueden medir, pero tiene la desventaja de detener prematuramente el crecimiento celular y de inducir una variedad de respuestas de estrés indeseables. Otro procedimiento usual sería provocando cualquier tipo de estrés en el cual la bacteria se viera afectada con cepas bacterianas que tengan deficiencia en gen *relA* o que su expresión se vea disminuida. La combinación de este procedimiento con cepas *spoT* deficientes, representa otra estrategia comúnmente utilizada para descubrir roles de (p)ppGpp en un proceso donde este participe. Las mutantes sencillas en el gen *relA* aún pueden producir ppGpp, por supuesto en menor medida, debido a la actividad sintetasa de la enzima SpoT, pero la eliminación de ambos genes *relA* y *spoT* (mutantes dobles $\Delta relA\Delta spoT$) genera bacterias totalmente deficientes de la alarmona (p)ppGpp (Montero *et al.*, 2014).

Como antecedente se tiene el trabajo realizado por Dalebroux en 2010 en el cual hacen una compilación de varios trabajos donde se muestra que la alarmona (p)ppGpp regula diferentes factores de virulencia en diversas bacterias. Por ejemplo: *Helicobacter pylori* en su supervivencia a los macrófagos del huésped; *Brucella sp.* en su supervivencia a los macrófagos del huésped y persistencia; *Streptococcus aureus* siendo esencial para la viabilidad *in vitro*; *Mycobacterium tuberculosis* en la persistencia; *V. cholerae* en su colonización en ratones. De este trabajo hay que destacar a dos bacterias en particular, la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC). Ambas bacterias se ven afectadas en su virulencia, al presentar una doble mutante $\Delta relA\Delta spoT$, particularmente en su actividad de adherencia.

De igual manera en 2018, Hüttener y colaboradores también utilizaron una doble mutante $\Delta relA\Delta spoT$ en la cepa 042 de *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Vieron si había una relación entre la alarmona, que es responsable de la respuesta estricta, y la virulencia dependiente de la proteína AggR. AggR es un activador de la transcripción



de genes de factores de virulencia en EAEC, incluyendo el gen *aafA* que codifica para la proteína AafA, la cual es requerida para la formación de biopelículas. Observaron que al no haber alarmona, la expresión de la proteína AggR se veía disminuida y por lo tanto también la expresión de la proteína AafA que es regulada positivamente por AggR. Por lo tanto, hay una correlación directa entre la alarmona, la expresión de AggR y el desarrollo de biopelículas en la cepa 042 de EAEC.

Hasta el día de hoy, no hay información que indique que la alarmona ppGpp tiene efectos sobre los factores de virulencia de ETEC. Por lo tanto, una sencilla ($\Delta reIA$ o $\Delta spoT$) o doble mutante ($\Delta reIA\Delta spoT$) en *E. coli* enterotoxigénica puede disminuir o suprimir sus factores de virulencia.



III. JUSTIFICACIÓN

Al ser la principal causa de diarrea en países en vías de desarrollo, tanto en infantes como en viajeros, es de gran importancia conocer más sobre los mecanismos moleculares que regulan la virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica. Debido a que no hay informes del papel de la alarmona (p)ppGpp en la regulación de los factores de virulencia de ETEC, este estudio ayudará a explicar algunos mecanismos de regulación para la virulencia de esta bacteria. Y de esta manera establecer bases para futuras investigaciones con la finalidad de diseñar antimicrobianos y vacunas dirigidas contra blancos moleculares para la prevención y el tratamiento terapéutico de las infecciones ocasionadas por ETEC.



IV. HIPÓTESIS

Si la alarmona (p)ppGpp induce la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica, entonces al realizar una mutante $\Delta relA$, se producirá una disminución de la expresión genética de dichos factores.



V. OBJETIVO GENERAL

Evaluar el efecto de la alarmona ppGpp sobre la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica.

VI. OBJETIVOS PARTICULARES

- a) Generar una mutante $\Delta relA$ en la cepa E9034A y H10407 de *E. coli* enterotoxigénica.
- b) Obtener ADNc a partir del ARN total de las cepas silvestre y mutante $\Delta relA$ de *Escherichia coli* enterotoxigénica E9034A y H10407.
- c) Analizar la expresión de diversos factores de virulencia, tales como factores de colonización y enterotoxinas en las cepas silvestre y mutante $\Delta relA$ de ETEC E9034A y ETEC H10407.



VII. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1. Cepas bacterianas y plásmidos

Se utilizaron las cepas de referencia de *Escherichia coli* enterotoxigénica E9034A y H10407, las cuales estaban conservadas en glicerol al 20% a -70°C . Estas cepas fueron donadas por el Dr. Jorge A. Girón de la Universidad de Virginia, Estados Unidos. La cepa de ETEC E9034A es un aislado clínico obtenido originalmente de un individuo con diarrea en el Caribe (Levine *et al.*, 1984). Mientras que la cepa de ETEC H10407 proviene de un aislado de heces líquidas de un paciente con diarrea severa similar al cólera (*V. cholerae* negativo) en Dacca, Bangladesh (Evans *et al.*, 1973).

Se empleó el plásmido pKD46 el cual expresa la proteína Beta Lambda Red, necesaria para la recombinación homóloga además de las proteínas Gama y Exo necesarias para este método. Como marcador de selección contiene un gen de resistencia a la ampicilina, además posee un promotor inducible por L-arabinosa y un origen de replicación sensible a temperatura (ori Psc101) siendo estas las características útiles para el ensayo (Figura 15). Este plásmido puede ser curado de una cepa con incubación entre 37°C y 42°C ya que posee un origen de replicación el cual es termosensible (Datsenko y Wanner, 2000). Previamente, en el grupo de trabajo, se transformaron las dos cepas de ETEC con el plásmido pKD46 mediante electroporación.

También se utilizó el plásmido pKD4 para amplificar el gen de resistencia a la kanamicina (Datsenko y Wanner, 2000).

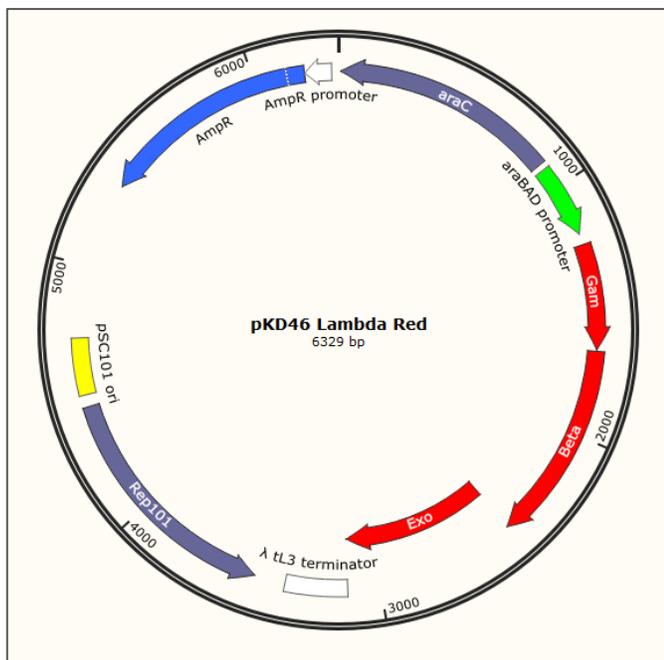


Figura 15. Mapa del plásmido de expresión Lambda Red pKD46

Se muestra el promotor inducible por L-arabinosa, los genes codificantes de las proteínas Lambda Red, el gen de resistencia a la ampicilina y el origen de replicación en color verde, rojo, azul y amarillo, respectivamente. GenBank: AY048746.1. Realizado en el programa informático SnapGene.

7.2. Equipo de laboratorio

- Autoclave Tuttnaver
- Balanza analítica AES 200
- Cámara para electroforesis BIO-RAD
- Campana de flujo laminar NUAIR clase II tipo A/B3
- Centrifuga DRAGON LAB
- Centrifuga Hettich Rotanta 460
- Congelador -20°C Thermo Scientific
- Espectrofotómetro UNICO 1100-RS
- Electroporador MicroPulser BIO-RAD
- Eppendorf Speed Vac
- Fotodocumentador QUANTUM
- Fuente de poder BIO-RAD



- Horno de microondas PANASONIC
- Incubadora agitadora shaker INNOVA40
- NanoDrop ONE Thermo Scientific
- Refrigerador 4°C LG
- Refrigerador 4°C LABLINE
- Sistema de purificación de agua PureLab ELGA
- Termociclador Mastercycler Nexus gradient eppendorf
- Termociclador de tiempo real Light cycler 480 ROCHE
- Termomezclador F 2.0 eppendorf
- Ultracongelador -70°C Thermo Scientific Elite Plus
- Vórtex Genie 2 Fisher
- Vórtex Heathrow Scientific

7.3. Metodología

7.3.1. Cultivo de cepas de *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC)

Se realizaron cultivos de las cepas de ETEC E9034A y H10407 que contienen el plásmido pKD46, a partir de viales que contenían las cepas en glicerol al 20% almacenados a -70°C. Inoculando 5 μ L de la cepa en 5 mL de caldo LB estéril en tubos cónicos estériles de 15 mL. Posteriormente los cultivos se incubaron a 30°C con agitación constante de 160 rpm durante toda una noche.

Se realizaron subcultivos a partir de los cultivos de la cepa silvestre y la cepa mutante de ETEC E9034A y H10407 a 37°C hasta alcanzar la densidad óptica de 1.0 a 1.4 que corresponde a la fase estacionaria de crecimiento de la bacteria. Para examinar la expresión de las enterotoxinas y CfaA se cultivó en caldo Luria-Bertani por 3.5 h para la cepa silvestre y 5 h para la cepa mutante. Para evaluar la expresión de Longus se utilizó el caldo de organismo similar a pleuropneumonie (PPLO) (De La Cruz *et al.*, 2017) por 4 h y 5 h para la cepas silvestre y mutante, respectivamente. Finalmente, para examinar la expresión de CS3 se cultivó en caldo de Factor de



Colonización (CFB) (Ares *et al.*, 2019) por 5 h y 6 h para la cepas silvestre y mutante, respectivamente.

7.3.2. Construcción de mutantes isogénicas

Las mutantes isogénicas $\Delta re/A$ en ETEC E9034A y H10407 se generaron a partir del método de recombinación homóloga Lambda Red utilizando productos de PCR (Datsenko y Wanner, 2000).

Los genes objetivo en ambas cepas de ETEC se reemplazaron con un gen de resistencia a kanamicina amplificado a partir del plásmido pKD4. Los iniciadores empleados para la amplificación del gen *kan^R* (resistencia a kanamicina) para la posterior delección del gen blanco en el cromosoma bacteriano y la confirmación de mutantes se muestran en la Tabla I.

7.3.2.1. Amplificación del gen de resistencia a kanamicina por PCR punto final

Se realizó una PCR punto final del gen *kan^R* utilizando como molde al plásmido pKD4 y los iniciadores *re/A-H1P1-ETEC* y *re/A-H2P2-ETEC*. Las siguientes condiciones fueron utilizadas para cada mezcla de reacción: 75 μ L de agua estéril libre de nucleasas, 6 μ L de $MgCl_2$ de 25 mM (Invitrogen), 10 μ L de Buffer X10 (Tris-HCl 200 mM pH = 8.4; KCl 500 mM) (Invitrogen), 2 μ L de dNTP's de 10 mM, 2 μ L de cada iniciador 10 μ M (IBT-UNAM), 1 μ L de *Phusion* polimerasa (5 U/ μ L) (Invitrogen) y 4 μ L de ADN a una concentración final de 50 ng/ μ L. Las etapas de la PCR consistieron en una desnaturalización inicial a 95°C por 5 min, posteriormente 30 ciclos que comenzaron por la etapa de desnaturalización a 95°C por 50 s, después la alineación a 52°C por 50 s y la elongación a 72°C por 1.5 min. Finalmente se terminó la reacción con una etapa de elongación a 72°C por 5 min y enfriamiento constante a 4°C.

Tabla I. Iniciadores utilizados en este estudio

Iniciadores	Secuencia (5' → 3')	Gen objetivo
<i>relA</i> -H1P1- ETEC	TGGTCCCTAAAGGAGAGGACGATGGTTGCGGTAAGAAGG CACATTGTAGGCTGGAGCTGCTTCG	<i>kan^R</i>
<i>relA</i> -H2P2- ETEC	TAGATACGAGCAAATTTTCGGCCTAACTCCCGTCCAACCGA CGCGCCATATGAATATCCTCCTTAG	<i>kan^R</i>
<i>relA</i> CM-L	TAGTTGCGATTTGCCGATTTTCG	<i>relA</i>
<i>relA</i> CM-R	TCCTCAAACCGCTATCATATGT	<i>relA</i>
*CS3-5-RT	AGCTTTGCCACCACCATTTC	<i>cstH</i>
*CS3-3-RT	TGGCAACTGACTCCCATTTC	<i>cstH</i>
* <i>IngA</i> -5-RT	GAGGAAAATACTTATGCTATCCGTGT	<i>IngA</i>
* <i>IngA</i> -3-RT	CCTTTTGGAAAAATTAACGGTACG	<i>IngA</i>
* <i>eltA</i> -5-RT	GGATTCATCATCATGCACCACAAGG	<i>eltA</i>
* <i>eltA</i> -3-RT	TTGTGCTCAGATTCTGGGTCTC	<i>eltA</i>
* <i>sta3</i> -5-RT	TCGCTCAGGATGCAAACCAG	<i>sta3</i>
* <i>sta3</i> -3-RT	ACTATTCATGATTTCAGGACCAC	<i>sta3</i>
° <i>cfaA</i> -5-RT	ATTGGATGGTGGGCTTG TAG	<i>cfaA</i>
° <i>cfaA</i> -3-RT	ACGTATTGATTTACTCGCTCCTG	<i>cfaA</i>
° <i>eltA</i> -5-RT	GGATCCATCATGCACCACAAG	<i>eltA</i>
° <i>eltA</i> -3-RT	TTGTGCTCAGATTCTGGGTCT	<i>eltA</i>

La secuencia de 20 nucleótidos correspondiente al plásmido molde pKD4 está subrayada. La secuencia ubicada en el extremo 5' de los iniciadores H1P1 y H2P2 es de 45 nucleótidos correspondientes a los 7 codones ubicados corriente arriba y corriente abajo del codón de inicio y del codón de paro del gen *relA*, respectivamente. CM-L, iniciador izquierdo (Left) para caracterizar mutante; CM-R, iniciador derecho (Right) para caracterizar mutante. *Iniciadores correspondientes a la cepa ETEC E9034A. °Iniciadores correspondientes a la cepa ETEC H10407. RT, iniciadores para las PCR en tiempo real.



Se llevó a cabo la purificación de los productos de PCR para limpiar el ADN de los residuos que se pudieron quedar de la reacción de PCR. Se pasó la mezcla de ADN por la columna con filtro de los tubos eppendorf, se centrifugó a 13,000 rpm durante 1 min y se desechó el líquido que se filtró. Se adicionó 750 μ L de Wash Buffer PE (QIAGEN) sobre el tubo colector para después centrifugar el tubo a 13,000 rpm durante 1 min. Se volvió a desechar el líquido que no se filtró y se centrifugó a 13,000 rpm durante 3 min para secar la columna. Se transfirió la columna a un tubo eppendorf de 1.5 mL estéril en donde se le añadió 30 μ L de agua estéril, se dejó incubando a temperatura ambiente durante 4 min y posteriormente se centrifugó a 14,000 rpm durante 1 min. Finalmente se trabajó con el líquido que contiene los productos de PCR purificados.

7.3.2.2. Elaboración de células competentes

Se realizaron subcultivos de las cepas de ETEC E9034A y H10407. Se inocularon 50 μ L de las cepas crecidas anteriormente en 20 mL de caldo estéril LB suplementado con 20 μ L de ampicilina a 100 μ g/mL y 1 mL de L-arabinosa al 20%. Esto para hacer la selección de las colonias con el plásmido pKD46 y a su vez inducir la expresión de Lambda Red. Se incubaron a 30°C por 3 h hasta alcanzar una densidad óptica (OD) a 600 nm de 0.5 – 0.7 y de esta manera obtener a las bacterias en la fase logarítmica de crecimiento, de acuerdo a las curvas de crecimiento previamente estandarizadas en el laboratorio (De La Cruz *et al.*, 2017).

Se realizaron tres lavados del cultivo de cada cepa de ETEC con 20 mL de agua bidestilada estéril (4,000 rpm a 4°C por 10 min). Se decantó toda el agua para agregarle 1,000 μ L de glicerol 10% y resuspender la pastilla. Posteriormente, se realizaron dos lavados más a 12,000 rpm a 4°C por 5 min con 700 μ L y 500 μ L de glicerol 10%. Todo lo anterior realizado en hielo y en zona de esterilidad.

7.3.2.3. Transformación de células competentes con los productos de PCR

Enseguida, se realizó la transformación de las cepas de ETEC E9034A y H10407 con los productos de PCR mediante electroporación. Para esto se hizo una mezcla de 90 μL de células competentes con 10 μL de producto de PCR. A continuación, se transfirió la mezcla a una celda para electroporación (previamente enfriada) y se prosiguió a electroporar eligiendo el programa establecido Ec2, el cual maneja un solo pulso eléctrico de 2.5 kV. Una vez realizada la electroporación, se agregó 1 mL de caldo LB directamente a la celda para resuspender la mezcla y se transfirieron a un microtubo estéril de 2 mL para su incubación por 3 h a 30°C en agitación constante (1500 rpm).

Una vez transcurrido el tiempo de incubación se transfieren 200 μL de la mezcla a una caja de agar LB suplementado con kanamicina (concentración final 50 mg/mL). Se le agregaron entre 8 y 12 perlas de vidrio para homogenizar el inóculo sobre el agar. Después los microtubos se centrifugaron a 12,000 rpm por 30 s para obtener una concentración más alta de mezcla y se repitió el mismo procedimiento. Finalmente se incubaron las cajas a 42°C durante una noche, para curar al plásmido de las células bacterianas y obtener colonias mutantes candidatas.

Posteriormente, se realizó la selección de las cepas silvestres y mutantes por medio de PCR punto final y por electroforesis en gel de agarosa. Para la PCR se utilizaron iniciadores que se unieron 50 pares de bases corriente arriba y 50 pares de bases corriente abajo del gen *relA* (tabla I). Esto para confirmar la inserción correcta del gen de resistencia a la kanamicina en el sitio adecuado. Las condiciones para la PCR fueron las mismas que se describieron anteriormente en el punto 7.3.2.1. con excepción de la temperatura de alineamiento (TM) que fue de 55°C. Se utilizaron 5 μL de estos productos de PCR con 2 μL de buffer de carga para cada pozo del gel de agarosa al 1% y en otro pozo adicional se cargaron 5 μL de marcador de peso molecular 1 kb plus GeneRuler (Thermo Scientific). Se realizó el corrimiento electroforético a 120 volts por 30 min para posteriormente teñir el gel con bromuro de etidio y obsérvalo en el fotodocumentador.

7.3.3. Extracción de ARN total

Posteriormente, se realizaron cultivos de las cepas silvestres y mutantes en medio LB a 37°C en agitación constante a 1500 rpm hasta que alcanzaron la fase estacionaria de crecimiento al alcanzar un O.D. de 1.0–1.4 (De La Cruz *et al.*, 2017). Los cultivos se centrifugaron, se eliminó el sobrenadante y las pastillas celulares se utilizaron para extracción de ARN total con el método modificado de fenol ácido caliente (Jahn *et al.*, 2008). La extracción se llevó a cabo de la siguiente manera:

7.3.3.1. Lisis celular.

La pastilla celular se resuspendió con 500 μ L de solución A (Tabla II) para posteriormente lisar las células bacterianas con vórtex en tres ciclos de 30 s a velocidad máxima seguido de 30 s de incubación en hielo. Enseguida, se le añadieron 500 μ L de fenol ácido (Sigma) previamente calentado a 65°C dando un vórtex de 30 s al final. Después, los tubos se incubaron a 65°C por 5 min para su posterior centrifugación a 14,000 rpm a 4°C por 5 min. Se recuperaron 500 μ L del sobrenadante y se colocó en un microtubo estéril. A cada tubo se le añadió 1 mL de etanol absoluto frío, para después agitarlos en el vórtex Genie 2 (Fisher) y se dejaron incubar a -70°C por 30 min para que precipitara el ARN.

Tabla II. Preparación de la solución de lisis (solución A)

Solución A	Cantidad para 1 reacción	Concentración final
Agua	910 μ L	---
SDS 10%	50 μ L	0.5%
Acetato de sodio 1M	20 μ L	20 mM
EDTA 0.5M	20 μ L	10 mM
Volumen final	1000 μ L	10 mM



7.3.3.2. Precipitación del ARN total

Los microtubos se centrifugaron a 14,000 rpm a 4°C por 10 min para después decantar el sobrenadante. Se lavaron las pastillas con 1 mL de etanol al 70% frío y se centrifugaron a 12,000 rpm a 4°C por 2 min para después decantar el sobrenadante. Se repitieron dos veces más los lavados con etanol al 70%. Se dejó secar en el equipo Eppendorf Speed Vac por 15 min. Se resuspendió la pastilla con 100 µL de agua tratada con DEPC (Invitrogen) para evitar la degradación del ARN.

7.3.3.3. Purificación del ARN total

El ARN obtenido se purificó con 1 mL de DNasa TURBO (Ambion, Inc.) y 10 µL de buffer de la DNasa TURBO 10X. Enseguida se incubaron los microtubos a 37°C por 30 min agitándolos a 300 rpm por 5 s cada 10 min de incubación. Terminada la incubación se le añadió 10 µL de reactivo de inactivación de la DNasa y se mezclaron suavemente para su posterior incubación a temperatura ambiente por 5 min. Después los microtubos se centrifugaron a 10,000 rpm por 5 min y se transfirió el sobrenadante, que contenía al ARN, a un microtubo nuevo.

El ARN se cuantificó y se evaluó su pureza mediante la relación A260/A280 nm y A260/230 nm utilizando el equipo NanoDrop ONE (ThermoScientific). Se realizaron los cálculos para obtener la concentración final necesaria de ARN (1000 ng) para la Retrotranscripción (RT).

7.3.3.4. Electroforesis del ARN total en gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes

Posteriormente, se determinó la integridad del ARN total mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes. Este se realizó añadiendo 1% v/v de hipoclorito de sodio comercial Clorox® (500 µL) a la mezcla de agarosa (0.5 g) más buffer TAE 1X (50 mL) y se incubó a temperatura ambiente durante 5 min con agitación manual. Esto se realizó antes de calentar la suspensión para fundir la agarosa. Se calentó la suspensión para fundir la agarosa y se dejó que se enfriará un poco antes se agregaron 2 µL de bromuro de etidio. Después se vertió la solución en



el molde del gel y se dejó solidificar. Se agregó buffer TAE 1x a la cámara de electroforesis y se cargaron las muestras de ARN junto con buffer de carga Gel Loading Dye Purple (6x) (New England BioLabs). Finalmente, se corrió el gel a 120 V durante 35 minutos para después observarlo en el fotodocumentador. Una vez obtenido un ARN íntegro se procedió a realizar la síntesis de ADNc.

7.3.4. Síntesis de ADN complementarios (ADNc) mediante retrotranscripción (RT)

Para poder realizar los experimentos posteriores de PCR en tiempo real (qPCR) se necesitan ADNc, los cuales se sintetizaron a partir del ARN total obtenido previamente. Se utilizaron los reactivos de un kit comercial (Thermo Scientific) para realizar la mezcla de reacción la cual contenía lo siguiente: los μg calculados de ARN anteriormente, 9 μL del Mix RT y los microlitros restantes de agua libre de ribonucleasas para dar un volumen final de 20 μL . El Mix RT contiene 4 μL de buffer de reacción, 2 μL de dNTP's (10mM), 1 μL de iniciadores al azar (50 ng/ μL), 1 μL de RNasa Ribolock (40 U/ μL) y 1 μL de la enzima Revertaid M-MuIV (50 U/ μL).

Enseguida se realizó la retrotranscripción en el termociclador Mastercycler Nexus (Eppendorf) siguiendo los siguientes ciclos de temperaturas: 25°C por 5 min, 42°C por 1 h, 70°C por 5 min y 4°C primeramente por 5 min y en el ciclo final permanentemente. Finalmente se realizó una dilución de 1:50 de los ADNc para su uso en qPCR. Los ADNc se almacenaron a -20°C hasta su posterior uso.

7.3.5. Amplificación de los genes en estudio por PCR en tiempo real (qPCR)

La amplificación se llevó a cabo en el termociclador LightCycler 480 de Roche y se utilizó un kit comercial para qPCR. Se utilizaron los siguientes reactivos para cada Mix de reacción: 5 μL del fluorocromo SYBR Green I Master para emisión de fluorescencia, 2 μL de agua grado PCR contenida en el kit y 0.5 μL de mezcla de los dos iniciadores (20 μM) para cada gen. A este Mix se le añadió 2.5 μL de los ADNc sintetizados previamente para obtener un volumen final de 10 μL en cada mezcla de reacción. El



SYBR Green I Master de Roche contiene Fast Start Taq ADN polimerasa (5 U/ μ L), dNTP's (10 mM), MgCl₂ (25 mM) y SYBR Green I (5 μ M).

Con la mezcla de reacción se llenó cada pozo de la placa para realizarlo por triplicado y se selló con una lámina plástica adherente. Enseguida se colocó la placa en el equipo LightCycler® 480 (Roche) seleccionando el programa que se describe a continuación: un ciclo de desnaturalización a 95°C durante 5 min, 45 ciclos en las siguientes condiciones: 95°C durante 10 s, temperatura de alineamiento de 59°C durante 10 s y 72°C durante 10 s (en este punto se realizó la medición de la fluorescencia), posteriormente un ciclo en las siguientes condiciones: 95°C durante 5 s, 65°C durante 1 min y 97°C durante 5 s (durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para construir la curva de desnaturalización), y un ciclo final de enfriamiento a 40°C por 10 s.

7.3.5.1. Elaboración de curvas estándar y curvas de expresión de los genes objetivo

Se elaboraron las curvas estándar para los posteriores experimentos de PCR en tiempo real. A partir de la concentración conocida de ADN genómico de ambas cepas silvestres de ETEC se realizaron los cálculos para obtener 10⁸ copias de ADN genómico con las siguientes fórmulas:

$$\text{Pares de bases del genoma} \times 650 \text{ Da} = R1$$

$$(R1 \times 10^8) \div 6.022 \times 10^{23} = R2$$

$$R2 \div \text{Concentracion de ADN conocido} = R3$$

6.022x10²³: Número de Avogadro

650 Da: Peso promedio de un solo par de bases

A partir de dicho stock se realizaron diluciones seriadas para obtener 10⁷, 10⁶, 10⁵ y 10⁴ copias de ADN genómico. Las cuatro diluciones se utilizaron para las posteriores reacciones de qPCR.



7.3.5.2. Cuantificación absoluta de los genes objetivo por medio de qPCR

Utilizando el software del equipo, a partir de las curvas estándar realizadas se interpolaron en ellas los valores de Ct (Cycle threshold) obtenidos de las curvas de amplificación de las cepas mutante y silvestre de ETEC E9034A y H10407 y de esta manera determinar el número de copias de ADN por microgramo de ARN total. Posteriormente se multiplicaron estas concentraciones por cincuenta, ya que los ADNc utilizados estaban diluidos 1:50, para obtener así la concentración real de las muestras problema. Los iniciadores empleados se encuentran en la tabla I con el nombre del gen más “RT”.

7.3.6. Análisis estadístico de los resultados

Con la finalidad de detectar diferencias significativas en la expresión genética de las diferentes cepas de ETEC, se realizó un análisis de prueba *t* de Student bilateral no pareada empleando para ello el software estadístico GraphPad PRISM 5.0 (San Diego, CA, United States). Los valores de $p \leq 0.05$ se consideraron como estadísticamente significativos.

VIII. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

8.1. Construcción de mutantes isogénicas

Se realizó la amplificación por PCR punto final del gen *kan^R* utilizando como molde el plásmido pKD4 e iniciadores que contienen en su extremo 5' una extensión homóloga al gen *relA* (H1 y H2) y en su extremo 3' las secuencias complementarias a las secuencias que flanquean al gen *kan^R* (P1 y P2) (tabla1). Por lo que los amplicones resultantes del gen de resistencia al antibiótico contienen secuencias flanqueantes homólogas a las secuencias flanqueantes del gen *relA*. En la Figura 16 se pueden observar los amplicones de 1542 pares de bases (pb) obtenidos por medio de esta técnica y confirma la amplificación del gen de resistencia a la kanamicina (Datsenko y Wanner, 2000).

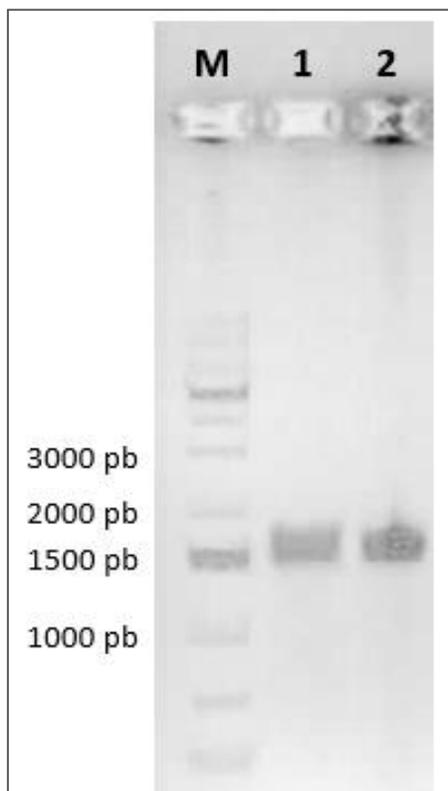


Figura 16. Amplificación del gen *kan^R* a partir del plásmido pKD4

Carril M, marcador de peso molecular 1kb plus GeneRuler Thermo Scientific. Duplicado de los productos de PCR de *kan^R* a partir del plásmido pKD4 (carril 1 y carril 2).

Los productos de PCR se utilizaron para la transformación de las células competentes de ambas cepas de ETEC y de esta manera se llevó acabo el intercambio del gen *kan^R* por el gen *relA* en el cromosoma de la bacteria mediante recombinación homóloga. Se observan los amplicones de 1500 pb correspondientes al tamaño del gen *relA* más 50 pb río arriba y 70 pb río abajo al utilizar los iniciadores para caracterizar las mutantes (Figura 17).

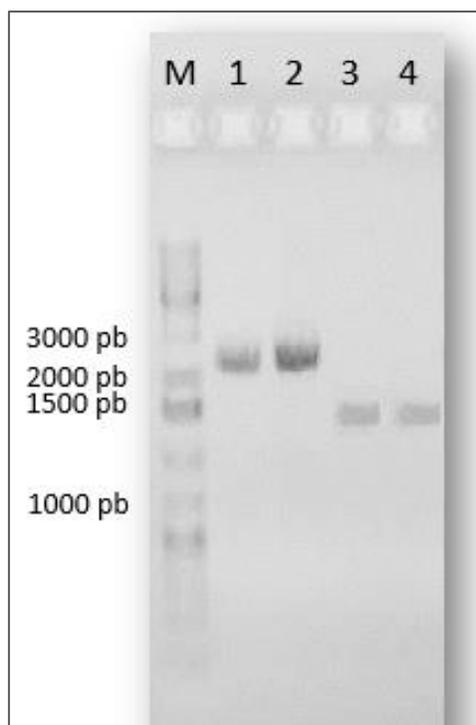


Figura 17. Generación mutante $\Delta relA$

Carril M, marcador de peso molecular 1kb plus Thermo Scientific; carril 1, cepa WT ETEC E9034A; carril 2, cepa WT ETEC H10407; carril 3, cepa ETEC E9034A $\Delta relA:kan^R$; carril 4, cepa ETEC H10407 $\Delta relA:kan^R$.

La exitosa recombinación por medio de la metodología Lambda-red puede depender de la longitud adecuada de las extensiones homólogas de los iniciadores debido a que estas pueden variar entre las especies bacterianas. Por ejemplo, en *Yersinia pseudotuberculosis* se requieren productos de PCR con extensiones más largas (aproximadamente 500 nucleótidos [nt]) para la alteración de genes mediante recombinación mediada por Lambda-red (Derbise *et al.*, 2003). En *V. cholerae* se

sugiere que, para aumentar la eficiencia de la recombinación, se deben generar productos de PCR con extensiones homólogas de 1000 nt (Yamamoto *et al.*, 2009).

En el caso de *E. coli* la recombinación mediada por Lambda-red ocurre eficientemente utilizando productos de PCR con una extensión homóloga corta (aproximadamente 50 nt) (Chagneau *et al.*, 2021; Datsenko y Wanner, 2000). Por otro lado, la homología de 50 a 100 nt entre el producto de PCR y el gen a mutar es suficiente para estimular la recombinación dependiente de Lambda-red (Yamamoto *et al.*, 2009). Esto se confirma con los resultados obtenidos en este trabajo, debido a que se obtuvieron productos de PCR utilizando iniciadores con una homología de 45 nt a las secuencias flanqueantes del gen *relA*. De esta manera se llevó a cabo la recombinación dependiente de Lambda red obteniendo amplicones de 1620 pb correspondientes al gen de resistencia a la kanamicina que sustituyó al gen *relA* en la cepa mutante $\Delta relA$ de ETEC H10407 y de ETEC E9034A (Datsenko y Wanner, 2000). Así mismo se obtuvieron amplicones de 2235 pb correspondientes al gen *relA* más 50 pb ría arriba y 70 pb río abajo en la cepa silvestre ETEC H10407 y ETEC E9034A (Riley *et al.*, 2006) (Figura 17).

8.2. Extracción e integridad del ARN

Una vez obtenido y purificado el ARN total se determinó su integridad mediante electroforesis en un gel de agarosa al 1% en condiciones desnaturizantes al agregarle 1% de hipoclorito de sodio comercial Clorox® a la mezcla de agarosa más buffer TAE 1X antes de fundir la agarosa. La adición de hipoclorito de sodio tiene la finalidad de desnaturizar la estructura secundaria del ARN y de destruir las ARNasas potencialmente contaminantes (Aranda *et al.*, 2012). La degradación del ARN por la acción de ARNasas es un problema que se tiene al manipular las muestras debido a que las ARNasas están presentes en eucariotes (Jin *et al.*, 2009), procariotes (Kazantsev y Pace, 2006) y virus (Taddeo *et al.*, 2007). Además, las ARNasas son secretadas por la piel y se encuentran en varios fluidos producidos por el cuerpo humano, incluyendo lágrimas, saliva, moco y sudor haciendo más alto el riesgo de contaminar las muestras y, por lo tanto, su degradación (Harder y Schroder, 2002).

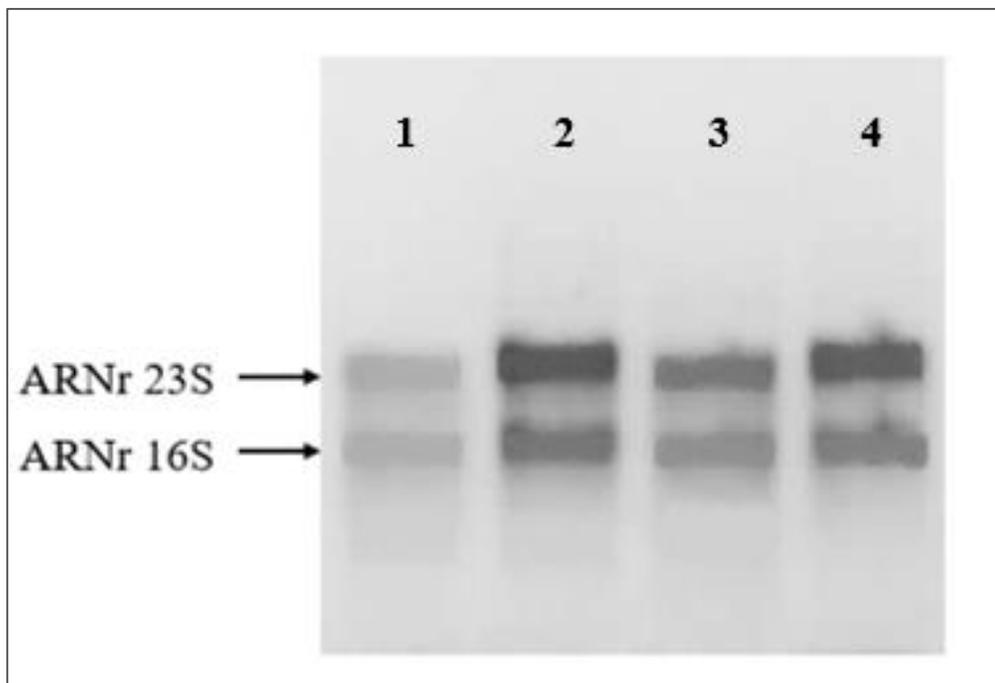


Figura 18. Integridad del ARN

Gel desnaturalizante al 1% de agarosa y 1% de Clorox®. Carril 1, ETEC E9034A WT; carril 2, ETEC E9034A $\Delta reIA$; carril 3, ETEC H10407 WT; carril 4, ETEC H10407 $\Delta reIA$.

La Figura 18 corresponde a una fotografía del resultado de la electroforesis en gel de agarosa en condiciones desnaturalizantes, en el cual se observaron dos bandas nítidas para cada muestra analizada. Estas bandas son correspondientes al ARNr 23S (2906 nt) y al ARNr 16S (1542 nt) (Pronk y Sanderson, 2001). Debido a que la velocidad de migración está limitada por la fuerza de fricción impuesta por la matriz del gel, esta puede verse afectada por la carga y/o el tamaño de las que pasan a través del gel. Por lo tanto, es el tamaño de la molécula lo que determina la velocidad que recorre a través del gel, lo que permite una separación eficaz de longitud de los fragmentos mediante electroforesis (Voytas, 2001). El tener mayor longitud hace que el ARNr 23S tenga un corrimiento electroforético más lento que el ARNr 16S y es por ello que la banda superior corresponde a este ARNr (Figura 18) . Al ser de tamaño menor, los ARN de transferencia y los ARN mensajeros no se alcanzan a observar en el gel desnaturalizante. Estos resultados nos indican que se obtuvo ARN con una integridad óptima. Lo que permitió concluir que los ARN mensajeros también se encontraban íntegros y de esta manera continuar con los experimentos.

8.3. Construcción de curvas estándar

Se obtuvieron las curvas de amplificación de los genes de interés a partir de las diluciones seriadas que se hicieron de ADN genómico (Figura 19). El software del equipo graficó las curvas de amplificación de acuerdo a la intensidad de la fluorescencia (eje Y) y el número de ciclo en el cual se detectó la emisión de la misma (eje X). A este valor se conoce como Ct que en otras palabras se define como el número de ciclos necesarios para que la señal fluorescente cruce el umbral (Scheffe *et al.*, 2006). En la Figura 19 se observa que a una mayor concentración de ADN genómico se obtiene un valor de Ct menor. Un ejemplo, es la curva correspondiente a 10^7 copias de ADN genómico para el gen *eltA* de ETEC H10407 donde su Ct es de aproximadamente 13 mientras que la concentración de 10^6 copias tiene un Ct aproximado de 21 y así sucesivamente.

El software del equipo realizó las curvas estándar a partir de las curvas de amplificación utilizando la fórmula de la recta y graficando en el eje de las ordenadas el número de ciclo en el cual se detectó la fluorescencia o se cruzó el umbral (Ct) y en el eje de las abscisas el número de copias de ADN por microgramo de ARN total (Figura 20).

La curva estándar se utiliza para evaluar el rendimiento del ensayo de qPCR y para ello, mediante el software del equipo, se determinó la eficiencia, el error y el coeficiente de correlación para cada una de las curvas estándar (Tabla III). Se define a la eficiencia calculada de la PCR en tiempo real como la fracción de moléculas diana que se copian en un ciclo de PCR (Lalam, 2006) donde un valor de eficiencia corresponde al número de moléculas de ADN que se copian a partir de una cadena. Una eficiencia aceptable ronda entre 1.8 y 2.1 (Pfaffl, 2004), lo cual concuerda con las eficiencias obtenidas en este trabajo. Por medio de regresión lineal se calculó el coeficiente de correlación, el cual es un término estadístico que indica la probabilidad de predecir un valor en relación a otro. Valores iguales o mayores de 0.90 se consideran óptimos para una curva estándar (Applied biosystems, 2016). Además, se calculó el error en cada curva estándar, siendo un valor de p menor o igual a 0.05 significativo (Pfaffl, 2004). En este caso, los parámetros obtenidos son aceptables, lo cual nos permitió utilizar las curvas

estándar para interpolar en ellas los valores de Ct de las muestras problema y predecir su concentración de copias de ADN por microgramo de ARN total.

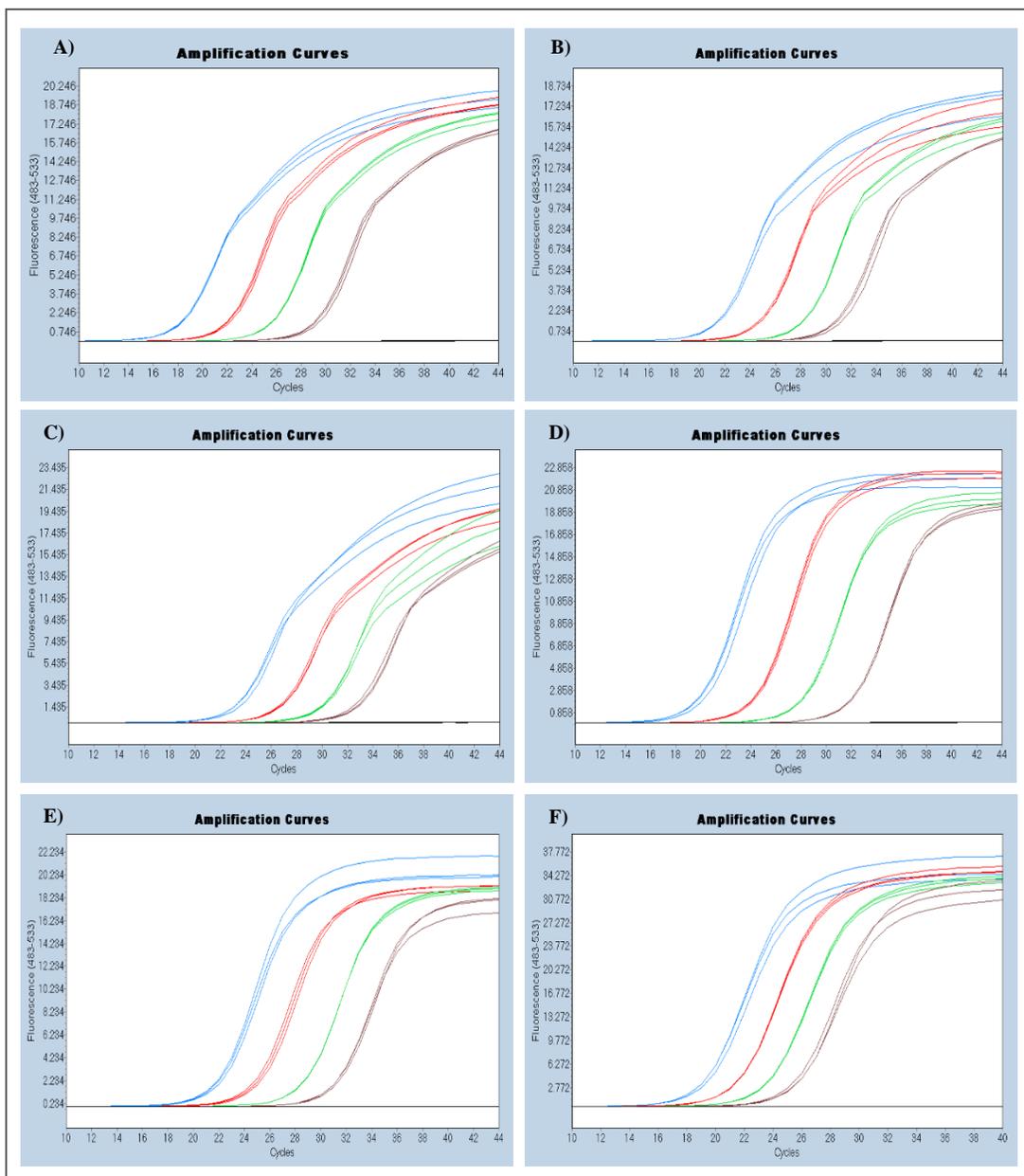


Figura 19. Curvas de amplificación para los genes en estudio de ETEC H10407 y E9034A

A) ETEC H10407 *eltA*; B) ETEC E9034A *eltA*; C) ETEC E9034A *sta3*; D) ETEC H10407 *cfaA*; E) ETEC E9034A *cstH*; F) ETEC E9034A *IngA*. En color azul se observan las curvas correspondientes a 10⁷ copias, de color rojo las curvas correspondientes a 10⁶ copias, de color verde las curvas correspondientes a 10⁵ copias y en color morado las curvas correspondientes a 10⁴ copias de ADN genómico.

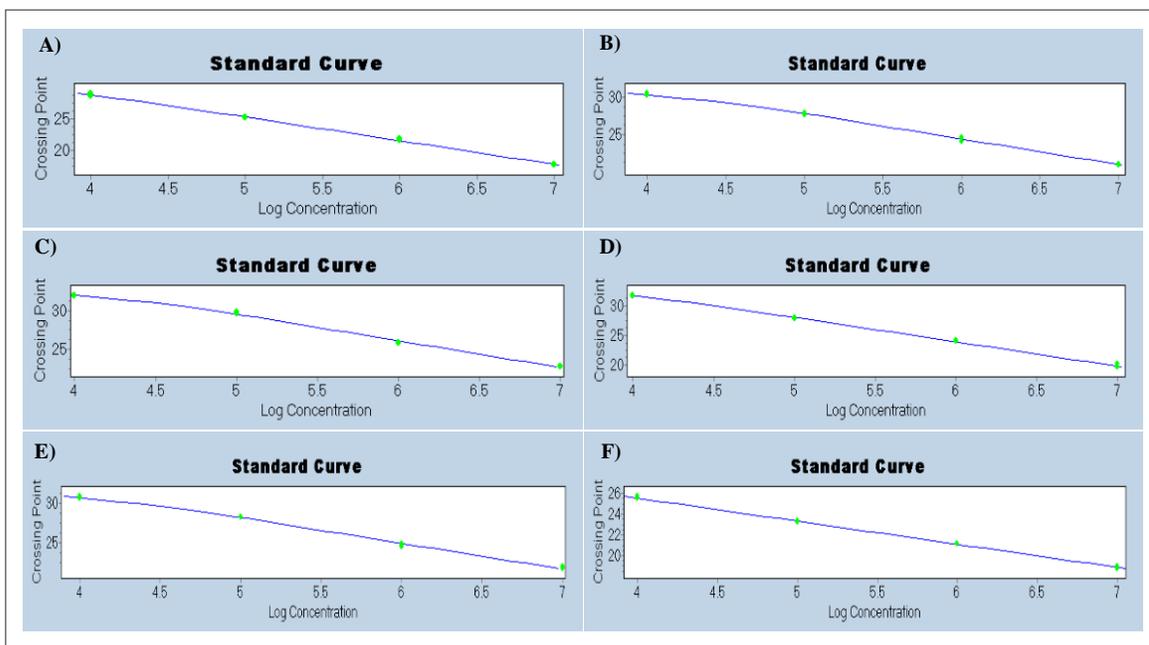


Figura 20. Curvas estándar para los genes en estudio de ETEC H10407 y E9034A

A) ETEC H10407 *eltA*; B) ETEC E9034A *eltA*; C) ETEC E9034A *sta3*; D) ETEC H10407 *cfaA*; E) ETEC E9034A *cstH*; F) ETEC E9034A *IngA*.

Tabla III. Valores de curvas estándar de ETEC H10407 y E9034A

Gen	Cepa	Coefficiente de correlación	Eficiencia	Error
<i>eltA</i>	H10407	0.93	1.85	0.01
<i>cfaA</i>	H10407	0.90	1.8	0.01
<i>eltA</i>	E9034A	0.99	1.98	0.05
<i>sta3</i>	E9034A	0.97	1.94	0.01
<i>cstH</i>	E9034A	0.99	1.98	0.01
<i>IngA</i>	E9034A	0.90	1.81	0.02

Con el uso de SYBR Green I, se puede confirmar la amplificación de la secuencia objetivo correcta (Wilhelm y Pingoud, 2003). Es por eso que después de la amplificación de nuestros genes en estudio se registraron las curvas de desnaturalización (Figura 21). las cuales presentan un solo pico o producto de desnaturalización. Esto indicó que en cada reacción no hubo una amplificación inespecífica y que solo se generó el amplicón correspondiente para el cual los iniciadores fueron diseñados. Las curvas de amplificación, la curva estándar y las curvas de desnaturalización para el gen *sta3* de la cepa de ETEC H10407 no se realizaron debido a que hubo un problema en la síntesis de los iniciadores.

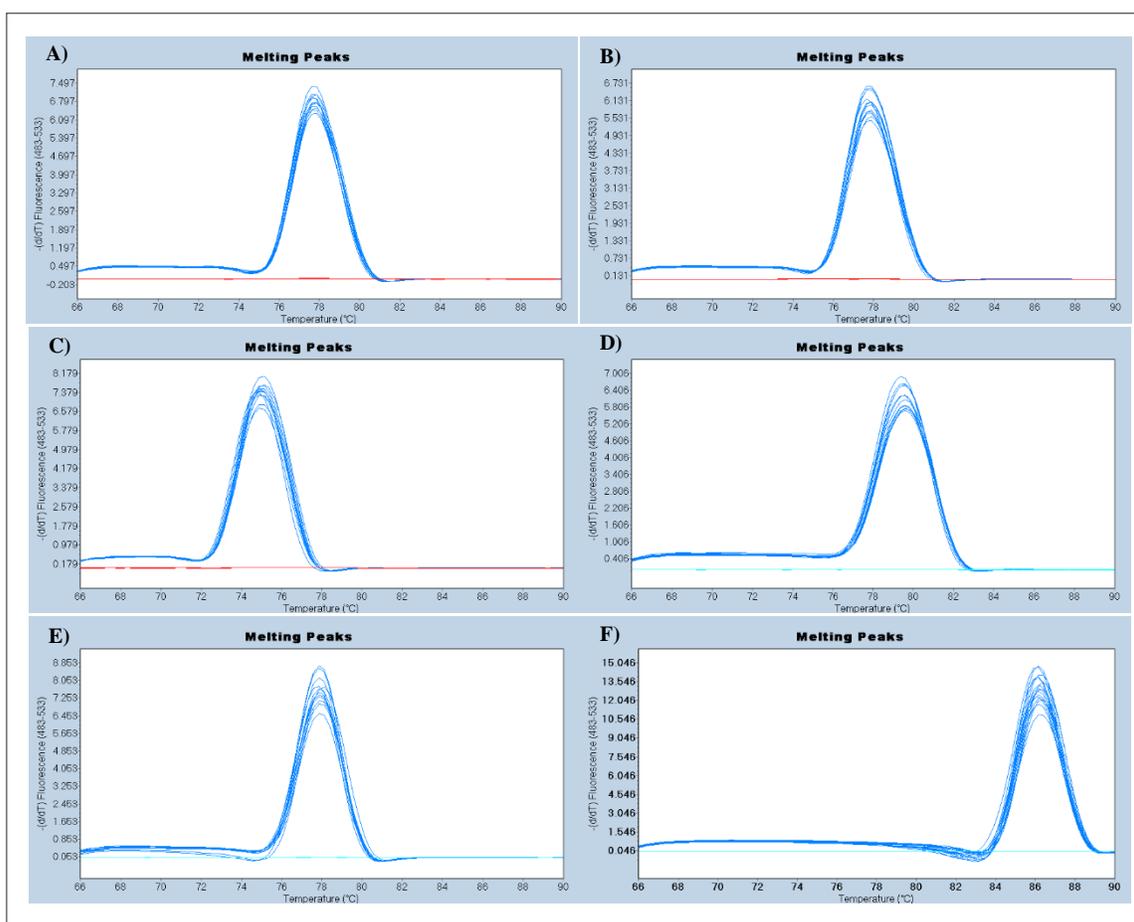


Figura 21. Curvas de desnaturalización de los productos de amplificación de los genes en estudio de ETEC H10407 y E9034A

A) ETEC H10407 *eltA*; B) ETEC E9034A *eltA*; C) ETEC E9034A *sta3*; D) ETEC H10407 *cfaA*; E) ETEC E9034A *cstH*; F) ETEC E9034A *IngA*.

8.4. Expresión genética de las toxinas termolábil y termoestable

La expresión de los genes *eltA* y *sta3* se determinó en las cepas mutante y silvestre de ETEC E9034A y H10407 utilizando las curvas estándar realizadas anteriormente para interpolar en ellas los valores de Ct obtenidos de los ADNc. En la gráfica A (Figura 22) se presentan los resultados de la expresión del gen *eltA* en la cepa de ETEC H10407. La expresión del gen *eltA* disminuyó cinco logaritmos en la cepa mutante *relA* con respecto a la cepa silvestre, lo cual fue estadísticamente significativo. Estos resultados indican que RelA regula positivamente la expresión genética de la toxina termolabil en la cepa H10407. En la gráfica B (Figura 22) se presentan los resultados de la expresión de los genes *eltA* y *sta3* en la cepa de ETEC E9034A. El gen *eltA* se expresó menos que el gen *sta3* en la cepa silvestre. La expresión del gen *eltA* disminuyó cinco logaritmos en la cepa mutante *relA* con respecto a la cepa silvestre, lo cual fue estadísticamente significativo. La expresión del gen *sta3* disminuyó siete logaritmos en la cepa mutante *relA* con respecto a la cepa silvestre, lo cual fue estadísticamente significativo. Estos resultados indican que RelA regula positivamente la expresión genética de ambas toxinas en la cepa E9034A ejerciendo un efecto regulador mayor sobre el gen *sta3*.

Estos resultados concuerdan con lo reportado por Silva y Benítez en el 2006 en la cepa C7258 de *V. cholerae*. Al igual que en este estudio, realizaron una cepa mutante en el gen *relA* con la diferencia que interrumpieron solo el dominio catalítico de RelA; sin embargo, al igual que con una mutante en todo el gen también se afecta la capacidad de sintetizar la alarmona. En tal estudio, observaron que en la mutante $\Delta relA$ disminuyó la expresión del gen *ctxA*, el cual codifica para la subunidad A de la toxina del cólera, con respecto a la cepa silvestre (Silva y Benitez, 2006). La cual es homóloga a la subunidad A de la toxina termolábil de ETEC (Dubreuil *et al.*, 2016). En el 2014 Oh y Cho reportaron que en una cepa mutante en los genes *relA* y *spoT* de la cepa O157:H7 EDL933 de *E. coli* enterohemorrágica disminuyó la toxicidad de dicha cepa sobre células Vero. Esto lo relacionaron con una disminución en la producción de la toxina Shiga de dicha cepa (Oh y Cho, 2013). Lo cual se puede relacionar con los resultados de este estudio, ya que la toxina Shiga de *E. coli* enterohemorrágica como

las toxinas termolábil y termoestable de ETEC son enterotoxinas. Finalmente, Saito y colaboradores en el 2018 reportaron que en la cepa mutante en el gen *relA* de la cepa tipo A de *Clostridium perfringens* disminuyó la expresión del gen *cpe* y por lo tanto RelA era requerido para la producción de la enterotoxina CPE lo cual también concuerda con los resultados de este estudio (Saito *et al.*, 2018).

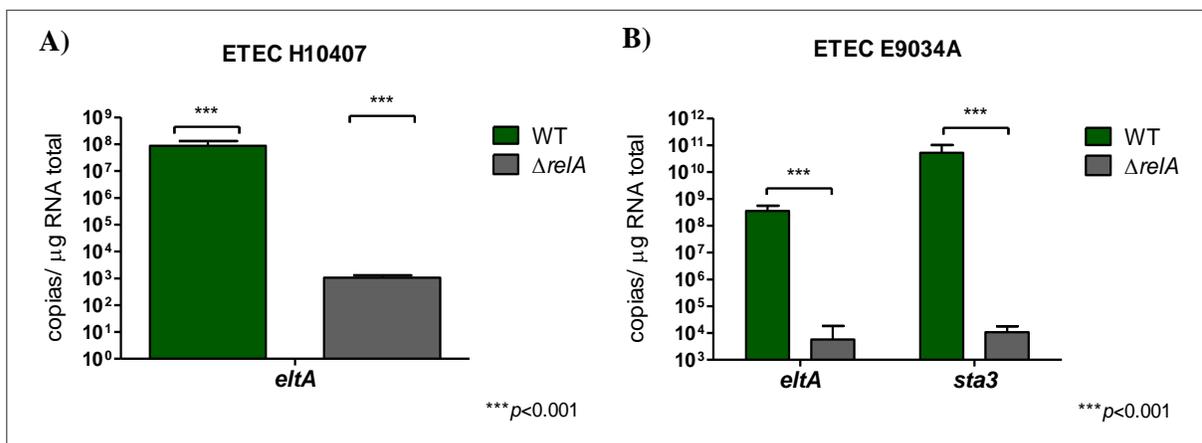


Figura 22. Expresión genética de las toxinas termolábil y termoestable en cepas silvestre y mutante de ETEC H10407 y E9034A

A) Cepa ETEC H10407; B) Cepa ETEC E9034A. Se observan en color verde y gris la cepa silvestre (WT) y mutante $\Delta relA$, respectivamente. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

8.5. Expresión genética de CS3, Longus y CfaA

La expresión de los genes *cstH*, *IngA* y *cfaA* se determinó en las cepas mutante y silvestre de ETEC E9034A y H10407 utilizando las curvas estándar realizadas para interpolar en ellas los valores de Ct obtenidos de los ADNc. En la gráfica A (Figura 23) se presentan los resultados de la cepa E9034A, donde se evaluó la expresión de los genes *cstH* y *IngA*, que codifican para la subunidad principal de pilina de CS3 y Longus, respectivamente. El gen *cstH* se expresó más que *IngA* en la cepa silvestre. La expresión de gen *cstH* disminuyó cinco logaritmos en la cepa mutante $\Delta relA$ con respecto a la cepa silvestre, lo cual fue estadísticamente significativo. No hubo expresión del gen *IngA* en la cepa mutante $\Delta relA$, lo cual fue estadísticamente

significativo al compararlo con la cepa silvestre. Estos resultados indican que RelA regula positivamente la expresión genética de CS3 y Longus en la cepa E9034A ejerciendo un efecto regulador mayor sobre el gen *IngA*. En la gráfica B (figura 23) se presentan los resultados de la expresión del gen *CfaA*, el cual codifica para la proteína chaperona de CFA/I. La expresión disminuyó cuatro logaritmos en la cepa mutante $\Delta relA$ con respecto a la cepa silvestre, lo cual fue estadísticamente significativo. Estos resultados indican que RelA regula positivamente la expresión genética de *CfaA* en la cepa de ETEC H10407.

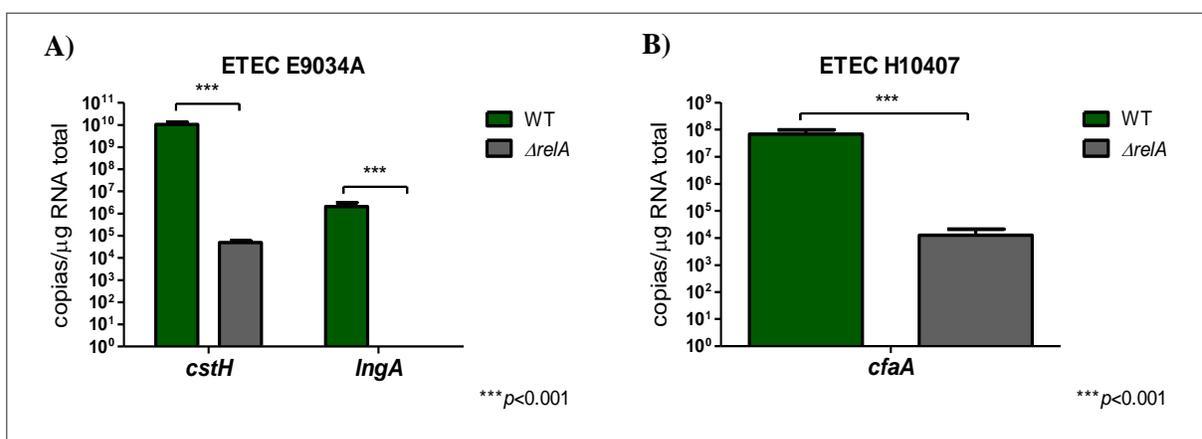


Figura 22. Expresión genética de CS3, Longus y CfaA en cepas silvestre y mutante de ETEC E9034A y H10407

A) Cepa ETEC H10407; B) Cepa ETEC E9034A. Se observan en color verde y gris la cepa silvestre (WT) y mutante $\Delta relA$, respectivamente. Los valores de $p < 0.05$ se consideran estadísticamente significativos.

La adhesión microbiana a las células del huésped tiene un papel fundamental en infecciones bacterianas ya que sin ella no podrían colonizar las células de los tejidos. La adhesión esta mediada por fimbrias, polímeros proteicos que sobresalen de la superficie bacteriana y reconocen los receptores del huésped (Bao *et al.*, 2014). En 2006 Aberg y colaboradores examinaron el papel de la alarmona (p)ppGpp en la expresión de determinantes de virulencia de cepas de *E. coli* uropatógena. Presentaron evidencia de que en una doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$ la expresión del gen *fimA*, que codifica para la subunidad principal de la fimbria tipo 1, se veía disminuida.



Lo que sugiere que (p)ppGpp regula la expresión de la fimbria tipo 1 en los aislados de *E. coli* uropatógena siendo esta fimbria un factor clave de virulencia de *E. coli* uropatógena, la cual favorece la adhesión inicial y la invasión de las células de la vejiga al unirse a receptores que contienen manosa (Aberg *et al.*, 2006). Nakanishi y colaboradores encontraron que la capacidad de adherencia de *E. coli* enterohemorrágica (EHEC) a células Caco-2 se veía disminuida en una mutante en el gen *relA* además de que la expresión genética del Locus del Borrado del Enterocito (LEE) disminuía en una doble mutante $\Delta relA \Delta spoT$. Además de codificar para el sistema de secreción tipo III y para proteínas necesarias para la formación de lesiones de adherencia y borrado, el locus LEE codifica para la proteína de membrana externa intimina, que es necesaria para la unión íntima de EHEC a las células epiteliales (Kaper *et al.*, 2004). Estos cambios mejoraron mediante un cambio descendente en los nutrientes o por la entrada en la fase de crecimiento estacionario, los cuales aumentan la concentración de ppGpp en las cepas silvestres. De acuerdo a esto, se sugirió que la expresión de los genes del LEE (específicamente del gen *eae*, el cual codifica para la intimina) y, por lo tanto, su capacidad de adherencia está controlada por el nivel de alarmona (Nakanishi *et al.*, 2006). Estos resultados concuerdan con los de este trabajo ya que sugieren que la ppGpp tiene un rol importante en la expresión de la intimina, la cual está involucrada en la adherencia de la bacteria, así como en la expresión de genes que codifican para fimbrias de este trabajo.

La biosíntesis de fimbrias en bacterias Gram negativas se da principalmente por medio de la ruta de chaperona-usher, el cual está mediado por la intervención de proteínas chaperonas las cuales ayudan al plegamiento correcto de las subunidades que conforman la fimbria, mantienen su estabilidad y las transporta a la membrana externa bacteriana para su correcto ensamblaje (He *et al.*, 2020). Al evaluar el efecto de la alarmona sobre la proteína chaperona CfaA, se vio disminuida la expresión del gen *cfaA*. Esta disminución en la cepa mutante sugiere que ppGpp está involucrado en el proceso de síntesis de la fimbria CFA/I ya que al no tener suficiente proteína chaperona el bioensamblaje de esta fimbria se ve reducido. Lo cual tiene similitud con el trabajo de Bao y colaboradores en 2016 donde hicieron mutaciones en residuos de CfaA que interactúan con CfaB (subunidad principal de CFA/I). Una mutación diseñada



para reducir la interacción chaperona-subunidad eliminó casi por completo la unión CfaA-CfaB, mientras que una mutación que impedía la unión de CfaA a CfaB tuvo nula producción de fimbrias (Bao *et al.*, 2016). Por lo tanto, al disminuir la síntesis de la fimbria CFA/I se ve disminuida la adherencia de la cepa de ETEC H10407.



IX. CONCLUSIONES

La proteína RelA, al sintetizar la alarmona, regula positivamente la expresión de las toxinas termoestable y termolábil, de las fimbrias CS3, Longus y de la proteína chaperona CfaA en las cepas de ETEC estudiadas. Además, la expresión de ambas toxinas, de las fimbrias y de la proteína chaperona disminuyó en la mutante $\Delta relA$ con respecto a la silvestre, lo cual sugiere que dicha cepa ($\Delta relA$) es menos virulenta. Y al comparar el nivel de expresión de las toxinas y de las fimbrias en ambas cepas de ETEC, presentaron mayor disminución en la cepa mutante en *relA* de ETEC E9034A, lo que indica que la alarmona tiene un efecto regulador mayor sobre los factores de virulencia de esta cepa.



X. RECOMENDACIONES

- Evaluar la expresión del gen *sta3* en la cepa de ETEC H10407 y realizar pruebas fenotípicas relacionados con los resultados de expresión de los genes analizados, tales como cuantificación de toxinas, formación de biopelícula y ensayos de adherencia sobre células epiteliales.
- Generar cepas mutantes en ambos genes ($\Delta reIA\Delta spoT$) para determinar la expresión genética de los factores de virulencia. De esta manera se garantizaría la nula producción de alarmona.
- Continuar con el estudio de ppGpp con la finalidad de encontrar un posible blanco para el desarrollo de vacunas y antimicrobianos dirigidos al tratamiento y la prevención contra la infección provocada por ETEC. Además, en otras bacterias, especialmente en aquellas que poseen gran resistencia antimicrobiana y son responsables de graves enfermedades.

XI. REFERENCIAS

- Aberg, A., Shingler, V., & Balsalobre, C. (2006). (p)ppGpp regulates type 1 fimbriation of *Escherichia coli* by modulating the expression of the site-specific recombinase FimB. *Mol Microbiol*, 60(6), 1520-1533. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05191.x>
- Alonso, M. M., Alemán, R., López Lirola, A., Castellano, A., Martín Ponce, E., & Gómez Sirvent, J. L. (2006). Diarrea del viajero. *Anales del Sistema Sanitario de Navarra*, 29, 127-138. http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1137-66272006000200011&nrm=iso
- Applied biosystems. (2016). *Real-time PCR: understanding Ct*. Thermo Fisher Scientific. <https://www.thermofisher.com/content/dam/LifeTech/Documents/PDFs/PG1503-PJ9169-CO019879-Re-brand-Real-Time-PCR-Understanding-Ct-Value-Americas-FHR.pdf>
- Aranda, P. S., LaJoie, D. M., & Jorcyk, C. L. (2012). Bleach gel: a simple agarose gel for analyzing RNA quality. *Electrophoresis*, 33(2), 366-369. <https://doi.org/10.1002/elps.201100335>
- Ares, M. A., Abundes-Gallegos, J., Rodríguez-Valverde, D., Panunzi, L. G., Jiménez-Galicia, C., Jarillo-Quijada, M. D., Cedillo, M. L., Alcántar-Curiel, M. D., Torres, J., Girón, J. A., & De la Cruz, M. A. (2019). The Coli Surface Antigen CS3 of Enterotoxigenic *Escherichia coli* Is Differentially Regulated by H-NS, CRP, and CpxRA Global Regulators. *Frontiers in microbiology*, 10, 1685. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01685>
- Atkinson, G. C., Tenson, T., & Hauryliuk, V. (2011). The RelA/SpoT homolog (RSH) superfamily: distribution and functional evolution of ppGpp synthetases and hydrolases across the tree of life. *PLoS One*, 6(8), e23479. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0023479>
- Bao, R., Fordyce, A., Chen, Y.-X., McVeigh, A., Savarino, S. J., & Xia, D. (2014). Structure of CfaA suggests a new family of chaperones essential for assembly of class 5 fimbriae. *PLoS pathogens*, 10(8), e1004316-e1004316. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004316>
- Bao, R., Liu, Y., Savarino, S. J., & Xia, D. (2016). Off-pathway assembly of fimbria subunits is prevented by chaperone CfaA of CFA/I fimbriae from enterotoxigenic



- E. coli. Molecular microbiology*, 102(6), 975-991.
<https://doi.org/10.1111/mmi.13530>
- Battesti, A., & Bouveret, E. (2009). Bacteria possessing two RelA/SpoT-like proteins have evolved a specific stringent response involving the acyl carrier protein-SpoT interaction. *J Bacteriol*, 191(2), 616-624. <https://doi.org/10.1128/jb.01195-08>
- Bölin, I., Wiklund, G., Qadri, F., Torres, O., Bourgeois, A. L., Savarino, S., & Svennerholm, A. M. (2006). Enterotoxigenic *Escherichia coli* with STh and STp genotypes is associated with diarrhea both in children in areas of endemicity and in travelers. *J Clin Microbiol*, 44(11), 3872-3877. <https://doi.org/10.1128/jcm.00790-06>
- Chagneau, C. V., Massip, C., Bossuet-Greif, N., Fremez, C., Motta, J.-P., Shima, A., Besson, C., Le Faouder, P., Cénac, N., Roth, M.-P., Coppin, H., Fontanié, M., Martin, P., Nougayrède, J.-P., & Oswald, E. (2021). Uropathogenic *E. coli* induces DNA damage in the bladder. *PLoS pathogens*, 17(2), e1009310-e1009310. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009310>
- Chung, W. Y., Carter, R., Hardy, T., Sack, M., Hirst, T. R., & James, R. F. (2006, Dec 22). Inhibition of *Escherichia coli* heat-labile enterotoxin B subunit pentamer (EtxB5) assembly in vitro using monoclonal antibodies. *J Biol Chem*, 281(51), 39465-39470. <https://doi.org/10.1074/jbc.M606038200>
- Clements, A., Young, J. C., Constantinou, N., & Frankel, G. (2012). Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Microbes*, 3(2), 71-87. <https://doi.org/10.4161/gmic.19182>
- Croxen, M. A., Law, R. J., Scholz, R., Keeney, K. M., Wlodarska, M., & Finlay, B. B. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 26(4), 822-880. <https://doi.org/10.1128/CMR.00022-13>
- Dalebroux, Z. D., Svensson, S. L., Gaynor, E. C., & Swanson, M. S. (2010). ppGpp conjures bacterial virulence. *Microbiol Mol Biol Rev*, 74(2), 171-199. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00046-09>
- Datsenko, K. A., & Wanner, B. L. (2000). One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97(12), 6640-6645. <https://doi.org/10.1073/pnas.120163297>



- De la Cruz, M. A., Ruiz-Tagle, A., Ares, M. A., Pacheco, S., Yáñez, J. A., Cedillo, L., Torres, J., & Girón, J. A. (2017). The expression of Longus type 4 pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli* is regulated by LngR and LngS and by H-NS, CpxR and CRP global regulators. *Environ Microbiol*, 19(5), 1761-1775. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.13644>
- Derbise, A., Lesic, B., Dacheux, D., Ghigo, J. M., & Carniel, E. (2003). A rapid and simple method for inactivating chromosomal genes in *Yersinia*. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 38(2), 113-116. [https://doi.org/10.1016/s0928-8244\(03\)00181-0](https://doi.org/10.1016/s0928-8244(03)00181-0)
- Dubreuil, J. D. (2012). The whole Shebang: the gastrointestinal tract, *Escherichia coli* enterotoxins and secretion. *Curr Issues Mol Biol*, 14(2), 71-82.
- Dubreuil, J. D., Isaacson, R. E., & Schifferli, D. M. (2016). Animal Enterotoxigenic *Escherichia coli*. *EcoSal Plus*, 7(1), 10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.ESP-0006-2016>
- Durfee, T., Hansen, A. M., Zhi, H., Blattner, F. R., & Jin, D. J. (2008). Transcription profiling of the stringent response in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 190(3), 1084-1096. <https://doi.org/10.1128/jb.01092-07>
- Evans, D. J., Jr., Evans, D. G., & Gorbach, S. L. (1973). Production of vascular permeability factor by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from man. *Infection and immunity*, 8(5), 725-730. <https://doi.org/10.1128/IAI.8.5.725-730.1973>
- Feng, B., Mandava, C. S., Guo, Q., Wang, J., Cao, W., Li, N., Zhang, Y., Zhang, Y., Wang, Z., Wu, J., Sanyal, S., Lei, J., & Gao, N. (2014). Structural and functional insights into the mode of action of a universally conserved Obg GTPase. *PLoS Biol*, 12(5), e1001866. <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.1001866>
- Fleckenstein, J. M., Hardwidge, P. R., Munson, G. P., Rasko, D. A., Sommerfelt, H., & Steinsland, H. (2010). Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes Infect*, 12(2), 89-98. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2009.10.002>
- Gaastra, W., & Svennerholm, A. M. (1996). Colonization factors of human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Trends Microbiol*, 4(11), 444-452. [https://doi.org/10.1016/0966-842x\(96\)10068-8](https://doi.org/10.1016/0966-842x(96)10068-8)



- Gaca, A. O., Kudrin, P., Colomer-Winter, C., Beljantseva, J., Liu, K., Anderson, B., Wang, J. D., Rejman, D., Potrykus, K., Cashel, M., Hauryliuk, V., & Lemos, J. A. (2015). From (p)ppGpp to (pp)pGpp: Characterization of Regulatory Effects of pGpp Synthesized by the Small Alarmone Synthetase of *Enterococcus faecalis*. *J Bacteriol*, 197(18), 2908-2919. <https://doi.org/10.1128/jb.00324-15>
- Girón, J. A., Levine, M. M., & Kaper, J. B. (1994). Longus: a long pilus ultrastructure produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 12(1), 71-82. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1994.tb00996.x>
- Gomes, T. A. T., Elias, W. P., Scaletsky, I. C. A., Guth, B. E. C., Rodrigues, J. F., Piazza, R. M. F., Ferreira, L. C. S., & Martinez, M. B. (2016). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian journal of microbiology : [publication of the Brazilian Society for Microbiology]*, 47 Suppl 1(Suppl 1), 3-30. <https://doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>
- Gomez-Duarte, O. G., Chattopadhyay, S., Weissman, S. J., Giron, J. A., Kaper, J. B., & Sokurenko, E. V. (2007). Genetic diversity of the gene cluster encoding longus, a type IV pilus of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 189(24), 9145-9149. <https://doi.org/10.1128/JB.00722-07>
- Harder, J., & Schroder, J. M. (2002). RNase 7, a novel innate immune defense antimicrobial protein of healthy human skin. *J Biol Chem*, 277(48), 46779-46784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207587200>
- Hauryliuk, V., Atkinson, G. C., Murakami, K. S., Tenson, T., & Gerdes, K. (2015). Recent functional insights into the role of (p)ppGpp in bacterial physiology. *Nature reviews. Microbiology*, 13(5), 298-309. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3448>
- He, L.-H., Wang, H., Liu, Y., Kang, M., Li, T., Li, C.-C., Tong, A.-P., Zhu, Y.-B., Song, Y.-J., Savarino, S. J., Prouty, M. G., Xia, D., & Bao, R. (2020). Chaperone-tip adhesin complex is vital for synergistic activation of CFA/I fimbriae biogenesis. *PLoS pathogens*, 16(10), e1008848-e1008848. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1008848>
- Hogg, T., Mechold, U., Malke, H., Cashel, M., & Hilgenfeld, R. (2004). Conformational antagonism between opposing active sites in a bifunctional RelA/SpoT homolog modulates (p)ppGpp metabolism during the stringent response [corrected]. *Cell*, 117(1), 57-68. [https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(04\)00260-0](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(04)00260-0)



- Hüttener, M., Prieto, A., Espelt, J., Bernabeu, M., & Juárez, A. (2018). Stringent Response and AggR-Dependent Virulence Regulation in the Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain 042. *Frontiers in microbiology*, 9, 717-717. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00717>
- Jahn, C. E., Charkowski, A. O., & Willis, D. K. (2008). Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *J Microbiol Methods*, 75(2), 318-324. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2008.07.004>
- Jalajakumari, M. B., Thomas, C. J., Halter, R., & Manning, P. A. (1989). Genes for biosynthesis and assembly of CS3 pili of CFA/II enterotoxigenic *Escherichia coli*: novel regulation of pilus production by bypassing an amber codon. *Molecular microbiology*, 3(12), 1685-1695. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.1989.tb00154.x>
- Jang, J., Hur, H. G., Sadowsky, M. J., Byappanahalli, M. N., Yan, T., & Ishii, S. (2017). Environmental *Escherichia coli*: ecology and public health implications-a review. *J Appl Microbiol*, 123(3), 570-581. <https://doi.org/10.1111/jam.13468>
- Jin, L., Kryukov, K., Suzuki, Y., Imanishi, T., Ikeo, K., & Gojobori, T. (2009). The evolutionary study of small RNA-directed gene silencing pathways by investigating RNase III enzymes. *Gene*, 435(1-2), 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2008.12.022>
- Joffré, E., von Mentzer, A., Svennerholm, A. M., & Sjöling, Å. (2016). Identification of new heat-stable (STa) enterotoxin allele variants produced by human enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). *Int J Med Microbiol*, 306(7), 586-594. <https://doi.org/10.1016/j.ijmm.2016.05.016>
- Kanjee, U., Gutsche, I., Alexopoulos, E., Zhao, B., El Bakkouri, M., Thibault, G., Liu, K., Ramachandran, S., Snider, J., Pai, E. F., & Houry, W. A. (2011). Linkage between the bacterial acid stress and stringent responses: the structure of the inducible lysine decarboxylase. *Embo j*, 30(5), 931-944. <https://doi.org/10.1038/emboj.2011.5>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews. Microbiology*, 2(2), 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kazantsev, A. V., & Pace, N. R. (2006). Bacterial RNase P: a new view of an ancient enzyme. *Nat Rev Microbiol*, 4(10), 729-740. <https://doi.org/10.1038/nrmicro1491>



- Keusch, G. T. (2002). 52 - Toxin-associated Gastro-intestinal Disease: A clinical Overview. In M. Sussman (Ed.), *Molecular Medical Microbiology* (pp. 1083-1088). Academic Press. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/B978-012677530-3/50271-3>
- Keusch, G. T., Fontaine, O., Bhargava, A., Boschi-Pinto, C., Bhutta, Z. A., Gotuzzo, E., Rivera, J., Chow, J., Shahid-Salles, S., & Laxminarayan, R. (2006). Diarrheal Diseases. In nd, D. T. Jamison, J. G. Breman, A. R. Measham, G. Alleyne, M. Claeson, D. B. Evans, P. Jha, A. Mills, & P. Musgrove (Eds.), *Disease Control Priorities in Developing Countries*. The International Bank for Reconstruction and Development/The World Bank Group.
- Keusch, G. T., Walker, C. F., Das, J. K., Horton, S., & Habte, D. (2016). Diarrheal Diseases. In R. E. Black, R. Laxminarayan, M. Temmerman, & N. Walker (Eds.), *Reproductive, Maternal, Newborn, and Child Health: Disease Control Priorities, Third Edition (Volume 2)*. The International Bank for Reconstruction and Development / The World Bank. https://doi.org/10.1596/978-1-4648-0348-2_ch9
- Khakimova, M., Ahlgren, H. G., Harrison, J. J., English, A. M., & Nguyen, D. (2013). The stringent response controls catalases in *Pseudomonas aeruginosa* and is required for hydrogen peroxide and antibiotic tolerance. *J Bacteriol*, 195(9), 2011-2020. <https://doi.org/10.1128/jb.02061-12>
- Kim, C., Mwangi, M., Chung, M., Milheiriço, C., de Lencastre, H., & Tomasz, A. (2013). The mechanism of heterogeneous beta-lactam resistance in MRSA: key role of the stringent stress response. *PLoS One*, 8(12), e82814. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0082814>
- Kriel, A., Brinsmade, S. R., Tse, J. L., Tehranchi, A. K., Bittner, A. N., Sonenshein, A. L., & Wang, J. D. (2014). GTP dysregulation in *Bacillus subtilis* cells lacking (p)ppGpp results in phenotypic amino acid auxotrophy and failure to adapt to nutrient downshift and regulate biosynthesis genes. *J Bacteriol*, 196(1), 189-201. <https://doi.org/10.1128/jb.00918-13>
- Kumar, P., Kuhlmann, F. M., Bhullar, K., Yang, H., Vallance, B. A., Xia, L., Luo, Q., & Fleckenstein, J. M. (2016). Dynamic Interactions of a Conserved Enterotoxigenic *Escherichia coli* Adhesin with Intestinal Mucins Govern Epithelium Engagement and Toxin Delivery. *Infection and immunity*, 84(12), 3608-3617. <https://doi.org/10.1128/IAI.00692-16>



- Kushwaha, G. S., Oyeyemi, B. F., & Bhavesh, N. S. (2019). Stringent response protein as a potential target to intervene persistent bacterial infection. *Biochimie*, 165, 67-75. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.biochi.2019.07.006>
- Lalam, N. (2006). Estimation of the reaction efficiency in polymerase chain reaction. *J Theor Biol*, 242(4), 947-953. <https://doi.org/10.1016/j.jtbi.2006.06.001>
- Lanata, C. F., Fischer-Walker, C. L., Olascoaga, A. C., Torres, C. X., Aryee, M. J., Black, R. E., Child Health Epidemiology Reference Group of the World Health, O., & Unicef. (2013). Global causes of diarrheal disease mortality in children <5 years of age: a systematic review. *PLoS One*, 8(9), e72788. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0072788>
- Lee, J. W., Park, Y. H., & Seok, Y. J. (2018). Rsd balances (p)ppGpp level by stimulating the hydrolase activity of SpoT during carbon source downshift in *Escherichia coli*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 115(29), E6845-e6854. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722514115>
- Levine, M. M., Ristaino, P., Marley, G., Smyth, C., Knutton, S., Boedeker, E., Black, R., Young, C., Clements, M. L., Cheney, C., & et al. (1984). Coli surface antigens 1 and 3 of colonization factor antigen II-positive enterotoxigenic *Escherichia coli*: morphology, purification, and immune responses in humans. *Infect Immun*, 44(2), 409-420. <https://doi.org/10.1128/iai.44.2.409-420.1984>
- Liu, K., Bittner, A. N., & Wang, J. D. (2015). Diversity in (p)ppGpp metabolism and effectors. *Curr Opin Microbiol*, 24, 72-79. <https://doi.org/10.1016/j.mib.2015.01.012>
- Maciąg-Dorszyńska, M., Szalewska-Pałasz, A., & Węgrzyn, G. (2013). Different effects of ppGpp on *Escherichia coli* DNA replication in vivo and in vitro. *FEBS open bio*, 3, 161-164. <https://doi.org/10.1016/j.fob.2013.03.001>
- Madhavan, T. P., & Sakellaris, H. (2015). Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Adv Appl Microbiol*, 90, 155-197. <https://doi.org/10.1016/bs.aambs.2014.09.003>
- McAdam, A. J. (2020). *Enterobacteriaceae*? *Enterobacterales*? What Should We Call Enteric Gram-Negative Bacilli? A Micro-Comic Strip. *Journal of Clinical Microbiology*, 58(2), e01888-01819. <https://doi.org/10.1128/jcm.01888-19>



- Mechold, U., Potrykus, K., Murphy, H., Murakami, K. S., & Cashel, M. (2013). Differential regulation by ppGpp versus pppGpp in *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 41(12), 6175-6189. <https://doi.org/10.1093/nar/gkt302>
- Mirhoseini, A., Amani, J., & Nazarian, S. (2018). Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. *Microbial Pathogenesis*, 117, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2018.02.032>
- Montero, M., Rahimpour, M., Viale, A. M., Almagro, G., Eydallin, G., Sevilla, Á., Cánovas, M., Bernal, C., Lozano, A. B., Muñoz, F. J., Baroja-Fernández, E., Bahaji, A., Mori, H., Codoñer, F. M., & Pozueta-Romero, J. (2014). Systematic production of inactivating and non-inactivating suppressor mutations at the *relA* locus that compensate the detrimental effects of complete *spot* loss and affect glycogen content in *Escherichia coli*. *PLoS One*, 9(9), e106938-e106938. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0106938>
- Nakanishi, N., Abe, H., Ogura, Y., Hayashi, T., Tashiro, K., Kuhara, S., Sugimoto, N., & Tobe, T. (2006). ppGpp with DksA controls gene expression in the locus of enterocyte effacement (LEE) pathogenicity island of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* through activation of two virulence regulatory genes. *Mol Microbiol*, 61(1), 194-205. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05217.x>
- Nataro, J. P., & Kaper, J. B. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11(1), 142-201.
- Nguyen, D., Joshi-Datar, A., Lepine, F., Bauerle, E., Olakanmi, O., Beer, K., McKay, G., Siehnel, R., Schafhauser, J., Wang, Y., Britigan, B. E., & Singh, P. K. (2011). Active starvation responses mediate antibiotic tolerance in biofilms and nutrient-limited bacteria. *Science (New York, N.Y.)*, 334(6058), 982-986. <https://doi.org/10.1126/science.1211037>
- Ochi, S., Shimizu, T., Ohtani, K., Ichinose, Y., Arimitsu, H., Tsukamoto, K., Kato, M., & Tsuji, T. (2009). Nucleotide sequence analysis of the enterotoxigenic *Escherichia coli* Ent plasmid. *DNA Res*, 16(5), 299-309. <https://doi.org/10.1093/dnares/dsp015>
- Oh, K. H., & Cho, S. H. (2013). Interaction between the quorum sensing and stringent response regulation systems in the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 EDL933 strain. *J Microbiol Biotechnol*.



Organización Mundial de la Salud. (02 de mayo del 2017). Enfermedades diarreicas. Recuperado de: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease>

Pfaffl, M. W. (2004). Quantification strategies in real-time PCR. *AZ of quantitative PCR*, 1, 89-113.

Potrykus, K., Murphy, H., Philippe, N., & Cashel, M. (2011). ppGpp is the major source of growth rate control in *E. coli*. *Environ Microbiol*, 13(3), 563-575. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02357.x>

Primm, T. P., Andersen, S. J., Mizrahi, V., Avarbock, D., Rubin, H., & Barry, C. E., 3rd. (2000). The stringent response of Mycobacterium tuberculosis is required for long-term survival. *Journal of bacteriology*, 182(17), 4889-4898. <https://doi.org/10.1128/jb.182.17.4889-4898.2000>

Pronk, L. M., & Sanderson, K. E. (2001). Intervening sequences in rrl genes and fragmentation of 23S rRNA in genera of the family *Enterobacteriaceae*. *Journal of bacteriology*, 183(19), 5782-5787. <https://doi.org/10.1128/JB.183.19.5782-5787.2001>

Riley, M., Abe, T., Arnaud, M. B., Berlyn, M. K., Blattner, F. R., Chaudhuri, R. R., Glasner, J. D., Horiuchi, T., Keseler, I. M., Kosuge, T., Mori, H., Perna, N. T., Plunkett, G., 3rd, Rudd, K. E., Serres, M. H., Thomas, G. H., Thomson, N. R., Wishart, D., & Wanner, B. L. (2006). *Escherichia coli* K-12: a cooperatively developed annotation snapshot--2005. *Nucleic Acids Res*, 34(1), 1-9. <https://doi.org/10.1093/nar/gkj405>

Rios-Muniz, D., Cerna-Cortes, J. F., Moran-Garcia, N., Meza-Segura, M., & Estrada-Garcia, T. (2019). *Escherichia coli* enterotoxigenica y enteroagregativa: prevalencia, patogenesis y modelos muridos. *Gac Med Mex*, 155(4), 410-416. <https://doi.org/10.24875/gmm.19004716>

Rodríguez, G. (2002). Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México*, 44, 464-475. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0036-36342002000500011&nrm=iso

Ronneau, S., & Hallez, R. (2019). Make and break the alarmone: regulation of (p)ppGpp synthetase/hydrolase enzymes in bacteria. *FEMS microbiology reviews*, 43(4), 389-400. <https://doi.org/10.1093/femsre/fuz009>



- Ross, W., Sanchez-Vazquez, P., Chen, A. Y., Lee, J.-H., Burgos, H. L., & Gourse, R. L. (2016). ppGpp Binding to a Site at the RNAP-DksA Interface Accounts for Its Dramatic Effects on Transcription Initiation during the Stringent Response. *Molecular cell*, 62(6), 811-823. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.04.029>
- Rymer, R. U., Solorio, F. A., Tehranchi, A. K., Chu, C., Corn, J. E., Keck, J. L., Wang, J. D., & Berger, J. M. (2012). Binding mechanism of metal-NTP substrates and stringent-response alarmones to bacterial DnaG-type primases. *Structure*, 20(9), 1478-1489. <https://doi.org/10.1016/j.str.2012.05.017>
- Sahl, J. W., & Rasko, D. A. (2012). Analysis of global transcriptional profiles of enterotoxigenic *Escherichia coli* isolate E24377A. *Infection and immunity*, 80(3), 1232-1242. <https://doi.org/10.1128/IAI.06138-11>
- Saito, R., Talukdar, P. K., Alanazi, S. S., & Sarker, M. R. (2018). RelA/DTD-mediated regulation of spore formation and toxin production by *Clostridium perfringens* type A strain SM101. *Microbiology (Reading)*, 164(5), 835-847. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000655>
- Saldaña, Z., Rodea, G. E., Cruz-Córdova, A., Rodríguez-Ramírez, V., Espinosa-Mazariego, K., González-Montalvo, M. A., Ochoa, S. A., González-Pedrajo, B., Eslava-Campos, C. A., López-Villegas, E. O., Hernández-Castro, R., Arellano-Galindo, J., Patiño-López, G., & Xicohtencatl-Cortes, J. (2016). Effects of lng Mutations on lngA Expression, Processing, and CS21 Assembly in Enterotoxigenic *Escherichia coli* E9034A [Original Research]. *Frontiers in Microbiology*, 7(1201). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01201>
- Schefe, J. H., Lehmann, K. E., Buschmann, I. R., Unger, T., & Funke-Kaiser, H. (2006). Quantitative real-time RT-PCR data analysis: current concepts and the novel "gene expression's CT difference" formula. *J Mol Med (Berl)*, 84(11), 901-910. <https://doi.org/10.1007/s00109-006-0097-6>
- Silva, A. J., & Benitez, J. A. (2006). A *Vibrio cholerae* relaxed (relA) mutant expresses major virulence factors, exhibits biofilm formation and motility, and colonizes the suckling mouse intestine. *J Bacteriol*, 188(2), 794-800. <https://doi.org/10.1128/jb.188.2.794-800.2006>
- Steinchen, W., & Bange, G. (2016). The magic dance of the alarmones (p)ppGpp. *Mol Microbiol*, 101(4), 531-544. <https://doi.org/10.1111/mmi.13412>



- Swidsinski, A., Loening-Baucke, V., Lochs, H., & Hale, L. P. (2005). Spatial organization of bacterial flora in normal and inflamed intestine: a fluorescence in situ hybridization study in mice. *World J Gastroenterol*, 11(8), 1131-1140. <https://doi.org/10.3748/wjg.v11.i8.1131>
- Syal, K., Joshi, H., Chatterji, D., & Jain, V. (2015). Novel pppGpp binding site at the C-terminal region of the Rel enzyme from *Mycobacterium smegmatis*. *Febs j*, 282(19), 3773-3785. <https://doi.org/10.1111/febs.13373>
- Taddeo, B., Sciortino, M. T., Zhang, W., & Roizman, B. (2007). Interaction of herpes simplex virus RNase with VP16 and VP22 is required for the accumulation of the protein but not for accumulation of mRNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104(29), 12163-12168. <https://doi.org/10.1073/pnas.0705245104>
- Tagami, S., Sekine, S.-I., & Yokoyama, S. (2011). A novel conformation of RNA polymerase sheds light on the mechanism of transcription. *Transcription*, 2(4), 162-167. <https://doi.org/10.4161/trns.2.4.16148>
- Venkatesan, M. M., & Van de Verg, L. L. (2015). Combination vaccines against diarrheal diseases. *Hum Vaccin Immunother*, 11(6), 1434-1448. <https://doi.org/10.4161/21645515.2014.986984>
- Voytas, D. (2001). Agarose gel electrophoresis. *Curr Protoc Immunol*, Chapter 10, Unit 10.14. <https://doi.org/10.1002/0471142735.im1004s02>
- Wang, H., Zhong, Z., Luo, Y., Cox, E., & Devriendt, B. (2019). Heat-Stable Enterotoxins of Enterotoxigenic *Escherichia coli* and Their Impact on Host Immunity. *Toxins*, 11(1), 24. <https://doi.org/10.3390/toxins11010024>
- Weiglmeier, P. R., Rösch, P., & Berkner, H. (2010, Sep). Cure and curse: *E. coli* heat-stable enterotoxin and its receptor guanylyl cyclase C. *Toxins*, 2(9), 2213-2229. <https://doi.org/10.3390/toxins2092213>
- Wilhelm, J., & Pingoud, A. (2003). Real-time polymerase chain reaction. *Chembiochem*, 4(11), 1120-1128. <https://doi.org/10.1002/cbic.200300662>
- Wolf, M. K. (1997). Occurrence, distribution, and associations of O and H serogroups, colonization factor antigens, and toxins of enterotoxigenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 10(4), 569-584. <https://doi.org/10.1128/cmr.10.4.569-584.1997>



- Yamamoto, S., Izumiya, H., Morita, M., Arakawa, E., & Watanabe, H. (2009). Application of lambda Red recombination system to *Vibrio cholerae* genetics: simple methods for inactivation and modification of chromosomal genes. *Gene*, 438(1-2), 57-64. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2009.02.015>
- Yamamoto, T., Gojobori, T., & Yokota, T. (1987). Evolutionary origin of pathogenic determinants in enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae* O1. *J Bacteriol*, 169(3), 1352-1357. <https://doi.org/10.1128/jb.169.3.1352-1357.1987>