



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

TESIS

**EFFECTO DEL INDOL SOBRE LA EXPRESIÓN DE
FACTORES DE VIRULENCIA DE *ESCHERICHIA COLI*
ENTEROAGREGATIVA**

Para obtener el grado de
Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Presenta:

M.V.Z. Rubi Joseline Castillo Juárez

Director(a)

Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega

Codirector (a)

Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas

Comité tutorial

Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez

Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán

Dra. María del Carmen Valadez Vega

San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo, agosto, 2023



14/08/2023

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado
Directora de Administración Escolar
Presente.

El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulada **“Efecto del indol sobre la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enteroagregativa”**, realizado por la sustentante **Rubí Joseline Castillo Juárez** con número de cuenta 297733 perteneciente al programa de **Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

Por lo que la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

Atentamente

“Amor, Orden y Progreso”

Pachuca, Hidalgo a 14 de agosto de 2023

El Comité Tutorial

Jeannett Alejandra Izquierdo Vega
Directora

Miguel Ángel de la Cruz Villegas
Co-director

Manuel Sánchez Gutiérrez
Miembro del comité



Eduardo Osiris Madrigal Santillán
Miembro del comité

María del Carmen Valadez Vega
Miembro del comité

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera
Pachuca Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo,
México. C.P. 42160
Teléfono: 52 (771) 71 720 00 Ext. 4308,2361,4346,4310
medicina@uaeh.edu.mx

Agradecimientos

Durante el desarrollo de estos estudios de Maestría de la estudiante fue una beca de manutención por el Consejo Nacional de Humanidades, Ciencia y Tecnología (CONAHCyT), número de beca 797866 y número de CVU 1146865.

Agradezco a la Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega por la paciencia, esmero y apoyo otorgado durante estos dos años para poder realizar este proyecto.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas por el apoyo y paciencia brindada durante el periodo del 01 de marzo al 30 de septiembre del 2022 para realizar la parte experimental de dicho proyecto en el laboratorio de Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional Siglo XXI, Ciudad de México.

Durante el desarrollo en la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud, se publicó una revisión bibliográfica titulada “Indole as a regulator of bacterial physiology” en la revista Mexican Journal of Medical Research ICSa DOI: <https://doi.org/10.29057/mjmr.v11i21.8894> a

ÍNDICE GENERAL	
ÍNDICE DE FIGURAS	v
ÍNDICE DE TABLAS	v
ABREVIATURAS	vi
RESUMEN	vii
ABSTRACT	viii
INTRODUCCIÓN	ix
I. GENERALIDADES	1
1.1 <i>Escherichia coli</i>	1
1.1.1 <i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	2
1.1.1.1. <i>Epidemiología e importancia clínica</i>	3
1.1.1.2. <i>Transmisión y patogénesis</i>	4
1.1.1.3 <i>Tratamiento</i>	5
1.1.1.4 <i>Resistencia a antibióticos</i>	6
1.1.2 Plásmido de adherencia agregativa (pAA)	7
1.1.3 Factores de virulencia	8
1.1.3.1 <i>Fimbrias</i>	8
1.1.3.2 <i>Dispersina</i>	9
1.1.4 Indol	9
1.1.4.1 <i>Características químicas</i>	9
1.1.4.2 <i>Metabolismo del indol en E. coli</i>	10
1.1.4.3 <i>Funciones del indol en E. coli</i>	11
II. ANTECEDENTES	13
2.1 <i>Efecto del indol sobre la producción de biopelículas</i>	13
2.2 <i>Efecto de la dispersina sobre la inhibición de EAEC</i>	15
2.3 <i>Efecto del indol sobre la inhibición de genes de virulencia</i>	16
	ii

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	18
IV. JUSTIFICACIÓN	18
V. HIPÓTESIS	19
VI. OBJETIVOS	20
6.1. <i>Objetivo General</i>	20
6.2. <i>Objetivos Específicos</i>	20
VII. MATERIAL Y MÉTODO	20
7.1 <i>Contexto de la investigación</i>	20
7.2 <i>Tipo de estudio</i>	20
7.3 <i>Variables</i>	21
7.4 <i>Muestra</i>	22
7.4.1 <i>Cepa bacteriana</i>	22
7.5 <i>Criterios de selección</i>	22
7.6 <i>Diagrama experimental</i>	23
7.7 MÉTODOS	23
7.7.1 <i>Determinación de la expresión genética relativa mediante qRT-PCR</i>	23
7.7.2 <i>Evaluación de la formación de biopelícula</i>	26
7.7 <i>Análisis estadístico</i>	27
VIII. RESULTADOS	28
8.1 <i>Expresión genética de los factores de virulencia de EAEC</i>	28
8.2 <i>Cuantificación de la formación de biopelícula</i>	30
IX. DISCUSIÓN	31
X. CONCLUSIÓN	36
XI. PERSPECTIVAS	37
XII. REFERENCIAS	38
XIII. ANEXOS	43

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Estructuras químicas del triptófano y el indol. a) Estructura del triptófano, b) Estructura del indol	10
Figura 2. Diagrama experimental	23
Figura 3. El indol disminuye la expresión genética de los genes de virulencia de EAEC 042 (aaFa, aggR y aap)	29
Figura 4. El indol disminuye la capacidad de formación de biopelícula en comparación con la cepa EAEC 042	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Mecanismo de acción de los principales fármacos utilizados contra EAEC	5
Tabla 2. Variables	21
Tabla 3. Mezcla de reactivos qRT-PCR	26

ABREVIATURAS

AAF	Fimbrias de Adhesión Agregada
<i>aap</i>	Gen de proteína antiagregación
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AggR	Activador transcripcional de los genes de agregación
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
EAEC	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa
EHEC	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica
ICA	Indol-3-carboxaldehído
IAA	Ácido indol-3-acético
LB	Luria-Bertani
LEE	Locus de borramiento de enterocito
μM	Micromolar
mM	Milimolar
pAA	Plásmido de Adherencia Agregada
PAI	Islotes de patogenicidad
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
RT-PCR	Reacción en cadena de la polimerasa tiempo real
TnaA	Triptofanasa

RESUMEN

Escherichia coli enteroagregativa (EAEC) es un patotipo causante de la diarrea aguda y persistente y su importancia en salud pública radica en que la infección en la población puede ser mortal, principalmente en niños, adultos mayores y personas inmunocomprometidas. EAEC expresa diversos factores de virulencia que incluyen la expresión de las fimbrias, la dispersina, toxinas y sistemas de secreción. Ha sido reportado en otras enterobacterias que los factores de virulencia pueden ser regulados por el indol, producto del metabolismo del triptófano en esta bacteria. El objetivo de este estudio fue analizar el efecto del indol exógeno sobre la expresión de genes de virulencia, tales como aquellos que codifican para las fimbrias (*aafA*) la dispersina (*aap*) y el regulador maestro AggR (*aggR*) en EAEC. Además, se determinó el efecto del indol sobre la formación de biopelícula en EAEC. La cuantificación de la expresión de los genes se realizó mediante RT-qPCR, el cual utiliza un sistema de detección con fluorocromo SYBR® Green I. Para evaluar la formación de biopelícula se realizó una tinción con cristal violeta. En este estudio, observamos que en la cepa silvestre, el indol (500 μ M) disminuyó significativamente la expresión genética relativa de los genes de *aafA* 2.56 veces, *aap* 2.29 veces y *aggR* de 2.07 veces ($p < 0.0001$ para los tres genes) comparados con la cepa silvestre. Con respecto a la formación de biopelícula hubo una disminución de 1.97 veces en comparación con la cepa silvestre de EAEC tras la adición de 500 μ M de indol. Los resultados sugieren que la adición de indol inhibe la expresión de *aafA*, *aap* y *aggR* así como la formación de biopelícula, sugiriendo que el indol puede disminuir la patogenicidad de la EAEC.

Palabras clave: Biopelícula, dispersina, *Escherichia coli* enteroagregativa, fimbrias, indol.

ABSTRACT

Enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) is a pathotype causing acute and persistent diarrhea and its public health importance lies in the fact that infection in the population can be fatal, mainly in children, the elderly and immunocompromised persons. EAEC expresses several virulence factors including expression of fimbriae, dispersin, toxins and secretion systems. It has been reported in other enterobacteria that virulence factors may be regulated by indole, a product of tryptophan metabolism in this bacterium. The aim of this study was to analyze the effect of exogenous indole on the expression of virulence genes, such as those encoding for fimbriae (*aafA*) dispersin (*aap*) and the master regulator AggR (*aggR*) in EAEC. In addition, the effect of indole on biofilm formation in EAEC was determined. Quantification of gene expression was performed by RT-qPCR, which uses an SYBR® Green I fluorochrome detection system. To evaluate biofilm formation, crystal violet staining was performed. In this study, we observed that in the wild-type strain, indole (500 μ M) significantly decreased the relative gene expression of *aafA* 2.56-fold, *aap* 2.29-fold and *aggR* 2.07-fold ($p < 0.0001$ for all three genes) compared to the wild-type strain. With respect biofilm formation there was a 1.97-fold decrease compared to the wild-type EAEC strain after the addition of 500 μ M indole. The results suggest that the addition of indole inhibits the expression of *aafA*, *aap* and *aggR* as well as biofilm formation, suggesting that indole may decrease the pathogenicity of EAEC.

Keywords: Biofilm, dispersin, enteroaggregative *Escherichia coli*, fimbriae, indole.

INTRODUCCIÓN

EAEC es un importante patógeno causante de dolor abdominal, diarrea del viajero y diarrea pediátrica, principalmente en países con bajos recursos, así como diarrea persistente en pacientes infectados por el VIH. Actualmente algunos estudios de diversas cepas de *E. coli* diarreogénicas han demostrado que el indol puede inhibir la expresión de algunos genes de virulencia (1). El objetivo de este estudio fue evaluar el efecto del indol sobre la expresión de genes de virulencia y formación de biopelícula en una cepa de EAEC.

A continuación se presenta el siguiente trabajo, el cual se divide en cinco secciones, en la primera sección encontramos información actualizada sobre las generalidades de EAEC tales como patogénesis, transmisión, epidemiología, tratamiento, resistencia y sus factores de virulencia; también se aborda información sobre el indol y sus efectos sobre los genes de virulencia. En la segunda sección se describen los antecedentes, planteamiento del problema, justificación, hipótesis, y objetivos respectivamente. La tercera sección describe la metodología utilizada para evaluar la expresión de los genes de virulencia *aafA*, *aap* y *aggR* en presencia de indol mediante RT-qPCR así como la evaluación de la formación de biopelícula mediante la tinción con cristal violeta. Además se muestran y describen los resultados obtenidos, indicando las pruebas estadísticas realizadas en cada resultado. En esta sección también se ubica la discusión en la que se explican y argumentan los resultados obtenidos. En la cuarta sección se encuentra la conclusión, perspectivas y referencias. Finalmente, en la sección de anexos se encuentra la preparación de los reactivos que se utilizaron en las determinaciones, el oficio de aprobación del Comité de Ética e Investigación y el artículo de revisión sobre el indol.

I. GENERALIDADES

1.1 *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, que no forma esporas, fimbriado con flagelo peritricoso y a menudo posee una cápsula. Esta bacteria pertenece a la familia *Enterobacteriaceae* y crece fácilmente en cultivos simples o en medios sintéticos con glicerol o glucosa como única fuente de carbono y energía; en medios sólidos, las colonias son circulares y lisas con borde completo; en medios que contienen eritrocitos lavados, puede demostrar la producción de β -hemolisina asociada a la célula. Se utilizan diversos antígenos para tipificar las cepas de *E. coli*, los más comunes el somático (O), capsular (K) y flagelar (H) (2).

Escherichia coli comienza a colonizar el intestino en el ser humano poco después de haber nacido, por lo que se le considera parte de la microbiota normal, sin embargo, hay cepas que pueden ser patógenas produciendo diversos cuadros clínicos, principalmente diarrea. Se han reconocido seis patotipos de *Escherichia coli* causantes de diarrea en humanos, clasificándose de la siguiente manera: *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* productora de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* difuso adherente y *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (3).

El patotipo al que pertenece una cepa en particular se define por la manifestación clínica de la enfermedad, el repertorio de los factores de virulencia, la epidemiología y los perfiles filogenéticos (4). Regularmente no se hacen pruebas bioquímicas a estas categorías, ya que solo nos indica especie, si se desea caracterizar se tienen que realizar métodos moleculares, y en base a ello se identifican los diversos loci de cada patotipo (5).

1.1.1 *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC)

EAEC es un grupo heterogéneo de bacterias entéricas que muestran un patrón de adherencia agregativa (AA) característica. Entre las cepas de EAEC existe variabilidad en la presencia de factores de patogenicidad, por lo que aún no se ha encontrado relación entre un genotipo o fenotipo específico y el desarrollo de la enfermedad. Actualmente se describe la asociación entre las cepas EAEC y el grupo filogenético (6). Las cepas de EAEC pertenecen a un gran número de serogrupos diferentes como O44, O55, O86, O111, O125, O126 Y O128. El polisacárido antígeno O de EAEC está compuesto por unidades de repetición de tetrasacáridos; (2) sin embargo, el serotipado O para propósitos de clasificación es problemático ya que varias cepas aglutinan; existe una gran variedad de serotipos y algunas cepas que los comparten se adhieren diferencialmente a células HEp-2 (7).

EAEC se caracteriza por tener de sitio blanco a la mucosa del intestino delgado y grueso con un período de incubación menor a ocho horas y durar hasta dieciocho a 20 días; (8) y, se ha implicado en diversos cuadros clínicos como la diarrea del viajero, diarrea endémica en países de bajos recursos y diarrea persistente en pacientes con VIH (1).

Algunos de los factores de virulencia que posee esta cepa son las fimbrias de adherencia agregativa; proteína dispersina (la cual se une al lipopolisacárido para neutralizar la carga negativa de la célula), toxinas Pet y EAST-1 (codificada en el plásmido pAA), toxinas ShET1 y Pic (codificadas en el cromosoma) y un sistema de secreción tipo VI (4).

Esta cepa presenta un plásmido que codifica varios factores de virulencia, en los que se incluye el regulador AggR perteneciente a la familia de activadores transcripcionales AraC/XylS (6), por lo que EAEC es clasificada en cepas típicas las cuales contienen el gen *aggR* y en cepas atípicas que lo carecen (7). Algunos genes regulados por AggR son necesarios para la expresión del patrón AA que implica las fimbrias AAF con variantes I, II, III, IV y V codificadas por los genes *aggA*, *aafA*, *agg3A* y *agg4A* y *aaf5A* (6).

La prueba considerada el estándar de oro para identificar la EAEC es el cultivo de cinco colonias por paciente en caldo Luria a 37°C y luego infectar células Hep-2

semi-cofluentes durante 3 horas y observar el patrón de adherencia agregativa; el cual se caracteriza por su agregación de aspecto de “ladrillo apilado”, donde los bacilos son alargados y a veces se alinean en una sola capa en la superficie de la célula. Sin embargo, este método no distingue cepas patógenas de no patógenas (7), ya que no todas las cepas que tienen el patrón de unión AA son diarreicas, y las que sí lo son no presentan un único gen o conjunto de genes que distinga las cepas de EAEC patógenas y no patógenas (7).

1.1.1.1. Epidemiología e importancia clínica

La diarrea es la principal causa de mortalidad y morbilidad en países en vías de desarrollo, principalmente en niños, pues se asocia con inflamación intestinal y desnutrición, así como con disminución en el crecimiento y función cognoscitiva (5). EAEC es causante de diarrea acuosa aguda o persistente (con o sin moco) en niños menores de cinco años, además es el segundo agente más aislado de episodios de “diarrea del viajero” en adultos, así como en pacientes infectados con VIH (7).

En México los cuadros diarreicos son un problema de salud nacional, de hecho, es la segunda causa de morbilidad y la quinta causa de mortalidad en niños menores de cinco años y se ha demostrado que EAEC fue una de las cepas que más se identificó en niños con diarrea en Yucatán, México, siendo más predominante durante el verano en niños de 6 a 24 meses que en menores de 6 meses (9).

Estudios epidemiológicos realizados en América del Sur, África y Asia han demostrado que los enteropatógenos se encuentran frecuentemente en muestras de niños de 0-24 meses de edad, con o sin diarrea, siendo más frecuente en las muestras diarreicas. La infección por EAEC, tuvo una prevalencia de segundo y tercer lugar en los dos primeros años de vida en niños (3).

Un estudio en Brasil identificó la infección por EAEC como la causa más común de diarrea en niños menores de 2 años; por otra parte en una sala neonatal de Serbia fue descrito un brote de diarrea por EAEC viéndose afectados 19 bebés, de los cuales sólo 3 desarrollaron piroxia y pérdida de peso (10).

Adicionalmente, esta cepa también puede afectar a la población adulta de países industrializados que viajan a zonas endémicas, se estima que del 3 al 17% de los adultos con “diarrea del viajero” desarrollan enfermedad inflamatoria intestinal (5).

1.1.1.2. Transmisión y patogénesis

Diversas investigaciones han mostrado que la transmisión de EAEC se lleva a cabo a través de los alimentos y agua contaminada, sin embargo, no se ha identificado algún vehículo alimentario específico (11). Se ha descrito que EAEC se adhiere al epitelio intestinal formando una biopelícula induciendo la producción de moco y liberando toxinas como: Pet (Plasmid-encoded toxin, por sus siglas en inglés), SheT1 (*Shigella enterotoxin 1*, por sus siglas en inglés) y Pic (Protease involved in intestinal, por sus siglas en inglés) que promueven la inflamación. Actualmente la patogénesis de EAEC comprende tres etapas: 1) adherencia a la mucosa intestinal, mediada generalmente por fimbrias de adherencia agregativa; 2) incremento de la liberación de moco conllevando al desarrollo de biopelícula en la superficie de los enterocitos, y 3) liberación de enterotoxinas y citotoxinas que inducen la inflamación de la mucosa. La adhesión inicial de EAEC a la mucosa intestinal está mediada por estructuras conocidas como fimbrias de adhesión agregada (AAF), estas se consideran la principal adhesión y se encuentran exclusivamente en este patotipo (11).

Se ha demostrado que las fimbrias AAF/II en la cepa prototipo 042 median la adhesión a la citoqueratina-8 y a diversas proteínas de la matriz extracelular como el colágeno, la laminina y la fibronectina; también contribuyen a la respuesta inflamatoria en las células epiteliales del colon y la migración de neutrófilos por medio del epitelio mediada por la mucina MUC1. Es importante mencionar que el mecanismo molecular involucrado en la respuesta inflamatoria a las fimbrias y los receptores asociados a este proceso aún es desconocido (12). Por otra parte, la fibronectina sólo actúa en la adherencia pero no en la respuesta inflamatoria (3).

1.1.1.3 Tratamiento

Los síntomas gastrointestinales asociados a esta cepa suelen persistir durante semanas, la infección llega a ser autolimitante, y el tratamiento estándar recomendado es la rehidratación oral (11). El tratamiento farmacológico es necesario si la diarrea y el dolor abdominal son graves y/o prolongados. Los antimicrobianos para tratar la diarrea del viajero deben tomarse en cuenta de acuerdo a la región del mundo, ya que existen diferentes patrones de susceptibilidad antimicrobiana para cada región geográfica, sin embargo se ha utilizado la ampicilina, el cotrimoxazol, las tetraciclinas (doxiciclina) y las quinolonas debido a su fácil disponibilidad y bajo costo (7). De manera general, EAEC suele ser sensible a las fluoroquinolonas; algunos pacientes que han sido tratados con ciprofloxacino 500 mg dos veces al día durante tres a siete días mostraron una disminución del periodo diarreico con un 50% menos de deposiciones diarias y una reducción del 42% de la sintomatología entérica (1).

Tabla 1. Mecanismo de acción de los principales fármacos utilizados contra EAEC

Fármaco	Familia	Mecanismo de acción	Ref
Ciprofloxacino	Fluoroquinolona de segunda generación	Penetran por el canal acuoso de las porinas, uniéndose e inactivando selectivamente las topoisomerasas e impidiendo el plegamiento de la doble hélice del ácido desoxirribonucleico (ADN).	(13)
Doxiciclina	Tetraciclina semisintética de segunda generación	Inhiben la síntesis de las proteínas bacterianas mediante la unión a la subunidad ribosomal 30S de las bacterias impidiendo la unión al sitio aminoacil del ácido ribonucleico de transferencia, paralizando la	(14)

		incorporación de aminoácidos durante la síntesis proteica.	
Cotrimoxazol	Sulfamidas y diaminopirimidinas; asociación de trimetoprima y sulfametoxazol (TMP-SXT) en proporción 1/5	Inhiben la síntesis de los ácidos nucleicos bacterianos, están estructuralmente relacionados con el ácido paraaminobenzoico, compitiendo con él por la enzima dihidropteroato que interviene en el metabolismo del ácido fólico, que es imprescindible para sintetizar precursores ácidos nucleicos, además la trimetoprima inhibe la dihidrofolato reductasa.	(14)
Ampicilina	Beta-lactámicos	Su efecto se produce mediante 2 mecanismos: inhibición de la síntesis de la pared bacteriana e inducción de la autólisis bacteriana.	(15)

1.1.1.4 Resistencia a antibióticos

La infección por EAEC suele ser autolimitante en la mayoría de los casos, pero si ésta persiste es necesario el uso de antibióticos; de manera general, se ha detectado que esta cepa produce betalactamasa de espectro extendido y presenta resistencia a las quinolonas (16).

Sin embargo, la multi-resistencia parece ser común en EAEC y está geográficamente extendida; en algunos estudios en África y Asia se detectaron que aislados de esta cepa exhiben una alta incidencia de resistencia al cotrimoxazol, ampicilina y tetraciclinas. En otro estudio realizado entre 2006 y 2007 se observó que los aislados presentaban resistencia a las quinolonas; la resistencia a la

ampicilina, cefotaxima (codificada por el gen β -lactamasa *CTX-M-15*), gentamicina, cotrimoxazol, ácido nalidíxico y ciprofloxacina fue notificada de aislados procedentes de viajeros de la India que regresaron a España (11).

En un estudio realizado en un hospital de Hamada, Irán, se recolectaron 140 muestras de niños con diarrea por EAEC, mostrando resistencia a la ampicilina (100%), eritromicina (100%), cefalotina (78.6%), cotrimoxazol (71.4%), tetraciclina (64.3%), ácido nalidíxico (57.1%) y una resistencia reducida a la ciprofloxacina (42.9%) y norfloxacina (7.1%) (17).

Debido a la multi-resistencia de antibióticos, al seleccionarlos se debe tomar en cuenta la región del mundo donde se adquirió la infección; las infecciones por EAEC se han tratado exitosamente con ciprofloxacino y otras quinolonas, aunque este antibiótico no es el más adecuado para uso en niños debido a su asociación con artropatías; la resistencia a las quinolonas y a las cefalosporinas de tercera generación ha comprometido el tratamiento en algunas regiones del mundo (11).

1.1.2 Plásmido de adherencia agregativa (pAA)

En las cepas de EAEC, el fenotipo de adherencia agregativa está asociado a la presencia de un plásmido, denominado pAA de 60-MDa conformado por 113,346 pb; dicho plásmido pertenece a la familia IncFIIA e incluye 152 clústeres de diferenciación, de los cuales 32 son pseudogenes, 7 codifican proteínas hipotéticas, 23 codifican proteínas hipotéticas conservadas sin función conocida, 55 tienen funciones de transferencia, replicación o mantenimiento del plásmido, 18 genes derivados de elementos móviles codifican transposones y los 17 restantes cumplen funciones en la virulencia; entre los genes de virulencia se encuentran el transportador de proteínas antiagregantes, una proteína termoestable enteroagregante (EAST; *astA*), la fimbria de adherencia agregativa II (AAF/II; *aafA*), la proteína secretora dispersina (*aap*), el gen codificante del activador transcripcional AggR (*aggR*) necesario para la expresión de las fimbrias (4,17).

1.1.3 Factores de virulencia

1.1.3.1 Fimbrias

Las fimbrias son organelos adhesivos con estructura piliforme característicos de las bacterias Gram negativas, los cuales se localizan en la parte externa de las bacterias, pudiéndose encontrar distribuidos en toda su superficie o solamente en los polos (18). La cantidad de fimbrias que expresa una bacteria se asocia a diversos factores como: temperatura, pH, osmolaridad y presencia de ligandos específicos en el medio; dichos factores pueden favorecer o reprimir la expresión de las subunidades fimbriales, mismas que se ensamblan por la ruta de ensamblaje “Chaperon/Usher” (19).

En EAEC la capacidad de agregación está mediada por las fimbrias de adherencia agregativa (AAF) que constan de cuatro genes, A-D; el gen A codifica la molécula de adhesión y es más divergente, los genes B-D codifican proteínas accesorias y se encuentran altamente conservados. En general, existen diferentes variantes de fimbrias (I, II, III, IV y V) codificadas por los genes *aggA*, *aafA*, *agg3A*, *agg4A* y *aag5A*, respectivamente; Todas las AAF muestran un alto nivel de conservación de sus genes accesorios, a pesar del bajo nivel de identidad de aminoácidos entre las subunidades de la pilina. Las AAF son miembros del grupo de chaperonas-usher fimbrias, comunes en bacterias Gram negativas. El operón consiste en cuatro proteínas: El usher, chaperona, subunidad de micropilina y subunidad de pilina mayor; (6,11,20) en algunas cepas que carecen de AAF la adherencia agregativa se ha relacionado con el gen *hral* (también conocido como *hek*) o con la posesión de adhesinas alternativas como Hda (7).

Es importante mencionar que las fimbrias son esenciales para la formación de biopelículas y para mediar la interacción con las células huésped, el fenotipo de adherencia mediado por las AAF/II es modulado por la proteína dispersina (4). Se ha demostrado que las AAF/II están fuertemente asociadas con la diarrea, mientras que las AAF/I no lo están. Si bien las AAF desempeñan un papel importante en la presentación de la diarrea, aún no se ha dilucidado la prevalencia de cada tipo de AAF ni su relación con propiedades virulentas (20).

1.1.3.2 Dispersina

La dispersina es una pequeña proteína inmunogénica de 10.2 kDa que consta de epítomos amino-terminales, con carga positiva y estructura de sándwich beta plegado que incluye un enlace disulfuro. Este enlace disulfuro se une mediante enlace no covalente al lipopolisacárido de la membrana externa neutralizando la superficie celular bacteriana repeliendo y proyectando fimbrias de adherencia II cargadas positivamente (AAF/II), dando lugar a su adhesión con la superficie de la mucosa intestinal. Esta acción disminuye la auto-agregación bacteriana permitiendo la dispersión en la mucosa intestinal. El gen que codifica la dispersina (*aap*) se encuentra en el plásmido pAA secuencias arriba del gen que codifica para el activador transcripcional *aggR*. Se ha demostrado que la secreción de la dispersina requiere de un clúster de cinco genes localizados en el plásmido pAA pero desvinculado del gen *aap*; estos genes incluyen homólogos de ATPasa y permeasa ABC (casete de unión a ATP) (*aatA*) que codifica un homólogo estructural del canal de membrana externa TolC (1,21,22).

Se ha sugerido que esta proteína es secretada a través de la membrana celular bacteriana por el sistema transportador enteroagregativo ABC (Aat), y forma una cubierta poco asociada en la superficie celular. La antiagregación mediada por la dispersina parece ser un factor que garantiza que EAEC colonice las superficies mucosas, ya que se sabe que la supresión del gen *aap* provoca un aumento de la autoagregación y adherencia de la cepa prototipo 042 de EAEC (22,23).

1.1.4 Indol

1.1.4.1 Características químicas

El indol o benzopirrol es un heterocíclico bicíclico aromático, cuyo anillo bencénico está fusionado con un anillo pirrólico (Figura 1) (24). Se considera un ácido al estar presente un hidrógeno unido a un nitrógeno. El indol es producido por más de 85 especies de bacterias y está implicado en múltiples procesos de señalización, pues funciona como señal de detección (25). Aunque, aún no se confirma la expresión de un receptor para el indol (26).

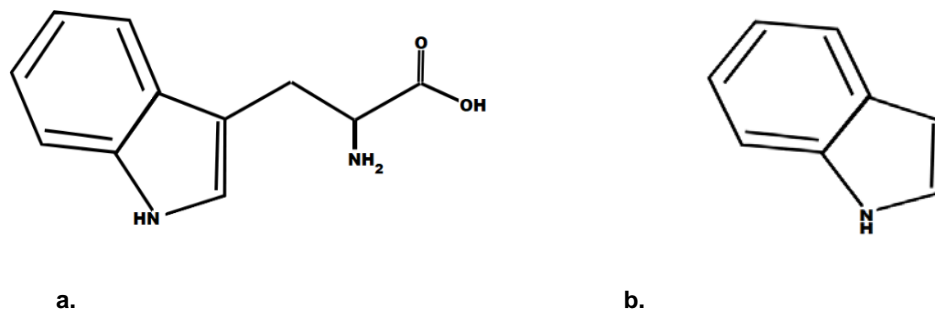


Figura 1. Estructuras químicas del triptófano y el indol. a) Estructura del triptófano, b) Estructura del indol

1.1.4.2 Metabolismo del indol en *E. coli*

El indol es generado a partir de la actividad de la triptofanasa (TnaA), cuando el triptófano es incorporado a las bacterias del medio ambiente; (27) generando también en esta reacción piruvato y amoníaco. La TnaA utiliza fosfato piridoxal como cofactor. La expresión de TnaA requiere de AMP cíclico y se incrementa por la presencia de los aminoácidos como el triptófano y la cisteína, el estrés alcalino y la reducción del grupo hemo. Asimismo, la expresión de TnaA es suprimida por la glucosa, el piruvato y el acetato (26).

Se estima que *E. coli* produce 500 μM de indol durante su crecimiento *in vitro* (28), aunque no lo hace de manera constante, ya que en la transición de la fase exponencial a la fase estacionaria la concentración puede multiplicarse hasta 5 veces en 30 minutos. Durante este periodo el indol es producido más rápido de lo que puede salir de la célula, en consecuencia se produce un aumento rápido pero de corta duración. En este punto la concentración alcanza los 60 mM; este fenómeno es descrito como “pulsos de indol”. El efecto del pulso es hacer que *E. coli* tipo silvestre entre en fase estacionaria a una densidad inferior al de las cepas no productoras de indol, de este modo se conservan los recursos de supervivencia de la bacteria, mejorando su viabilidad durante esta fase (25).

1.1.4.3 Funciones del indol en *E. coli*

El indol tiene diferentes funciones en la fisiología bacteriana, desempeñando un papel importante en la formación de biopelículas, virulencia, estabilización de plásmidos, formación de esporas, resistencia a los ácidos, respuesta al estrés y la formación de células persistentes, es decir, una subpoblación menor al 1% de células isogénicas (26).

Con respecto a la tolerancia a un pH ácido, se ha mostrado que la adición de indol reprime el gen de resistencia al ácido del glutamato descarboxilasa *gadABC* de 2 a 4 veces; *GadABC* está regulado por *GadE* que protegen a *E. coli* de un pH menor o igual a dos, permitiendo la colonización del tracto gastrointestinal por esta bacteria. También, otros genes conocidos de resistencia al ácido y *hdeABC* (funcionan como chaperonas para prevenir la agregación de proteínas periplásmicas en condiciones altamente ácidas) fueron reprimidas entre 3-5 veces por el indol, lo que sugiere que el indol disminuye la resistencia al ácido (29). Asimismo, concentraciones de 4-5 mM de indol exógeno añadido en un cultivo de *E. coli* inhibe de forma reversible el crecimiento y la división celular debido a que actúa como un ionóforo de protones, reduciendo la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana citoplasmática e impidiendo el funcionamiento correcto del sistema *MinCD*, *MinC* y *MinD* que son una familia de proteínas cuya sobreexpresión da lugar a un bloqueo de división celular (25).

Por otro lado, la disminución de las concentraciones de indol favorece la patogénesis bacteriana, pues al ser producido por la microbiota está presente en el intestino, principalmente en el lumen, además de ser absorbido por las células epiteliales para mejorar la función de la barrera intestinal; por lo que un daño en este tejido causa diseminación bacteriana, esto sugiere el indol es detectado como señal para que los patógenos se dispersen por el intestino (30).

Un estudio sobre la implicación del indol en la regulación de expresión de genes de virulencia en cepas mutantes de *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC) que carecen de *TnaA* y no producen indol, se observa una disminución de la expresión del locus de borramiento de enterocitos (LEE), esencial para que estos patógenos formen lesiones de adhesión y borrado (A/E) en los enterocitos; dichas lesiones se

caracterizan por la disrupción de las microvellosidades y la formación de protuberancias llenas de actina o "pedestales" debajo de la bacteria adherida. La adición exógena de 500 μ M de indol en EHEC mutantes y silvestres disminuyó la expresión de genes de virulencia, así como la formación de A/E, además, no se modificó el crecimiento o viabilidad de las bacterias. Asimismo, concentraciones altas de indol (5mM), es decir, 15 veces más de la producida fisiológicamente por *E. coli*, tuvo efectos inhibitorios sobre el crecimiento (28,31).

El indol induce diversos genes exportadores de xenobióticos, incluidos *acrD*, *acrE*, *cusB*, *emrK*, *mdtA*, *mdtE* y *yceL*, que desempeñan un papel importante en la tolerancia intrínseca bacteriana frente a diversos fármacos y compuestos tóxicos; se ha comprobado que el tratamiento con indol en *E. coli* confiere resistencia a rodamina 6G y SDS por medio de la inducción de *mdtE* y *acrD* respectivamente (32). También se ha demostrado que la supervivencia de un mutante *tnaA* de *E. coli* BW25113, tras exposición a la kanamicina se redujo en comparación con la de tipo silvestre, que se multiplicaba 30 veces en presencia de indol; por otra parte, la exposición a niveles crecientes de norfloxacina en *E. coli* el indol confirió tolerancia al antibiótico ya que se inducen bombas de eflujo de fármacos y mecanismos de protección contra el estrés oxidativo en los patógenos, conduciendo a una mayor supervivencia de los patógenos más susceptibles (27).

Cuando *E. coli* interacciona con los antibióticos, algunas células son lisadas y protegen a la mayoría de las células proximales liberando indol como molécula de señalización de defensa, induciendo la expresión de genes exportadores de múltiples fármacos y aumentando la resistencia a los antibióticos en las bacterias de *E. coli*, *Salmonella* y *Pseudomonas* (26).

II. ANTECEDENTES

2.1 Efecto del indol sobre la producción de biopelículas

La biopelícula es una comunidad de bacterias adheridas a una superficie tanto biótica como abiótica, la cual, se apoya en una matriz compuesta por sustancias poliméricas extracelulares, los cuales se conforman de ácidos nucleicos, proteínas, lípidos y otras biomoléculas; además contiene canales que permiten el paso de agua, oxígeno y nutrientes (33,34). Las biopelículas crean entornos particulares que confieren tolerancia y resistencia bacteriana a antibióticos mediante diversos mecanismos dependientes de factores como la composición de la biopelícula, arquitectura, fase de desarrollo y condiciones de crecimiento; por lo que la estructura de la biopelícula dificulta la penetración de antibióticos e impide la acumulación de concentraciones bactericidas en toda la biopelícula. En general, la biopelícula confiere muchos beneficios a las bacterias contenidas en ella, incluida la recalcitrancia colectiva; término que se define como “la capacidad de las biopelículas patógenas para sobrevivir en presencia de altas concentraciones de antibióticos”. Es por esto que las biopelículas son reconocidas como reservorios de genes de resistencia a los antibióticos (35).

Diversas evidencias sugieren que la formación de biopelícula está regulada por una compleja cascada de reguladores denominada “quorum sensing o autoinducción”; que se refiere a un mecanismo regulador dependiente de la acumulación en el ambiente de una molécula de señalización, el auto inductor, permite a la bacteria percibir la densidad de población existente; en las bacterias Gram negativas el principal auto-inductor es la acil-homoserina-lactona; existen factores que facilitan la adherencia de bacterias adicionales, como son las sustancias poliméricas extracelulares (SPE), que también promueven la cohesión célula-célula (incluido el reconocimiento entre especies) para facilitar la aglomeración microbiana; otras interacciones interespecíficas dependen de mecano-sensores o pares específicos de adhesinas (proteínas) - receptores (sacáridos). Los SPE que se forman en el lugar de adhesión forman una matriz polimérica inicial que promueve la colonización microbiana y la agrupación de células, la producción continua de SPE *in situ*

expande la matriz tridimensionalmente mientras se forma un núcleo de células bacterianas, dicho núcleo funciona como apoyo, facilitando el desarrollo de grupos y agregados en 3D, finalmente algunas bacterias de la matriz se liberan de la biopelícula para colonizar nuevas superficies concluyendo el proceso de desarrollo (33,36).

Actualmente no hay algún fármaco con un mecanismo de acción sobre la biopelícula, por lo que se han estudiado sus mecanismos de inhibición; uno de ellos demostró que la interrupción del gen *tnaA* genera una bacteria mutante que disminuye significativamente la formación de biopelícula en el medio LB, posteriormente se evidenció que la inactivación de la enzima triptofanasa con un inhibidor competitivo (oxindolil-L-alanina) afecta la formación de biopelículas sin afectar el crecimiento bacteriano, pero la suplementación con indol exógeno a una concentración de 625 μ M restablece la formación de biopelículas en un 83.8% (37). Por el contrario, la adición de indol exógeno a una concentración de 500 μ M disminuye la formación de biopelículas en *E. coli* K-12 cultivada en medio LB suplementada con 0.2 % de glucosa; ya que, en presencia de glucosa los niveles de indol se reducen como resultado de la inhibición de la enzima TnaA, sin afectar la formación de biopelícula en este medio (27).

El efecto del indol es muy variable en la formación de biopelículas ya que depende de la concentración y es específico de cada cepa (38).

En *E. coli* y *Pseudomonas*, la tolueno *o*-monooxigenasa está muy expresada y participa en la oxidación del indol; un cambio en la concentración de indol (hasta 60 mM de forma transitoria en la fase estacionaria, debido a una mayor producción y no debido al aumento de bacterias) afecta la formación de biopelículas de las dos especies; así, las bacterias no productoras de indol contrarrestan los efectos del indol exógeno y eliminan el estrés inducido por el indol. Cabe mencionar que *P. aeruginosa* degrada el triptófano en antranilato, no en indol, debido a la falta de TnaA, por lo cual, el indol puede antagonizar el efecto del antranilato en la formación de biopelículas porque activa los genes implicados en la degradación del antranilato. Si las bacterias no productoras de indol no logran degradar o metabolizar el exceso

de indol, los mecanismos de defensa como las chaperonas y las proteasas, se activan para proteger a la célula (26).

En *E. coli*, el aumento de la formación de biopelícula está ligado con la expresión diferencial de genes relacionados con la respuesta al estrés, de 17 a 26 genes relacionados con el indol se expresan de manera diferencial, incluyendo Mtr (codifica una proteína implicada en la importación de indol) y AcrEF (codifica proteínas para la exportación de indol) así como la señalización a través de indol. Las lactonas de acil-homoserina (AHL), el autoinductor-2 (AI-2) y el indol influyen en la formación de biopelículas, sin embargo, SdiA es necesaria para que *E. coli* controle su formación de biopelícula, así como para ejercer su señalización, por tanto, SdiA detecta AHL de otras bacterias para controlar la formación de biopelículas, y la señalización de indol requiere de la proteína de detección de quórum SdiA; sin embargo, a diferencia de la señalización de AI-2, la señalización de indol se detecta principalmente a temperaturas inferiores a 37°C (39).

El indol y los compuestos químicamente relacionados como indol-3-carboxaldehído (ICA) y ácido indol-3-acético (IAA) (producidos por EPEC, EHEC y *E. coli* comensal) son moléculas que reducen la patogénesis, virulencia, motilidad, formación de biopelículas y producción de toxinas Shiga; se ha demostrado que concentraciones mayores a 1 mM de indol, ICA e IAA causan tal efecto, el cual fue corroborado aislando en agar blando cepas de EHEC 3023 y EAEC 2071, 3493, el ICA suprimió la formación de biopelícula con mayor efecto en EAEC 3493, además, el indol y el ICA lograron reducir la motilidad de todas las cepas. En general, estos compuestos afectan diversas propiedades fisiológicas que contribuyen a la virulencia de EAEC y EHEC, por lo que se consideran prometedores agentes terapéuticos (31).

2.2 Efecto de la dispersina sobre la inhibición de EAEC

EAEC se caracteriza por expresar en la superficie a una proteína denominada dispersina, esta proteína facilita la penetración de la capa de mucosa intestinal; en la actualidad dicha proteína se ha detectado en otros tipos patógenos de *E. coli* (22). La dispersina es un componente abundante e inmunogénico en las cepas de EAEC, sugiriendo que puede prevenir infecciones causadas por dicha cepa; además esta

proteína presenta algunas regiones conservadas que sirven como antígenos de diagnóstico. Se ha demostrado el efecto del anticuerpo anti-dispersina con respecto a la inhibición de los aislados de EAEC indicando que, en ausencia del anticuerpo anti-dispersina los aislados de EAEC tuvieron una gran tendencia a adherirse a las células HeLa, pero, en presencia del anticuerpo anti-dispersina la mayoría de los aislados de EAEC demostraron una disminución de la adherencia a las células; por esta razón se considera como un antígeno candidato a vacuna para prevenir la infección por EAEC (21).

Por otra parte, se sabe que el antibiótico de elección para las infecciones por EAEC es la ciprofloxacina, el cual es un antibiótico de amplio espectro que interactúa con la ADN girasa o topoisomerasa IV, inhibiendo la síntesis de ADN; sin embargo, se ha demostrado que la dispersina desempeña un papel fundamental en la susceptibilidad de la cepa 042 EAEC a dicho fármaco. Se examinó la concentración mínima inhibitoria de 25 aislados de EAEC demostrando que 15 aislados que codificaban dispersina eran más sensibles a la ciprofloxacina en comparación con los aislados no codificantes para dispersina; sugiriendo que la dispersina desempeña un papel importante en la sensibilidad a la ciprofloxacina; es importante mencionar que la dispersina no altera la afinidad entre las bacterias y el antibiótico, sino que facilita el paso de la ciprofloxacina a través de la membrana externa bacteriana (40).

2.3 Efecto del indol sobre la inhibición de genes de virulencia

La microbiota intestinal coordina comportamientos mediante la detección de señales provenientes del huésped o de las bacterias, el indol derivado de la microbiota es altamente prevalente en el lumen comparado con el tejido intestinal; esta diferencia de concentración de indol es un punto clave para modular la expresión de genes de virulencia de patógenos entéricos. El indol disminuye la expresión de los genes de patogenicidad del LEE, el cual es esencial para que estos patógenos formen lesiones de adhesión y borrado en los enterocitos. Se ha demostrado que la disminución de las concentraciones de indol favorece la patogénesis bacteriana,

mientras que un aumento en los niveles de indol disminuye la expresión de los genes de virulencia; los patógenos entéricos perciben un gradiente de la concentración de indol en el intestino para probar diferentes nichos y establecer con éxito una infección (28).

Como se ha mencionado, el indol es producido por diversas bacterias, entre ellas *Vibrio cholerae*, bacteria Gram negativa, que, coloniza el intestino delgado donde produce factores de virulencia como toxina reguladora del pili (TCP) y toxina del cólera (CT); la expresión de estos genes de virulencia está bajo control de *ToxR*. Se ha demostrado que el indol en esta bacteria contribuye a la represión de su virulencia durante la infección; en presencia de concentraciones crecientes (0.25 - 1 mM) de indol, se muestra una disminución dependiente de la dosis de indol en la producción de CT y TCP a partir de 0.25 mM de indol. La producción de CT se redujo en un 65% a 0.5 mM y 80% a 0.75 mM; la producción de CT y TCP quedó inhibida a 1 mM de indol, por lo que se concluye que el indol es un inhibidor de la virulencia (41).

En el caso de *Listeria monocytogenes*, bacteria Gram positiva; la cual percibe señales del entorno o del huésped para modular la transcripción de genes de respuesta al estrés asociados a la virulencia o genes reguladores; la señalización indólica reprime la motilidad, la producción de exopolisacáridos y la formación de biopelícula. Un estudio demostró el efecto del indol sobre la inhibición de genes de virulencia en esta bacteria, el cual utilizó una concentración de indol que no afectara el crecimiento (0.5 mM). Las bacterias se cultivaron con y sin tratamiento de indol, los resultados demuestran la reducción significativa de todos los genes asociados a la flagelos *flaA* (42%), *flil* (46%), *motB* (48%), y *gmaR* (77%) y genes asociados a la formación de biopelícula (42).

También se ha demostrado que algunos derivados de indol son capaces de regular algunos factores de virulencia en cepas patógenas de *E. coli*, tal es el caso de EPEC, donde una concentración de 50 μ M de indol activa la expresión de sus genes de virulencia, sin embargo, a concentraciones más altas (>1mM) el indol, ICA e IAA inhibieron la expresión de sus genes de virulencia (31).

III. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Las enfermedades diarreicas pueden producirse por diversos factores, siendo la bacteriana la causa más frecuente en un 39% (43); recientemente, en México, niños identificados con diarrea por EAEC requirieron hospitalización, en la Ciudad de México EAEC provocó 16 hospitalizaciones, en Yucatán provocó 56, mientras que en Sinaloa provocó 126; afortunadamente de ningún paciente se reportó su deceso, sin embargo, las secuelas generadas por esta infección, conllevan a la disminución de absorción de nutrientes, y por ende, desnutrición (5). Los tratamientos en muchas ocasiones suelen ser económicamente elevados; por lo que buscar otras alternativas de tratamientos a bajo costo, pero con efecto curativo o paliativo es una opción viable.

EAEC al igual que otras enterobacterias Gram negativas, se presenta con diarrea acuosa secretora, a menudo con mucosidad, y, puede ir acompañada de fiebre, náuseas, vómitos, dolor abdominal, y ocasionalmente heces con sangre (7). Este microorganismo presenta diversos factores de virulencia, siendo los principales: fimbrias, dispersina y formación de biopelícula. La dispersina es una proteína que permite la adhesión de la bacteria con la mucosa intestinal favoreciendo su dispersión en el epitelio intestinal (21). Se sabe que el indol es producto del metabolismo del triptófano en algunas bacterias, incluyendo *E. coli*, sin embargo, agregar indol de manera exógena ha demostrado interrupciones en la fisiología de la bacteriana.

Debido a ello, surge la siguiente pregunta de investigación: ¿El indol exógeno modifica la expresión de genes de virulencia en EAEC?

IV. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades diarreicas son las principales causas de morbilidad y mortalidad y mortalidad a nivel mundial, siendo *E. coli* uno de los patógenos más importantes. Las cepas de *E. coli* asociadas con la aparición de diarreas se han dividido en 6 tipos, siendo EAEC la bacteria que ocasiona la aparición de diarrea acuosa aguda o persistente con mayor prevalencia en viajeros. En México la transmisión más

común es a través de los alimentos, y el ser humano puede ser portador de EAEC, además, la resistencia a múltiples fármacos se ha extendido, por lo que es de suma importancia en la salud pública. Al igual que otras enterobacterias Gram negativas, EAEC contiene diversos factores de virulencia que incluyen la adhesión mediada por fimbrias, la dispersina (proteína unida a la membrana externa de la bacteria implicada en la dispersión en la mucosa intestinal y facilita la penetración de la capa del moco intestinal) y la formación de biopelícula. La expresión de los mecanismos de virulencia bacteriana se puede modificar en función del entorno ambiental, así como los relacionados con su metabolismo. El indol es producto del metabolismo bacteriano implicado en las respuestas a factores estresantes como antibióticos, cambios de pH, calor y especies reactivas de oxígeno. Actualmente no hay evidencia acerca del conocimiento del indol exógeno sobre los factores de virulencia de EAEC. Por lo tanto el presente estudio proporciona información sobre el efecto del indol en la expresión de genes de virulencia a nivel de fimbrias y de dispersina relacionadas con su capacidad de adherencia que favorece la colonización intestinal y la aparición de diarrea en el ser humano. Este trabajo brinda las bases sobre la modulación de los mecanismos de patogenicidad dependientes del indol exógeno para investigaciones futuras.

V. HIPÓTESIS

Ha: La adición de indol exógeno modifica la expresión de genes de virulencia afectando la capacidad de adherencia de EAEC.

H0: La adición de indol exógeno no modifica la expresión de genes de virulencia, por lo que no afecta la capacidad de adherencia de EAEC.

VI. OBJETIVOS

6.1. Objetivo General

Analizar el efecto del indol exógeno sobre la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enteroagregativa.

6.2. Objetivos Específicos

1. Determinar el efecto del indol sobre la expresión de los genes fimbriales AAF/II y la dispersina por RT-PCR en *E. coli* enteroagregativa.
2. Evaluar la formación de biopelícula mediante el método de tinción de cristal violeta en *E. coli* enteroagregativa en presencia de indol.

VII. MATERIAL Y MÉTODO

7.1 Contexto de la investigación

Para realizar los ensayos correspondientes a este estudio, hubo una previa aprobación por parte del Comité de Ética e Investigación del ICSa con folio 055/2022.

Los experimentos se llevaron a cabo en el laboratorio de la Unidad de Investigación en Enfermedades Infecciosas del Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional siglo XXI, CDMX, en el periodo de marzo 2022 - septiembre 2022.

7.2 Tipo de estudio

El proyecto de investigación es de tipo cuantitativo ensayo experimental transversal, ya que se determinó el efecto del indol sobre los factores de virulencia de EAEC, además se evaluó la expresión de genes virulentos mediante RT-PCR en presencia de indol, de esta manera se determinó si los efectos eran significativos o no.

7.3 Variables

Variable	Tipo de variable	Definición conceptual	Definición operacional
Expresión de fimbrias	Dependiente, cuantitativo continuo	Son organelos adhesivos con estructura piliforme característicos de las bacterias Gram negativas, se localizan en la parte externa de las bacterias, pudiéndose encontrar distribuidos en toda su superficie o solamente en los polos	RT-PCR (Fold-Change)
Expresión de dispersina	Dependiente, cuantitativo continuo	La dispersina es una pequeña proteína que consta de epítomos N-terminales y carga positiva	RT-PCR (Fold-Change)
Formación de biopelícula	Dependiente, cualitativa nominal	Comunidad de bacterias asociadas con la superficie y encerrada en una matriz extracelular que presenta distintos fenotipos a los de las células que flotan libres (planctónicas)	Tinción cristal violeta (Nanómetros)
Indol	Independiente, cuantitativa discreta	Es un heterocíclico bicíclico aromático, cuyo anillo bencénico está fusionado con un anillo pirrólico.	μM

Tabla 2. Variables

7.4 Muestra

En este estudio se trabajó con un muestreo no probabilístico intencional y el número de experimentos se realizó en dos ensayos independientes por triplicado.

7.4.1 Cepa bacteriana

Para el desarrollo del presente estudio se empleó la cepa de 042 de *E. coli* enteroagregativa serotipo O44:H18, la cual fue aislada de un paciente infantil con diarrea en el curso de un estudio epidemiológico en Lima, Perú en 1983. No todas las cepas de EAEC provocan diarrea, sin embargo, la 042, que causó diarrea en un estudio con voluntarios se convirtió en la cepa EAEC prototípica para el estudio de los factores de virulencia y la patogenicidad de EAEC (4).

7.5 Criterios de selección

Inclusión:

- Cepa 042 de EAEC.
- Bacterias que forman agregados en células HEp-2 o HeLa
- En agar E.M.B (eosina y azul de metileno), forman colonias de 2 a 4 mm de diámetro, con un centro grande de color oscuro y brillo verde metálico reflejan la luz. En agar MacConkey las colonias se observan color rojo con halo turbio.

Exclusión:

- Distinta coloración de las cepas en medio de cultivo E.M.B o MacConkey.

Eliminación:

- Bacterias que no se desarrollan en medio de cultivo.

7.6 Diagrama experimental

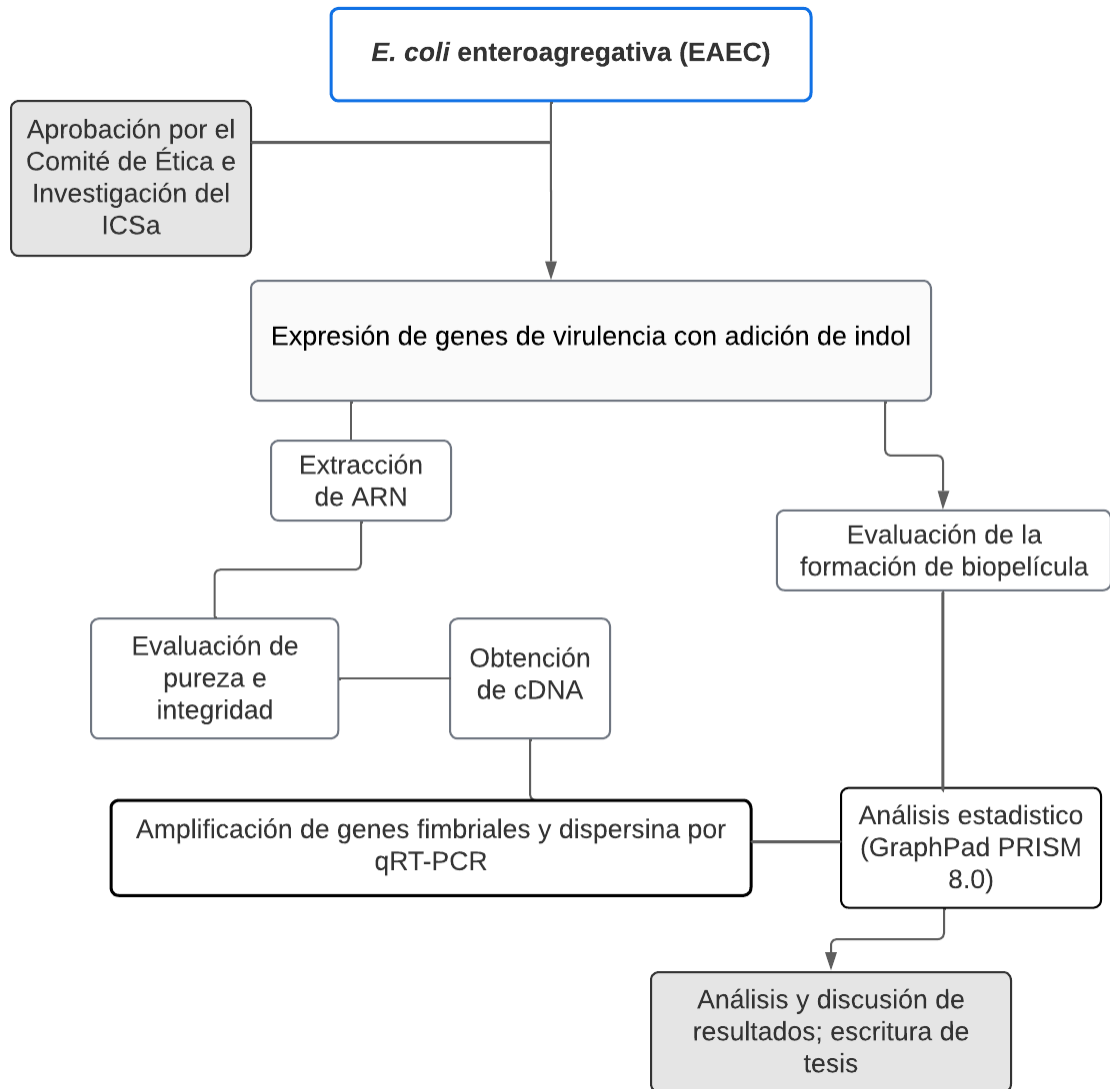


Figura 2. Diagrama experimental

7.7 MÉTODOS

7.7.1 Determinación de la expresión genética relativa mediante qRT-PCR

Fundamento: La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de ADN durante varios ciclos repetidos, es decir, la secuencia blanco es copiada fielmente. La

reacción aprovecha la actividad de la enzima ADN polimerasa que tiene la capacidad de sintetizar naturalmente el ADN en las células; en la qRT-PCR se utiliza un ADNc, proveniente del ARNm, esta conversión se logra mediante una reacción conocida como transcripción reversa, capaz de convertir el ARNm en una molécula de ADNc; este método es efectivo para detectar y cuantificar ácidos nucleicos (44).

Procedimiento: Este método descrito por Livack *et al.* (45) se utilizó para determinar la expresión genética en unidades de expresión relativa mediante la aplicación de la fórmula matemática $2^{-\Delta CT}$. La ΔCT se determinó al restar el valor de CT (“crossing treshold”) del gen en estudio al valor CT del gen rRNA 16S (*rrsH*), el cual es el gen normalizador. Los valores obtenidos se multiplicaron por un mismo factor con la finalidad de que el resultado obtenido sea mayor o igual a 1.

Extracción ARN total

El ARN total se extrajo de bacterias EAEC cultivadas con y sin indol a partir de dos ensayos independientes de acuerdo con el método descrito por Jahn *et al.*, (46) modificado por Ares, 2012 (47).

A partir de una muestra preservada en glicerol a -70°C se realizó un overnight de la cepa EAEC 042 O44:H18, tomando un inóculo de 100 μl de la muestra en 5 ml de medio LB e incubando durante 12 h a 37°C en agitación constante denominándose cultivo A. Posteriormente, se tomaron cuatro frascos estériles con 10 ml de medio DMEM en los que en 2 de ellos se adicionó (10 μl del cultivo A, 10 μl de indol a una concentración de 100 mM, y al otro 10 μl de metanol absoluto); en los otros 2 frascos se le adicionó (10 μl del cultivo A; 10 μl de indol a una concentración de 100 mM y al otro 10 μl de metanol absoluto), enseguida se incubaron de 4-6 horas hasta alcanzar una densidad óptica de 0.800. Transcurrido el tiempo de incubación, se tomaron tubos de 12 ml cada uno y fueron centrifugados durante 10 minutos a 5000 rpm, finalmente se decantaron conservando la pastilla a la que posteriormente se le agregó 500 μl de solución de lisis que contiene (SDS 10%, $\text{C}_2\text{H}_3\text{NaO}_2$ 1M, EDTA 0.5M) y se resuspendió.

Para lisar a las células se realizaron 3 ciclos de agitación y temperatura usando vórtex-hielo por 30 segundos. Posteriormente las células se transfirieron a tubos

cónicos nuevos con 500 µl de fenol-ácido (Sigma®) (previamente calentado) agitando con vórtex por 30 segundos, luego los tubos se incubaron durante 5 minutos a 65°C con agitación en ThermoMixer®. Tras finalizar la incubación se centrifugaron a 14000 rpm durante 5 minutos a 4°C. A partir de este tiempo las muestras se mantuvieron en hielo y se transfirió su fase acuosa a un tubo de 1.5 ml eppendorf limpio, donde se agregó 1 ml de etanol absoluto frío, se agitaron por 10 segundos y enseguida se incubaron durante 30 minutos a -70°C para precipitar el ARN.

Posteriormente las muestras fueron centrifugadas a 14000 rpm por 10 minutos a 4°C, se decantaron luego se añadió 1 ml de etanol al 70% frío, se agitaron y centrifugaron a 12000 rpm por 2 minutos a 4°C (este paso se realizó 3 veces). En el último paso de decantación la pastilla se secó en un Concentrador Eppendorf®, 5301 durante 15-20 minutos. Después se añadieron 80 µl de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC al 0.1%) en área de esterilidad y luego se resuspendió por 10 minutos. Finalmente, se cuantificó el ARN utilizando un equipo NanoDrop (ND-1000; Thermo Fisher Scientific), iniciando con la limpieza y calibración, para lo cual, al lector se le agregaron 2 µl de H₂O estéril, se secó y por último se colocaron 2 µl de la muestra para realizar la cuantificación.

Tras la cuantificación, se continuó con la purificación del ARN utilizando el kit Turbo DNA-free (Ambión, INC.). A las muestras se les adicionaron 10 µl de Buffer de DNAsa turbo 10x (Ambión, INC. cat AM1907) y 1 µl de DNAsa turbo 10x (Ambión, INC.), mezclando suavemente e incubando a 37°C durante 30 minutos, posteriormente se adicionaron 10 µl del reactivo de inactivación de la DNAsa, enseguida se mezclaron para incubar durante 5 min a temperatura ambiente con agitación constantemente para luego ser centrifugadas a 10000 rpm por 5 min. Se transfirieron aproximadamente 80 µl de la fase acuosa a un tubo eppendorf de 1.5 ml.

Para medir la pureza e integridad del ARN se realizó una electroforesis, para lo cual, en un matraz Erlenmeyer se agregaron 50 ml de (TAE 1X) y gel de agarosa al 1%, enseguida se calentó hasta obtener una apariencia transparente, se dejó enfriar y se agregó cloro al 1%; posteriormente la mezcla fue transferida a otro matraz

Erlenmeyer y se le adicionó 1.5 µl de bromuro de etidio (0.5 µg/ml), luego se vació en un molde para electroforesis dejando gelificar. En una placa se combinaron 1 µl de azul de bromofenol 1% y 4µl de ARN para agregarlas en los pozos y se realizó la electroforesis a 120 volts por 45 min. Finalmente las muestras se guardaron en tubos eppendorf a -70°C.

Obtención de cADN mediante transcripción reversa del ARN total

La PCR en tiempo real se realizó en el termociclador LightCycler 480 (Roche), el cual cuenta con un sistema de detección fluorocromo SYBR® Green I. (42) Para el procedimiento se utilizó una placa de 96 pozos para realizar la reacción correspondiente:

Tabla 3. Mezcla de reactivos qRT-PCR

Reactivo	Cantidad
Agua de grado PCR	2.0 µl
Cebador directo	0.5 µl (10 µM)
Cebador inverso	0.5 µl (10 µM)
2x Master Mix	5 µl
cDNA	2.5 µl

La mezcla de las reacciones se colocó en cada pozo de la placa, la cual se selló con un pedazo de plástico adherente, la amplificación se realizó por triplicado en 2 ensayos independientes. El programa aplicado a la placa fue el siguiente: desnaturalización 95°C durante 10 s con temperatura de alineamiento de 58°C durante 10 s y de 72°C durante 10 s, con un ciclo posterior de 95°C durante 5 s a una velocidad de 4.4 °C/s, 65°C durante 1 min a una velocidad de 2.2 °C/s y 97°C durante 5 s (se mide la fluorescencia en forma continua para construir curva de disociación) y un ciclo de enfriamiento a 40°C durante 10 s.

7.7.2 Evaluación de la formación de biopelícula

Fundamento: La cuantificación de biopelícula se llevó a cabo de acuerdo al método descrito por primera vez por Christensen et al., (48) el cual se basa en una simple

tinción con colorante catiónico como el cristal violeta y registrando la absorbancia en espectrofotómetro.

Procedimiento: Se llevó a cabo de acuerdo a una modificación del método descrito por O'Toole en 2011 (49). Se preparó un overnight de EAEC (5 ml) en medio LB y se dejó incubar a 37°C toda la noche, posteriormente en 12 tubos Eppendorf estériles se agregaron 1100 µL de medio DMEM high glucosa 4.5%, a 8 de ellos se les adicionó 11 µl del overnight, de los cuales 4 fueron marcados como "sin indol" y otros 4 fueron señalados como "indol", a estos últimos también se les adicionó 1.1 µl de indol (500 µM); por último los 4 tubos restantes solo se les adicionaron 11 µl de metanol absoluto, los cuales se marcaron como "blanco". Una vez preparados se agitaron en vórtex; posteriormente, en una placa de 96 pozos se agregaron 200 µL de cada inóculo por octuplicado y se dejaron incubar a 37°C durante 5 horas. Después se retiró el medio de cultivo invirtiendo la placa sobre cloro y se dejó secar la biopelícula; se realizaron 3 lavados con 200 µL PBS 1X y se dejó secar por completo durante 10 minutos; una vez seca la placa se agregaron 100 µl de cristal violeta filtrada al 1% a cada pozo con ayuda de la pipeta multicanal, la placa se dejó teñir durante 10 minutos. A continuación el cristal violeta se retiró y a la placa nuevamente se le realizaron 3 lavados con 200 µl de PBS 1X y se dejó secar. Por último, se agregaron 100 µl de etanol al 70% por 10 minutos y se leyeron las placas en el espectrofotómetro MultiScan Ascent a 595 nm.

7.7 Análisis estadístico

Los resultados fueron analizados comparando la expresión de los genes de virulencia de la cepa de EAEC con y sin indol exógeno, expresándose como el promedio \pm DE de 2 ensayos independientes por triplicado para el análisis de expresión de genes y 2 ensayos independientes por octuplicado para la evaluación

de biopelícula. El análisis estadístico se realizó mediante la prueba de ANOVA de una vía (para la expresión de genes de virulencia en EAEC) y T-student (para la cuantificación de biopelícula); un valor $p < 0.05$ se consideró significativo. Todos los análisis se realizaron utilizando el software estadístico GraphPad PRISM 8.0.

VIII. RESULTADOS

8.1 Expresión genética de los factores de virulencia de EAEC

Como se mencionó anteriormente, la evaluación de los genes de virulencia de la cepa EAEC 042 sin y con indol adicionado a una concentración de 500 μM , se determinaron mediante RT-qPCR empleando un sistema de detección de fluorocromo SYBR® Green I. Los resultados de los genes que codifican para las fimbrias (*aafA*), dispersina (*aap*) y el activador transcripcional (*aggR*) indicaron que tras la adición de indol exógeno, hubo una disminución de la expresión de los tres genes de virulencia en EAEC. La expresión de estos genes puede observarse en la figura 3, donde el gen *aafA* disminuyó 2.56 veces en comparación con la cepa WT EAEC, el gen *aggR* disminuyó 2.07 veces en comparación con la cepa WT EAEC y el gen *aap* disminuyó 2.29 veces en comparación con la cepa WT EAEC.

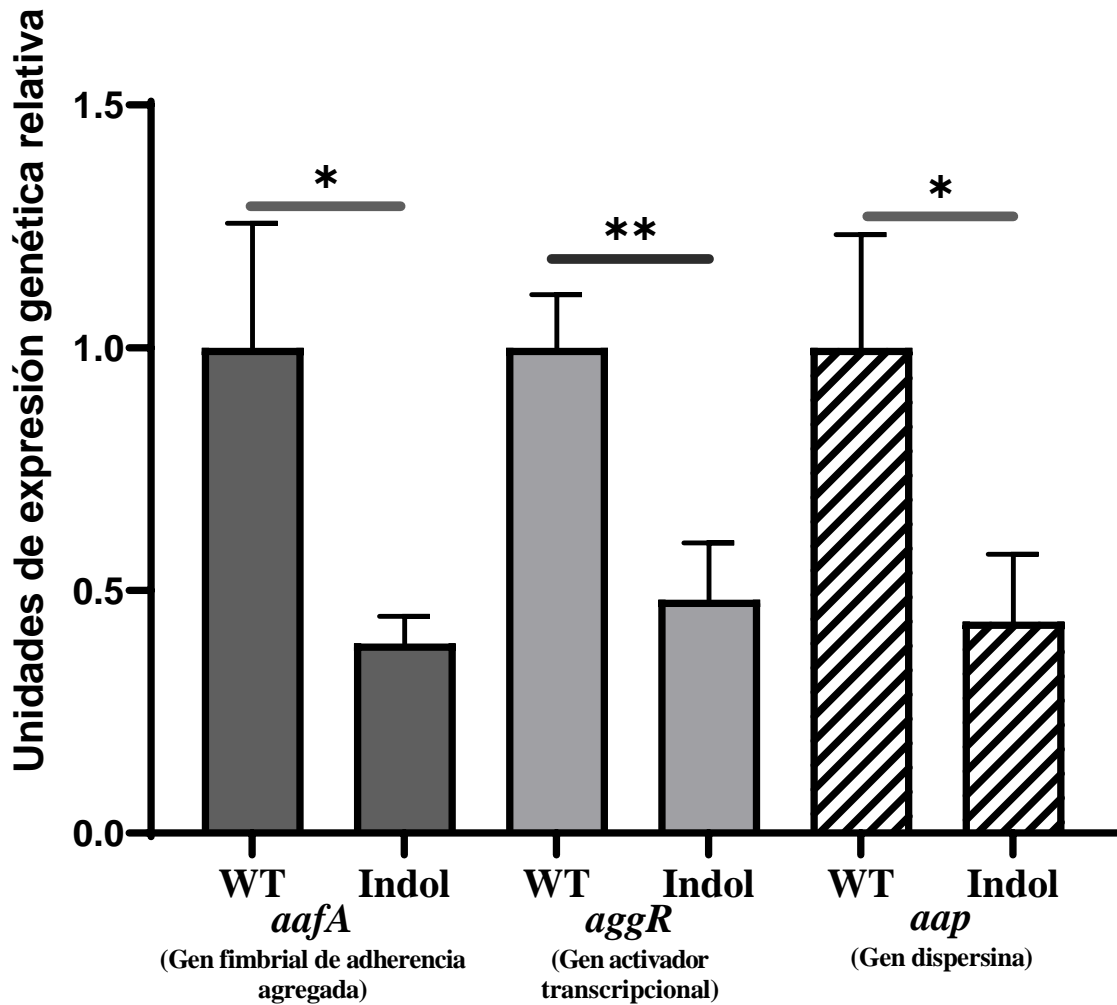


Figura 3. El indol disminuye la expresión genética de los genes de virulencia de EAEC 042 (*aafA*, *aggR* y *aap*). Los resultados se expresan como promedio ± DE d 2 ensayos independientes por triplicado. Se realizó una prueba estadística de ANOVA de una vía, seguido de una comparación múltiple con prueba de Tukey's * $p < 0.0001$, ** $p = 0.0001$ diferencias estadísticamente significativas respecto a la cepa WT EAEC.

8.2 Cuantificación de la formación de biopelícula

La capacidad de formación de biopelícula de la cepa EAEC 042 en presencia de indol a una concentración de 500 μM se determinó mediante la técnica cristal violeta, y la cuantificación se realizó espectrofotométricamente a 595 nm. La formación de biopelícula se redujo casi a la mitad en comparación con la cepa WT EAEC 042, la cual se observa en la figura 4.

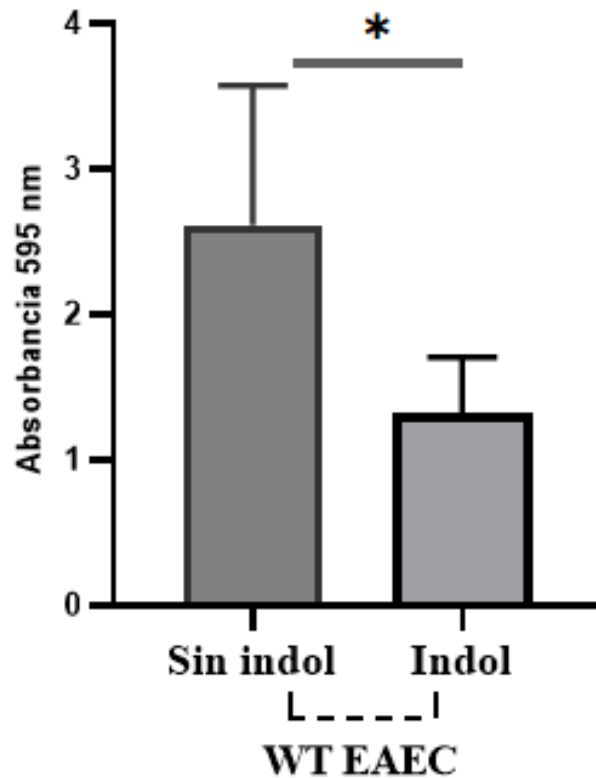


Figura 4. El indol disminuye la capacidad de formación de biopelícula en comparación con la cepa EAEC 042. Los resultados muestran el promedio \pm D.E. de 3 ensayos independientes por octuplicado. Se realizó la prueba estadística de T-student; $*p < 0.0001$ mostrando diferencias significativas respecto a la cepa que no contiene indol

IX. DISCUSIÓN

El indol es un compuesto que se genera a través de la desaminación del triptófano, reacción llevada a cabo en numerosas bacterias. Recientemente sus funciones biológicas han comenzado a evidenciarse en diversos estudios mostrando que el indol controla diversos aspectos de la fisiología bacteriana, que incluyen la formación de esporas, la estabilidad de plásmidos, la resistencia a medicamentos, la formación de biopelículas y la virulencia (50).

Por lo que para evaluar su efecto sobre los factores de virulencia de EAEC se cuantificó la expresión genética de los genes *aafA*, *aap*, *aggR*, así como la formación de biopelícula.

En este estudio se utilizó una concentración de indol, considerando la producción fisiológica de indol en la bacteria, previamente se ha demostrado que *E. coli* produce 500 μM de indol en medios de cultivo, por ende, esta concentración no afecta el crecimiento bacteriano; además dicha concentración en indol sintético se ha ensayado en estudios previos debido a que no resulta tóxica para otras bacterias no productoras de indol como *Staphylococcus aureus* (28,42).

El indol reduce la expresión genética fimbrial y de dispersina en EAEC

El indol es un metabolito que participa en la comunicación de bacteriana mediante la regulación de genes como *astD*, *tnaB*, y *gabT* en respuesta a condiciones ambientales adversas. (30) Para determinar el efecto del indol sobre los genes de virulencia se evaluó la expresión de los genes de *aggR*, *aafA* y *aap* mediante RT-PCR en EAEC. En el presente estudio observamos que tras adicionar 500 μM de indol, la expresión de *aggR* disminuyó 2.07 veces respecto a la WT-EAEC. Es importante mencionar que AggR activa la expresión de genes de virulencia que codifican para AAF/II, la dispersina y su medio de exportación, proteína reguladora Aar y sistema de secreción tipo VI (T6SS), y algunas proteínas aún no identificadas (51). Similares estudios coinciden con lo descrito anteriormente, aunque han utilizado concentraciones de 1 mM de indol se ha observado una disminución significativa del gen *hilA* (regulador maestro de la isla de patogenicidad-1 de *Salmonella*), asimismo, disminuye la expresión de genes estructurales de secreción

de tipo III que son activados por HilA (52). También se ha mostrado en *Vibrio cholerae* que 1 mM de indol disminuye la expresión del regulón de virulencia ToxR y ToxT que a su vez activa los genes implicados en la expresión de la toxina reguladora del pili (TCP) y la toxina del cólera (CT) (41). Aunque aún no se ha establecido el mecanismo por el cual el indol inhibe los genes de virulencia, se sugiere que este efecto se da a partir de los regulones de las bacterias anteriormente mencionadas, creando una interrupción en su proceso de transcripción; en el caso de *hilA* pertenece a la familia de OmpR-ToxR que activa directamente a InvF, el cual es un regulador transcripcional similar a la familia AraC. Se ha demostrado que cambios en el entorno bacteriano alteran la expresión de los genes de invasión de *hilA* (53).

Por otra parte, ToxT, al igual que AggR e InvF, pertenece a la familia AraC de activadores transcripcionales que tiene dos motivos hélice-giro-hélice conservados en su extremo carboxilo terminal, siendo los dominios de unión al ADN comunes con otros miembros de la familia. Si bien, estos regulones pertenecen a la misma familia, también comparten el mecanismo de regulación; en este caso, ToxT y AggR están bajo el control de la proteína represora transcripcional H-NS, que además es uno de los principales componentes del nucleoide bacteriano implicado en la condensación y empaquetamiento del ADN así como en la modulación de la expresión génica. Por lo tanto, se sugiere que el indol actúa a partir de esta proteína, desencadenando alteraciones en la expresión de genes controlados por su entorno reprimiendo la transcripción y de esta manera interferir en la formación de complejos abiertos promotores de ARN polimerasa; ya que se ha demostrado que esta proteína silencia la expresión de genes virulentos en múltiples niveles de la cascada reguladora, lo cual concuerda con nuestros resultados donde se observó una considerable reducción de los principales genes de virulencia de EAEC (54).

Por esta razón, en el presente estudio también se evaluó el efecto del indol sobre los genes de fimbriales y de dispersina, en donde observamos que una concentración exógena de 500 μ M de indol disminuyó la expresión de los genes de fimbrias y de dispersina 2.56 veces y 2.29 veces respectivamente en comparación con la cepa WT-EAEC sin indol exógeno. Igualmente, se ha observado que algunos

derivados del indol poseen la capacidad de inhibir genes de virulencia, como es el caso de ICA que suprime la expresión de genes LEE en *E. coli* enteropatógena (EPEC) a una concentración >1mM de indol (31).

Asimismo, se sugiere que un incremento en la concentración de indol extracelular en el tracto gastrointestinal disminuye la expresión de genes que codifican reguladores como GadX y, por lo tanto, reducir la virulencia en el duodeno, ya que el gen *gadX* se encarga de activar los genes de virulencia (29).

Por otra parte *Listeria monocytogenes*, bacteria Gram positiva no productora de indol, también demostró una reducción de sus genes de virulencia del 42% al 77% tras adicionar indol a una concentración de aproximadamente 0.53 mM, dichos genes tiene diversas funciones como la motilidad (*flaA*, *flil*, *motB*), anti represor de genes de motilidad (*gmaR*), síntesis del ácido d-alanil-lipoteicoico (*dltA*), receptor de c-di-GMP (*pssE*), escape del fagosoma del huésped (*hly*), regulador de la respuesta QS (*agrA*), regulación por termo detección de los genes de virulencia (*prfA*), regulación de los genes de respuesta al estrés y de virulencia (*sigB*) y regulación global de genes metabólicos y de virulencia (*codY*) (42).

El indol puede ingresar a la bacteria a través de Mtr permeasa (55) y se exporta por el sistema de eflujo AcrEF al exterior de la célula, aunque aún no se establece una vía de señalización en respuesta al indol, se sugiere que tiene un efecto en los genes *astD* y *gabT*, que participan en la degradación de aminoácidos a piruvato y succinato, considerando el catabolismo de aminoácidos como un factor importante para persistir en una fase estacionaria, por lo tanto el indol desempeña un papel de preparación de las bacterias para un ambiente deficiente en nutrientes cuando el catabolismo de aminoácidos se vuelve importante para producir energía (56).

El indol disminuye la formación de biopelícula en EAEC

Las biopelículas son poblaciones bacterianas que se encuentran dentro en una matriz extracelular, las cuales se adhieren entre sí a superficies tanto bióticas como abióticas, estas muestran alta tolerancia al sistema inmunitario del huésped y causan infecciones persistentes con resistencia al tratamiento con antibióticos; de hecho, cerca del 80% de las infecciones bacterianas en los pacientes están asociadas a biopelículas (38).

La motilidad mediada por flagelos y fimbrias tipo 1 son importantes para el contacto de la superficie celular de *E. coli* iniciando la formación de biopelícula y la propagación bacteriana a lo largo de las superficies; además las interacciones hidrofóbicas entre las células y la superficie abiótica median la unión bacteriana resultando en el desarrollo de biopelículas, por lo tanto, los cambios en los componentes de la superficie celular causados por mutaciones o factores ambientales influyen en el desarrollo de biopelículas (57).

Debido a lo anterior realizamos la evaluación de la formación de biopelícula por medio de la técnica tinción con cristal violeta y tras adicionar indol se demostró que esta disminuyó 1.97 veces en comparación con la cepa WT EAEC. Estos resultados son semejantes a los obtenidos en la cepa de *E. coli* K-12 cultivada en medio LB suplementado con glucosa al 0.2% porque reduce las concentraciones de indol (resultado de la represión catabólica de TnaA) de modo que el indol exógeno mostraría mayor efecto; posteriormente, tras adicionar una concentración de 500 μ M de indol exógeno hubo una disminución en la formación de biopelícula así como un cambio de la arquitectura, la biomasa de la biopelícula se redujo en un 40%, además, también se ha demostrado que el indol a 1 mM disminuye la formación de biopelículas en medio LB a otras cuatro cepas de *E. coli*: ATCC 25404, JM109, TG1 y XL1Blue (27,29).

Es importante recordar que el indol se genera a través de la triptofanasa, codificada por *tnaA*; su transcripción está bajo control del AMP cíclico y la proteína receptora del AMPc, por lo que la represión catabólica es un mecanismo importante para regular la síntesis de indol y formación de biopelículas; (57) dicha importancia puede respaldarse en un estudio realizado a *Fusobacterium nucleatum*, que tras adicionar

indol exógeno a concentraciones de 0.2-1.6 mM de indol hubo un incremento en la formación de biopelícula dependiente de la concentración de indol, esto debido a que *F. nucleatum* no contiene la secuencia que se une a la proteína receptora de AMPc, la cual se encuentra proximal al sitio de inicio de la transcripción del operón *tna* en *E. coli* y se asocia con la expresión de *tnaA*; por lo que la regulación de los operones es diferente en ambas bacterias, siendo una de las posibles causas en la formación de biopelícula (58).

Se ha demostrado que el indol es una señal no tóxica que controla las biopelículas de *E. coli* reprimiendo la motilidad e induciendo el sensor de la señal de detección de quórum autoinductor-1 (SdiA), homólogo de LuxR, factor de transcripción regulado por detección de quórum en *E. coli*, que en otras bacterias controla la regulación génica dependiente de la densidad celular por medio de una lactona homoserina sintetasa, de la cual *E. coli* carece; debido a lo anterior, se sugiere que el indol induce a SdiA, el cual, regula algunos factores de virulencia, principalmente la formación de biopelícula ya que inhibe los genes de quimiotaxis y motilidad como: *sfmA*, *sfmC*, *sfmH*, *flgA*, *yehA*, *yhcA*, *yfcP*, también reprime *tnaA* e induce la exportación de indol a través de AcrEF. Además, el promotor de la división celular *ftsQ2p* es regulado a través de SdiA que a su vez es regulado por el indol. Por lo que también se plantea que el indol disminuye la motilidad a través de su interferencia en la división celular (29). Otro mecanismo para la inhibición de la división celular se debe a que el indol actúa como un ionóforo, disminuyendo la diferencia de potencial eléctrico a través de la membrana citoplasmática y bloqueando el adecuado funcionamiento del sistema de proteínas MinCD, donde, MinD potencia a MinC, quien inhibe la división celular por el inadecuado funcionamiento de la proteína FtsZ la cual inicia la formación del anillo de división en el centro de la célula (25,59).

X. CONCLUSIÓN

Se demostró que la expresión genética de los genes fimbriales, dispersina y regulador activador transcripcional en EAEC fueron disminuidas tras adicionar indol exógeno, por lo que nuestra hipótesis fue comprobada.

Adicionalmente, se evidenció que la capacidad de EAEC para formar biopelícula fue reducida con la adición de indol exógeno, sugiriendo que el indol actúa como molécula de señalización que impacta en su fisiopatología.

XI. PERSPECTIVAS

En base a los resultados obtenidos en este trabajo, se sugieren las siguientes perspectivas

- ❖ Determinar si el indol interacciona con la proteína represora H-NS, la cual regula negativamente a AggR y está asociada con el nucleoide y la proteína Aar (encargada de la autorregulación de AggR).
- ❖ Conocer la concentración de indol que ocasione la muerte celular, sin afectar al huésped ni a bacterias de microbiota.
- ❖ Establecer si indol puede afectar la capacidad de adherencia de EAEC al epitelio intestinal tanto *in vitro* como *in vivo*.
- ❖ Considerar al indol como una nueva alternativa a enfermedades diarreicas causadas por EAEC.
- ❖ Evaluar el efecto de la administración del indol con probióticos como una alternativa de tratamiento en modelos *in vivo*.

XII. REFERENCIAS

1. Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Curr Opin Gastroenterol*. 2005;21(1):4-8.
2. Villaseca J, Hernández U, Sainz-Espuñes T, Rosario C, Eslava C. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Rev Latinoam Microbiol*. 2005;47(3-4):21.
3. Lima AAM, Medeiros PHQS, Havt A. Enteroaggregative *Escherichia coli* subclinical and clinical infections. *Curr Opin Infect Dis*. 2018;31(5):433-9.
4. Chaudhuri RR, Sebahia M, Hobman JL, Webber MA, Leyton DL, Goldberg MD, et al. Complete Genome Sequence and Comparative Metabolic Profiling of the Prototypical Enteroaggregative *Escherichia coli* Strain 042. *PLoS ONE*. 2010;5(1):e8801.
5. Ríos-Muñiz D, Cerna-Cortés JF, Morán-García N, Meza-Segura M, Estrada-García T. *Escherichia coli* enterotoxigénica y enteroagregativa: prevalencia, patogénesis y modelos muridos. *Gac México*. 2019;155(4):1851.
6. Farfán-García AE, Ariza-Rojas SC, Vargas-Cárdenas FA, Vargas-Remolina LV. Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Rev Chil Infectologia Organo Of Soc Chil Infectologia*. 2016;33(4):438-50.
7. Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. Recent Advances in Understanding Enteric Pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*. 2013;26(4):822-80.
8. Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública México*. 2002;44:464-75.
9. Patzi-Vargas S, Zaidi MB, Perez-Martinez I, León-Cen M, Michel-Ayala A, Chaussabel D, et al. Diarrheagenic *Escherichia coli* Carrying Supplementary Virulence Genes Are an Important Cause of Moderate to Severe Diarrhoeal Disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis*. 2015;9(3):e0003510.
10. Kaur P, Chakraborti A, Asea A. Enteroaggregative *Escherichia coli*: An Emerging Enteric Food Borne Pathogen. *Interdiscip Perspect Infect Dis*. 2010;2010:254159.
11. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol*. 2018;416:27-50.
12. Alvestegui A, Olivares-Morales M, Muñoz E, Smith R, Nataro JP, Ruiz-Perez F, et al. TLR4 Participates in the Inflammatory Response Induced by the AAF/II Fimbriae From Enteroaggregative *Escherichia coli* on Intestinal Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*. 2019;9.

13. Arés Álvarez F, Martínez de la Ossa Sáenz-López R, Alfayate Miguélez S, Arés Álvarez F, Martínez de la Ossa Sáenz-López R, Alfayate Miguélez S. Quinolonas en Pediatría. *Pediatría Aten Primaria*. 2017;19(74):e83-92.
14. Vicente D, Pérez-Trallero E. Tetraciclinas, sulfamidas y metronidazol. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2010;28(2):122-30.
15. Suárez C, Gudiol F. Antibióticos betalactámicos. *Enfermedades Infecc Microbiol Clínica*. 2009;27(2):116-29.
16. Hebbelstrup Jensen B, Adler Sørensen C, Hebbelstrup Rye Rasmussen S, Rejkær Holm D, Friis-Møller A, Engberg J, et al. Characterization of Diarrheagenic Enteroaggregative *Escherichia coli* in Danish Adults—Antibiotic Treatment Does Not Reduce Duration of Diarrhea. *Front Cell Infect Microbiol*. 2018;8:306.
17. Aslani MM, Alikhani MY, Zavari A, Yousefi R, Zamani AR. Characterization of enteroaggregative *Escherichia coli* (EAEC) clinical isolates and their antibiotic resistance pattern. *Int J Infect Dis*. 2011;15(2):e136-9.
18. Stubenrauch CJ, Dougan G, Lithgow T, Heinz E. Constraints on lateral gene transfer in promoting fimbrial usher protein diversity and function. *Open Biol*. 2017;7(11):170144.
19. Knight SD, Bouckaert J. Structure, function, and assembly of type 1 fimbriae. *Top Curr Chem*. 2009;288:67-107.
20. Ito K, Matsushita S, Yamazaki M, Moriya K, Kurazono T, Hiruta N, et al. Association between aggregative adherence fimbriae types including putative new variants and virulence-related genes and clump formation among *aggR*-positive *Escherichia coli* strains isolated in Thailand and Japan. *Microbiol Immunol*. 2014;58(8):467-73.
21. Karam MRA, Rezaei AA, Siadat SD, Habibi M, Bouzari S. Evaluation of Prevalence, Homology and Immunogenicity of Dispersin among Enteroaggregative *Escherichia coli* Isolates from Iran. *Iran Biomed J*. 2017;21(1):40-7.
22. Moraes CTP, Longo J, Silva LB, Pimenta DC, Carvalho E, Morone MSLC, et al. Surface Protein Dispersin of Enteroaggregative *Escherichia coli* Binds Plasminogen That Is Converted Into Active Plasmin. *Front Microbiol*. 2020;11:1222.
23. Blanton LV, Wang LT, Hofmann J, DuBow J, Lafrance A, Kwak S, et al. Aggregative Adherence and Intestinal Colonization by Enteroaggregative *Escherichia coli* Are Produced by Interactions among Multiple Surface Factors. *mSphere*. 2018;3(2):e00078-18.
24. Murphy JA, Scott KA, Sinclair RS, Lewis N. A new synthesis of indoles. *Tetrahedron Lett*. 1997;38(41):7295-8.
25. Gaimster H, Summers D. Regulation of Indole Signalling during the Transition of *E. coli* from Exponential to Stationary Phase. *PLoS One*. 2015;10(9):e0136691.

26. Kim J, Park W. Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *J Microbiol Seoul Korea*. 2015;53(7):421-8.
27. Melander RJ, Minvielle MJ, Melander C. Controlling bacterial behavior with indole-containing natural products and derivatives. *Tetrahedron*. 2014;70(37):6363-72.
28. Kumar A, Sperandio V. Indole Signaling at the Host-Microbiota-Pathogen Interface. *mBio*. 2019;10(3):e01031-19.
29. Lee J, Jayaraman A, Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC Microbiol*. 2007;7:42.
30. Alexeev EE, Lanis JM, Kao DJ, Campbell EL, Kelly CJ, Battista KD, et al. Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *Am J Pathol*. 2018;188(5):1183-94.
31. Bommarius B, Anyanful A, Izrayelit Y, Bhatt S, Cartwright E, Wang W, et al. A family of indoles regulate virulence and Shiga toxin production in pathogenic *E. coli*. *PLoS One*. 2013;8(1):e54456.
32. Hirakawa H, Inazumi Y, Masaki T, Hirata T, Yamaguchi A. Indole induces the expression of multidrug exporter genes in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2005;55(4):1113-26.
33. Karygianni L, Ren Z, Koo H, Thurnheer T. Biofilm Matrixome: Extracellular Components in Structured Microbial Communities | Elsevier Enhanced Reader. 2020.
34. Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future Med Chem*. 2015;7(4):493-512.
35. Uruén C, Chopo-Escuin G, Tommassen J, Mainar-Jaime RC, Arenas J. Biofilms as Promoters of Bacterial Antibiotic Resistance and Tolerance. *Antibiotics*. 2020;10(1):3.
36. Farinati A. Biopelículas: Un desafío para entender la patogénesis y la terapia antiinfectiva. *FASGO*.
37. Martino PD, Fursy R, Bret L, Sundararaju B, Phillips RS. Indole can act as an extracellular signal to regulate biofilm formation of *Escherichia coli* and other indole-producing bacteria. *Can J Microbiol*. 2003;49(7):443-9.
38. Zarkan A, Liu J, Matuszewska M, Gaimster H, Summers DK. Local and Universal Action: The Paradoxes of Indole Signalling in Bacteria. *Trends Microbiol*. 2020;28(7):566-77.
39. Lee J, Zhang XS, Hegde M, Bentley WE, Jayaraman A, Wood TK. Indole cell signaling occurs primarily at low temperatures in *Escherichia coli*. *ISME J*. 2008;2(10):1007-23.

40. Mortensen NP, Boisen N, Carey S, Kennel SJ, Fowlkes JD, Doktycz MJ, et al. Enteroaggregative *Escherichia coli*: surface protein dispersin increases bacterial uptake of ciprofloxacin. *Int J Antimicrob Agents*. 2013;42(5):462-5.
41. Howard MF, Bina XR, Bina JE. Indole Inhibits ToxR Regulon Expression in *Vibrio cholerae*. *Infect Immun*. 2019;87(3):e00776-18.
42. Rattanaphan P, Mittraparp-Arthorn P, Srinoun K, Vuddhakul V, Tansila N. Indole signaling decreases biofilm formation and related virulence of *Listeria monocytogenes*. *FEMS Microbiol Lett*. 2020;367(14):fnaa116.
43. Foster MA, Iqbal J, Zhang C, McHenry R, Cleveland BE, Romero-Herazo Y, et al. Enteropathogenic and enteroaggregative *E. coli* in stools of children with acute gastroenteritis in Davidson County, Tennessee. *Diagn Microbiol Infect Dis*. 2015;83(3):319-24.
44. L T de D, C I, C V. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Investig En Discapac*. 2013;2(2):70-8.
45. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods San Diego Calif*. diciembre de 2001;25(4):402-8.
46. Jahn CE, Charkowski AO, Willis DK. Evaluation of isolation methods and RNA integrity for bacterial RNA quantitation. *J Microbiol Methods*. 2008;75(2):318-24.
47. Ares M. Bacterial RNA Isolation. *Cold Spring Harb Protoc*. 2012;2012(9):pdb.prot071068.
48. Christensen GD, Simpson WA, Younger JJ, Baddour LM, Barrett FF, Melton DM, et al. Adherence of coagulase-negative staphylococci to plastic tissue culture plates: a quantitative model for the adherence of staphylococci to medical devices. *J Clin Microbiol*. 1985;22(6):996-1006.
49. O'Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp JoVE*. 2011;(47):2437.
50. Lee JH, Lee J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS Microbiol Rev*. 2010;34(4):426-44.
51. Morin N, Santiago AE, Ernst RK, Guillot SJ, Nataro JP. Characterization of the AggR Regulon in Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2013;81(1):122-32.
52. Kohli N, Crisp Z, Riordan R, Li M, Alaniz RC, Jayaraman A. The microbiota metabolite indole inhibits *Salmonella* virulence: Involvement of the PhoPQ two-component system. *PloS One*. 2018;13(1):e0190613.

53. Lucas RL, Lostroh CP, DiRusso CC, Spector MP, Wanner BL, Lee CA. Multiple Factors Independently Regulate *hilA* and Invasion Gene Expression in *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* 2000;182(7):1872-82.
54. Yu RR, DiRita VJ. Regulation of gene expression in *Vibrio cholerae* by ToxT involves both antirepression and RNA polymerase stimulation. *Mol Microbiol.* 2002;43(1):119-34.
55. Yanofsky C, Horn V, Gollnick P. Physiological studies of tryptophan transport and tryptophanase operon induction in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 1991;173(19):6009-17.
56. Wang D, Ding X, Rather PN. Indole Can Act as an Extracellular Signal in *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* 2001;183(14):4210-6.
57. Zhang XS, García-Contreras R, Wood TK. YcfR (BhsA) Influences *Escherichia coli* Biofilm Formation through Stress Response and Surface Hydrophobicity. *J Bacteriol.* 2007;189(8):3051-62.
58. Sasaki-Imamura T, Yano A, Yoshida Y. Production of Indole from l-Tryptophan and Effects of These Compounds on Biofilm Formation by *Fusobacterium nucleatum* ATCC 25586. *Appl Environ Microbiol.* 2010;76(13):4260-8.
59. Osawa M, Anderson DE, Erickson HP. Reconstitution of Contractile FtsZ Rings in Liposomes. *Science.* 2008;320(5877):792-4.

XIII. ANEXOS

13.1 Preparación de reactivos

Preparación de indol 100mM

Pesar 0.29 gr de indol (Alfa Aesar-Thermo Fisher Scientific, A14427, India) disolver en 5 ml de metanol absoluto. (33) Cubrir con papel aluminio, rotular y almacenar a 4°C.

Preparación de Etilendiaminotetraacético (EDTA) 0.5 M

Pesar 186.1 g de EDTA disódico (Sigma) y disolverlo en 800 ml de agua destilada, agitar vigorosamente en placa de agitación magnética, ajustar el pH a 8.0 con NaOH (aproximadamente 20 g de gránulos), aforar a 1L y esterilizar en autoclave. Rotular y conservar a temperatura ambiente.

Preparación de Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1X

Pesar 242.28 g de tris base, 18.61 g de EDTA, combinarlos y agregar 750 ml de agua desionizada, disolver y agregar 57.1 ml de ácido acético glacial, aforar hasta un volumen de 1L.

A partir de la solución TAE 50X añadir 20ml de esta y disolver en 980 ml de agua desionizada, conservar a temperatura ambiente.

Preparación de Sulfato de Docecil de Sodio (SDS) 10%

Pesar 10 g de SDS y disolver en 80 ml de agua, aforar a 100 ml. Solución estable hasta por 6 meses manteniendo a temperatura ambiente.

Preparación de Solución Salina Tamponada con Fosfato (PBS) 1X

Reactivo	Cantidad
NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na ₂ HPO ₄	1.44 g
KH ₂ PO ₄	0.24 g

Disolver los reactivos en 800 ml de agua, ajustar el pH a 7.4 con HCl y aforar a 1L. esterilizar durante 20 min a 15 psi. Guardar a temperatura ambiente.



GOBIERNO DE
MÉXICO



Unidad de Investigación Médica en Enfermedades
Infecciosas y Parasitarias

Ciudad de México, 3 de febrero de 2023

Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez
Coordinador del Programa de Maestría en
Ciencias Biomédicas y de la Salud
Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo
PRESENTE

Por medio de la presente reciba un cordial saludo y a su vez sirva para hacer de su conocimiento que la **MVZ Rubí Joseline Castillo Juárez**, estudiante de Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud en ICSa, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, con número de matrícula 297733 concluyó satisfactoriamente su estancia académica en el laboratorio de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias del Centro Médico Nacional Siglo XXI del Instituto Mexicano del Seguro Social, ubicado en Av. Cuauhtémoc No. 330, Ciudad de México cubriendo un periodo del 1 de marzo al 30 de septiembre del año 2022, durante el cual realizó diversos experimentos de su trabajo de tesis de maestría titulado: **“Efecto del indol sobre la expresión de factores de virulencia de *Escherichia coli* enteroagregativa”**. En esta estancia la estudiante utilizó técnicas de biología molecular, tales como extracción de ácidos nucleicos, síntesis de cDNA y cuantificación de la expresión genética por medio de RT-qPCR.

Aprovecho este medio para enviarle un saludo y quedo atento a cualquier solicitud que usted o el posgrado requiera.

ATENTAMENTE

Dr. Miguel Ángel De la Cruz Villegas
Investigador Titular C, SNI II
Unidad de Investigación Médica en
Enfermedades Infecciosas y Parasitarias

Indole as a regulator of bacterial physiology Indol como regulador de la fisiología bacteriana

Rubi Joseline Castillo-Juárez^a

Abstract:

During the last years, indole has been the subject of study, this is chemically defined as an aromatic bicyclic heterocycle, from the synthesis of tryptophan after its degradation by tryptophanase (*TnaA*); it has also been implicated as a signalling molecule used by several bacteria to establish multiple behaviours. Most studies have focused mainly on *Escherichia coli* (*E. coli*), which produces a small amount of indole during the transition from exponential to stationary phase. According to the literature review, indole plays a fundamental role in many bacterial processes, mainly: biofilm formation, virulence, acid resistance, antibiotic resistance, and persistent cell formation; the concentrations of this molecule play an important role in regulating these mechanisms; on this basis, indole could control undesired bacterial physiological processes, offering us a new therapeutic alternative to different behaviours of microorganisms. The objective of this bibliographic review is to expand the area of knowledge about indole as a regulator of diverse bacterial mechanisms, and thus motivate further research on this molecule and its therapeutic use.

Keywords:

Indole, tryptophanase, bacteria, *E. coli*, regulator, signalling

Resumen:

Durante los últimos años, el indol ha sido objeto de estudio, este se define químicamente como un heterociclo bicíclico aromático, proveniente de la síntesis del triptófano tras su degradación con triptofanasa (*TnaA*); a su vez se le ha involucrado como molécula de señalización empleada por diversas bacterias para establecer múltiples comportamientos. La mayoría de estudios se han enfocado principalmente en *Escherichia coli* (*E. coli*), dicha bacteria produce una pequeña cantidad de indol durante la transición de fase exponencial a fase estacionaria. De acuerdo a la revisión bibliográfica, el indol desempeña un papel fundamental en cuantiosos procesos fisiológicos bacterianos, principalmente: formación de biopelícula, virulencia, resistencia a los ácidos, resistencia antibiótica y formación de células persistentes; las concentraciones de esta molécula juegan un papel importante para regular dichos mecanismos; con base en esto, el indol podría controlar los procesos fisiológicos bacterianos indeseados, ofreciéndonos una nueva alternativa terapéutica a diversos comportamientos de los microorganismos. El objetivo de esta revisión bibliográfica es expandir el área de conocimiento acerca del indol como regulador de distintos mecanismos bacterianos, y de esta manera motivar a realizar más investigaciones sobre dicha molécula y su uso terapéutico.

Palabras Clave:

Indol, triptofanasa, bacteria, *E. coli*, regulador, señalización

INTRODUCTION

There are currently about 85 indole producing bacterial species, which are involved in multiple signalling processes.¹ Indole signalling is key communication pathway between mammalian gut species.² Several Gram-positive and Gram-negative bacteria encode a unique copy of *TnaA* gene on their chromosome and produce indole. Although most microorganisms have the ability to synthesize tryptophan, only bacteria encoding *TnaA* can synthesize indole.³ It is important to mention that after induction with tryptophan, the molecular sensor (*tnaC*) controls indole

biosynthesis for the correct functioning of the dynamics of macromolecules (RNA polymerase, ribosomes and transcription termination factors) during their transcription and translation.² This literature review aims to expand the knowledge on bacterial physiology by promoting interest in further research on this molecule.

INDOLE: DEFINITION AND SYNTHESIS

Chemically, indole is defined as an aromatic bicyclic heterocycle, where the benzene ring is fused to a pyrrole ring.⁴ Indole is generated when tryptophan is taken up by bacteria

^a Corresponding author, Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, Hospital de Pediatría, Centro Médico Nacional Siglo XXI, IMSS, Ciudad de México <https://orcid.org/0000-0001-7738-7299>, Email: rjoseline629@gmail.com

through the environment and used as a source of carbon and nitrogen, after degradation with *TnaA*, pyruvate and ammonia are also obtained.⁵

TnaA is a pyridoxal phosphate dependent enzyme responsible for hydrolysing tryptophan to obtain indole.⁶

During the transition from exponential to stationary phase *E. coli* produces a significant amount of the indole molecule aromatic; in the Luria-Bertani (LB) medium the concentration of indole in the supernatant reaches a maximum of 0.5-1 mM.¹

Indole production by *E. coli* is not constant during the growth of a culture, the indole concentration in the supernatant increases 5-fold in about 30 minutes; during this period, indole is produced faster than it can leave, and consequently there is a rapid but short-lived increase; at its peak the cell-associated concentration reaches 60 mM, a level that would otherwise require the addition of 4 mM to the culture supernatant, this phenomenon is described as "indole pulses".¹

MAIN INDOLE-PRODUCING BACTERIA AND CONCENTRATIONS PRODUCED

Many bacteria excrete various metabolites within their natural habitat.⁶ Indole production is widely used in the bacterial kingdom in more than 85 species of bacteria, both Gram negative and Gram positive.⁵

Since 1897, it has been demonstrated that *E. coli* and *Vibrio cholerae* produce indole during the stationary growth phase.³

This molecule is also produced by certain members of Proteaceae such *Proteus vulgaris*, *Providencia spp*, and *Morganella spp*.⁷

Other bacteria of medical interest are also included such as: *Klebsiella oxytoca*, *Shigella dysenteriae*, and *Enterococcus faecalis*.⁵ However, most studies have focused on indole production from *E. coli*. Commensal and pathogenic strains of *E. coli* produce approximately 500 µM in culture media.⁸ The maximum indole concentration in a culture supernatant is usually 0.5-1 mM.⁹

At very high concentrations (5 mM) indole is harmful to *E. coli* because it causes changes in the membrane leading to superoxidation. However, the concentration at which indole is toxic is approximately 15 times higher than the physiological concentration observed in supernatants.⁷

INDOLE SIGNALING

Many bacteria use various intercellular signalling systems, such as quorum sensing (QS).¹⁰ QS is a type of bacterial communication that depends on cell density.⁶

Intercellular signalling molecules include N-acyl-homoserine-lactones (AHLs) in Gram-negative bacteria, autoinducer 2 (AI-2) and indole in Gram-negative and Gram-positive bacteria, signal peptides in Gram-positive bacteria, and others.¹⁰

AHL molecules are synthesized by enzymes of the *LuxI* family and are sensed by regulatory proteins of the *LuxR* family, which bind the autoinducer molecule to cellular DNA; AI-2 is synthesized by the *LuxS* enzyme and the gene that encodes it, *LuxS*. *E. coli* possesses the ability to alter the expression pattern

of some of its genes and their phenotypic properties in response to the AHL signal, but it isn't able to synthesize this molecule, since the bacterium lacks the *LuxI* gene and a homologous gene that allows it to produce it; however, *E. coli* possesses a transcription receptor homologous to *LuxR*, called *SdiA*, which allows the bacterium to sense and respond to the accumulation of the AHL signal produced by other bacteria in the extracellular medium. Six groups of *E. coli* genes have been identified, which are transcriptionally activated when there is accumulation of signals in the medium; indole is the signal that regulates the expression of the genes: *astD*, *tnaB*, and *gabT*.¹¹

The indole present in the extracellular medium is transported into the cell, through the cell membrane by means of Mtr permease to the cytosol, where in turn, indole is synthesized in the tryptophan metabolic pathway, by the enzyme tryptophanase, when the substance accumulates to a certain amount activates the regulator that allows the expression of the previously mentioned genes, and finally is expelled to the outside of the cell by the AcrEF pump.¹¹

Most studies on indole signalling have been performed in *E. coli*, and have focused on concentrations of 0.5-1 mM, which are similar to those detected in a stationary-phase LB culture supernatant.¹

The *E. coli* *LuxR* homologue, *SdiA*, has been considered to be related to indole signalling; in one study the addition of exogenous indole increased the expression of the *ppoR* gene, a homologue of *SdiA* in *Pseudomonas putida*; thus it is speculated that indole may act as a signal through *ppoR*; although there is still no clear evidence that indole can bind to any homologue of *SdiA*, it has recently been argued that *SdiA* is unresponsive to indole in *E. coli* and *Salmonella enteric* serovar *Typhimurium* (*S. typhimurium*). Thus, the link between indole signalling and bacterial quorum sensing remains unclear.¹²

There are two forms of indole action: persistent or pulsed; in persistent signalling, indole is present in the culture for a prolonged period at a relatively low concentration (<1 mM). In pulsed signalling, intracellular indole reaches a high concentration (50 mM) for a short time (10-20 minutes) during entry into stationary phase.¹³

PROCESSES CONTROLLED BY INDOLE SIGNALING

A. BIOFILM

A biofilm is a community of microorganisms adhered to a surface, which play an important role in the persistence of infections; the biofilm is supported by a matrix composed of one or several extracellular polysaccharides, DNA and proteins; the biofilm channels allow water, oxygen and nutrients to reach the entire structure.¹⁴

According to several studies, this physiological function is affected by indole at a concentration of 0.5-2.0 mM, which is similar to the concentration of supernatants of *E. coli* cultures in stationary phase.⁶

Extracellular indole concentrations higher than 600 μM have been studied with wild-type *E. coli* K12 and 500 μM of indole was added in LB supplemented with 0.2 % glucose, where biofilm formation decreased as a consequence of *TnaA* catabolite repression due to glucose, so such culture medium was chosen since the addition of exogenous indole would have a greater effect, this addition changed the biofilm architecture from dispersed tower to flat colony; i.e., it was reduced by 40%. In another study, 1000 μM of indole was added to 96 wells in LB at 30°C using crystal violet and it was found that the biofilm also decreased.¹⁵

In a two-species biofilm *E. coli* (indole-producing) and *Pseudomonas spp* (non-indole-producing) toluene o-monoxygenase is highly expressed and thus participates in indole oxidation. A change in indole concentration can affect the biofilm formation of two species; thus, bacteria that do not produce indole counteract the effects of exogenous indole and eliminate indole-induced stress.⁶

B. INHIBITION OF CELL DIVISION

Indole was recently found to inhibit *E. coli* cell division as part of the cell cycle caused by the accumulation of plasmid dimers. Plasmid dimers produce a regulatory RNA (Rcd) that stimulates indole synthesis by *TnaA*, but the mechanism by which indole prevents cell division is not yet well understood, although some ways by which it does so have been contemplated.¹⁶

Current studies suggest that cell division results because indole acts as a proton ionophore, reducing the electrical potential difference across the cytoplasmic membrane and preventing the proper functioning of the MinCD system that positions the FtsZ ring. This effect was not immediately obvious, since a concentration of indole approximately 10 times higher than that detected in the supernatants is required.¹ Concentrations of 3-6 mM indole added exogenously to an *E. coli* culture have shown reversible inhibition of growth and cell division.¹⁶

One study showed that adding 5 mM indole to *E. coli* culture medium immediately suppressed cell division; nondividing cells continued to grow slowly for up to approximately 2 hours, doubling in size.¹⁷

C. VIRULENCE REGULATION

Indole is produced by the microbiota of the lumen and absorbed by the cells of the intestinal epithelium, suggesting that a high concentration of indole may be present in the lumen; however, indole levels in the mammalian intestine are unknown. To evaluate the role of indole in the regulation of virulence genes, a mutant of enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) was constructed that lacked *TnaA* and therefore could not produce its own indole; an increasing concentration of indole was added to this mutant, which decreased the expression of virulence genes.⁸

Indole has also been shown to repress virulence genes in *Vibrio cholerae*, which produces several virulence factors such as pili regulatory toxin (TCP) and cholera toxin (CT). For testing, the effect of indole on TC and TCP production was quantified by culturing a wild type (WT) JB58 strain in the presence of

increasing concentrations of indole starting at 0.25 mM, with this, a dose-dependent indole decrease of TC and TCP was observed; TC production was reduced by 65% at 0.5 mM and 80% at 0.75 mM, TC and TCP production was repressed at 1 mM indole, thus concluding that indole is a virulence repressor.¹⁸

In another study performed with *Listeria monocytogenes* (non-indole-producing), which detects signals from the environment or host to regulate the transcription of virulence-associated genes, a concentration of 0.5 mM indole was used, bacteria were cultured with and without indole; the results showed a significant reduction of all genes associated with flagella and genes associated with biofilm formation.¹⁹

The decrease in indole concentrations favours bacterial pathogenesis, since it is produced by the intestinal microbiota to improve the function of the intestinal barrier; if damage occurs in this tissue, it would cause dissemination of pathogenic bacteria.²⁰

D. RESISTENCE TO ACIDS

With respect to acid pH resistance, indole addition has been shown to repress the acid resistance gene of the glutamate decarboxylase *gadABCEX 2* to 4-fold; *GadABC* is regulated by *GadE* that protect *E. coli* at a pH of 2 or below, allowing the bacterium to colonize the gastrointestinal tract. Also, the other known acid resistance genes and *hdeABD* (function as chaperones to prevent aggregation of periplasmic proteins in extremely acidic conditions) were repressed 3 to 5 times more than the rest. To test this, 2mM indole was added to a WT strain of *E. coli* K-12 at pH 2.5, in which a 350 to 650-fold decrease in survival was observed.¹⁵

E. ANTIBIOTIC RESISTENCE

It has been speculated that antibiotic-susceptible bacteria may acquire antibiotic resistance through activation of the expression of antibiotic defense genes against antibiotics, such as indole multidrug efflux pumps.²¹

When *E. coli* is exposed to antibiotics, some cells are lysed and protect most neighbouring cells by releasing indole as a defense signalling molecule. Indole-mediated antibiotic tolerance in *E. coli* and *S. typhimurium* may be due to the induction of oxidative stress and a phage shock response. Indole induces the expression of multidrug exporter genes and increases antibiotic resistance in *E. coli*, *Salmonella* and *Pseudomonas*.⁶

In one study they tested whether indole production increases in response to ciprofloxacin treatment, such an increase could be achieved both by increasing *TnaA* expression and by stimulation of indole production by the *TnaA* already present; an *E. coli* strain expressing *TnaA* GFP-tagged from its native promoter was used to explore the effect of the antibiotic on enzyme expression. Ciprofloxacin (100 \times MIC) was added to an exponentially growing culture of *E. coli* WT and sampled during 5 hours of treatment for indole measurement in the supernatant. The indole concentration in the supernatant before addition of the antibiotic was about 25 μM and showed little change during treatment.¹³ microorganisms. Adapted from ³

Table 1. Phenotypic changes affected by indole in

Bacterium	Phenotype changes
<i>Aspergillus niger</i>	Inhibited cell growth.
<i>Escherichia coli</i> spp.	Decreased biofilm formation and motility. Enhanced plasmid stability and delayed cell division. Acid resistance and drug. Activated <i>astD</i> , <i>gabT</i> and <i>tnaB</i> as an extracellular signalling molecule. Formation of quiescent cells (in genetically modified) and development of phenotypic diversity. ⁶
<i>Listeria monocytogenes</i>	Suppression of virulence genes associated to flagella and biofilm formation. ¹⁹
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Decreased virulence and increased antibiotic resistance. Biofilm formation affectation. ⁶
<i>Pseudomonas putida</i>	Inhibition of grow cells and promotion biofilm formation. ¹²
<i>Salmonella enteric</i>	Drug resistance. ⁶
<i>Vibrio cholerae</i>	Increased biofilm formation and grazing resistance to phagocytic eukaryote. Suppression of virulence genes (CT and TCP). ¹⁸

Aspergillus niger, *Pseudomonas aeruginosa* and *putida*, *Listeria monocytogenes* and *Salmonella enteric* did not produce indole.

F. PERSISTENT CELL FORMATION

Persistent cells are a subpopulation of genetically sensitive bacteria that survive antibiotics by entering a dormant state; the appearance of persistent cells after antibiotic withdrawal leads to recurrent infections.¹³

Indole and its functional metabolites are known to contribute to the regulation of persistent cells in *E. coli* at high concentrations (sub-mM to Mm).²²

Incubation of *E. coli* with indole increased persistence by at least one order of magnitude after subsequent exposure to high concentrations of antibiotics from three different families: ofloxacin, kanamycin and ampicillin, suggesting that the protective effects of indole are a general phenomenon.⁵

In one study, bacterial communication through indole signalling was shown to induce persistence; to test this, indole-induced persistent cell formation was monitored by microfluidics and oxidative stress and shock pathways in phage's were identified; a model was proposed in which a bacterial subpopulation is "inoculated" against antibiotics by activating stress responses, leading to the formation of persistent cells.²³

Similarly, it was shown that when grown on rich medium where indole signalling is expected to occur in the wild-type strain, a *TnaA* mutant showed a decrease in persistent cell formation by almost an order of magnitude, and that the addition of indole re-established this deficit; thus the authors proposed that the mechanism of indole mediated persistent cell formation involves

the activation of the OxyR and Phage-Shock pathways; providing a clear example of bacterial communication through indole signalling, allowing the bacterial population to protect a subpopulation.²³

CONCLUSION

Many bacteria are able to synthesize indole, a molecule that can control several bacterial functions such as: biofilm formation, acid and antibiotic resistance, inhibition of cell growth, virulence regulation, formation of persistent cells, among others (these functions are summarized in Table 1, which has been previously modified). To regulate these functions, the indole concentration plays an important role, as do the indole-responsive *SdiA* homologs, since upon detection of an amount of indole in the medium, the cells receive the "signal" to protect themselves from "stress" that may be caused by external factors. Further molecular studies on the physiological functions of indole are needed to determine how it represses or protect cells, and thus to consider indole as a possible therapeutic agent.

REFERENCES

- [1] Wang T, Zheng X, Ji H, Wang TL, Xing XH, Zhang C. Dynamics of transcription–translation coordination tune bacterial indole signaling. *Nat. Chem. Biol.* 2020;16(4):440-9.
- [2] Gaimster H, Summers D. Regulation of Indole Signalling during the Transition of *E. coli* from Exponential to Stationary Phase. *PLoS. One.* 2015;10(9): e0136691.
- [3] Lee J-H, Lee J. Indole as an intercellular signal in microbial communities. *FEMS. Microbiol. Rev.* 2010;34(4):426-44.
- [4] Bejarano Triana JA. Synthesis of compounds with indole and pyridinic nucleus and evaluation of their cytotoxic activity. [Degree magister thesis]. Bogotá: Pontificia Javeriana University; 2015.
- [5] Melander RJ, Minvielle MJ, Melander C. Controlling bacterial behavior with indole-containing natural products and derivatives. *Tetrahedron.* 2014;70(37):6363-72.
- [6] Kim J, Park W. Indole: a signaling molecule or a mere metabolic byproduct that alters bacterial physiology at a high concentration? *J. Microbiol. Seoul. Korea.* 2015;53(7):421-8.
- [7] Wang D, Ding X, Rather PN. Indole Can Act as an Extracellular Signal in *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* 2001;183(14):4210-6.
- [8] Kumar A, Sperandio V. Indole Signaling at the Host-Microbiota-Pathogen Interface. *mBio.* 2019;10(3): e01031-19.
- [9] Gaimster H, Cama J, Hernández-Ainsa S, Keyser UF, Summers DK. The indole pulse: a new perspective on indole signalling in *Escherichia coli*. *PLoS. One.* 2014;9(4): e93168.
- [10] Kim Y-G, Lee J-H, Cho MH, Lee J. Indole and 3-indolylacetonitrile inhibit spore maturation in *Paenibacillus alvei*. *BMC. Microbiol.* 2011; 11:119.

- [11] Parra Flores DC. Analysis of indole function as a quorum sensing signal and indicator of the metabolic state of *Escherichia coli* bacteria. [Degree project]. Bogotá: University of the Andes; 2010.
- [12] Kim J, Hong H, Heo A, Park W. Indole toxicity involves the inhibition of adenosine triphosphate production and protein folding in *Pseudomonas putida*. *FEMS. Microbiol.* 2013;343(1):89-99.
- [13] Zarkan A, Matuszewska M, Trigg SB, Zhang M, Belgami D, Croft C, et al. Inhibition of indole production increases the activity of quinolone antibiotics against *E. coli* persisters. *Sci. Rep.* 2020;10(1):11742.
- [14] Rabin N, Zheng Y, Opoku-Temeng C, Du Y, Bonsu E, Sintim HO. Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future. Med. Chem.* 2015;7(4):493-512.
- [15] Lee J, Jayaraman A, Wood TK. Indole is an inter-species biofilm signal mediated by SdiA. *BMC. Microbiol.* 2007; 7:42.
- [16] Chant EL, Summers DK. Indole signalling contributes to the stable maintenance of *Escherichia coli* multicopy plasmids. *Mol. Microbiol.* 2007;63(1):35-43.
- [17] Chimere C, Field CM, Piñero-Fernandez S, Keyser UF, Summers DK. Indole prevents *Escherichia coli* cell division by modulating membrane potential. *Biochim. Biophys. Acta.* 2012;1818(7):1590-4.
- [18] Howard MF, Bina XR, Bina JE. Indole Inhibits ToxR Regulon Expression in *Vibrio cholerae*. *Infect. Immun.* 2019;87(3): e00776-18.
- [19] Rattanaphan P, Mittraparp-Arthorn P, Srinoun K, Vuddhakul V, Tansila N. Indole signaling decreases biofilm formation and related virulence of *Listeria monocytogenes*. *FEMS. Microbiol.* 2020;367(14): fnaa116.
- [20] Alexeev EE, Lanis JM, Kao DJ, Campbell EL, Kelly CJ, Battista KD, et al. Microbiota-Derived Indole Metabolites Promote Human and Murine Intestinal Homeostasis through Regulation of Interleukin-10 Receptor. *Am. J. Pathol.* 2018;188(5):1183-94.
- [21] Lee HH, Molla MN, Cantor CR, Collins JJ. Bacterial charity work leads to population-wide resistance. *Nature.* 2010;467(7311):82-5.
- [22] Kim CS, Li J-H, Barco B, Park HB, Gatsios A, Damania A, et al. Cellular Stress Upregulates Indole Signaling Metabolites in *Escherichia coli*. *Cell. Chem. Biol.* 2020;27(6):698-707.e7.
- [23] Vega NM, Allison KR, Khalil AS, Collins JJ. Signaling-mediated bacterial persister formation. *Nat. Chem. Biol.* 2012;8(5):431-3.