



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD

“Expresión genética de fimbrias de *Enterobacter cloacae* y su relación con la formación de biopelícula en diferentes condiciones de osmolaridad”

Tesis que para obtener el grado de:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOMÉDICAS Y DE LA SALUD

Presenta:

LORENA SARAHÍ CABRERA AYALA

Director(a) de Tesis

DRA. JEANNETT ALEJANDRA IZQUIERDO VEGA

Co-Director(a) de Tesis:

DR. MIGUEL ÁNGEL DE LA CRUZ VILLEGAS

San Agustín Tlaxiaca Hgo. a 01 de Junio de 2021.



01/junio/2021
AAM/MCBS/040/2021
Asunto: Asignación de Jurado de Examen

Lorena Sarahí Cabrera Ayala
Alumna de la Maestría en Ciencias Biomédicas y de la Salud

Por este conducto le comunico el jurado que le fue asignado a su Tesis titulada "Expresión genética de fimbrias de *Enterobacter cloacae* y su relación con la formación de biopelícula en diferentes condiciones de osmolaridad" con el cual obtendrá el **Grado de Maestra en Ciencias Biomédicas y de la Salud**; después de revisar la tesis mencionada y haber realizado las correcciones acordadas, han decidido autorizar la impresión de la misma.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los integrantes del jurado:

PRESIDENTE	Dr. Manuel Sánchez Gutiérrez
PRIMER VOCAL	Dra. Jeannett Alejandra Izquierdo Vega
SECRETARIO	Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas
SUPLENTE	Dr. Eduardo Osiris Madrigal Santillán
SUPLENTE	Dra. María del Carmen Valadez Vega

Sin otro asunto en particular, reitero a usted la seguridad de mi atenta consideración.

Atentamente
"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

M.C. ESP. ADRIÁN MOYA ESCALERA
DIRECTOR



DRA. LYDIA LÓPEZ PONTIGO
COORDINADORA DE POSGRADO ICSA

DR. MANUEL SÁNCHEZ GUTIÉRREZ
COORDINADOR DEL PROGRAMA

Agradecimientos

Durante el desarrollo de estos estudios, se contó con una beca de manutención otorgada por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), número de beca 839867.

Agradezco al Dr. Miguel Ángel de la Cruz Villegas, jefe de la Unidad de Investigación Médica en Enfermedades Infecciosas y Parasitarias, del Centro Médico Siglo XXI, por el apoyo prestado durante la parte experimental de este proyecto, lugar donde se realizó una estancia de investigación en su laboratorio del 7 de Enero al 14 de Diciembre del 2019.

Agradezco al Dr. Carlos Trejo López, jefe del Laboratorio de Biofísica y Fisiología Vegetal y Animal, del Colegio de Postgraduados, campus Montecillo, por el apoyo para realizar las mediciones de osmolaridad de los medios de cultivo en su unidad de investigación.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE GENERAL	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	viii
ABREVIATURAS	ix
RESUMEN	x
ABSTRACT	xii
I. GENERALIDADES	1
1.1 <i>Enterobacter cloacae</i>	1
1.2 Taxonomía de <i>E. cloacae</i>	1
1.3 Bioquímica de <i>E. cloacae</i>	2
1.4 Importancia clínica de <i>E. cloacae</i>	2
1.5 Patogénesis de <i>E. cloacae</i>	2
1.6 Epidemiología de <i>E. cloacae</i>	2
1.6.1. Epidemiología en México	3
1.7 Tratamiento de infecciones causadas por <i>E. cloacae</i>	4
1.8 Resistencia antibiótica	4
1.9 Mecanismo de virulencia de <i>E. cloacae</i>	5
2.1 Fimbrias	7
2.1.1. Características generales y estructura	7
2.1.2 Organización genética	7
2.1.3 Ensamblaje fimbrial	8
2.1.3.1 Ruta chaperón/usher	8
2.1.3.2 Clasificación de la ruta chaperon/usher	8
2.2.1. Sistemas de secreción	9
2.2.1.1. Sistema de secreción Sec	10
2.2.1.2. Sistema de secreción Tat	10
2.2.1.3. Sistemas de secreción en Gram negativas	11
2.3.1 Fimbrias tipo P y tipo I	12
2.3.1.1. Biogénesis de las fimbrias tipo I y tipo P	14
2.3.2. Fimbrias tipo Curli	15

2.3.2.1.	Biogénesis de las fimbrias tipo Curli	15
2.3.3.	Fimbrias tipo III.....	17
2.3.3.1.	Biogénesis de las fimbrias tipo III.....	17
2.3.4.	Fimbrias tipo CSU	18
2.3.4.1.	Biogénesis de las fimbrias tipo CSU.....	19
2.3.5.	Fimbrias tipo ECP	20
2.3.5.1.	Biogénesis de las fimbrias tipo ECP	20
II.	Antecedentes de problema.....	22
2.1.	Expresión de fimbrias en <i>Enterobacter cloacae</i> ATCC 13047	22
2.2.	Biopelícula.....	23
2.3.	Biopelícula y resistencia antibiótica	24
2.4.	Osmolaridad	25
2.4.1.	Efecto de la osmolaridad en la expresión de fimbrias	26
2.4.2.	Efecto de la osmolaridad en la formación de biopelícula.....	27
III.	JUSTIFICACIÓN.....	29
IV.	HIPÓTESIS	29
V.	OBJETIVOS.....	30
VI.	MATERIALES Y MÉTODOS.....	30
6.1.	Material.....	30
6.1.1.	Cepa bacteriana y líneas celulares	30
6.1.2.	Medios de cultivo	30
6.1.3.	Diagrama experimental.....	32
6.2.	Métodos	33
6.2.1.	Medición de la osmolaridad de los medios de cultivo	33
6.2.2.	Evaluación de la formación de biopelícula.....	33
6.2.3.	Determinación de la expresión genética relativa mediante RT-qPCR	34
6.2.4.	Extracción del DNA genómico.....	34
6.2.5.	Expresión genética de los genes fimbriales y diseño de sus iniciadores	35
6.2.6.	Extracción de RNA total.....	35
6.2.7.	Obtención de cDNA mediante la transcripción reversa (RT) del RNA total	36
6.2.8.	Análisis estadístico de los resultados.....	37

VII.	RESULTADOS	38
7.1.	Osmolaridad de los medios de cultivo.....	38
7.2.	Análisis de expresión de genes fimbriales.....	39
7.2.1.	Expresión genética de las fimbrias Tipo I	39
7.2.2	Expresión de los genes fimbria tipo ECP	44
7.2.3	Expresión de los genes fimbria tipo III	46
7.2.4	Expresión de los genes fimbria tipo Csu	47
7.2.5	Expresión de los genes fimbrias sin homología	48
7.3	Evaluación de la formación de biopelícula.....	52
7.4	Correlaciones estadísticas.....	53
7.4.1.	Osmolaridad fimbrias de <i>E. cloacae</i>	53
7.4.2	Biopelícula fimbrias de <i>E. cloacae</i>	54
VIII.	DISCUSIÓN	55
IX.	CONCLUSIONES	64
X.	RECOMENDACIONES	65
XI.	REFERENCIAS	66
XII.	ANEXOS	81
12.1	Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias Tipo I.....	81
12.2	Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias Tipo ECP.....	83
12.3	Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias Tipo III	84
12.3.1	Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias Tipo Csu.....	84
12.4	Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias sin Homología	85
12.5	Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias sin Homología	86
12.6	Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias Tipo	87
12.7	Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias Tipo ECP	89
12.8	Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias Tipo III	90
12.9	Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias Tipo Csu.....	90
12.10	Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias sin Homología	91
12.11	Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias sin Homología	92
12.12	Dictamen del Comité de Ética e Investigación.....	93

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1: Esquema del sistema de secreción Sec.	10
Figura 2: Esquema del sistema de secreción Tat.....	11
Figura 3: Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas.	12
Figura 4: Estructura de las fimbrias tipo I.....	13
Figura 5: Estructura de las fimbrias tipo P.....	14
Figura 6: Estructura de las fimbrias tipo Curli.....	16
Figura 7: Estructura de las fimbrias III.	18
Figura 8: Estructura de la fimbria tipo Csu.	19
Figura 9: Estructura de la fimbria tipo Ecp.	21
Figura 10: Diagrama experimental.....	32
Figura 11: Valores de osmolaridad de los diferentes medios de cultivo.....	38
Figura 12: Expresión genética del ECL_04369 de <i>E. cloacae</i>	39
Figura 13: Expresión genética del ECL_00371 de <i>E. cloacae</i>	40
Figura 14: Expresión genética de ECL_02932 de <i>E. cloacae</i>	41
Figura 15: Expresión genética de ECL_00091 de <i>E. cloacae</i>	42
Figura 16: Expresión genética de ECL_01281 de <i>E. cloacae</i>	43
Figura 17: Expresión genética de ECL_00072 de <i>E. cloacae</i>	44
Figura 18: Expresión genética de ECL_03398 de <i>E. cloacae</i>	45
Figura 19: Expresión genética de ECL_01106 de <i>E. cloacae</i>	46
Figura 20: Expresión genética de ECL_01410 de <i>E. cloacae</i>	47
Figura 21: Expresión genética de ECL_04605 de <i>E. cloacae</i>	48
Figura 22: Expresión genética de ECL_02380 de <i>E. cloacae</i>	49
Figura 23: Análisis de la expresión de ECL_04373 de <i>E. cloacae</i>	50
Figura 24: Análisis de expresión ECL_02932 de <i>E. cloacae</i>	51
Figura 25: Formación de biopelícula de <i>E. cloacae</i> en los diferentes medios de cultivo....	52
Figura 26: Gráficas de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética de los genes que codifican para las fimbrias Tipo I de <i>E. cloacae</i>	81
Figura 27: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética del gen que codifica para las fimbrias tipo I de <i>E. cloacae</i>	82

Figura 28: Gráficas de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética de los genes que codifican para las fimbrias ECP de <i>E. cloacae</i>	83
Figura 29: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética del gen que codifican para las fimbrias Tipo III de <i>E. cloacae</i>	84
Figura 30: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión del gen que codifican para las fimbrias Tipo Csu de <i>E. cloacae</i>	84
Figura 31: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética de los genes que codifican para las fimbrias sin Homología de <i>E. cloacae</i> que presentan mayor expresión en el medio TSB.	85
Figura 32: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética de los genes que codifican para las fimbrias sin Homología de <i>E. cloacae</i> que presentan mayor expresión en el medio DMEM.	86
Figura 33: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias tipo I de <i>E. cloacae</i>	87
Figura 34: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética del gen que codifican para fimbrias tipo I de <i>E. cloacae</i>	88
Figura 35: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias tipo ECP de <i>E. cloacae</i>	89
Figura 36: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética del gen que codifican para fimbrias tipo III de <i>E. cloacae</i>	90
Figura 37: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética del gen que codifican para fimbrias tipo Csu de <i>E. cloacae</i>	90
Figura 38: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias sin homología definida de <i>E. cloacae</i> que presentan mayor expresión en el medio TSB.	91
Figura 39: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias sin homología definida de <i>E. cloacae</i> que presentan mayor expresión en el medio DMEM.	92
Figura 40: Dictamen aprobatorio del Comité de Ética e Investigación, UAEH.	93

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1: Genes fimbriales para proteínas usher, codificados en el genoma de <i>E. cloacae</i> ATCC13047.	22
Tabla 2: Tabla de composición de los medios de cultivo utilizados.	31
Tabla 3: Mezcla de reactivos RT-qPCR.....	37
Tabla 4: Tabla de resultados de R^2 de las correlaciones entre la osmolaridad de los medios y la expresión genética de los genes de <i>E. cloacae</i>	53
Tabla 5: Tabla de resultados de R^2 de las correlaciones entre la formación de biopelícula de los medios y la expresión genética de los genes de <i>E. cloacae</i>	54

ABREVIATURAS

NNIS	Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales
NDM-1	metalo-beta-lactamasas de Nueva Delhi
CRE	<i>Enterobacteriaceae</i> resistentes a carbapenemas
MDR	Microorganismos Multirresistentes a Fármacos
CU	chaperón/Usher
SS	sistemas de secreción
NTD	dominio periplasmático N-terminal
CTD1	dominio periplasmáticos C-terminal
CDT2	dominio periplasmáticos C-terminal
ITU	infecciones de tracto urinario
HTH	hélice-giro-hélice
ITU	infecciones de tracto urinario
PTH	proteína Tamm-Horsfall
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogénica
AFM	microscopía de fuerza atómica
ExPEC	<i>E. coli</i> extraintestinal
LB	Luria Bertani
TSB	Soya Trypticaseina
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Media high glucose,
CFB	Colonization Factor Broth
CT	Crossing treshold
c-di-GMP	diguanylate cíclico
IHF	factor de integración al hospedero
H-NS	proteína estructural tipo histona
Lrp	proteína de unión a leucina
HTH	dominio C-terminal hélice-giro-hélice
IHF	factor de integración al hospedero
DGCs	di-guanylate ciclasas
PDEs	fosfodiesterasas

RESUMEN

El objetivo del estudio fue analizar la expresión genética de diferentes tipos de fimbrias (Tipo I, Tipo III, Tipo Csu, y Tipo ECP) implicadas en la formación de biopelícula de *E. cloacae* en diferentes condiciones de osmolaridad. La osmolaridad se evaluó en diferentes medios de cultivo utilizando un osmómetro de presión de vapor (Vapro™ 5520). La expresión genética se analizó mediante qRT-PCR utilizando un sistema de detección con fluorocromo SYBR® Green I. Finalmente, la formación de biopelícula fue evaluada con el método de cristal violeta. Los medios TSB, DMEM y PPLO tuvieron una osmolaridad de 260.611 ± 2.05 mOsm/L, 247.167 ± 2.05 mOsm/L y 269.333 ± 2.05 mOsm/L respectivamente, siendo los que presentaron los valores de osmolaridad más altos. Con respecto a la expresión genética relativa de las fimbrias tipo I en las diferentes condiciones de osmolaridad, TSB, tuvo un incremento estadísticamente significativo con respecto al control ($p < 0.001$). El gen *ECL_01281* que también codifica para las fimbrias Tipo I de *E. cloacae* se expresó diferente, mostrando una disminución significativa ($p < 0.001$) en los medios TSB, CFB, DMEM y PPLO con respecto al control, siendo el medio de cultivo CFB el de menor disminución de la expresión. Para las fimbrias ECP, los genes *ECL_00072* y *ECL_03398*, mostraron un incremento significativo en los medios TSB ($p < 0.001$) y DMEM ($p < 0.01$). Sin embargo, en ambos genes el promedio de expresión genética relativa fue significativo, el promedio más alto fue en el medio TSB ($p < 0.001$). Con respecto a las fimbrias Tipo III, la expresión genética más alta fue en el medio TSB, aunque también se observó significancia DMEM ($p < 0.001$). Por otra parte, en la fimbria tipo Csu, su expresión genética en los medios TSB y DMEM fue significativa ($p < 0.001$); siendo el promedio de DMEM el de mayor expresión. También se evaluaron los genes de *E. cloacae* que codifican para fimbrias sin homología definida (*ECL_00940*, *ECL_04373*, *ECL_04605* y *ECL_02380*). *ECL_00940* y *ECL_04373*, mostraron un incremento significativo ($p < 0.001$) en el medio TSB y DMEM ($p < 0.01$), siendo en ambos genes el medio TSB que presentó el mayor promedio de expresión genética. Los genes *ECL_04605* y *ECL_02380* tuvieron un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.001$) en los medios DMEM y TSB, para estos genes el medio DMEM es el de mayor expresión genética con respecto al control. Con respecto a la formación de biopelícula, *E. cloacae* tuvo una mayor formación de biopelícula en el medio de cultivo DMEM ($p < 0.001$)

con respecto al control, mientras que PPLO presentó menor formación de biopelícula ($p < 0.01$). Como parte del análisis de variables en este estudio, se realizó un análisis de regresión entre la osmolaridad y la expresión genética de los trece genes evaluados de acuerdo al tipo de fimbria, el cual resultó en un modelo de regresión cuadrática; además, se realizó otro análisis de regresión entre la expresión genética y la formación de biopelícula, que también resultó en un modelo de regresión cuadrática. Estos resultados sugieren que las condiciones ambientales están relacionadas con la expresión de los factores de virulencia de este microorganismo; ya que existe correlación estadísticamente significativa entre las variables de osmolaridad y expresión genética; y entre las variables expresión genética y formación de biopelícula.

ABSTRACT

This study objective was to analyze the genetic expression on the different types of fimbriae (Type I, Type III, Type Csu, and Type ECP) involved in the *E. cloacae* biofilm formation on different osmolarity conditions. The osmolarity was evaluated in different culture media by a vapor pressure osmometer (Vapro™ 5520). The genetic expression was analyzed by qRT-PCR using the fluorochrome detection system SYBR Green I. Finally, the biofilm formation was evaluated by the crystal violet method. The media TSB, DMEM, and PPLO had an osmolarity of 260.611 ± 2.05 , 247.167 ± 2.05 , and 269.33 ± 2.05 , respectively, being the ones with the higher values of osmolarity. In the relative gene expression analysis of the Type I fimbriae in different osmolarity conditions, TSB had a statistically significant increase compared with the control. ECL_01281 gene encoded for the Type I fimbriae had a different expression, showing a statistically significant decrease in the TSB, CFB, DMEM, and PPLO media, compared with the control of the CFB media, the one with smaller expression decrease. For ECP fimbriae, ECL_00072 and ECL_03398 genes showed a statistically significant increase in the TSB and DMEM media. However, in both genes, the genetic expression average was statistically significant. The highest average was in TSB. In the Type III fimbriae, the highest genetic expression was in the TSB media and observed statistically significant results in DMEM. Moreover, in the Type Csu fimbriae case, the genetic expression in the TSB and DMEM was statistically significant, being the DMEM average the highest. The *E. cloacae* genes without genetic homology defined (ECL_00940, ECL_04373, ECL_04605, and ECL_02380) also were evaluated. ECL_00940 and ECL_04373 showed a statistically significant increase in TSB and DMEM media, being in both genes the average in TSB media the one with the highest genetic expression. ECL_04605 and ECL_02380 had a statistically significant increase in DMEM and TSB media. For these genes, the DMEM media had more gene expression than the control. For the biofilm formation, *E. cloacae* have a higher biofilm formation in DMEM media than the control, while PPLO showed less biofilm formation. As part of the analysis of variables in this study, a regression analysis was performed between the osmolarity and genetic expression of the thirteen genes evaluated according to the fimbriae type results in a quadratic regression model. Also, another regression analysis between the genetic expression and the

biofilm formation also results in a quadratic regression model. This result suggests that the environmental conditions is related to this microorganism virulence factor expression; a relation is statistically significant between the osmolality and genetic expression variables; and between the genetic and biofilm formation variables.

I. GENERALIDADES

1.1 *Enterobacter cloacae*

El género *Enterobacter* se define como un grupo de microorganismos anaerobios facultativos Gram negativos que pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae*, los cuales son responsables de importantes infecciones bacterianas en humanos, este género descrito en 1960 por Hormaeche y Edwards actualmente se compone de 22 especies. Dentro del género se identifican seis especies que componen el complejo *E. cloacae* las cuales son: *E. cloacae*, *E. asburiae*, *E. hormaechei*, *E. kobei*, *E. ludwigii* y *E. nimipressuralis*, estas especies comparten 61-67% de relación genotípica, la importancia de estas especies se atribuye a la variedad de infecciones en humanos que provocan, ya que el resto de las especies pertenecientes a *Enterobacter* se encuentran principalmente en plantas, alimentos y en el medio ambiente (1,2).

La secuenciación del genoma de *E. cloacae* ATCC 13047 reveló que se compone de un cromosoma circular de 5,314,588 pares de bases (pb) y dos plásmidos circulares pECL_A y pECL_B de 200,370 pb y 85,650 pb, respectivamente (3)

1.2 Taxonomía de *E. cloacae*

- Reino: *Bacteria*
- Fílum: *Proteobacteria*
- Clase: *Grammaproteobacteria*
- Orden: *Enterobacterales*
- Familia: *Enterobacteriaceae*
- Género: *Enterobacter*
- Especie: *Enterobacter cloacae complex*

1.3 Bioquímica de *E. cloacae*

Este microorganismo; al igual que la mayoría de las especies pertenecientes al género *Enterobacter*; se caracteriza por las reacciones bioquímicas y fermentaciones que realiza, reacciona positivamente con la arginina dihidrolasa, y el α -metil-D.glucósido. Además, realiza múltiples fermentaciones que incluyen: la fermentación de sorbitol, sacarosa, melibiosa, rafinosa y lactosa. En cuanto a sus características destaca que este microorganismo no reacciona a la disponibilidad de lisina descarboxilasa, la esculina, la ureasa, el inositol, el adonitol, el D-arabitol y el dulcitol (4–6)

1.4 Importancia clínica de *E. cloacae*

En 1970 se estableció a *E. cloacae* como patógeno nosocomial; sin embargo, fue hasta 1980 que el NNIS (Sistema Nacional de Vigilancia de Infecciones Nosocomiales) de Estados Unidos determinó que entre el 5 al 7% de los patógenos nosocomiales estudiados en el periodo de 1976 a 1989 pertenecía a *E. cloacae* (5). A esta bacteria, se le ha definido como un patógeno oportunista de alta incidencia responsable de infecciones nosocomiales como son: bacteriemia, infecciones de sitio quirúrgico e infecciones respiratorias, intestinales y renales, cuya resistencia a fármacos lo ha convertido en un problema de salud importante (7,8).

1.5 Patogénesis de *E. cloacae*

Reportado por más de treinta años como una amenaza multirresistente a fármacos, *E. cloacae* ha demostrado capacidad para adaptar su metabolismo y fisiología a diferentes condiciones de estrés; la presencia de cascadas reguladoras se ha relacionado con esta capacidad, debido a que controlan eficientemente la membrana externa permitiendo la secreción de enzimas desintoxicantes relacionadas a la resistencia antibiótica y brindan protección; estas habilidades facilitan la colonización de nuevos ambientes (9).

1.6 Epidemiología de *E. cloacae*

La incidencia de *E. cloacae*, como responsable de infecciones nosocomiales en unidades de cuidados intensivos, ha ido en aumento. En el año 2001, 25 unidades de cuidados intensivos

fueron seleccionados en Estados Unidos y Canadá por el programa de vigilancia antimicrobiana, en ellas realizaron 1,321 aislamientos bacterianos, de los cuales el 7% corresponden a *E. cloacae*. Además, en China este microorganismo es el tercer género de *Enterobacteriaceae* más frecuentemente aislado en infecciones nosocomiales con un porcentaje del 13% del total (10,11). Los brotes causados por este microorganismo se han identificado en diferentes entornos hospitalarios; la colonización de mezclas intravenosas, soluciones parenterales, fórmulas infantiles, soluciones cardioplégicas, hemoderivados y soluciones de enjuague con heparinas, ha sido relacionada como una de las causas principales de su alta incidencia (11).

1.6.1. Epidemiología en México

Un estudio realizado en el 2011 por la Secretaría de Salud de México evaluó la incidencia de las enfermedades nosocomiales. De los 4,274 pacientes evaluados en diferentes hospitales de México; 914 casos fueron identificados con enfermedades nosocomiales, siendo la neumonía (33%) y las infecciones de vías urinarias (24.6%) las infecciones más aisladas, mientras que la bacteriemia se encontró en menor porcentaje (5.8%). De estos casos, los principales microorganismos responsables de las infecciones fueron *Enterobacter spp* (38%), *Pseudomonas spp.* (13%) y *Staphylococcus aureus* (13%), *Acinetobacter spp.* (7%); *Enterococcus spp.* (6%) y *Candida spp.* (5%) (12).

Otro estudio realizado de 2006 a 2009 en la ciudad de Monterrey Nuevo León; se evaluaron muestras de pacientes provenientes de diferentes unidades de cuidados intensivos, para determinar qué bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido estaban relacionadas con la incidencia de estas infecciones. Se encontró que las bacterias productoras de β -lactamasas de espectro extendido más frecuentemente aisladas fueron *K. pneumoniae* (62%), *E. coli* (18%) y *E. cloacae* (13%); además de que las cepas bacterianas no que no producen ESBLs tuvieron los siguientes porcentajes de incidencia: *K. pneumoniae* (60%), *E. cloacae* (16%) y *E. coli* (16%) (13).

Un estudio realizado de 2010 a 2013 en un hospital pediátrico de tercer nivel de Ciudad de México, identificó que el 51.2% de los casos de infecciones nosocomiales en el torrente sanguíneo están relacionados con bacilos Gram negativos, siendo los tres microorganismos

aislados con mayor frecuencia *K. pneumoniae* (30.4%), *E. coli* (18.9) y *E. cloacae* (15.1%) (14). En el año 2017 se reportó en México un brote hospitalario ocasionado por enterobacterias multirresistentes a fármacos que poseen el gen que codifica para metalo-beta-lactamasas de Nueva Delhi (NDM-1), en el cual *E. cloacae* fue el segundo patógeno aislado de pacientes hospitalizados (3.6%) sólo por debajo de *K. pneumoniae* (46.9%) (15).

1.7 Tratamiento de infecciones causadas por *E. cloacae*

Las carbapenemas son el mecanismo de acción primario contra infecciones asociadas a microorganismos multirresistentes a fármacos pertenecientes a la familia de *Enterobacteriaceae*; la razón principal es que los microorganismos (como *E. cloacae*) presentan resistencia intrínseca a las penicilinas, así como a la primera generación de cefalosporinas y cefamicinas, por lo que la potencia y confiabilidad de las carbapenemas es necesaria; sin embargo, recientemente se demostró que ciertas especies como *E. cloacae* son capaces de adquirir resistencia a nuevos antibióticos (8,16).

Desde que en 2001 se notificó el primer caso de *K. pneumoniae* CRE (*Enterobacteriaceae* resistentes a carbapenemas, por sus siglas en inglés), se ha identificado y llevado un control anual de su aparición en todos los estados de la Unión Americana (17). Las infecciones causadas por CRE representan un serio problema en términos de atención médica, ya que las opciones de tratamiento son limitadas, además el uso de terapias empíricas inapropiadas o de tratamientos antibióticos puede conducir a peores resultados (16).

Adicional a la resistencia intrínseca de estos microorganismos, cuentan con la habilidad de desarrollar resistencia a nuevas generaciones de fármacos. En el caso de *Enterobacter* spp. la capacidad de resistencia de este microorganismo a la tercera generación de cefalosporinas, se atribuye principalmente a la expresión de las enzimas llamadas β -lactamasa AmpC, las cuales son capaces de hidrolizar los antibióticos β -lactámicos (8).

1.8 Resistencia antibiótica

El incremento de la resistencia antibiótica de diferentes microorganismos es un problema de salud a nivel mundial que va en aumento, particularmente los ambientes hospitalarios, los

cuales favorecen la selección, permanencia y mantenimiento de las cepas que presentan multiresistencia a fármacos. Los fenómenos relacionados a la resistencia, generalmente son: alteración en el objetivo del antibiótico, permeabilidad de la membrana y los cambios genéticos, en este último se encuentran las mutaciones genéticas y la transferencia de genes asociados a la transferencia mediante plásmidos (18–20).

Estos fenómenos permiten la defensa y proliferación de los microorganismos, lo que tiene como resultado que el tratamiento antibiótico falle, incrementando la mortalidad y morbilidad hospitalaria, teniendo además un impacto significativo sobre el costo de los tratamientos médicos y de prevención de enfermedades bacterianas. Un ejemplo claro de lo anterior son las infecciones provocadas por *Staphylococcus aureus* ya que solamente en Estados Unidos se estima un costo anual de billones de dólares (21).

Una evaluación realizada de 2004 a 2014 en microorganismos Gram negativos MDR (Microorganismos Multirresistentes a Fármacos, por sus siglas en inglés) demostró que del total de microorganismos de *E. cloacae* aislados, el 7% fueron cepas MDR. Las tasas globales de *E. cloacae* MDR aumentaron del 4.5% en 2004 a 10% en el periodo 2008-2009 y decrecieron al 4% en 2014. Un punto a recalcar de este estudio fue que el 14% de los aislamientos de *E. cloacae* en América Latina correspondían a MDR dato que contrasta con los aislados en las demás regiones de estudio (África, Norteamérica, Europa, Asia y Medio Oriente) en los que *E. cloacae* MDR corresponde al 9%, por lo que se confirmó que la mayoría de las cepas analizadas en todo el mundo correspondientes a *E. cloacae* MDR fueron resistentes a los antibióticos levofloxacina, minociclina y ceftriaxona (22).

1.9 Mecanismo de virulencia de *E. cloacae*

A pesar de la relevancia de *E. cloacae* como patógeno nosocomial altamente incidente, la información que existe sobre la acción de sus mecanismos de virulencia y la patogenicidad es limitada (23,24). Los atributos microbianos que confieren el potencial de virulencia se dividen en múltiples categorías derivadas de habilidades como son: entrar en la célula, evadir sus defensas, interactuar con las respuestas inmunes de la bacteria, la habilidad de crecer, adquirir iones y nutrientes en su ambiente (25).

Uno de los mecanismos de virulencia relacionados con *E. cloacae* son las adhesinas y exotoxinas. Las adhesinas son compuestos microbianos conformados por proteínas y polisacáridos que permiten la unión al hospedero además de provocar respuestas inmunes del mismo (25). Mientras que las exotoxinas bacterianas interfieren con la homeostasis celular: en el caso de bacterias toxigénicas, la enfermedad se atribuye completamente al daño de la toxina en el huésped donde los encargados de codificar estos compuestos pueden ser fagos, plásmidos o islas de patogenicidad (25,26)

Se ha sugerido que entre sus mecanismos de virulencia *E. cloacae* puede ser capaz de excretar enterotoxinas, alfa-hemolisinas y citotoxinas formadoras de poro (similares a las toxinas Shiga tipo 2) mediante sistemas de secreción, los cuales son componentes bacterianos capaces de causar daño al hospedero (26,27). Las enzimas han sido relacionadas y consideradas como factores de virulencia importantes que actúan contra los componentes del hospedero; este mecanismo vuelve el entorno apto para el avance de la infección. Un ejemplo de esto son las proteasas y fosfolipasas, las cuales son capaces de dañar la membrana del hospedero permitiendo el ingreso bacteriano (25,28).

La capacidad de adherencia a la superficie del hospedero es un requisito importante para la colonización y el desarrollo de la infección. Durante el proceso de colonización los microorganismos patógenos son capaces de inducir estrés oxidativo en la membrana externa generando lesiones. Las ROS (especies reactivas de oxígeno, por sus siglas en inglés) que pueden ser producidas durante este proceso son: H_2O_2 (peróxido de hidrógeno), radicales $OH^\cdot$ (hidroxilo), O_2^- (anión súper óxido) y los intermediarios de nitrógeno reactivo como NO (óxido nítrico); estos últimos se pueden involucrar en la degradación de DNA cromosomal. Un estudio (2004) sugiere que *E. cloacae* produce toxinas que aumentan la producción de ROS en los leucocitos, provocando estrés oxidativo y finalmente desencadenando muerte celular por apoptosis (30).

Un componente crítico en la patogénesis de ciertas enfermedades infecciosas que se vincula a otros procesos como son fijación y señalización es la formación de biopelícula, que son densos agregados microbianos que conforman una matriz de exopolisacáridos. Para algunas enfermedades como endocarditis bacteriana, fibrosis quística y caries dentales, la formación

de esta biopelícula es necesaria para el desarrollo del proceso patogénico; ya que al conformarse por componentes bacterianos y del huésped permite a los microorganismos aislarse de la acción de los mecanismos de defensa del hospedero y de la acción farmacológica de los antimicrobianos. Las biopelículas médicamente relevantes pueden componerse por un único microorganismo o constituirse de una diversa comunidad de microorganismos (25,31).

2.1 Fimbrias

2.1.1. Características generales y estructura

Los organelos adhesivos denominados pilis o fimbrias son estructuras piliformes ampliamente distribuidas y características de las bacterias Gram negativas, se localizan en la parte externa de las bacterias donde se pueden encontrar distribuidos en toda su superficie bacteriana o solamente en los polos (32). La importancia de estos organelos radica en la adhesión y unión específica a células. La cantidad de fimbrias que expresa una bacteria se asocia a diferentes factores ambientales como son: temperatura, pH, osmolaridad y presencia de ligandos específicos en el medio; estos factores pueden favorecer o reprimir la expresión de las subunidades fimbriales, mismas que se ensamblan mediante la ruta de ensamblaje “Chaperón/Usher” (33). En el caso específico de *E. cloacae* la presencia de múltiples genes fimbriales, indica que este microorganismo es capaz de colonizar un rango muy amplio de células en diferentes ambientes, lo cual contribuye a incrementar la diversidad de la especie (34).

2.1.2 Organización genética

Desde la primera descripción de las fimbrias, la descripción y caracterización de estos organelos ha permitido la identificación de numerosas especies, lo que a lo largo de los años acentuó la necesidad de desarrollar una clasificación. Los estudios sobre bioquímica y genética involucrados en su biosíntesis, dieron lugar a una nomenclatura que permite distinguir las fimbrias dependiendo del mecanismo de ensamblaje que utilizan. En el caso de las bacterias Gram negativas como *E. cloacae*, las clases de ensamblaje características

incluyen las fimbrias conjugativas de fertilidad, el ensamblaje fimbria por la ruta de nucleación y el ensamblaje por la ruta Chaperón/Usher (35).

2.1.3 Ensamblaje fimbrial

La clasificación de las fimbrias se basa en su genealogía, cuya nomenclatura se estableció mediante estudios bioquímicos y genéticos de la biogénesis fimbrial, permitiendo identificar de una manera más eficaz a las fimbrias en base a sus mecanismos de ensamblaje. En las bacterias Gram negativas, los mecanismos de ensamblaje más identificados son: fimbrias de fertilidad conjugativa (F), fimbrias tipo IV, fimbrias ensambladas por la vía extracelular de nucleación/precipitación (curli) y las fimbrias ensambladas por la ruta chaperón/usher (35).

2.1.3.1 Ruta chaperón/usher

La ruta chaperón/usher (CU) es un “sistema de secreción” altamente conservado en bacterias Gram negativas dedicado al ensamblaje de sus subunidades fimbriales. Los genes responsables de la síntesis de las fimbrias se encuentran organizados en operones (es decir, en conjuntos de genes que se transcriben con el mismo iniciador), que codifican para las tres diferentes proteínas necesarias para el ensamblaje fimbrial: la estructura mayor, los chaperones y una proteína usher. Así mismo los operones fimbriales contienen genes adicionales encargados de codificar para proteínas estructurales, de ensamblaje o regulatorias (35).

2.1.3.2 Clasificación de la ruta chaperon/usher

Las subunidades proteicas de ensamblaje y estructura contienen secuencias típicas localizadas en el amino terminal (N-terminal), característica que es fundamental y que permite su transporte a través de la membrana citoplasmática mediante la vía secretora Sec; una vez en el periplasma ocurre el procesamiento de la péptido señal y la formación de enlaces disulfuro, gracias a la acción catalizadora de isomerasas disulfuro periplasmáticas (Como: DsbA y SrgA). Además, estas subunidades carecen de cadenas β antiparalelas finales y cuentan con pliegues tipo inmunoglobulina, lo que permite la formación de una hendidura hidrófoba donde las chaperonas son capaces de unirse, esta interacción asegura el

plegamiento correcto de las mismas. En ausencia de su chaperona las subunidades forman agregados periplasmáticos que son degradados rápidamente por la proteasa DegP y dependiendo de la orientación del filamento las subunidades pueden ensamblar fimbrias flexibles y delgadas con dos unidades por giro o fimbrias gruesas con tres subunidades por giro que pueden incorporar adhesinas de punta o proteínas adaptadoras (35–37).

Basado en las secuencias de aminoácidos pertenecientes a las proteínas Usher, las fimbrias incluidas en el ensamblaje CU pueden ser clasificadas en seis grupos: α - fimbrias, ensambladas por la vía CU alternativa, β -, γ -, κ - y π -fimbrias, ensambladas por la vía CU clásica; y finalmente las σ -fimbrias ensambladas por la vía CU arcaica (35). Estas fimbrias se encuentran ubicuamente expresadas en la superficie de múltiples bacterias patógenas Gram negativas, como lo es *E. cloacae*, estos organelos fungen como importantes factores de virulencia que facilitan las interacciones entre la bacteria y el hospedero, proceso que es fundamental para el desarrollo del proceso infeccioso y para la persistencia del patógeno dentro del hospedero; además, su presencia se ha relacionado a otro factor de virulencia importante: la Biopelícula (38,39).

2.2.1. Sistemas de secreción

Los sistemas son fundamentales para el desarrollo de las bacterias, ya que permiten la secreción de diversos sustratos como proteínas, polisacáridos y ácidos nucleicos. Además, en ciertos casos los sistemas de secreción son utilizados por bacterias patógenas para manipular al huésped o para tomar ventaja sobre el ambiente. Existen diferentes clases de sistemas de secreción (SS) para bacterias y sus diseños difieren dependiendo de qué sustratos cruzan a través de una, dos o hasta tres membranas fosfolipídicas, donde dos pertenecen a la bacteria patógena y una al huésped (40).

Como ya se mencionó, existen diferentes tipos de secreción, siendo la secreción general (Sec) y la translocación gemela de arginina (Tat) los procesos más utilizados. En bacterias Gram negativas las proteínas viajan desde la membrana citoplasmática de la célula hacia el exterior por las vías Sec o Tat (40).

2.2.1.1. Sistema de secreción Sec

Esta vía de secreción transloca proteínas desplegadas y como se muestra en la Figura 1, consiste de tres partes: primero los componentes de direccionamiento de proteínas (SecB) mantienen la proteína en su forma desplegada, después llevan la proteína hacia la proteína motora SecA, la cual finalmente es la encargada de guiar la proteína al canal conductor integrado a la membrana SecYEG. Además, SecA tiene la capacidad de fungir como ATPasa proporcionando la energía necesaria para la translocación. Aunque las proteínas secretadas por esta vía pueden tener diversas funciones, la mayoría de éstas promueven la virulencia de patógenos bacterianos, siendo uno de los medios de secreción más utilizados por las especies Gram negativas (40–42)

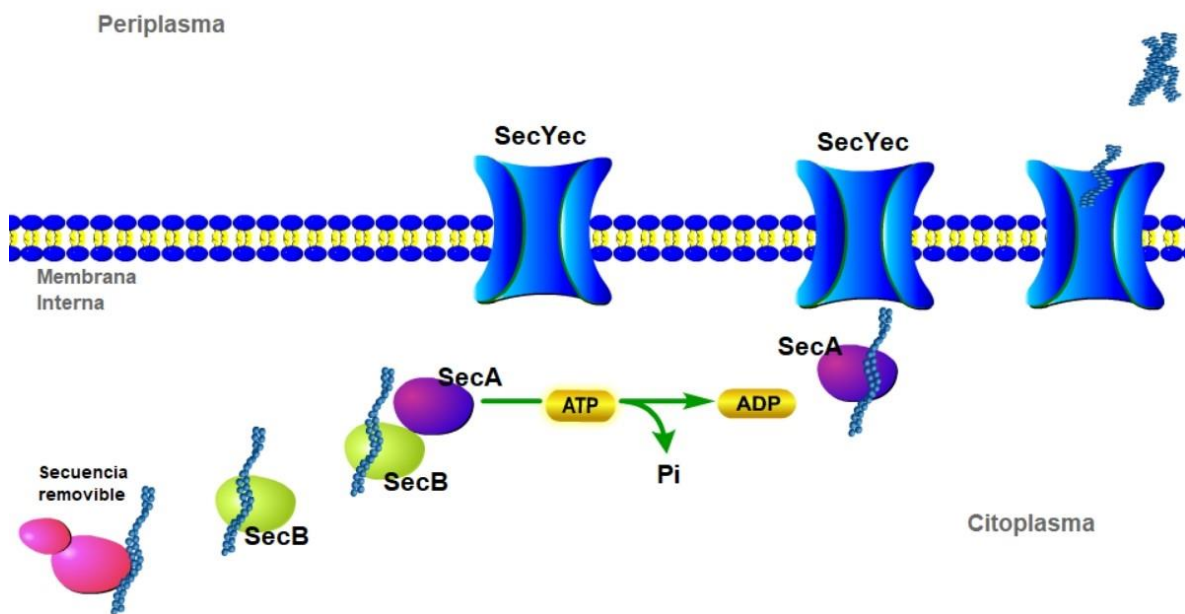


Figura 1: Esquema del sistema de secreción Sec.

2.2.1.2. Sistema de secreción Tat

A diferencia de la vía de secreción Sec, la vía Tat secreta proteínas plegadas. Esta vía es considerada crítica ya que no todas las proteínas pueden secretarse en su estado desplegado debido a que existen proteínas que presentan modificaciones postraduccionales como son los factores redox que se sintetizan en el citoplasma. Como se muestra en la Figura 2, este sistema

se integra de tres componentes TatA, TatB y TatC, se ha observado que en las bacterias Gram negativas tanto TatB como TatC se unen a una señal N-terminal específica que contiene motivos “gemelos” de arginina para la secreción de sustratos del sistema Tat. Posteriormente TatB y TatC se unen a TatA que es la encargada de formar el canal en la membrana interna, a través del cual las proteínas se translocan hacia el periplasma (40,43).

Aunque la ruta de Tat es importante para la fisiología y la supervivencia de las bacterias patógenas y no patógenas, existen diferentes bacterias patógenas que requieren de la vía Tat para la virulencia completa en modelos de infección, las enzimas de la fosfolipasa C son un ejemplo de proteínas secretadas por Tat que sirven como factores de virulencia para varios patógenos (40,44,45).

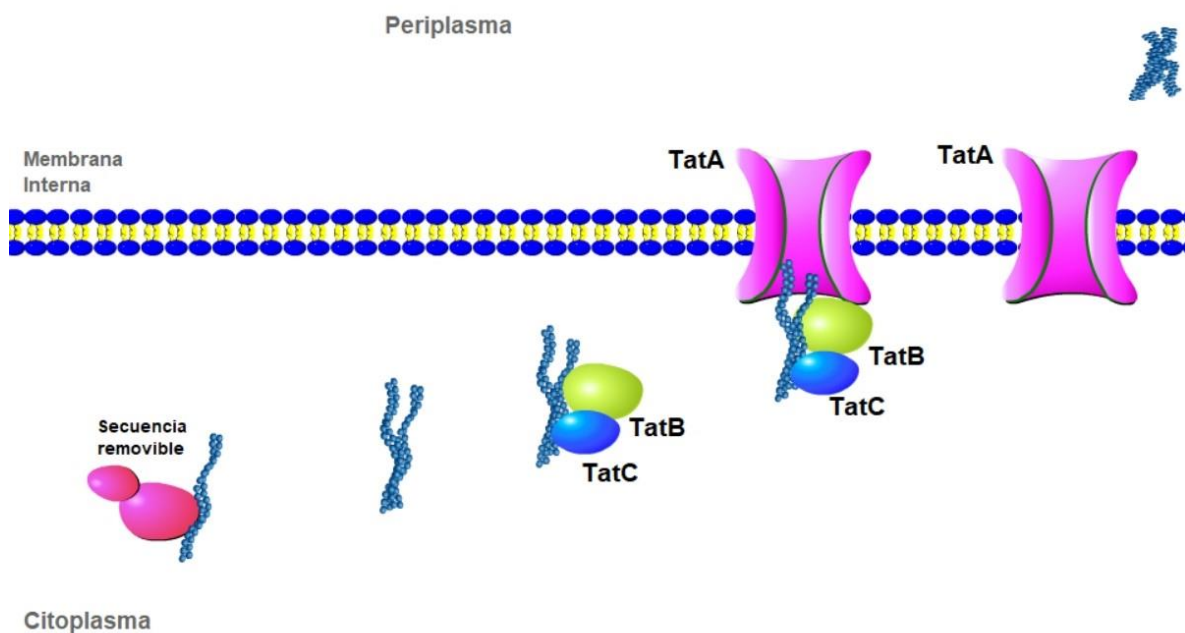


Figura 2: Esquema del sistema de secreción Tat.

2.2.1.3. Sistemas de secreción en Gram negativas

Un gran número de bacterias Gram negativas dependen de los sistemas de secreción para transportar proteínas de virulencia fuera de la célula; esta secreción puede representar un desafío para las bacterias ya que las proteínas deben atravesar dos o tres membranas de

fosfolípidos para alcanzar su destino final. Algunas proteínas secretadas en Gram negativas atraviesan las membranas en dos pasos, donde primero se envían al periplasma a través de los sistemas de secreción Sec o Tat y luego son transferidos a través de la membrana externa por la acción de un segundo sistema de transporte conocido como “Secreción de proteínas dependiente de Sec o Tat”. Otras proteínas son secretadas a través de canales que atraviesan las membranas interna y externa en un proceso conocido como “Secreción de proteínas independiente de Sec y Tat”. Como se observa en la Figura 3 los sistemas de secreción para bacterias Gram negativas están numerados y cada sistema transporta un subconjunto específico de proteínas, los sistemas se basan en canales barril β que forman un anillo en la membrana externa presentando además diversidad de estructuras y funciones (40).

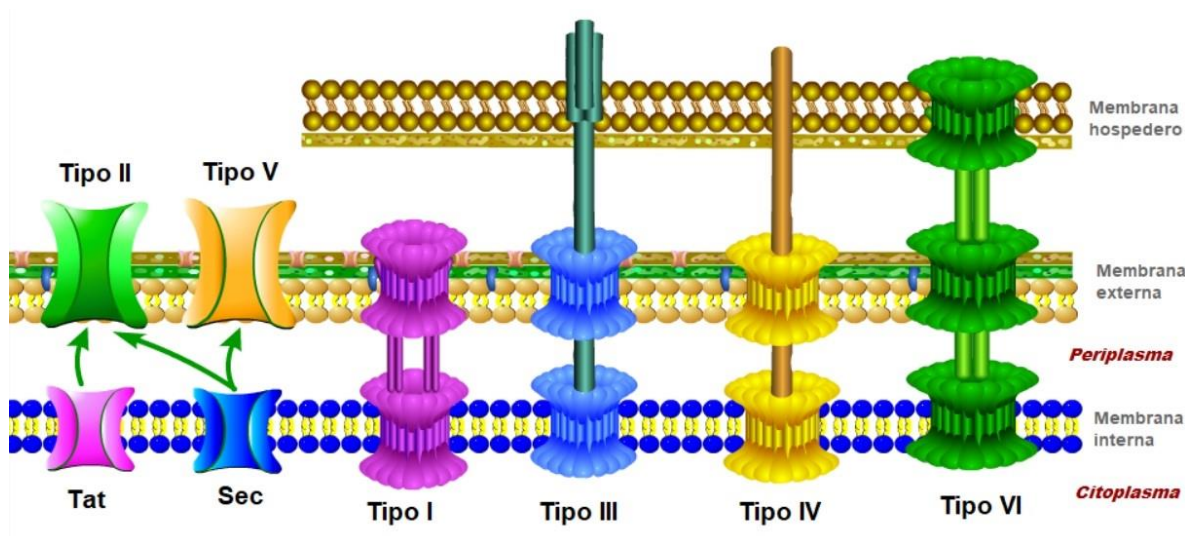


Figura 3: Sistemas de secreción en bacterias Gram negativas.

2.3.1 Fimbrias tipo P y tipo I

El término fimbrias de tipo I se refiere a cualquier estructura fimbrial de entre 6-8 nm de ancho que se relaciona con la regulación de la aglutinación de glóbulos rojos mediante la inhibición de la manosa. También pueden ser llamadas fimbria “comunes”, o “sensibles a manosa” y generalmente se encuentran en miembros de la especie *Enterobacteriaceae* que al ser observadas al microscopio electrónico se aprecian como estructuras de 1-2 μ m de largo por 7 nm de ancho distribuidas uniformemente sobre la superficie de la bacteria (33).

Las fimbrias pertenecientes a esta clasificación se componen por subunidades denominadas “pilinas”, el número de subunidades que compone a una fimbria es variable. Como se observa en la Figura 4, en el caso de las fimbrias Tipo I, las subunidades que la conforman son: FimG, FimF, FimA (subunidad mayor), FimH (adhesina), FimD (chaperona) y FimC (usher), que son codificadas por el operón *fim*. Una vez expresadas mediante la acción de las proteínas FimD y FimC, las subunidades se entrelazan en una estructura helicoidal de 1-2 μm , que se compone por ~ 1000 copias de FimA con un diámetro de 7-8 nm, situando en el extremo distal de la fimbria una copia única de la subunidad adhesiva FimH (46,47).

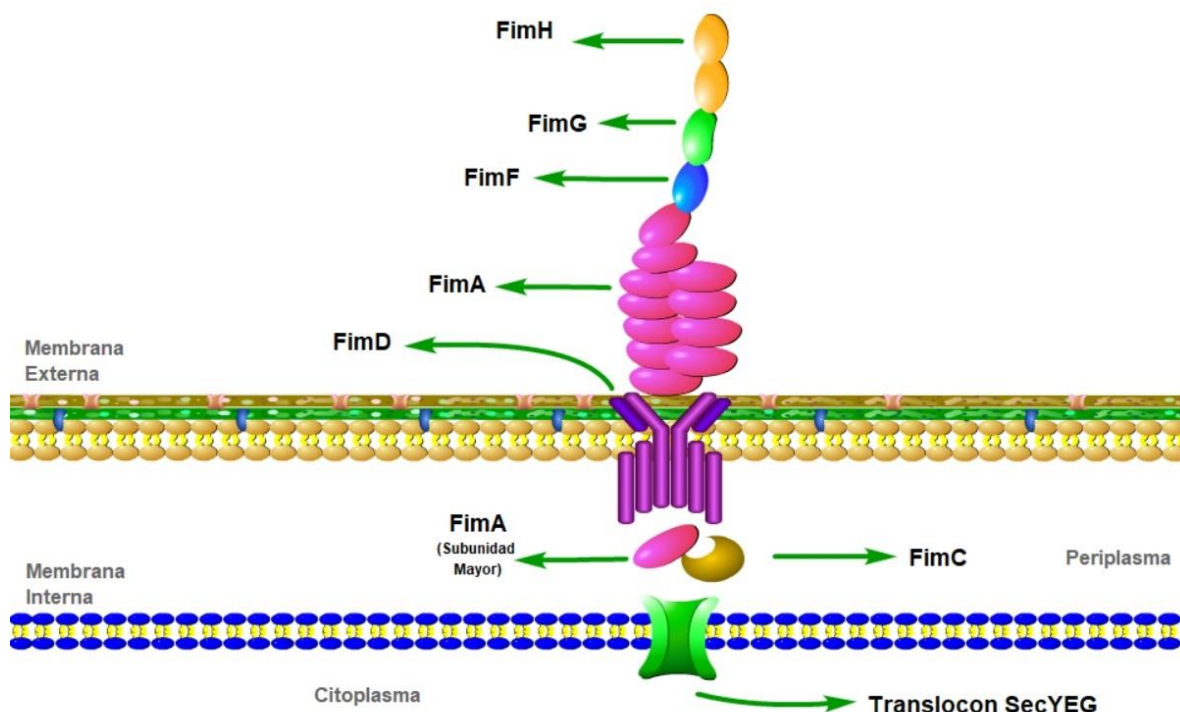


Figura 4: Estructura de las fimbrias tipo I.

El ensamblaje de las fimbrias Tipo P es idéntico al de las fimbrias Tipo I, siendo la diferencia el clúster (es decir, el grupo de genes que codifica sus subunidades). Como podemos observar en la Figura 5, en este caso, las subunidades que la conforman son: PapF, PapE, PapK, PapA (subunidad mayor), PagG (adhesina), PapC (chaperona) y PapD (Usher), las cuales son codificadas por el operón *pap* (46,47).

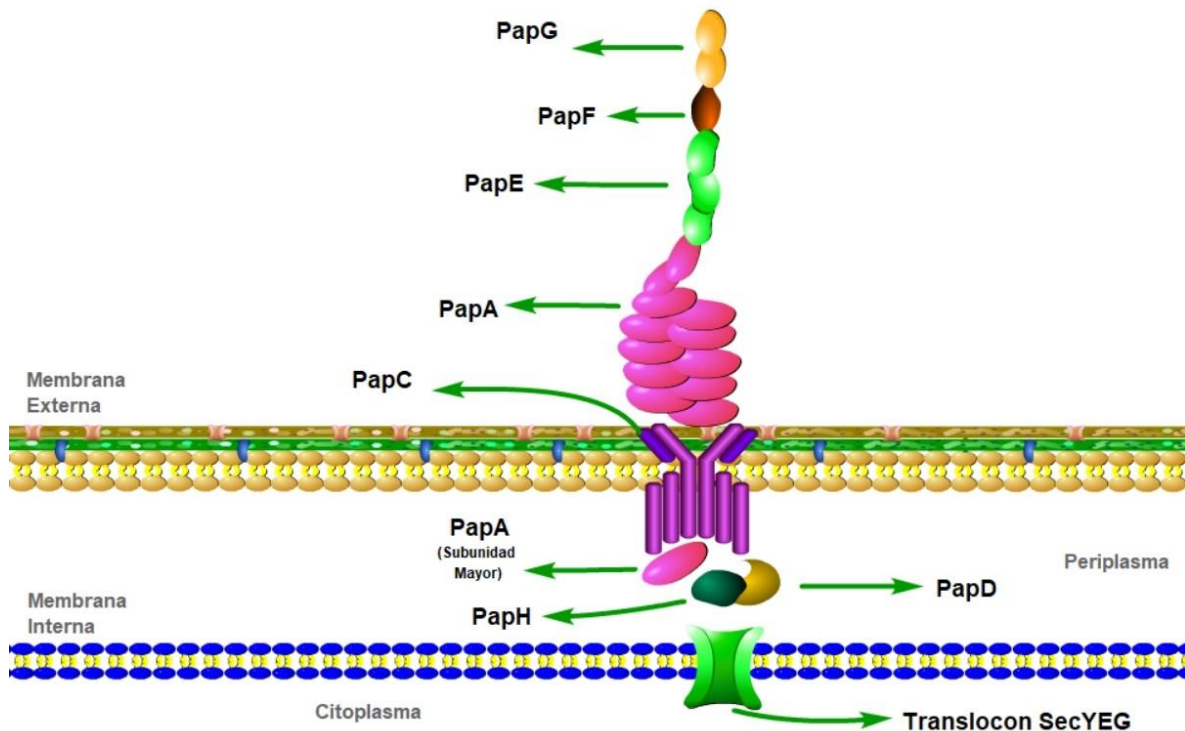


Figura 5: Estructura de las fimbrias tipo P.

2.3.1.1. Biogénesis de las fimbrias tipo I y tipo P

El inicio de la biogénesis de estas fimbrias comienza en el citoplasma con la síntesis de las subunidades fimbriales, posteriormente son trasladadas al periplasma a través del “Sistema de secreción Sec”. Una vez ahí, las subunidades se unen a las chaperonas protoplasmáticas para formar el complejo chaperón-adhesina, el cual inicia el proceso de transporte. La formación de estos complejos evita las interacciones entre ellas, manteniéndose disponibles para interactuar con la proteína Usher (compuesta por 24 poros β -barril, un dominio periplasmático N-terminal (NTD), dos dominios periplasmáticos C-terminal (CTD1 y CDT2) y un dominio conector que actúa como catalizador del ensamblaje fimbrial) lo que finalmente permite la liberación de la chaperona, el ensamblaje de las subunidades estructurales y, la secreción de la estructura a la superficie externa de la célula a través del canal Usher (39,48,49).

2.3.2. Fimbrias tipo Curli

Descritas en 1989, se definieron como una fibra proteica enrollada característica de bacterias entéricas como *E. coli* y *Salmonella spp* (50). Actualmente las fimbrias tipo Curli se describen como fibras amiloides extracelulares, en las cuales tienen roles la patogenicidad y la formación de biopelícula. La matriz extracelular que forma la biopelícula protege a las comunidades bacterianas de condiciones externas como lo es el estrés, además de promover la colonización y la permanencia en el hospedero (51).

2.3.2.1. Biogénesis de las fimbrias tipo Curli

Los genes que codifican para las subunidades necesarias en el ensamblaje de las fimbrias tipo Curli se encuentran en dos operones que son: *csgBA* y *csgDEFG*. Específicamente *csgBA* codifica para subunidad mayor, mientras que CsgD actúa como activador transcripcional positivo del mismo; las subunidades CsgE, CsgF y CsgG son factores adoptados del ensamblaje (52).

Las fimbrias Curli se componen principalmente de la subunidad proteica mayor CsgA, que es translocada en su forma desplegada a través de la membrana externa; posteriormente se ensambla en fibras mediante la acción de la subunidad menor CsgB. La subunidad CsgA contiene una secuencia SecYEG que codifica la señal de secreción y un dominio nuclear amiloide C-terminal. El dominio nuclear se compone de 5 unidades repetidas R1, R2, R3, R4 y R5 (con una longitud de 19-24 residuos), cada uno de los cuales forma la estructura recurrente “ β -cadena giro β -cadena” las cuales se ensamblan para formar una lámina β , la cual es una estructura típica de los amiloides. Por otra parte, la subunidad CsgB exhibe una organización similar al dominio de CsgA, con la excepción de que la unidad R5 carece de los residuos que se encuentran conservados en las otras cuatro unidades, en su lugar esta unidad contiene residuos que son necesarios para el ensamblaje de CsgB con la pared celular. Después de la secreción CsgB permite la polimerización de las subunidades CsgA en las fimbrias Curli (53).

En el periplasma la subunidad CsgA tienen tres posibles destinos: pueden continuar hacia el canal CsgG y excretarse a la superficie de la bacteria, otra opción es que pueden someterse a

la degradación proteolítica, o pueden permanecer en el periplasma donde la polimerización de CsgA llevaría a la formación de fibras tóxicas lo cual se evita mediante la unión de CsgC a CsgA. Como se observa en la Figura 6, si la subunidad CsgA permanece en el espacio periplasmático y no se forman fibras tóxicas, la subunidad interactúa primero con un nonámero de CsgG y después con el canal de difusión CsgG (Poro β -barril de 36 cadenas nonaméricas) (54). El dominio periplasmático de la subunidad CsgG se ensambla para formar el dominio CsgE, la región que se encuentra entre el periplasma y la transmembrana forma un canal con un diámetro aproximado de 9 Å, a través de cual pueden pasar solamente polipéptidos desplegados. CsgE forma un adaptador periplasmático soluble que se une al CsgG periplasmático formando un tipo de jaula alrededor del canal de secreción CsgG; el tamaño de la jaula es del tamaño ideal para que las subunidades CsgA desplegadas atraviesen enteras, por lo que la captación y el confinamiento de CsgA dentro de la jaula periplasmática de CsgG-CsgE genera un gradiente de entropía a través de la membrana provocando la extrusión del péptido CsgA a través del canal CsgG hacia la membrana externa de la bacteria. Una vez ahí, CsgB controla la nucleación y polimerización de las subunidades CsgA de las fimbrias tipo Curli de forma dependiente a CsgF (55–57).

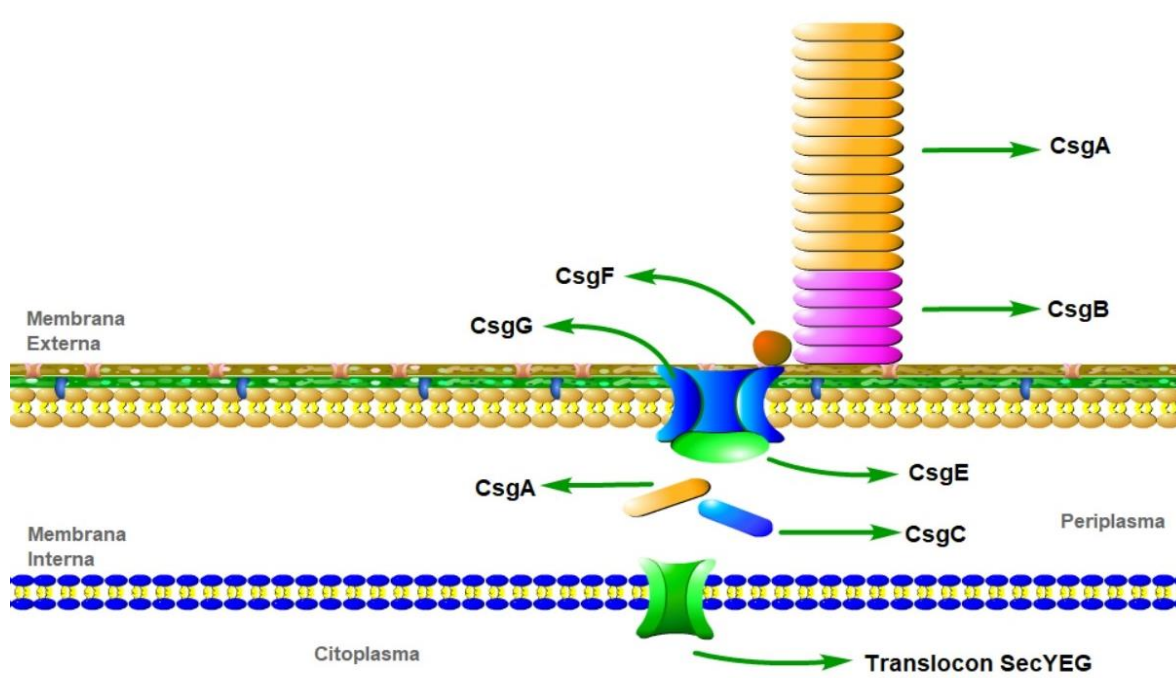


Figura 6: Estructura de las fimbrias tipo Curli.

2.3.3. Fimbrias tipo III

Las fimbrias Tipo III fueron identificadas y caracterizadas inicialmente en *K. pneumoniae* por Duguid y colaboradores en 1959. Este tipo de organelos se pueden encontrar en múltiples patógenos pertenecientes a las enterobacterias como son *Klebsiella*, *Serratia*, *Proteus*, *Citrobacter*, *Providencia* y *Enterobacter*, y pertenecen a la clase de fimbrias ensambladas mediante la ruta CU (58). Tienen 2-4 nm de ancho por 0.5-2 μm de longitud, se caracterizan por su capacidad para aglutinar eritrocitos *in vitro* por adición de ácido tánico en presencia o ausencia de manosa. Además de aglutinar células rojas, las fimbrias tipo III pueden mediar la adherencia a levaduras de una manera resistente a la manosa (59).

2.3.3.1. Biogénesis de las fimbrias tipo III

Los genes que codifican la producción de fimbrias tipo III en *K. pneumoniae* pueden ser transmitidos por plásmidos o transportados en el cromosoma bacteriano; existe evidencia de que el grupo de genes transportados por plásmidos está relacionado con un plásmido conjugativo, que también puede estar involucrado en transferencia de resistencia antibiótica entre bacterias. Las fimbrias de este tipo son codificadas por el operón *mrk* (*mrkABCDF*) compuesto por cinco genes que codifican los componentes estructurales y de ensamblado. El operón *mrk* está altamente conservado en las especies de *Klebsiella* y *Enterobacter*, y aunque una sonda de *mrkA* puede utilizarse para detectar este gen en cepas que no pertenecen a la especie *Klebsiella*, la relación entre los grupos de genes *mrk* de diferentes cepas de enterobacterias no se ha determinado del todo; la comparación de MrkB y MrkC con proteínas de otros clúster genéticos para fimbrias indican su pertenencia a la familia de los chaperones periplasmáticos y de las proteínas de ensamblaje respectivamente (60).

Las fimbrias tipo III se ensamblan utilizando la vía chaperón/usher; como se observa en la Figura 7, en esta ruta de ensamblaje, las subunidades fimbriales son transportadas a través del sistema de secreción Sec hacia el periplasma donde la chaperona MrkB forma un complejo por complementación de cadena donante con las subunidades fimbriales y posteriormente este complejo se une a la proteína de ensamblaje MrkC, la cual se encuentra en la membrana externa (61). La estabilidad estructural de las fimbrias se asocia con los β filamentos en la región C-terminal de MrkA, mientras que MrkD, ubicado en la punta de las

fimbrias, confiere las propiedades adhesivas del apéndice y determina la especificidad de unión de la fimbria. Se ha observado que la adhesión de MrkD tiene efecto sobre la capacidad de la bacteria para adherirse a superficies basolaterales de células derivadas del tracto urinario y el epitelio bronquial. Aunque la función de MrkD es desconocida; existe evidencia experimental que ha demostrado su incorporación de forma intermitente a las fimbrias III en donde desempeña un papel de estabilización en las fimbrias y reducción de la longitud de las mismas. Además, se ha sugerido que MrkD puede ser un iniciador para el ensamblaje de las fimbrias tipo III (59,62,63).

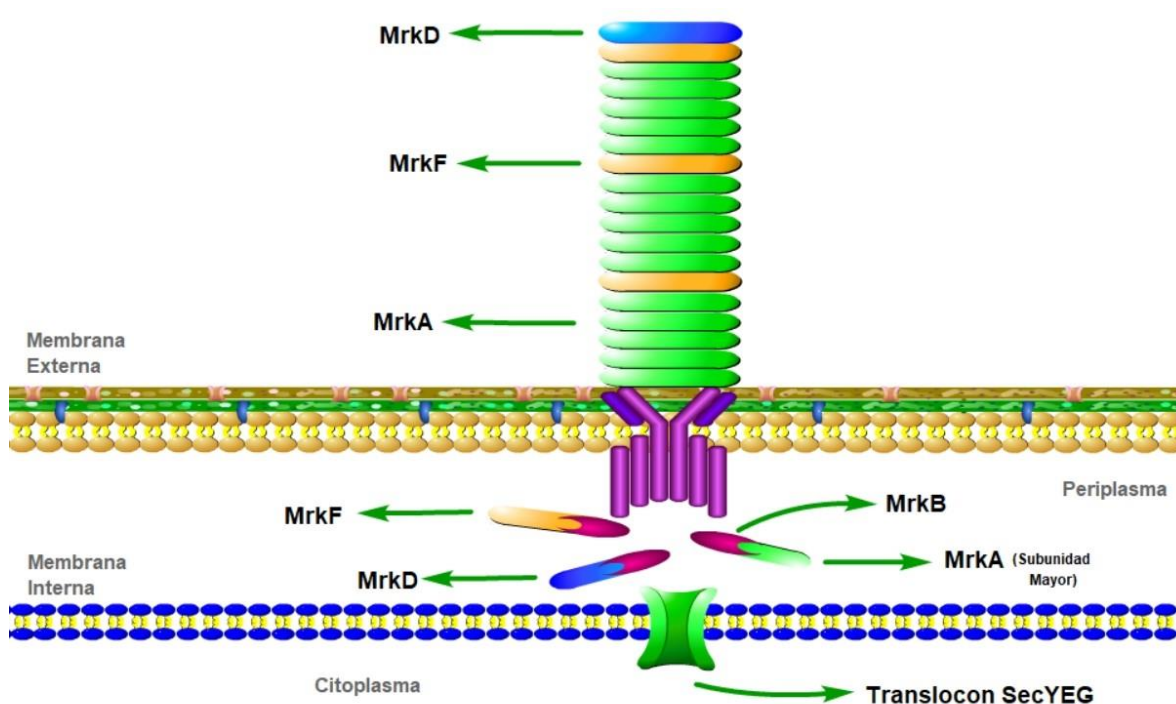


Figura 7: Estructura de las fimbrias III.

2.3.4. Fimbrias tipo CSU

Las fimbrias de este tipo pertenecen a la vía de ensamblaje CU arcaica (la rama “no clásica” más grande de este tipo de ensamblaje); este sistema arcaico tiene una distribución filogenética muy amplia y se asocia con una amplia variedad de enfermedades (también relacionadas a fimbrias ensambladas por las vías clásicas CU). Debido a que esta vía fue descrita hace poco tiempo, el conocimiento sobre su mecanismo de ensamblaje y adhesión

es poco. La presencia, función y relación con la formación de biopelícula de este tipo de fimbria, se ha estudiado principalmente en el microorganismo *Acinetobacter baumannii* (64).

2.3.4.1. Biogénesis de las fimbrias tipo CSU

El sistema que codifica para estas fimbrias se encuentra en el clúster *csuA/B-A-B-C-D-E*. Esta fimbria se conforma por cuatro subunidades proteicas: CsuA/B (16.1 kDa), CsuA (17.3 kDa), CsuB (16.9 kDa) y CsuE (33.5 kDa), ensambladas mediante la maquinaria Chaperón/usher CsuC/CsuD. La chaperona de unión CsuA/B cuenta con un dominio incompleto Ig-like muy flexible en un sándwich tipo β de seis hebras, lo que provoca que en la séptima hebra se forme una hendidura hidrófoba. Una vez que comienza a formarse el polímero las subunidades CsuA/B se unen por complementación de la hebra donante (DSC), el extremo N-terminal de la subunidad se inserta en la hendidura hidrófoba de la subunidad vecina; A diferencia de CsuA/E, la subunidad CsuE no es capaz de autoensamblarse, en lugar de la hebra donante esta subunidad contiene un dominio adicional, lo que provoca que CsuE se localice en la punta de la fimbria y ya que múltiples subunidades de dos dominios ubicadas en la punta fimbrias han demostrado actuar como adhesinas de unión al hospedero. Se cree que CsuE también puede estar involucrado en la unión a sustratos bióticos y abióticos (65).

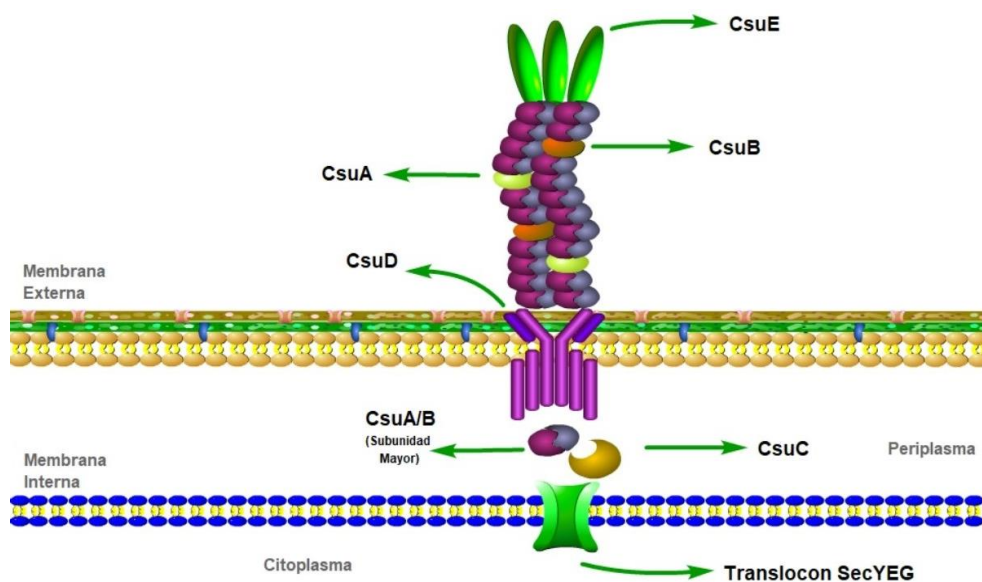


Figura 8: Estructura de la fimbria tipo Csu.

2.3.5. Fimbrias tipo ECP

Descrita en 2001, fue nombrada como fimbria tipo Mat (fimbria asociada a meningitis y temperatura regulada, por sus siglas en inglés); se presentó como un nuevo tipo de fimbria en *E. coli* cuya morfología era similar a la de las fimbrias tipo I y P (5 a 7 nm de diámetro y 0.4 a 5 µm de longitud); los estudios serológicos y de la secuencia de sus subunidades, fueron los que permitieron afirmar que no existía relación entre las proteínas fimbriales caracterizadas anteriormente en *E. coli* y otras bacterias (66). Posteriormente, se demostró que este tipo de fimbria se encuentra altamente conservada y expresada en todas las cepas patógenas de *E. coli*, así como en cepas comensales, por lo que el nombre de pili (fimbria) común de *E. coli* (ECP) fue propuesto como alternativa a “Mat”, esto con la finalidad de describir apropiadamente su ubicuidad (67).

2.3.5.1. Biogénesis de las fimbrias tipo ECP

Las subunidades fimbriales de las fimbrias ECP se encuentran codificadas en el clúster *ecpRABCDE* (también conocido como *matABCDEF*); como se observa en la Figura 9 las subunidades que conforman esta fimbria son EcpA (subunidad mayor), EcpC (usher putativo), EcpE (usher potencial), EcpB (chaperón putativo), EcpD (adhesina), EcpR (regulador positivo de la expresión de esta fimbria). La primer subunidad que codifica el operón *ecp* es EcpR, la cual contiene un dominio C-terminal hélice-giro-hélice (HTH) de unión a DNA putativo para LuxR y que actúa como un regulador de la expresión fimbrial; esta subunidad se une río arriba a *ecp* activando la transcripción a la vez que inhibe el efecto represor de H-NS, además indirectamente estabiliza la producción del mRNA para EcpA (68).

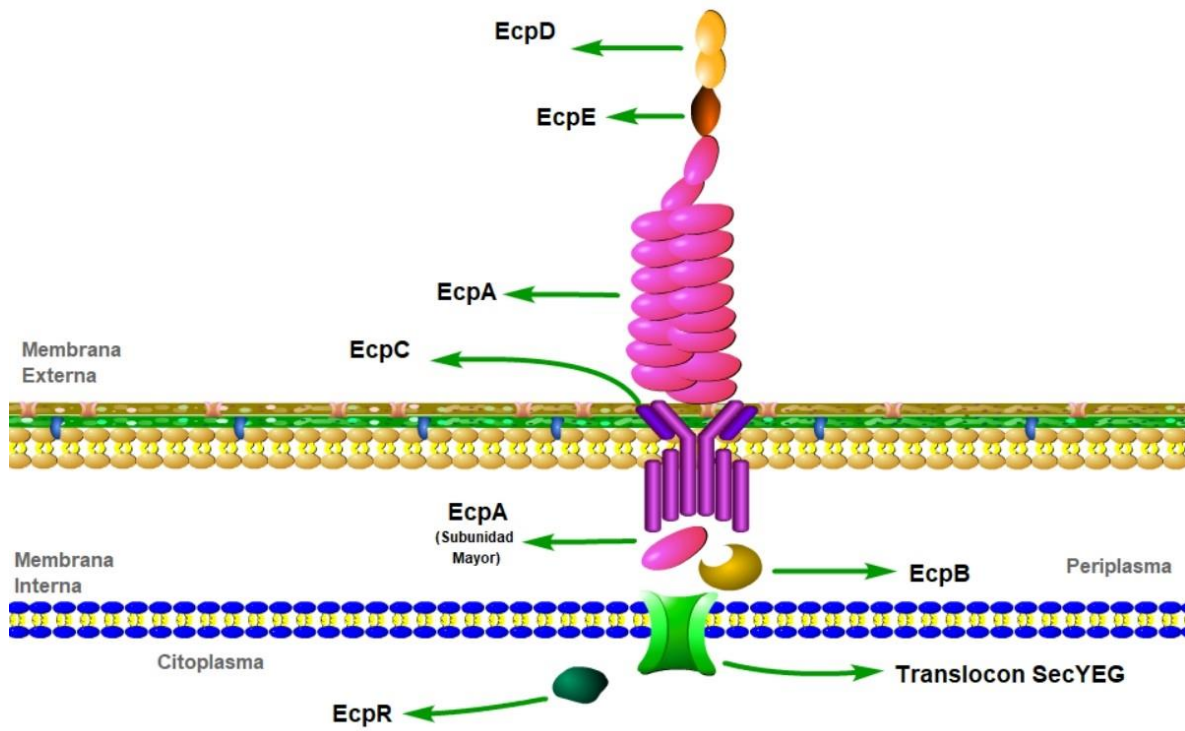


Figura 9: Estructura de la fimbria tipo Ecp.

II. Antecedentes de problema

2.1. Expresión de fimbrias en *Enterobacter cloacae* ATCC 13047

E. cloacae forma parte de los patógenos nosocomiales entéricos de mayor relevancia; entre las infecciones más comúnmente atribuidas a este microorganismo y en las que se destaca la acción de la biopelícula, se encuentran las infecciones del tracto biliar y el urinario, especialmente las asociadas al uso de catéter (52).

En el genoma de *E. cloacae* se encuentran codificados 14 genes para las proteínas tipo usher, utilizadas en el ensamblaje de las fimbrias de este microorganismo. En la tabla 1 se presenta la descripción de sus genes fimbriales.

Tabla 1: Genes fimbriales para proteínas usher, codificados en el genoma de *E. cloacae* ATCC13047.

Gen	Descripción	Homología	
		Fimbria	Tipo
<i>ECL_01281</i>	Proteína usher de membrana externa.	FimA	I
<i>ECL_01106</i>	Proteína usher de membrana externa (Biogénesis fimbrial).	MrkA	III
<i>ECL_01410</i>	Proteína usher de membrana externa (Biogénesis fimbrial).	CsuA/B	Csu
<i>ECL_00940</i>	Proteína fimbrial usher.	StkA	-
<i>ECL_04369</i>	Proteína fimbrial usher.	FimA	I
<i>ECL_00371</i>	Proteína usher Pmfc de membrana externa.	FimA	I
<i>ECL_02932</i>	Proteína usher Lpfc de membrana externa.	FimA	I

<i>ECL_00072</i>	Proteína hipotética.	EcpA	ECP
<i>ECL_03398</i>	Proteína usher putativa.	EcpA	ECP
<i>ECL_04605</i>	Proteína hipotética.	-	-
<i>ECL_04373</i>	Proteína fimbrial usher	-	-
<i>ECL_02380</i>	Proteína usher Lpfc de membrana externa.	LpfA	-
<i>ECL_00091</i>	Proteína de ensamblaje para fimbria tipo P, porina PapC	FimA	I
<i>ECL_00064</i>	Proteína usher de membrana externa, putativa para FimD	-	-

2.2. Biopelícula

La biopelícula es una estructura comunitaria formada por la acumulación de células bacterianas sésiles, que construyen lo que se denomina una “matriz extrapolimérica”. Esta matriz es considerada un método de protección importante para la adhesión y correcto desarrollo de múltiples bacterias. Para permitir el continuo desarrollo y la permanencia, la biopelícula forma diversos canales, que permiten la circulación de nutrientes favoreciendo su proliferación, ocasionando la expresión de diferentes patrones genéticos dependiendo de la región de la biopelícula a la cual pertenecen; destacando que las células pertenecientes a la biopelícula tengan la capacidad de regresar a su forma planctónica y de esta forma colonizar nuevas superficies (69,70).

Estos agregados se distinguen de las formaciones planctónicas por la base estructural que presentan, compuesta de polisacáridos, agua, iones, DNA y proteínas excretadas por las bacterias. Su tamaño es variable (desde micrómetros y hasta varios centímetros), facilitando el desarrollo de los microorganismos en ambientes grandes y diversos, por lo que la presencia de biopelícula, es reconocida como un factor importante para el correcto desarrollo de múltiples infecciones en humanos (70,71).

2.3. Biopelícula y resistencia antibiótica

La formación de biopelículas es una etapa importante de la virulencia de muchos patógenos, es un proceso complejo, cuyo desarrollo se divide en etapas como son la “Unión reversible” que es la unión de los microorganismos a la superficie del hospedero mediante interacciones débiles como son las fuerzas de van der Waals. La “Colonización” que consiste en la unión irreversible del microorganismo por interacciones hidrofóbicas o hidrofílicas de fimbrias, lipopolisacáridos, exopolisacáridos, etc. El “Desarrollo” es donde se da la acumulación de células y la proliferación de las mismas y finalmente, la “Maduración” que es la formación estable la biopelícula y los canales de distribución de nutrientes para que, las células se diseminan, regresando a su estado planctónico y poder continuar la colonización (72).

Las bacterias formadoras de biopelícula muestran una mayor resistencia a los antibióticos; el mecanismo responsable de esto ha sido investigado, y se atribuye a diversos procesos. La matriz de la biopelícula evita la difusión eficiente de los antibióticos, lo que provoca una menor exposición de las bacterias a ellos, por otra parte, se ha sugerido que el crecimiento lento dentro de las bacterias que residen dentro de una biopelícula proporciona resistencia aumentada y las proteínas específicas de unión a antibióticos están poco expresadas (60).

El cambio fenotípico de célula planctónica a una célula sésil perteneciente a una biopelícula es un proceso regulado por numerosos factores genéticos y ambientales, el cual varía dependiendo de la especie (73). Existen diversas características para diferenciar las células pertenecientes a una biopelícula y las células planctónicas. Mientras que las células planctónicas se encuentran expuestas a un ambiente prácticamente uniforme, las células pertenecientes a la biopelícula experimentan diferentes gradientes nutrimentales y producción de desechos (74). Sin embargo, la diferencia más importante entre ambos tipos de células es que las pertenecientes a una biopelícula son menos susceptibles a la acción de agentes antimicrobianos (75). La resistencia bacteriana a los fármacos se puede definir como aquella capacidad para desarrollarse en ambientes donde las concentraciones de los agentes antimicrobianos generalmente inhibieron su crecimiento; dicha resistencia, generalmente es atribuida a mutaciones o al intercambio de elementos genético lo cual es definido como “resistencia adquirida”. Sin embargo, esta resistencia también puede ser intrínseca,

dependiendo de los genes y las propiedades innatas de las cepas silvestres. Por ejemplo, en comparación con las bacterias Gram positivas, las bacterias Gram negativas cuentan con mayor resistencia intrínseca a los antibióticos. La tolerancia hacia agentes microbianos favorece la habilidad del microorganismo para sobrevivir, sin continuar su desarrollo, ni crecimiento en presencia de agentes bactericidas. Los ejemplos de mecanismos de tolerancia son: a) la tasa de crecimiento, b) células persistentes y c) mecanismos relacionados con el estrés oxidativo inducido por los antibióticos (76–78).

La resistencia y tolerancia a los antibióticos ejercida por las biopelículas es multifactorial. Los mecanismos para esta resistencia y tolerancia dependen del agente antimicrobiano, de la especie, la edad y el estadio de la biopelícula. Además, de las condiciones ambientales de crecimiento, ninguno de estos factores es capaz de aumentar, individualmente la resistencia antibiótica; solo integrados en conjunto son capaces de limitar la efectividad de los tratamientos farmacológicos disponibles (79–82).

2.4. Osmolaridad

La osmolaridad ($n_{\text{osm/L}}$) y la osmolalidad ($n_{\text{osm/Kg}}$), expresan la concentración osmótica de partículas activas en una solución (83). La osmolaridad es directamente proporcional a su molaridad (mol/L), ya que ambas están expresadas en unidades de volumen dependientes a la temperatura. Por tanto, es correcto aceptar que la osmolaridad y la osmolalidad tienen el mismo valor (84).

En el caso de las bacterias, la osmolaridad es un factor importante que determina diversas propiedades del microorganismo; por ejemplo, la rigidez, aunque las bacterias son semirrígidas este valor depende de la composición de su pared celular, la cual está compuesta por peptidoglicanos, y organelos como son las fimbrias. Así mismo, la concentración de solutos en el citoplasma genera presión osmótica que es denominada “presión de turgencia” la cual es limitada por la pared celular, definiendo de esta manera la forma de la célula (85).

2.4.1. Efecto de la osmolaridad en la expresión de fimbrias

El microorganismo patógeno *Pseudomonas aeruginosa* ocupa el tercer lugar como responsable de infecciones de tracto urinario (ITU) asociadas a catéter (93). La patogenicidad es atribuida a factores ambientales como son: iones de hierro, presencia de proteína Tamm-Horsfall (PTH), el pH urinario y la propia osmolaridad de la orina, que en conjunto facilitan la colonización. *P. aeruginosa* requiere de hierro para desarrollarse y producir factores de patogenicidad (Exo A), mientras que la alta osmolaridad y un bajo pH muestran efectos inhibitorios en el crecimiento. En el caso de la orina, la osmolaridad y el pH son variables ya que se pueden afectar por diversos factores (como son, la edad, dieta, enfermedades), siendo los valores que se consideran normales de 50 a 1,400 mOsm/Kg (86–92). Un estudio realizado en 2009, expuso una cepa de *P. aeruginosa* a diferentes condiciones de osmolaridad (200-350 mOsm/L con 0.1 M de NaCl y pH de 7.0) para evaluar la influencia de ésta en su virulencia; demostrando que el incremento de osmolalidad de 200 a 300 mOsm/L aumenta su patogenicidad debido a que favorece la expresión sus mecanismos de virulencia y que, la misma osmolaridad del medio determina la extensión del daño tisular, para lo cual usaron como indicador los niveles de malondialdehído (MDA) por el método de Wills en un modelo animal en ratones (94).

Otro microorganismo que sobrevive a estrés osmótico es *E. coli* uropatogénica (UPEC). Estudios previos demostraron que la osmolaridad del ambiente afecta la expresión de fimbrias tipo I de UPEC y sugieren que la proteína de unión a DNA OmpR regula la expresión de diferentes genes tipo *fim*. Un estudio realizado en el 2013 expuso a cepas de *E. coli* a cuatro diferentes condiciones de osmolaridad y pH en medio Luria-Bertani (LB). Las condiciones fueron: a) pH 5.5 con baja osmolaridad (osmolaridad estándar del medio), b) pH 5.5 con alta osmolaridad (800 mOsm de NaCl), c) pH 7.0 con baja osmolaridad y d) pH 7.0 con alta osmolaridad. Se observó, que los niveles de expresión de *fimB* evaluados a pH neutro con baja osmolaridad fueron altos, mientras que el pH ácido y baja osmolaridad evidenciaron baja expresión. Este gen se encuentra regulado por la acción de SlyA o RcsB, los cuales son activadores de transcripción propuestos. El cambio de osmolaridad baja y pH neutro hacía pH ácido y alta osmolaridad (lo cual puede encontrarse en el tracto urinario humano), favorece la expresión de OmpR y la unión al sitio promotor desplazando a SlyA o RcsB como

activadores de *fimB*; así mismo, la expresión de OmpR en UPEC incrementa en ambientes ácidos con alta osmolaridad. Estos resultados sugieren el rol fisiológico de OmpR en *E. coli* que se desarrolla en ambientes de este tipo como lo es el riñón humano (95,96).

Otro estudio que evidenció fenómenos semejantes fue el realizado en 2005, donde se evaluó el efecto de la osmolaridad en la expresión de los genes OmpR y CpxR relacionados con las subunidades de las fimbrias tipo Curli de *E. coli*. Para ello, utilizaron el medio M63/2 en donde se empleó una condición de baja osmolaridad al suplementarse con glucosa al 0.2% y una de alta osmolaridad utilizando sacarosa al 20% y/o 0.1 M de NaCl. Sus resultados demostraron que en los medios con baja y media osmolaridad, el gen *csgD* es activado por OmpR y se incrementa la producción de las fimbrias Curli; mientras que en el caso de la alta osmolaridad, la respuesta es que CpxR inhibe la transcripción de *csgD* provocando que se reprima la expresión de este tipo de fimbria (97).

2.4.2. Efecto de la osmolaridad en la formación de biopelícula

Los microorganismos en la naturaleza no se encuentran bajo sus condiciones de crecimiento óptimas, en realidad se encuentran expuestos a diferentes tipos de estrés en condiciones hostiles, siendo la presión osmótica una de las condiciones físicas más significativas donde las bacterias se enfrentan (84). La pared celular es la estructura primaria que protege a la bacteria, además de proveer su forma y mantener la integridad mecánica de la misma, funge como barrera ante el estrés osmótico o “presión de turgencia”, la cual resulta de los componentes citoplasmáticos que presionan la membrana citoplasmática o la pared celular (98-100). Los valores de turgencia normales en el caso de *E. coli* varían de entre 0.5 a 3 atm (atmósferas) dependiendo de la osmolaridad del medio de cultivo (101). Además, se conoce mediante microscopía de fuerza atómica (AFM) que *Streptococcus* puede presentar cambios en la estructura y elasticidad de sus peptidoglicanos cuando está sujeta al incremento de la presión de turgencia debido a la variación de osmolaridad del medio (102).

El estudio genético de la formación de biopelícula en la bacteria Gram positiva *Bacillus subtilis* ha sido estudiado ampliamente, demostrándose su capacidad de formar biopelículas complejas. La superficie de la biopelícula se encuentra cubierta con hidrofobinas BslA, las cuales proveen la capacidad de repeler el agua. Sin embargo, el agua fluye hacia la

biopelícula y con ella los nutrientes, los cuales son impulsados por los gradientes osmóticos consecuencia de la presión osmótica ejercida por las diversas sustancias extrapoliméricas (EPS's) que la conforman. Aunque este comportamiento se ha descrito en *B. subtilis*, no es un comportamiento exclusivo de su biopelícula, ya que se demostró la expansión de biopelículas en la bacteria Gram negativa *Vibrio cholerae* (103,104).

E. coli extraintestinal (ExPEC) causa gran variedad de infecciones que pueden ser de tracto urinario, sistema nervioso central, tracto respiratorio, entre otros; y se relacionan con su capacidad para formar la biopelícula; Un ejemplo es *E. coli* uropatogénica, la cual causa infecciones en el tracto urinario difíciles de erradicar aún con la acción de antibióticos (105). Por ello, en 2014, un estudio mostró la relación entre la osmolaridad, la producción de fimbrias tipo curli y la capacidad de formación de biopelícula de *E. coli*. Estudiaron el rol de la proteína TolC (que pertenece a la familia de proteínas de eflujo de membrana externa) en diferentes condiciones de osmolaridad, demostrando la importancia que tiene a altas osmolaridades ya que promueve el mantenimiento de la estructura y funciones de la membrana externa; favoreciendo también la formación de biopelícula y la expresión de fimbrias tipo curli (106).

En relación al presente estudio, se sabe poco de la relación de las fimbrias Curli de *E. cloacae*. En 2012, se realizó un análisis para conocer la participación de estas fimbrias y su relación con la formación de biopelícula en este microorganismo. Se encontró que el operón csgBA existía en el 78.6% de las cepas de *E. cloacae* aisladas y que la capacidad de formación de su biopelícula se relacionaba positivamente con la expresión de ARNm del gen csgA. Los aislamientos del estudio resaltan la importancia de las fimbrias Curli en la capacidad de formación de biopelícula y en cómo las cepas que presentan fimbrias de este tipo forman biopelículas maduras en forma de pilares, resaltando su importancia en la formación y morfología de la biopelícula de *E. cloacae* (52).

III. JUSTIFICACIÓN

Las infecciones nosocomiales son un problema de salud mundial, estas son contraídas en hospitales y centros de salud por pacientes de internamiento hospitalario o atención ambulatoria y representan una causa de morbilidad y gasto económico importante para países tanto desarrollados como carentes de recursos. Desde hace años, *E. cloacae* es considerado un patógeno oportunista de alta importancia epidemiológica, siendo uno de los microorganismos más frecuentemente aislados en hospitales, cuya gran resistencia al tratamiento farmacológico ha permitido su propagación. Al igual que otras bacterias Gram negativas, *E. cloacae* contiene distintos factores de virulencia como son toxinas, adhesinas, sistemas de secreción, fimbrias y biopelícula. La expresión de estos mecanismos de virulencia se puede modificar en función del ambiente en el que se desarrolla la bacteria, siendo los factores ambientales; como osmolaridad, pH, disponibilidad de nutrientes y temperatura, entre otros, así como los que se relacionan con el metabolismo del microorganismo. Es claro que la cantidad de estudios acerca de sus factores de virulencia y cómo éstos se ven alterados por los factores ambientales es limitada. Actualmente se sabe que el genoma de la cepa de *E. cloacae* ATCC 13047 tiene 14 operones que codifican para sus subunidades fimbriales pero no se ha mostrado la relación de estas subunidades con la capacidad de formación de su biopelícula. Por lo tanto, el presente trabajo, brindará información sobre la relación entre la osmolaridad, la expresión de las fimbrias y la formación de biopelícula aportando un conocimiento nuevo sobre el mecanismo de patogénesis de *E. cloacae* que permita sentar bases para idear un tratamiento integral eficiente contra las infecciones provocadas por este microorganismo.

IV. HIPÓTESIS

Cambios en la osmolaridad del medio modifica la expresión de los genes fimbriales de *E. cloacae* y por lo tanto su capacidad en la formación de biopelícula.

V. OBJETIVOS

5.1 Objetivo general

Analizar la expresión genética de diferentes tipos de fimbrias implicadas en la formación de biopelícula de *Enterobacter cloacae* en diferentes condiciones de osmolaridad.

5.2 Objetivos específicos

1. Cuantificar la osmolaridad de los medios de cultivo LB, TSB, CFB, DMEM y PPLO mediante osmómetro de presión de vapor.
2. Cuantificar la expresión genética de los genes fimbriales de *E. cloacae* ATCC 13047 por RT-qPCR bajo el crecimiento en diferentes condiciones osmolaridad.
3. Evaluar la formación de biopelícula mediante el método de tinción con cristal violeta en la cepa de *E. cloacae* ATCC 13047 en las diferentes condiciones de osmolaridad.
4. Relacionar la osmolaridad con la expresión de diferentes genes fimbriales de *E. cloacae* ATCC 13047 y la formación de biopelícula.

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

6.1. Material

6.1.1. Cepa bacteriana y líneas celulares

Para el desarrollo del presente estudio se empleó la cepa de referencia de *E. cloacae* subespecie *cloacae* ATCC 13047, la cual fue aislada del fluido cerebroespinal de un paciente inmunocomprometido. La cepa se mantuvo en glicerol al 15% a -70°C hasta su uso.

6.1.2. Medios de cultivo

Los cultivos bacterianos se realizaron en diversos medios líquidos: Luria Bertani (LB), Soya Trypticaseina (TSB), *Dulbecco's Modified Eagle Media* (DMEM) *high glucose*, *Colonization Factor Broth* (CFB) y medio PPLO. La descripción de los medios de cultivo se muestra en la siguiente tabla:

Tabla 2: Tabla de composición de los medios de cultivo utilizados.

Medio	Contenido	Compuesto
LB	10 g/L	Digerido enzimático de caseína
	5 g/L	Extracto de levadura
	10 g/L	NaCl
TSB	17 g/L	Digerido enzimático de caseína
	3 g/L	Peptona de harina de soya
	2.5 g/L	Dextrosa
	5 g/L	NaCl
	2.5 g/L	K ₂ HPO ₄
CFB	1 g/L	Casamino ácidos
	0.15 g/L	Extracto de levadura
	0.005 g/L	MgCl ₂
	0.0005 g/L	MnCl ₂
DMEM	4.5 g/L	Glucosa
	110 mg/L	Piruvato de sodio
	264.92 mg/L	CaCl ₂ 2H ₂ O
	0.10 mg/L	Fe(NO ₃) ₃
	400 mg/L	KCl
	200 mg/L	MgSO ₄ 7H ₂ O
	6.4 g/L	NaCl
	3.7 g/L	NaHCO ₃
	125 mg/L	NaH ₂ PO ₄ -H ₂ O
	15 mg/L	Rojo de fenol
PPLO	6 g/L	Digerido enzimático de tejido animal
	10 g/L	Peptona enriquecida con levadura
	5 g/L	NaCl

En caso de ser necesario, los medios de cultivo se suplementan con antibióticos. Estos antibióticos se añadieron al medio estéril a partir de una solución concentrada conservada a -20°C de acuerdo a las instrucciones establecidas por Sambrock *et. al.* (107). Las concentraciones finales de los antibióticos a utilizar fueron las siguientes: ampicilina (200 µg/mL), kanamicina (50 µg/mL) y tetraciclina (10 µg/mL).

6.1.3. Diagrama experimental

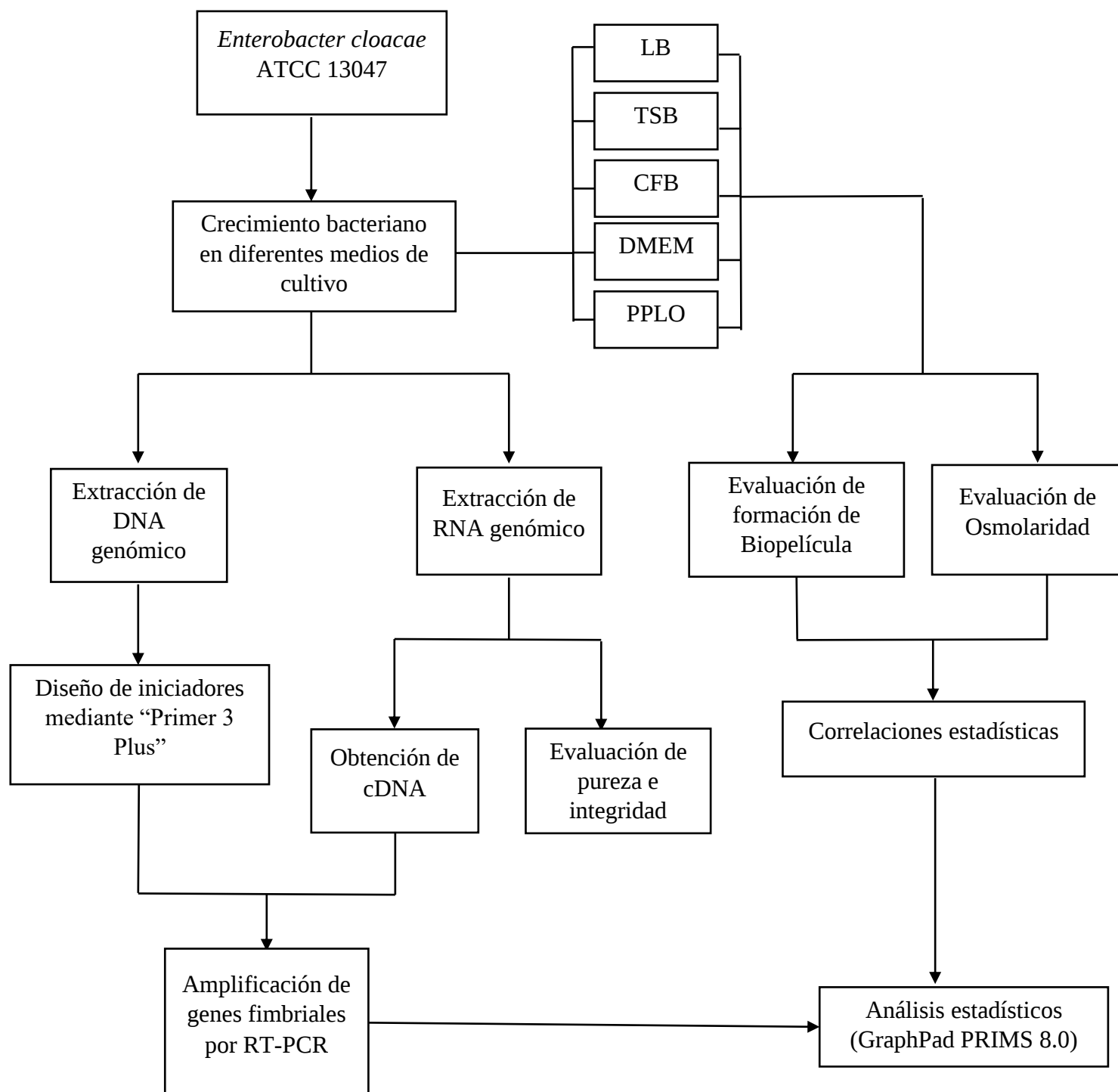


Figura 10: Diagrama experimental.

6.2. Métodos

6.2.1. Medición de la osmolaridad de los medios de cultivo

Principio: La medición de osmolaridad en el osmómetro de presión de vapor se fundamenta en el punto de congelación y depresión de la presión de vapor por acción de un higrómetro de termopar.

Procedimiento: La cuantificación de la osmolaridad de los diferentes medios de cultivo se realizó con el Vapro™ 5520 de la marca Wescor. Se colocó un disco de papel filtro de medidas estándar al equipo en el portamuestras y se colocaron 10 µL de medio con ayuda de una micropipeta, se cierra el portamuestras y se inició el ciclo de 75 seg monitoreando la temperatura inicial y final del ciclo. Este procedimiento fue realizado por quintuplicado.

6.2.2. Evaluación de la formación de biopelícula

Principio: La cuantificación de biopelícula se realizó mediante un método descrito por primera vez por Christensen *et. al.* (108), basado en una simple tinción con un colorante catiónico como el cristal violeta y registrando la absorbancia en un espectrofotómetro.

Procedimiento: El procedimiento se llevó a cabo de acuerdo a una modificación del método descrito por O'Toole en 2011 (109). Se preparó un cultivo de *E. cloacae* (aproximadamente 5 mL) en medio LB y se dejó incubar a 37°C toda la noche; posteriormente 1.5 µL del cultivo base fueron inoculados en 1.5 mL de cada uno de los medios estudiados y se homogeneizaron; en una placa de 96 pozos se agregaron 200 µL de cada inóculo por quintuplicado y se dejó incubar a TA durante 24 horas. Después se retiró el medio de cultivo y se dejó secar la biopelícula, se realizaron 3 lavados con 200 µL PBS 1X y se dejó secar completamente; una vez seca la placa se agregaron 100 µL por pozo de cristal violeta filtrado al 1%, la placa se dejó teñir durante 10 minutos. Posteriormente, el cristal violeta se retiró y fue filtrado; a la placa se le realizaron nuevamente 3 lavados con 200 µL de PBS 1X y se dejó secar. Finalmente se agregaron 100 µL de etanol al 70% por 10 minutos y se leyeron las placas en el lector a 600 nm.

6.2.3. Determinación de la expresión genética relativa mediante RT-qPCR

Principio: La reacción en cadena de la polimerasa es una reacción enzimática *in vitro* que amplifica millones de veces una secuencia específica de DNA durante varios ciclos; en los que la secuencia blanca es copiada. Cuando se utiliza DNAc proveniente del ARNm se conoce como RT-qPCR, la cual se lleva a cabo mediante una reacción conocida como transcripción inversa, siendo es el método más efectivo para detectar y cuantificar ácidos nucleicos (110,111).

Procedimiento: El método descrito por Livack *et. al.* (112), se utilizó para determinar la expresión genética en unidades de expresión relativa mediante la aplicación de la fórmula matemática $2^{-\Delta CT}$. La ΔCT determinó al restar el valor de CT (“crossing treshold”) del gen en estudio al valor de 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 final sea mayor o igual a 1.

6.2.4. Extracción del DNA genómico

La extracción de DNA genómico se realizó de acuerdo a la metodología descrita en 1966 por González *et. al.* (113). Para ello, 10 mL de las cepas de *E. cloacae* en fase estacionaria se centrifugaron a 400 rpm durante 10 min; se decantó el sobrenadante y se resuspendió la pastilla en 500 μ L de regulador de lisis (Cloruro de guanidinio 6M, Tween 80 al 10%, EDTA 0.5 M y 2- β -Mercaptoetanol 14.7M). Posteriormente, la suspensión se transfirió a tubos de 2 mL con tapón de rosca. Después los tubos se sometieron a tres ciclos de choque térmico, cada uno de 10 min a -70 °C en ultracongelador y 10 min a 65 °C en baño maría. Se adicionaron 500 μ L de una mezcla de fenol:cloroformo:alcohol isoamílico (25:24:1) y todo se agitó suavemente en el vórtex para centrifugar a 14,000 rpm a temperatura ambiente durante 10 min. La fase acuosa se recuperó, se transfirió a un tubo Eppendorf de 1.5 mL y se le agregaron 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1), se agitó en vórtex y se centrifugó bajo las mismas condiciones.

A partir de los cultivos de la cepa de referencia *E. cloacae* ATCC 13047 en fase estacionaria se realizó RT-PCR en tiempo real para evaluar la expresión genética de los 14 operones

fimbriales en los diferentes medios de cultivo; determinando la expresión de estos genes durante la formación de biopelícula y las mediciones de osmolaridad. Para lo cual, la fase acuosa se recuperó nuevamente y se precipitó el DNA con dos volúmenes de etanol absoluto; inmediatamente después se colocaron los tubos a una temperatura de -20°C durante 24h para favorecer la precipitación del material genético. Los tubos se centrifugaron nuevamente a 16000 x g a temperatura ambiente durante 15 min, se eliminó el sobrenadante y se lavó la pastilla con 500 µl de etanol al 70%, posteriormente se eliminó el exceso de etanol secando el DNA en el secador “DNA110 Speed Vac”. La muestra se resuspendió en un volumen apropiado de agua destilada estéril dependiendo del tamaño de la pastilla obtenida y el DNA se cuantificó y evaluó su pureza por espectrofotometría utilizando el Nano Drop-1000 (ND-1000). Finalmente se determinó su calidad e integridad mediante electroforesis en gel de agarosa al 1% y se almacenó a -20°C hasta su uso.

La fase acuosa se recuperó nuevamente y se precipitó el DNA añadiendo 1 mL de etanol absoluto frío, se agitó en vortex y fue centrifugado a 12,000 rpm por 10 min. Para finalizar, se decantó y agregaron 500 µL de etanol frío al 70% y se centrifugó por 2 min

6.2.5. Expresión genética de los genes fimbriales y diseño de sus iniciadores

Para el análisis de la expresión genética de los genes que codifican para las proteínas usher de *E. cloacae* que se estudiaron en este trabajo (Tabla 1) se utilizó como gen normalizador el gen constitutivo *rrsH*, el cual codifica para el rRNA 16S de *E. cloacae*. Los iniciadores se diseñaron utilizando el programa “Primer 3 plus” que fueron seleccionados en base a un Tm entre 58 y 62 °C y a producir un amplicón de entre 75 y 150 pb. Una vez diseñados los iniciadores, fueron enviados para su síntesis al Instituto de Biotecnología de la UNAM.

6.2.6. Extracción de RNA total

La extracción del RNA total se realizó siguiendo el protocolo descrito por Jahn *et. al.* (114). A partir de un cultivo de *E. cloacae* ATCC 13047 incubado durante 24 h con 10 mL de LB, TSB, CFB, DMEM o PPLO, se seleccionaron las muestras que fueron centrifugadas a 4,000 rpm durante 15 min, el sobrenadante se desechó y a la pastilla se le agregaron 500 µL de solución de lisis (SDS 10%, C₂H₃NaO₂ 1M, EDTA 0.5M).

Para llevar a cabo el rompimiento celular, se realizaron tres ciclos de vortex-hielo durante 30 s cada uno, posteriormente se añadieron 500 μ L de fenol-ácido previamente calentado y se incubó por cinco minutos a 65°C. Finalizada la incubación fue centrifugado a 14,000 rpm por cinco minutos a 4°C, la fase acuosa se transfirió a un tubo limpio en donde se le agregó 1 mL de etanol absoluto frío y se dejó precipitar durante una hora a -70 °C.

Posteriormente, la muestra se centrifugó (14,000 rpm por 10 min a 4 °C) y el sobrenadante fue eliminado. La pastilla fue colocada en hielo y se le añadió 1 mL de etanol frío al 70%, seguido de una centrifugación (12,000 por 2 min a 4 °C), de donde el sobrenadante se decantó y a la pastilla se le agregaron 400 μ L de solución de lisis (SDS 10%, $C_2H_3NaO_2$ 1M, EDTA 0.5M) y 1 mL de etanol, ambos fríos, (proceso que se realizó por duplicado). Después del segundo proceso, la pastilla se dejó secar por 15 min y se agregaron 100 μ L de dietil-pirocarbonato al 0.01%, se homogeneizó suavemente durante 10 min y se procedió a cuantificar el RNA. Para lo cual, se utilizó el equipo Nanodrop (Thermo Scientific, NanoDrop 1000). Primero se limpió y calibró el lector del aparato con H₂O estéril, posteriormente se colocaron 2 μ L de la muestra y se realizó la cuantificación.

Posterior a la cuantificación, a la muestra se adicionaron 10 μ L de regulador para DNAsa y 1 μ L de DNAsa Turbo 10X (Ambión), se incubó durante 30 min a 37 °C con una agitación cada 5 minutos a 300 rpm. Después se adicionaron 10 μ L del agente de inactivación de la DNAsa y la muestra se incubó y homogeneizó durante 5 min a temperatura ambiente para después ser centrifugada a 10,000 rpm por 5 min. Finalmente, la fase acuosa fue transferida a un tubo limpio para determinar la pureza e integridad del RNA mediante electroforesis (45 min a 120 volts) en gel de agarosa con cloro al 1% (Agarosa 3 g, 30 mL de TAE 1X, Cloralex).

6.2.7. Obtención de cDNA mediante la transcripción reversa (RT) del RNA total

Para realizar la PCR en tiempo real se utilizó el termociclador LightCycler 480 (Roche) que cuenta con un sistema de detección fluorocromo SYBR[®] Green I. Así mismo, se utilizaron placas de 96 pozos para realizar la reacción correspondiente de acuerdo al siguiente protocolo:

Tabla 3: Mezcla de reactivos RT-qPCR

Reactivo	Cantidad
H2O grado PCR (kit comercial)	1.5 μ L
Primer 1	0.5 μ L
Primer 2	0.5 μ L
“LightCycler® 480 SYBR Green I Master” 10X	5 μ L
cDNA	2.7 μ L

La mezcla de reacción se colocó en cada pozo de la placa, la cual fue sellada con una lámina plástica adherente y que antes de ser colocada en el equipo LightCycler® 480 (Roche) fue centrifugada a 1500 rpm por dos minutos. El programa aplicado a la placa fue el siguiente: 95 °C durante 10 s, con una 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 (durante esta fase se midió la fluorescencia en forma continua para la construcción de la curva de disociación), y un ciclo final de enfriamiento a 40 °C durante 10 s.

6.2.8. Análisis estadístico de los resultados

El software estadístico que se utilizó para el análisis de los resultados fue GraphPad PRISM 8.0. Con la finalidad de detectar diferencias estadísticamente significativas se realizó un Análisis Paramétrico de Varianza Unifactorial (ANOVA de una vía) a los resultados de la cuantificación de la osmolaridad, la expresión genética y formación de biopelícula de los medios de cultivo. Además, los resultados de la cuantificación de osmolaridad y la formación de biopelícula fueron correlacionados con los resultados de la expresión genética. Para todos

los análisis de este trabajo los valores de $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

VII. RESULTADOS

7.1. Osmolaridad de los medios de cultivo

A continuación, se presentan los resultados de las mediciones de osmolaridad en los diferentes medios de cultivo.

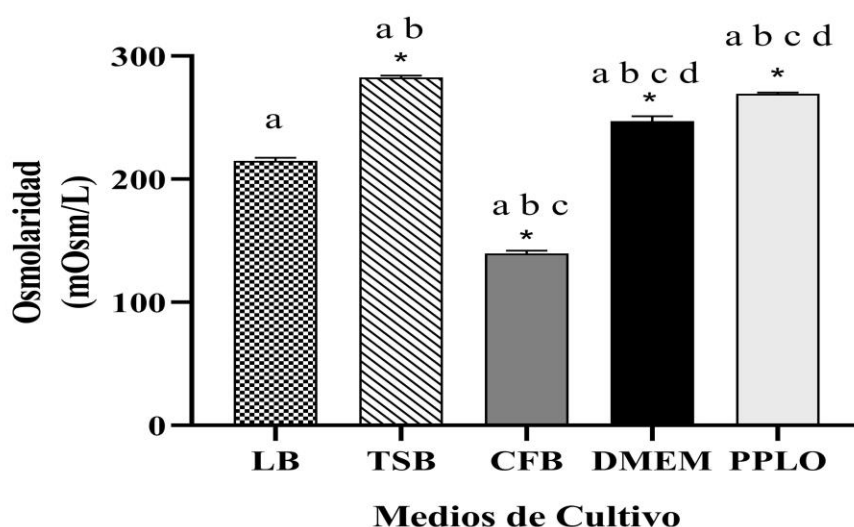


Figura 11: Valores de osmolaridad de los diferentes medios de cultivo.

* $p < 0.001$ diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Los datos que se observan en la Figura 11, mostraron que existen diferencias estadísticamente significativas en los cuatro medios de cultivo evaluados con respecto al control LB, el cual tuvo un promedio de 214.933 mOsm/L $\pm$ 2.05. El medio de cultivo que presentó el mayor promedio de osmolaridad, con respecto al control, fue TSB, con un valor de 260.611 mOsm/L $\pm$ 2.05; es decir, una osmolaridad de 1.31 veces mayor con respecto a LB. Así mismo, el medio de cultivo PPLO también presentó un alto valor de osmolaridad con un promedio de 269.333 mOsm/L $\pm$ 2.05 siendo 1.25 veces mayor que el control; mientras que el medio de cultivo DMEM presentó un valor de 247.167 mOsm/L $\pm$ 2.05 (es decir, 1.15 veces sobre el

medio control). Finalmente, el medio de cultivo CFB fue el que presentó la osmolaridad más baja ($139.667 \text{ mOsm/L} \pm 2.05$), observándose una disminución de 0.64 veces con respecto al control; por lo que el rango de osmolaridad en este estudio fue 139.667 a 260.611 mOsm/L.

7.2. Análisis de expresión de genes fimbriales

Como ya se mencionó, la evaluación de la expresión genética se realizó mediante una PCR en tiempo real de la cepa silvestre de *E. cloacae* en cinco medios de cultivo, empleando el sistema de detección de fluorocromo SYBR® Green I, siendo el medio LB el control de este estudio.

7.2.1. Expresión genética de las fimbrias Tipo I

Los resultados correspondientes a los genes que codifican para las fimbrias tipo I indicaron que:

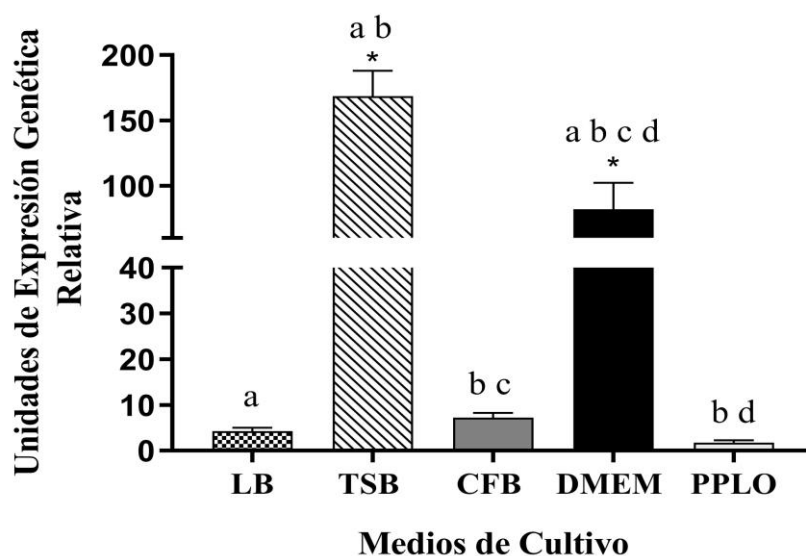


Figura 12: Expresión genética del ECL_04369 de *E. cloacae*.

*** $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

La expresión genética de *ECL_04369*, como se observa en la Figura 12, mostró incrementos significativos en los medios TSB y DMEM. El medio TSB aumentó 39.16 veces con respecto

al control siendo el que presentó la mayor expresión. Mientras que el medio de cultivo DMEM se incrementó 19.09 veces con respecto a LB. Se confirmó que el medio CFB solo incrementó 1.68 veces con respecto al medio control. Por otra parte, el medio PPLO fue el único que presentó una menor expresión; es decir, solo 0.41 veces con respecto a LB.

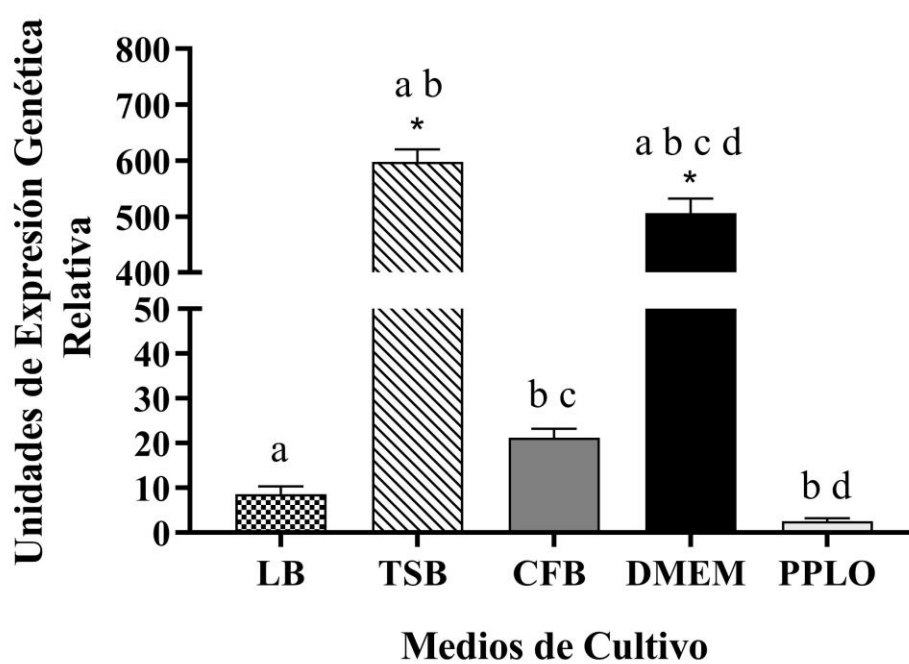


Figura 13: Expresión genética del ECL_00371 de *E. cloacae*.

*** $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Con respecto al análisis de los resultados obtenidos para el gen *ECL_00371*, que se muestran en la Figura 13, se demostró que los medios de cultivo TSB y DMEM tuvieron incrementos estadísticamente significativos con respecto al control. El medio de cultivo que presentó la mayor expresión genética fue TSB incrementándose 69.25 veces con respecto al control, seguido del medio DMEM que se incrementó 58.66 veces más que el medio LB. El medio de cultivo CFB mostró un incremento no significativo de 2.46 veces con respecto al medio

control. No así, el medio PPLO que por el contrario presentó una disminución de 0.30 veces en comparación con LB.

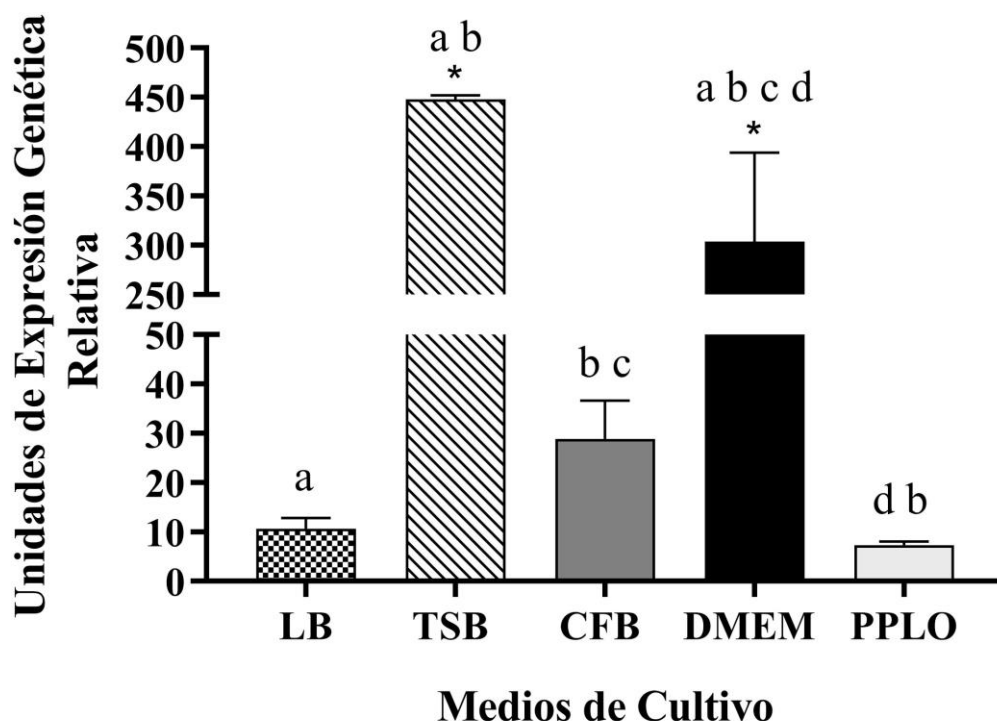


Figura 14: Expresión genética de ECL_02932 de *E. cloacae*.

*** $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Como se observa en la Figura 14, la evaluación de la expresión genética del gen *ECL_02932* evidenció que existieron incrementos estadísticamente significativos en los medios TSB y DMEM. Para este gen, el medio que presentó la mayor expresión genética con respecto al control fue TSB; ya que se incrementó 43.22 veces. Por otra parte, DMEM presentó un aumento significativo de 25.79 veces mayor al medio control. Solo se observó un ligero incremento de 2.79 veces del medio CFB por lo que no fue estadísticamente significativo. Finalmente, el medio de cultivo PPLO tuvo una disminución 0.71 veces menor en relación al medio control, por lo que nuevamente no fue un valor significativo.

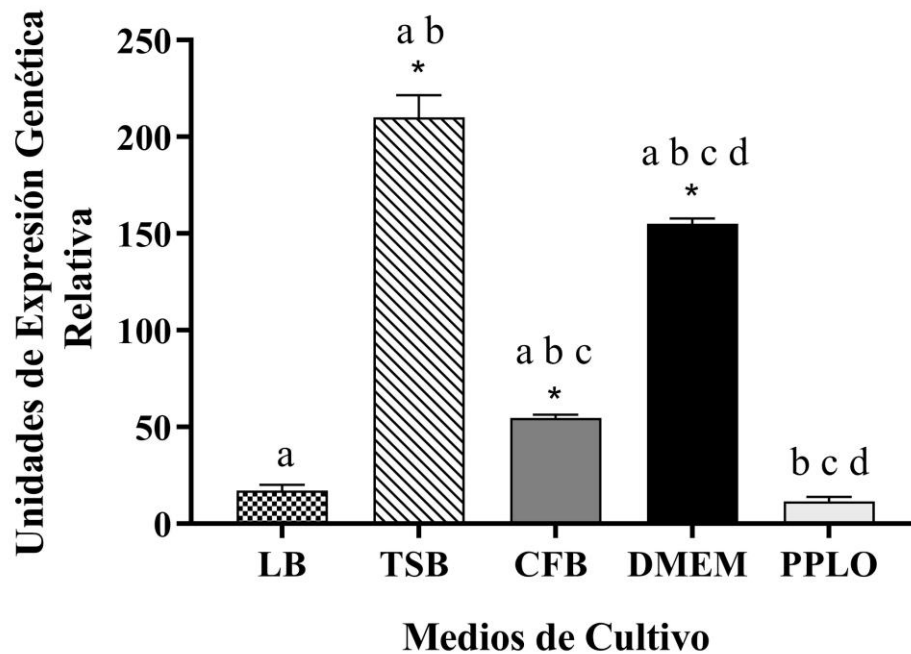


Figura 15: Expresión genética de ECL_00091 de *E. cloacae*.

* $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Con respecto a los resultados de expresión del gen *ECL_00091*, como se muestra en la Figura 15 se observan incrementos significativos en los medios TSB, DMEM y CFB. El primero de estos mostró un incremento de 12.17 veces mayor al control, seguido del medio DMEM con una expresión de 8.99 veces. El medio CFB solo se incrementó 3.16 veces con respecto al medio LB. En este gen el medio PPLO fue el único que no mostró significancia estadística; ya que disminuyó 0.67 veces.

Los genes *ECL_04369*, *ECL_00371*, *ECL_02932* y *ECL_00091* que codifican para las proteínas tipo usher de las fimbrias Tipo I de *E. cloacae* mostraron una regulación similar en

para estos genes. Los resultados de los medios TSB y DMEM fueron estadísticamente significativos, siendo el medio TSB el que presenta la mayor cantidad de expresión.

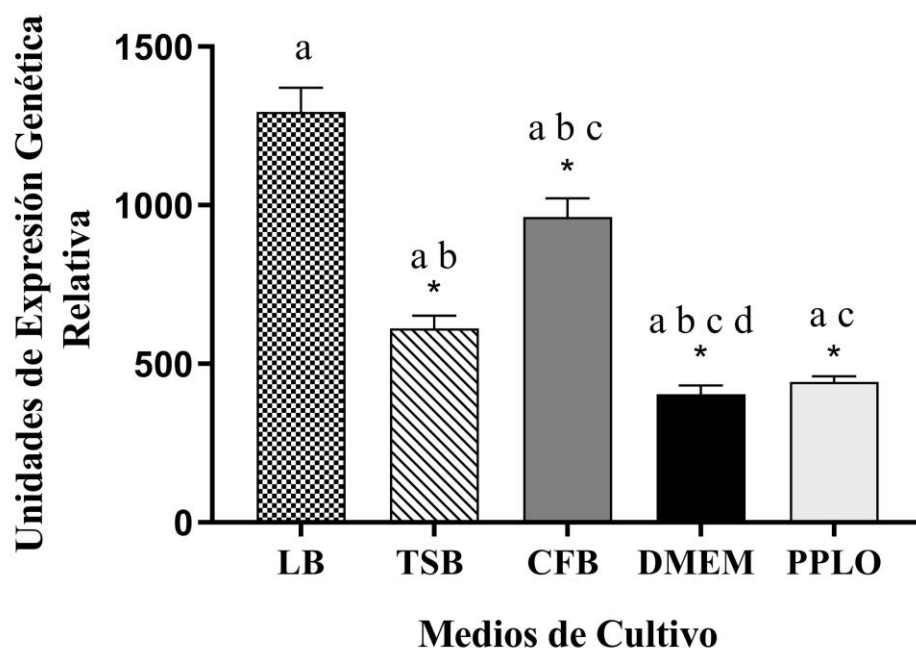


Figura 16: Expresión genética de ECL_01281 de *E. cloacae*.

* $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Como se observa en la Figura 16, el análisis del gen *ECL_01281* evidenció disminución estadísticamente significativa en los cuatro medios de cultivo (TSB, CFB, DMEM y PPLO) con respecto al medio control de LB. Los de mayor reducción fueron CFB y TSB mostrando 0.74 y 0.47 veces, respectivamente. Mientras que para el resto de los medios (DMEM y PPLO) la disminución osciló entre 0.31 y 0.34. Por otra parte, aunque el gen *ECL_01281* pertenece a los genes que codifican para la proteína tipo Usher de las fimbrias tipo I, la evaluación de la expresión genética de este gen mostró que se regula de manera diferente a los otros cuatro genes evaluados (*ECL_04369*, *ECL_00371*, *ECL_02932* y *ECL_00091*) ya que disminuye su expresión en todos los medios de cultivo.

7.2.2 Expresión de los genes fimbria tipo ECP

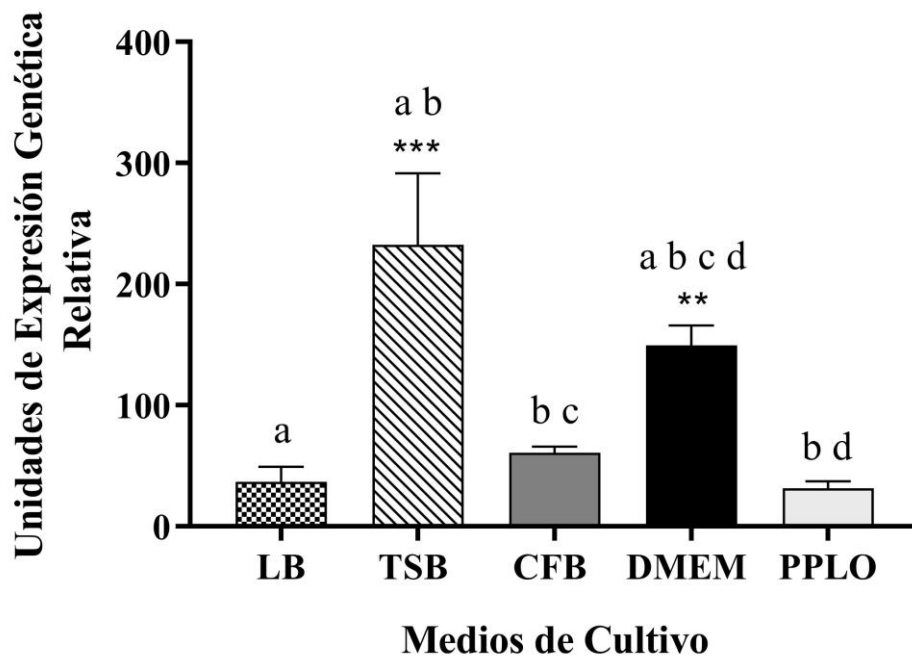


Figura 17: Expresión genética de ECL_00072 de *E. cloacae*.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

El análisis de la expresión genética de *ECL_00072* que se observa en la Figura 17, indicó la significancia en los medios de cultivo TSB y DMEM con respecto al control. El primero de estos, se incrementó 6.34 veces mientras que DMEM fue 4.08 veces. El medio CFB solo se incrementó 1.66 veces sin mostrar significancia estadística. Por el contrario, el medio PPLO disminuyó 0.86 veces con respecto al medio control LB.

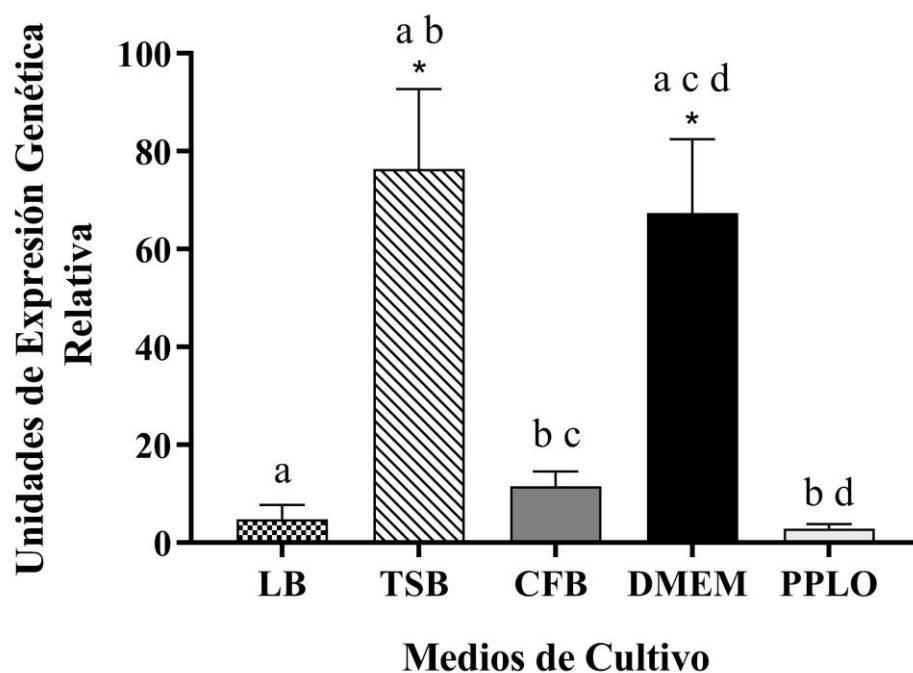


Figura 18: Expresión genética de ECL_03398 de *E. cloacae*.

* $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Finalmente, como se muestra en la Figura 18 el gen *ECL_03398* mostró resultados significativos solo en TSB y DMEM. En el primer caso, se observó una expresión aproximada de 15.90 veces más que el control, mientras que para DMEM fue de 14.02; ambos datos fueron significativos al medio control. Mientras que el medio CFB solo presentó un ligero aumento de 2.40 veces. A diferencia de estos tres medios, PPLO disminuyó 0.60 veces con respecto a LB.

Es importante mencionar que los genes *ECL_00072* y *ECL_03398* codifican para la proteína tipo Usher de las fimbrias tipo ECP de *E. cloacae* y fueron los que mostraron incremento significativo para los medios de cultivo TSB y DMEM. De manera más específica, también se confirmó que el medio TSB fue el que presentó los valores más altos de expresión para ambos tipos de genes.

7.2.3 Expresión de los genes fimbria tipo III

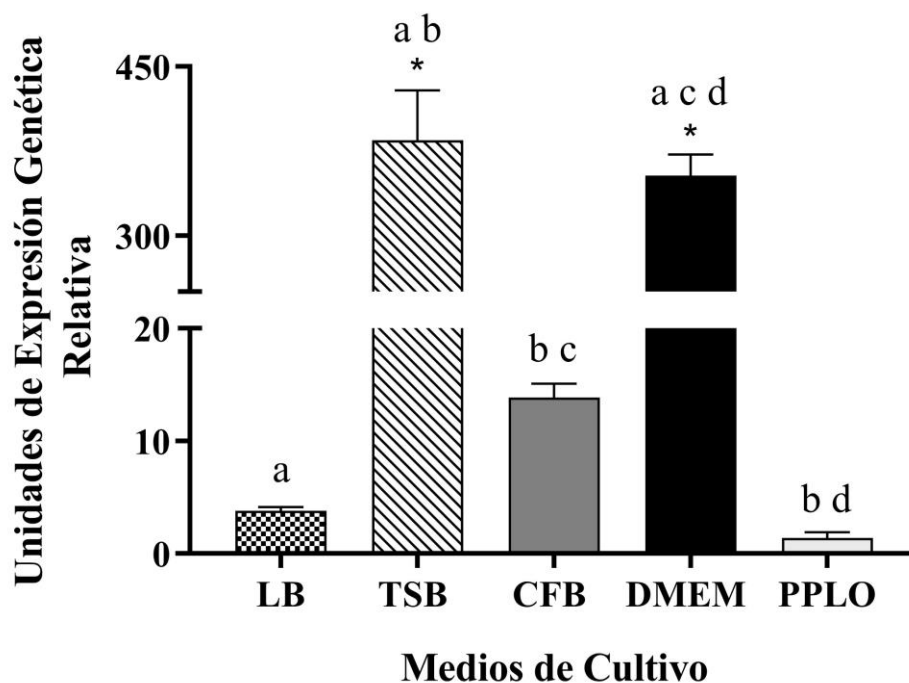


Figura 19: Expresión genética de ECL_01106 de *E. cloacae*.

* $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

El gen *ECL_01106*, que codifica para la proteína tipo Usher de las fimbrias Tipo III de *E. cloacae* arrojó incrementos estadísticamente significativos solo en los medios TSB y DMEM con respecto al control-de LB. El primero, aumentó 101.54 veces mientras que el medio DMEM fue de 93.31 veces. El medio de cultivo que menos se incrementó (3.65 veces) fue el de CFB. En relación al medio PPLO se presentó una ligera disminución de 0.37 veces con respecto a LB.

7.2.4 Expresión de los genes fimbria tipo Csu

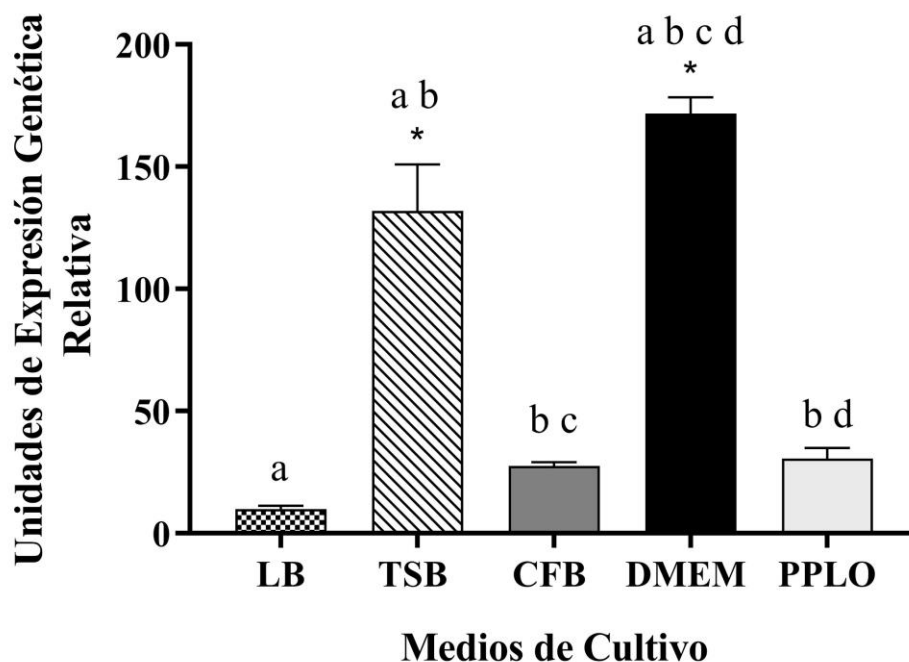


Figura 20: Expresión genética de ECL_01410 de *E. cloacae*.

* $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Los resultados de la expresión genética del gen *ECL_01410* que codifica para la proteína Usher de las fimbrias tipo Csu se muestran en la Figura 20 y evidenciaron que fueron estadísticamente significativos en los medios TSB y DMEM. El medio de cultivo que presenta la mayor cantidad de expresión génica fue DMEM con 17.41 veces con respecto al control. El medio TSB aumentó 13.38 veces; mientras que PPLO y CFB fueron los de menor expresión, al mostrar solo incrementos de 3.10 y 2.80 veces, respectivamente.

7.2.5 Expresión de los genes fimbrias sin homología

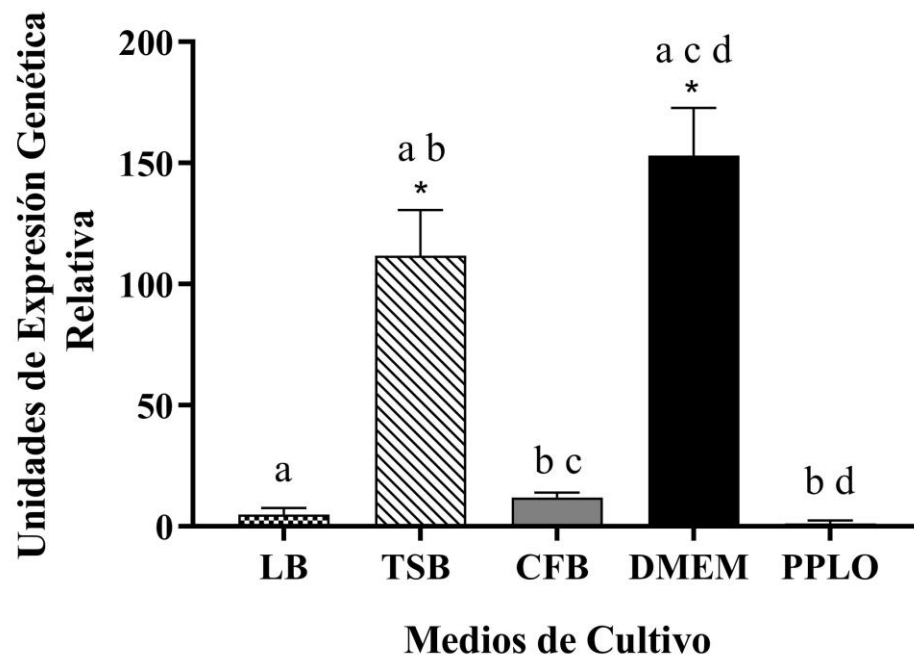


Figura 21: Expresión genética de ECL_04605 de *E. cloacae*.

* $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Los resultados de expresión del gen *ECL_04605* que se observan en la Figura 21, mostraron significancia estadística en DMEM ya que aumentó 30.84 veces con respecto al control, mientras que TSB aumentó 22.51, en el caso de este gen la expresión de los medios PPLO y CFB fue mínima.

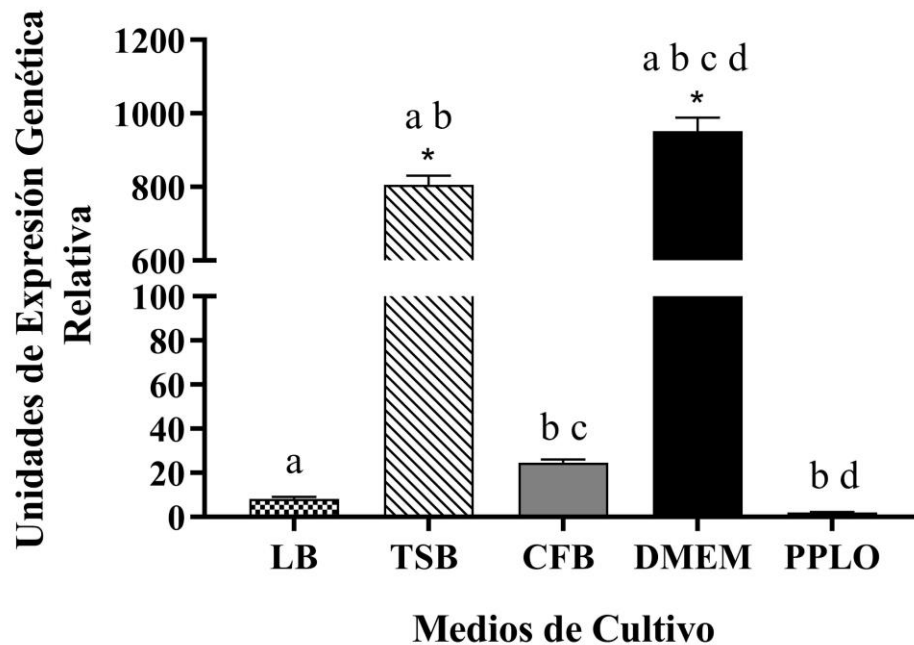


Figura 22: Expresión genética de ECL_02380 de *E. cloacae*.

* $p < 0.001$, indica diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

En la Figura 22 se muestran los resultados del gen *ECL_02380*, donde de manera relevante se observó que solo DMEM y TSB mostraron una expresión genética significativa con respecto al control. Siendo el medio DMEM el de mayor expresión expresándose 117.05 veces más que el medio control. TSB fue el otro medio que mostró un incremento relevante de 99.09 veces. Tanto CFB y PPLO evidenciaron un ligero incremento de 3.03 y 0.25 veces, respectivamente.

Aunque los genes *ECL_04605* y *ECL_02380* no tienen homología definida, se puede observar que tienden a seguir el mismo modelo de expresión génica, encontrándose que la expresión más alta y significativa fue para los medios DMEM y TSB. Por el contrario, la expresión en el medio PPLO fue prácticamente nula.

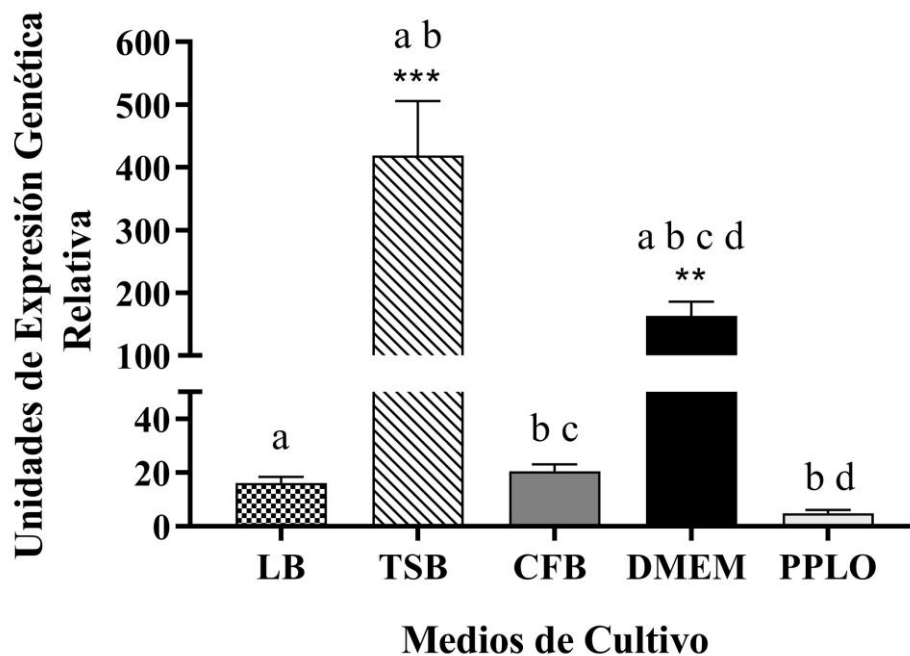


Figura 23: Análisis de la expresión de ECL_04373 de *E. cloacae*.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

Como se observa en la Figura 23, la evaluación de la expresión genética del gen *ECL_04373* demostró que existieron diferencias estadísticamente significativas entre los medios TSB, DMEM y el control. TSB aumentó 24.37 veces, mientras que DMEM aumentó 11.69 veces; aunque CFB aumentó 2.42 veces más que el medio control los resultados no fueron estadísticamente significativos. Por el contrario, el medio de cultivo PPLO disminuyó 0.47 veces con respecto al medio LB.

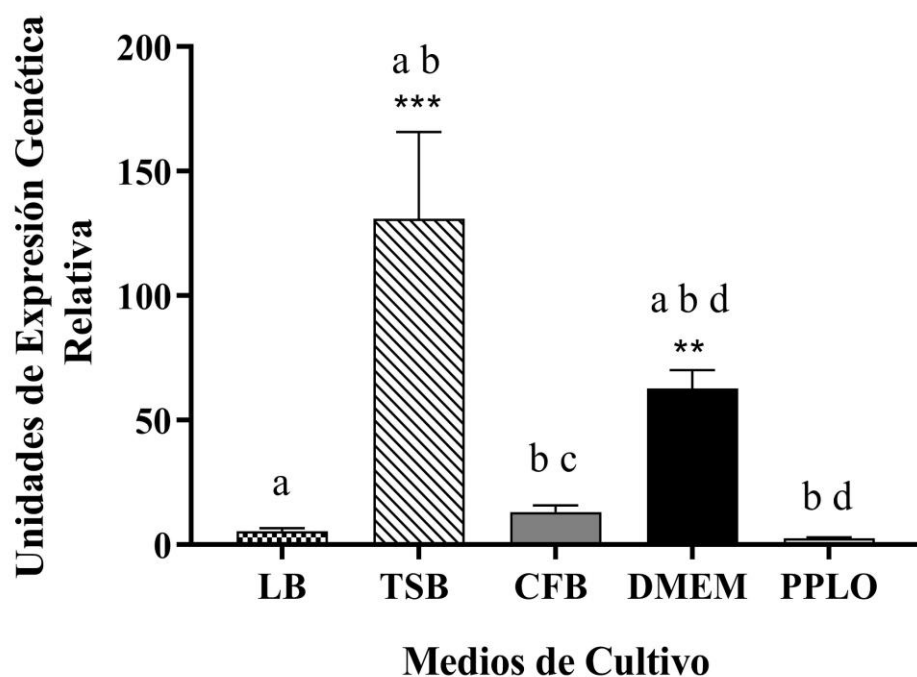


Figura 24: Análisis de expresión ECL_02932 de *E. cloacae*.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias estadísticamente significativas $p < 0.001$

En la Figura 24 se muestra que, con respecto al genes *ECL_00940* y *ECL_02932* se encontraron diferencias significativas en los medios TSB y DMEM, siendo TSB el de mayor expresión debido a un incremento de 25.94 veces con respecto al control. Mientras que DMEM se expresó 10.12 veces y CFB solo 1.27 veces más que el medio control. Por el contrario, el medio de cultivo PPLO disminuyó 0.30 veces con respecto al medio LB y sus resultados no tuvieron significancia estadística.

Aunque los genes *ECL_04373* y *ECL_00940* tampoco tienen homología definida, se puede observar que tienden a seguir el mismo modelo de expresión, encontrándose que la expresión más alta corresponde a los medios TSB y DMEM con resultados significativos estadísticamente. El medio TSB presentó los mayores niveles de expresión, una expresión prácticamente nula y sin significancia en el medio PPLO.

7.3 Evaluación de la formación de biopelícula

En la figura 25, se presentan los resultados de la evaluación de la formación de biopelícula analizada mediante el método de cristal violeta en placa.

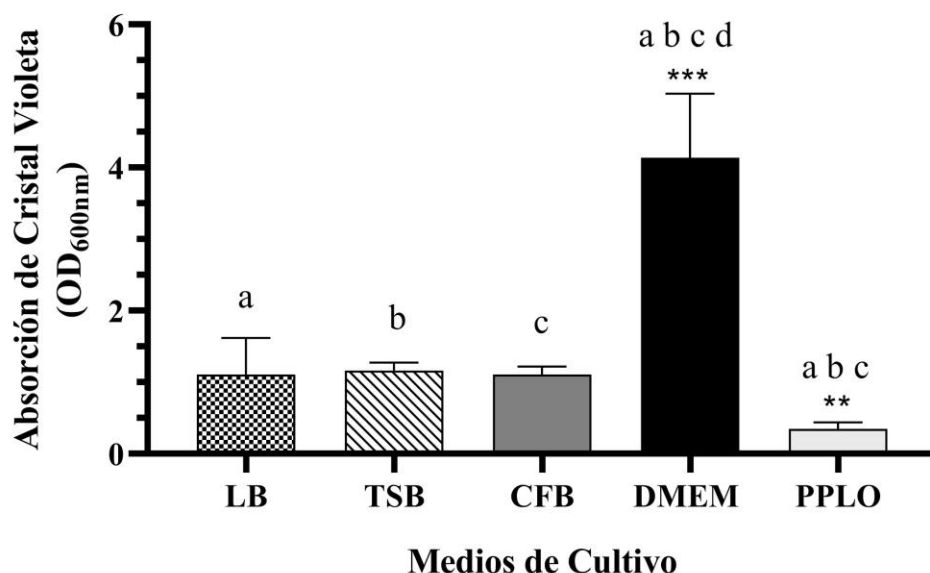


Figura 25: Formación de biopelícula de *E. cloacae* en los diferentes medios de cultivo.

*** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$, * $p < 0.05$ diferencias estadísticamente significativas con respecto al control. Los valores representan la media $\pm$ DE, letras iguales significan diferencias

Los resultados obtenidos de la evaluación de la formación de biopelícula en los diferentes medios de cultivo mostraron un incremento estadísticamente significativo en DMEM con respecto al control. En este medio, la biopelícula se incrementó 3.73 veces por sobre el control, siendo el medio que presentó la mayor formación de biopelícula. En contraste, el medio TSB aumentó 1.04 veces sobre el control con resultados no significativos. Los medios CFB y PPLO mostraron una disminución; siendo de 0.99 veces en el primer caso y de 0.31 veces para el medio PPLO. Por lo que este sí presentó significancia estadística con respecto al control. Aunque los resultados fueron estadísticamente significativos solamente en los medios DMEM y PPLO, se observa que sí existe formación de biopelícula en todos los medios.

7.4 Correlaciones estadísticas

7.4.1. Osmolaridad fimbrias de *E. cloacae*

Tabla 4: Tabla de resultados de R^2 de las correlaciones entre la osmolaridad de los medios y la expresión genética de los genes de *E. cloacae*.

Gen	Homología	R^2 (Osmolaridad)	Ecuación Cuadrática
<i>ECL_04369</i>	FimA	0.9659	$Y = (36025) + [(-32182) (4)] + [(7175) (4)^2]$
<i>ECL_00371</i>	FimA	0.9753	$Y = (132720) + [(-118832) (4)] + [(26558) (4)^2]$
<i>ECL_02932</i>	FimA	0.9947	$Y = (97889) + [(-87450) (4)] + [(19500) (4)^2]$
<i>ECL_00091</i>	FimA	0.9967	$Y = (46776) + [(-41644) (4)] + [(9260) (4)^2]$
<i>ECL_01281</i>	FimA	0.7270	$Y = (-192552) + [(172114) (4)] + [(-38179) (4)^2]$
<i>ECL_00072</i>	EcpA	0.9928	$Y = (45605) + [(-40621) (4)] + [(9039) (4)^2]$
<i>ECL_03398</i>	EcpA	0.9643	$Y = (16735) + [(-14953) (4)] + [(3336) (4)^2]$
<i>ECL_01106</i>	MrkA	0.9541	$Y = (86347) + [(-77337) (4)] + [(17290) (4)^2]$
<i>ECL_01410</i>	CsuA/B	0.7753	$Y = (30049) + [(-26882) (4)] + [(6007) (4)^2]$
<i>ECL_04605</i>	-	0.7660	$Y = (25411) + [(-22794) (4)] + [(5106) (4)^2]$
<i>ECL_02380</i>	LpfA	0.8555	$Y = (183460) + [(-164603) (4)] + [(36868) (4)^2]$
<i>ECL_00940</i>	StkA	0.9581	$Y = (28114) + [(-25080) (4)] + [(5585) (4)^2]$
<i>ECL_04373</i>	-	0.9145	$Y = (87367) + [(-78003) (4)] + [(17382) (4)^2]$

Los resultados de la tabla 4 indican que existe correlación estadísticamente significativa entre los valores de osmolaridad y de expresión genética de los genes fimbriales.

7.4.2 Biopelícula fimbrias de *E. cloacae*

Tabla 5: Tabla de resultados de R^2 de las correlaciones entre la formación de biopelícula de los medios y la expresión genética de los genes de *E. cloacae*.

Gen	Homología	R^2 (Biopelícula)	Ecuación Cuadrática
<i>ECL_04369</i>	FimA	0.9967	$Y = (0.6132) + [(0.08946) (4)] + [(-0.0005103) (4)^2]$
<i>ECL_00371</i>	FimA	0.9833	$Y = (0.4638) + [(0.04485) (4)] + [(-7.287e-005) (4)^2]$
<i>ECL_02932</i>	FimA	0.9799	$Y = (0.4795) + [(0.03466) (4)] + [(-7.376e-005) (4)^2]$
<i>ECL_00091</i>	FimA	0.6240	$Y = (-0.8426) + [(0.07528) (4)] + [(-0.0003021) (4)^2]$
<i>ECL_01281</i>	FimA	0.6686	$Y = (-8.864) + [(0.02771) (4)] + [(-1.524e-005) (4)^2]$
<i>ECL_00072</i>	EcpA	0.8447	$Y = (-2.547) + [(0.09523) (4)] + [(-0.0003382) (4)^2]$
<i>ECL_03398</i>	EcpA	0.7006	$Y = (-1.213) + [(0.3327) (4)] + [(-0.003843) (4)^2]$
<i>ECL_01106</i>	MrkA	0.9282	$Y = (0.1749) + [(0.1108) (4)] + [(-0.0002803) (4)^2]$
<i>ECL_01410</i>	CsuA/B	0.9931	$Y = (-2.967) + [(0.1640) (4)] + [(-0.0008138) (4)^2]$
<i>ECL_04605</i>	-	0.9657	$Y = (0.1581) + [(0.1228) (4)] + [(-0.0007564) (4)^2]$
<i>ECL_02380</i>	LpfA	0.9888	$Y = (0.6661) + [(0.02783) (4)] + [(-2.864e-005) (4)^2]$
<i>ECL_00940</i>	StkA	0.9592	$Y = (0.09251) + [(0.1246) (4)] + [(-0.0008865) (4)^2]$
<i>ECL_04373</i>	-	0.9986	$Y = (0.4061) + [(0.04012) (4)] + [(-9.130e-005) (4)^2]$

En los resultados de la tabla 5 podemos observar que existe correlación estadísticamente significativa entre los valores de expresión genética de los genes fimbriales y la formación de biopelícula.

VIII. DISCUSIÓN

El objetivo del estudio fue analizar la expresión genética de los diferentes tipos de fimbrias implicadas en la formación de la biopelícula de *E. cloacae* bajo diferentes condiciones de osmolaridad. Para lo cual, se cuantificó dicha propiedad, así como la expresión genética y la formación de biopelícula en cinco medios de cultivo (LB, CFB, TSB, DMEM y PPLO) Considerando que el análisis de estos factores de virulencia en *E. cloacae* no ha sido ampliamente estudiado; es necesario tomar como base de comparación aquellas investigaciones realizadas en otros microorganismos pertenecientes a la misma familia de *Enterobacteriaceae* y/o antecedentes sobre la regulación de fimbrias que expresa *E. cloacae*, por lo que el siguiente apartado fue redactado de acuerdo al tipo de fimbria evaluado en este estudio.

9.1. La osmolaridad modifica la expresión genética de los diferentes tipos de fimbrias en *E. cloacae*

Como ya se mencionó, se utilizaron cuatro medios de cultivo para evaluar el efecto de la osmolaridad sobre la expresión de los genes que codifican para las fimbrias de *E. cloacae* y en su capacidad para formar biopelícula. Todos estos medios de cultivo fueron comparados estadísticamente contra el medio Luria Bertani (LB) debido a que es un cultivo estándar y por lo tanto se puede considerar como lote o control positivo (115). La evaluación de la osmolaridad en los diferentes medios demostró que dicha propiedad fue variable cuando se comparó con el resultado promedio obtenido en el medio control (LB), ya que su valor de osmolaridad fue de $214.83 \text{ mOsm/L} \pm 2.05$. En general, se observó que los medios TSB, PPLO y DMEM presentaron los valores más altos de osmolaridad (282.667 ± 2.05 , 269.333 ± 2.05 y $247.167 \pm 2.05 \text{ mOsm/L}$, respectivamente); a diferencia del medio CFB, que mostró la osmolaridad más baja ($139.667 \pm 2.05 \text{ mOsm/L}$).

Con respecto al efecto de la osmolaridad sobre la expresión genética de las subunidades que codifican para las fimbrias, los resultados nuevamente mostraron que los medios TSB y DMEM fueron los que tuvieron altos valores de osmolaridad (282.667 ± 2.05 y 247.167 ± 2.05 mOsm/L) y por consiguiente los que favorecieron significativamente dicha expresión génica que estimula a las proteínas tipo Usher las fimbrias tipo I. Por lo que hace pensar y/o resaltar que la composición química de los medios es importante. En este sentido, se sabe que el medio de cultivo TSB está constituido por peptona de harina de soya y peptona de caseína, las cuales son fuentes abundantes de nitrógeno, fósforo, aminoácidos y dextrosa. Mientras que el medio DMEM contiene aminoácidos, glucosa, sales inorgánicas, vitaminas que en conjunto también actúan como fuentes de nitrógeno y fósforo, pero en menor cantidad. Esta posibilidad se reafirma más, si se analiza contra la composición del medio PPLO, el cual solo se compone de un digerido enzimático animal y peptona enriquecida. Lo que probablemente influyó en dar un valor intermedio de osmolaridad (269.333 ± 2.05 mOsm/L) que disminuyó significativamente la expresión genética en comparación al medio control LB y al resto de los medios de evaluación (TSB y DMEM). Así mismo, la prueba de correlación entre estas dos variables (expresión genética y osmolaridad) no resultó significativa; sugiriendo que pudo haber influido que el rango de osmolaridad (139-286 mOsm/L) no fue lo suficientemente amplio. Posteriormente, la evaluación de los resultados en estas dos variables llevó a un análisis de regresión, obteniéndose un modelo de regresión cuadrático significativo que permite realizar alguna predicción en estos rangos de concentraciones de osmolaridad. Estudios previos han mostrado que la propiedad de osmolaridad y la oferta nutrimental del ambiente, en el que se desarrolla el microorganismo, afectan la regulación multifactorial del clúster *fim*. ya que influyen en la expresión o represión de los reguladores proteicos involucrados en la biogénesis de las subunidades fimbriales y por lo tanto en la expresión de las fimbrias tipo I. Se conoce que existen, aproximadamente, veinte proteínas que juegan diferentes roles en la regulación de uno o más genes *fim* y/o en el posicionamiento del promotor *fimS*; el cual es el elemento encargado de liderar la transcripción de *fimA*, entre los que destacan H-NS, OmpR, Lpr, las recombinasas FimB y FimE (116). Otros estudios desarrollados en *E. coli* evidenciaron que la expresión de *fimA* y *fimB* se incrementa en condiciones de baja osmolaridad y a un pH neutro, mientras que esas mismas condiciones disminuyen la expresión de *fimE*; además, la baja osmolaridad inhibe la expresión de las

enzimas FimB y FimE, evitando su acción sobre el elemento convertible de DNA *fimS*, lo cual mantiene la fase ON provocando mayor expresión fimbrial (117). Lo anterior se reafirma, si tomamos en cuenta al regulador proteico OmpR (el cual es un regulador de respuesta asociado a la histidina quinasa EnvZ) y a la proteína citoplasmática OmpR-P, ya que en condiciones de alta osmolaridad OmpR es capaz de unirse al promotor de *fimB* e inhibir su transcripción, provocando que la fase de variación OFF se sostenga, impidiendo la transcripción de *fimS* y provocando un aminoramiento de la expresión de las fimbrias (96,118-120). Se puede observar también, que la glucosa es un compuesto que se encuentra en los medios de cultivo que presentaron mayor expresión genética y que, por lo tanto, su disponibilidad en el medio es relevante ya que envía señales que promueven la activación de una vía o acción en la que la expresión del complejo regulador de la fase exponencial de la biogénesis fimbrial: CRP-cAMP está favorecida. Este complejo promueve la actividad del promotor *fimS* y de la girasa de DNA, que a su vez reprime la fase de variación ON-OFF y bloquean la acción de la proteína Lpr sobre FimB, lo que desencadena la expresión de las fimbrias I (121). Los medios de cultivo TSB y DMEM contienen concentraciones de leucina de 1.98 y 0.105 g/L, respectivamente; aunque ambos medios presentan altos valores de expresión genética, la disponibilidad de leucina en el ambiente podría ser la causa de que la expresión sea mayor en el medio TSB. Esto debido a la acción de la proteína de unión a leucina (Lrp), la cual tiene influencia global en la transcripción de DNA; la unión de la proteína Lrp al promotor de *fimA* es indispensable para la expresión o represión de las fimbrias tipo I y, además, se demostró que esta proteína tiene la capacidad de unirse al promotor de FimZ (otra subunidad fimbrial). En general, la regulación de estos sistemas depende de los niveles de Lrp, ya que el su exceso o deficiencia resulta en la inhibición de la expresión; así mismo, la expresión de esta proteína está relacionada directamente con las condiciones ambientales, siendo la presencia de leucina en el ambiente, una de las condiciones más importantes, lo que permite afirmar que existe relación entre el estatus nutrimental de la bacteria y los niveles de Lrp, por lo que la leucina en el caso de la regulación de unión a *fimZ* influencia el punto de unión de Lrp al promotor (122,123).

El microorganismo *E. cloacae* contiene en su genoma el gen *ECL_01106* que codifica para las proteínas tipo Usher de las fimbrias tipo III. Los resultados de expresión genética relativa

de este estudio mostraron que los medios de cultivo que favorecen los valores de expresión más altos son TSB y DMEM. Al igual que en el tipo de fimbria I, diversos reguladores transcripcionales, como son el complejo CRP-cAMP, OmpR, CpxAR, RpoS, Lrp, H-NS, Fur y IscR, juegan un papel importante en la respuesta de las bacterias a estrés para las fimbrias tipo III. Como ya se mencionó, las condiciones de osmolaridad y oferta nutricional de los medios de cultivo tienen influencia en la regulación de estas fimbrias; además, el rol de la proteína OmpR en la biogénesis de las fimbrias tipo III, está relacionado con la osmolaridad de los medios. Es por ello que, si la osmolaridad del medio es baja, la vía de regulación para la proteína es por medio de la acción como fosfatasa de EnvZ. Además, la regulación OmpR está involucrada con la vía de señalización di-GMP la cual se coordina por la acción de las proteínas MrkH, MrkI y MrkJ, que regulan la expresión de las fimbrias tipo III en consecuencia de la disponibilidad de hierro y glucosa exógena, lo que indica que se orquestan varias vías de señalización en respuesta a señales ambientales dinámicas (120). Los estímulos externos de glucosa reprimen la función del CRP-cAMP provocando un incremento de la concentración de c-di-GMP (diguanilato cíclico) y de la expresión de los dominios proteicos MrkH y MrkI, lo que resulta en una alta expresión de las fimbrias tipo III (124). La ausencia de la proteína H-NS, provoca una regulación negativa de la expresión de *mrkA* y, una regulación positiva en la expresión del regulador negativo *mrkJ*, esta ausencia también provoca que la expresión de los reguladores transcripcionales MrkH y MrkI decrece, debido a la acción degradadora de MrkJ sobre el c-di-GMP afectando a los activadores de *mrkA* (125). IscR regula la biosíntesis de polisacáridos en condiciones de disponibilidad de hierro, ya que es capaz de unirse a la región promotora del clúster que codifica *mrkH* y *mrkI*, evitando de esta manera su expresión y afectando la expresión de las fimbrias tipo III (126).

Por otra parte, los genes *ECL_00072* y *ECL_03398* codifican para las proteínas tipo USher de las fimbrias tipo ECP de *E. cloacae*, estos genes tuvieron los promedios de expresión genética relativa más altos en los medios de cultivo DMEM y TSB. Al igual que otros tipos de fimbrias la producción de estas subunidades está sujeta a la influencia de reguladores ambientales como la temperatura, la presión de oxígeno y la oferta nutricional del medio donde se desarrolla. Los cuales influyen en la expresión de reguladores globales como son IHF (factor de integración al hospedero), H-NS (proteína estructural tipo histona) y Lrp

encargados de regular la expresión de este tipo de fimbrias (127). Entre los genes necesarios para la biogénesis de las fimbrias ECP se encuentra *ecpR*, que codifica para la proteína EcpR y que es un regulador positivo de la expresión del clúster *ecpABCDEF*, ya que actúa sobre el promotor; esta proteína contiene un dominio C-terminal hélice-giro-hélice (HTH) de unión a DNA putativo para LuxR (128). Además, de la acción de EcpR en la regulación de estas fimbrias, la influencia de los reguladores globales como son el factor de integración al hospedero (IHF), así como las proteínas H-NS y Lrp sobre la expresión de EcpR afecta la activación del promotor de *ecp*, reguladores que se afectan en función de las condiciones ambientales y del microorganismo al que pertenecen; es por ello, que el intercambio entre H-NS, IHF y EcpR es de suma importancia, ya que la interacción entre IHF y EcpR permite suprimir la expresión de H-NS, proteína que se puede regular mediante estímulos ambientales como se mencionó al inicio (129). Las condiciones ambientales como son baja temperatura, bajo pH y la osmolaridad (alta concentración de acetato) intervienen en el promotor de *ecpA*, en estas condiciones la proteína reguladora EcpA se une a la región río arriba del promotor, contrarrestando la acción inhibitoria de H-NS, activando la transcripción y, estabilizando de forma indirecta el mRNA de *matB* (68). También, el regulador de unión a DNA “RcsB” del sistema de fosforilación Rcs y la caja RcsAB son necesarios para la regulación e inicio de la transcripción, esto debido a que Rcs se afecta en función a los cambios ambientales como estrés y disponibilidad de glucosa; además han sido identificados en la región promotora de *ecp* sitios de unión para la proteína Lrp y para la proteína CRP del receptor de cAMP relacionado a estrés (68, 130-132).

El gen que codifica para las fimbrias tipo Csu de *E. cloacae* evaluado en este estudio fue el gen *ECL_01410*; este gen, contrario a los anteriormente mencionados presentó su promedio de expresión genética relativa más alto en el medio de cultivo DMEM, seguido del promedio obtenido en el medio TSB. Aunque existe poca información sobre la biogénesis de las fimbrias Csu, estudios previos han demostrado que la disponibilidad de residuos hidrofóbicos en el ambiente, intervienen en la polimerización de las subunidades CsuA/B; además, un estudio de 2014 mostró que se puede sustituir la treonina 114 en la hebra donante G₁ por leucina, lo que provoca la estabilidad del complejo e incrementa el orden de la región (64, 133,134).

En este estudio se evaluaron cuatro genes putativos para fimbrias sin homología definida, codificados en el genoma de *E. cloacae*; al igual que la mayoría de los genes evaluados en este estudio, presentaron mayor cantidad de expresión genética relativa en los medios de cultivo TSB y DMEM. Ya que la regulación de los diferentes tipos de fimbrias es compleja y se encuentra entrelazada, la identificación de la homología de estos genes es necesaria para explicar cómo afectan las condiciones ambientales su expresión genética, esto debido a que la expresión de un mismo factor favorece la expresión de un tipo de fimbria y al mismo tiempo es capaz de reprimir la expresión de otro tipo. Además, la identificación de la homología de todas las fimbrias, permitiría elucidar la regulación completa de las fimbrias de *E. cloacae*.

9.2. Relación de la expresión genética de las fimbrias de *E. cloacae* con la formación de biopelícula

En este estudio se evaluó la expresión genética de trece genes que codifican para las proteínas tipo Usher de *E. cloacae* en diferentes condiciones de osmolaridad y de disponibilidad de nutrientes. La evaluación de la expresión genética demostró que los medios de cultivo que favorecen la expresión genética de la mayoría de los genes son los medios TSB y DMEM. La evaluación de la capacidad de formación de biopelícula mostró que el medio de cultivo que favorece su formación fue el medio de cultivo DMEM con un promedio estadísticamente significativo de 4.1372 ± 0.209 , a la vez que el medio de cultivo PPLO mostró una disminución estadísticamente significativa de la capacidad de formación de biopelícula con un promedio de 0.3494 ± 0.209 . Como ya se mencionó la oferta nutrimental de los medios de cultivo y la osmolaridad, está relacionada con la expresión genética; en el caso de la expresión genética y la capacidad de formación de biopelícula, conocer la composición de los medios de cultivo también es fundamental para entender la manera en la que influyen sobre la formación de biopelícula. Estudios previos demostraron que, aunque los medios de cultivo TSB y LB favorecen la formación de biopelícula en otros microorganismos Gram negativos como lo es *Pseudomonas* spp, los análisis estadísticos entre la formación de biopelícula de cada uno de los medios no resultan estadísticamente significativos (135). En el caso de este estudio el análisis de correlación tampoco resultó estadísticamente significativo, así que al igual que en los resultados previos, se realizó un análisis de regresión

entre estas variables obteniendo un modelo de regresión cuadrático estadísticamente significativo que permite realizar una predicción de comportamiento entre los resultados obtenidos de estas variables.

La importancia de la formación de biopelícula por parte del microorganismo patógeno *E. cloacae* se ha estudiado en múltiples ocasiones durante los últimos años, demostrando que el ambiente en el que se desarrolla el microorganismo tiene influencia sobre la cantidad de biopelícula que se forma. Los factores que pueden influir en la regulación y expresión de biopelícula son condiciones ambientales, como: temperatura, pH, osmolaridad, fuerzas iónicas y los sustratos disponibles, ya que en conjunto activan o reprimen la expresión de este agregado que provee múltiples beneficios a la comunidad bacteriana (73,136). Además de la regulación por la acción de estos factores, el metabolismo de los microorganismos que conforman la biopelícula también influye debido a que estos microorganismos también responden a las condiciones ambientales, como es la disponibilidad de nutrientes y productos de desecho (74).

Como ya se mencionó en este estudio, los promedios de expresión genética más altos, para las proteínas tipo Usher de las fimbrias tipo I en *E. cloacae* fueron en los medios de cultivo TSB y DMEM, siendo DMEM que contiene glucosa, sales inorgánicas, vitaminas y aminoácidos, el medio que presentó mayor formación de biopelícula. Estudios previos demostraron que los organelos adhesivos del tipo I juegan un papel importante en las etapas del desarrollo de la biopelícula, principalmente en la adhesión irreversible a las superficies bióticas o abióticas, ya que se ha demostrado la relación entre la subunidad fimbrial FimH y la formación de biopelícula (137,138); una de las moléculas que regulan la formación de biopelícula es c-di-GMP quien induce el cambio de las células del estado planctónico al sésil; este segundo mensajero regula diversos procesos fisiológicos como son la adhesión, la síntesis de exopolisacáridos y formación de biopelícula (139,140). La regulación de c-di-GMP a su vez, está influenciada por el ambiente, ya que las condiciones ambientales determinan la expresión de enzimas reguladoras de c-di-GMP como son las DGCs (diguanilato ciclasas) y PDEs (fosfodiesterasas); enzimas que al mismo tiempo son reguladas por los dominios GGDEF y EAL (dominio proteico de señales postransduccionales), los cuales también se expresan en relación a condiciones ambientales como son: disponibilidad

de otras moléculas, potencial redox, disponibilidad de oxígeno, fuerzas iónicas, temperatura y pH. En el caso específico de EAL, un estudio sugirió que las condiciones óptimas para su actividad son pH alcalino y la disponibilidad de moléculas Mg^{+2} o Mn^{+2} , mientras que la presencia de Ca^{+2} la inhibe (141,142).

El gen que codifica para las proteínas tipo Usher de las fimbrias tipo III de *E. cloacae* también presentó los mayores niveles de expresión en los medios de cultivo TSB y DMEM. En otras especies de *Enterobacteriaceae* como es *K. pneumoniae*, se ha demostrado que la expresión de las fimbrias tipo III está relacionada con la formación y regulación de la biopelícula, mediante la participación de subunidades como es la adhesina MrkD que facilita la unión a al hospedero y, la subunidad estructural mayor MrkA (143-145). Como ya se mencionó la expresión de este tipo de fimbrias se regula mediante la expresión de otras moléculas como son H-NS, c-di-GMP, OmpR, Fur, IscR, Lrp y CRP-cAMP y esto influye a su vez sobre la biopelícula. Los factores de transcripción CRP-cAMP, IscR y Fur coordinan la expresión de las proteínas MrkH, MrkI y MrkJ relacionadas a c-di-GMP, en respuesta de la disponibilidad de estímulos nutrimentales como son la glucosa exógena y la disponibilidad de hierro (126,144,146-149); además, estudios previos demostraron que el estrés osmótico reprime la expresión de fimbrias tipo III en *K. pneumoniae*, ya que disminuye la actividad de reguladores como H-NS (150), este regulador reprime la expresión de *mrkHIJ* favoreciendo la expresión de *mrkA* (125); otra respuesta al estrés osmótico es la actividad de OmpR fosforilado, quien en estas condiciones participa en la regulación de la expresión de *mrkHIJ* y en la formación de biopelícula (120).

En el genoma de *E. cloacae* existen dos genes que codifican para las proteínas tipo Usher de las fimbrias tipo ECP de *E. cloacae*, en este estudio estos genes también presentaron los promedios de expresión genética relativa más altos en los medios de cultivo TSB y DMEM; estudios previos han demostrado que las condiciones y la oferta nutrimental del ambiente en donde se desarrolla el microorganismo, influyen en la expresión de los genes *ecp* y a las proteínas involucradas en la regulación transcripcional como son: IHF, H-NS, Lrp, LuxR y RcsB (66,67,127,129). Otro regulador importante de la transcripción del operon *ecp* es EcpA, quien contrarresta la acción del regulador negativo H-NS (151); Además, el regulador RcsB es necesario para activar la expresión de *ecp*, jugando un papel fundamental en la formación

de biopelícula (131). Además, estudios previos han demostrado que las fimbrias ECP promueven la formación de biopelícula, ya que participan en la adhesión y colonización al hospedero (152-154).

E. cloacae contiene en su genoma un gen que codifica para la proteína tipo Usher las fimbrias tipo Csu, en este estudio los promedios de expresión genética más altos fueron en el medio de cultivo DMEM y TSB, lo cual coincide con que el medio de cultivo DMEM fue el que presentó mayor formación de biopelícula. Antecedentes han demostrado la relación que existe entre la expresión de fimbrias tipo Csu y la formación de biopelícula (155), mediante la acción de diversas vías como son: la regulación de sistemas de dos componentes en la transcripción del operón *csu* (156,157); la posible participación de los dominios GGDEF y EAL sobre c-di-GMP en la regulación de la formación de biopelícula de *E. baumannii* (158) y la inhibición de la expresión de las fimbrias Csu por la acción de antibióticos como la trimetoprima con sulfametoxazol, afectando de esta manera la capacidad de formación de biopelícula (159).

Como se mencionó anteriormente en este estudio se evaluaron cuatro genes putativos para proteínas tipo Usher de fimbrias sin homología definida, codificados en el genoma de *E. cloacae*; al igual que la mayoría de los genes evaluados en este estudio, los mayores niveles de expresión se presentaron en los medios de cultivo TSB y DMEM. Debido a que la regulación de la biopelícula es compleja, la identificación de la homología de estos genes es fundamental para elucidar la totalidad de la posible regulación en este microorganismo y conocer como las condiciones ambientales como la osmolaridad influyen en la formación de biopelícula de *E. cloacae*.

IX. CONCLUSIONES

Se demostró que la expresión genética de los genes fimbriales en *E. cloacae* se ve afectada por la osmolaridad de los medios de cultivo.

Se encontró que la osmolaridad del medio en el que se desarrolla *E. cloacae*, no influye directamente en la capacidad de formación de biopelícula.

Se demostró que la osmolaridad del ambiente en el que se desarrolla *E. cloacae* tiene relación estadísticamente significativa con la expresión genética de los genes fimbriales.

Se encontró que la expresión genética de los genes fimbriales de *E. cloacae* en diferentes condiciones de osmolaridad, tiene relación estadísticamente significativa con la capacidad de formación de biopelícula.

X. RECOMENDACIONES

A partir de los resultados obtenidos y los análisis realizados, las perspectivas de este trabajo se orientan principalmente en una dirección: la descripción completa de la homología genética de *Enterobacter cloacae*. Los estudios dirigidos a ampliar la información sobre estas fimbrias, específicamente sobre aquellas que aún no tienen homología definida son necesarios, una vez que se complete esta información, será posible describir de manera más precisa la regulación fimbrial de esta bacteria y cómo influyen en su virulencia.

Una vez descrito lo anterior, se podrían proponer estudios enfocados en factores ambientales que pueden afectar la regulación de complejos proteicos, lo que permitiría comprobar si la biogénesis fimbrial de *E. cloacae* se regula de la misma manera que otros miembros de la familia de *Enterobacteriaceae* o de forma particular.

Finalmente, otro punto que sería importante abordar es la regulación de la biopelícula de *E. cloacae* en respuesta a estímulos ambientales extremos, ya que permitiría elucidar el rol de las bacterias que conforman las distintas capas de la biopelícula.

XI. REFERENCIAS

1. Hoffmann H, Roggenkamp A. Population genetics of the nomenspecies *Enterobacter cloacae*. *Appl Environ Microbiol*. 2003;69 (9): 5306-5318.
2. Hoffmann H, Stindl S, Stumpf A, Mehlen A, Monget D, Heesemann J, et al. Description of *Enterobacter ludwigii* sp. nov., a novel *Enterobacter* species of clinical relevance. *Syst Appl Microbiol*. 2005; 28 (3): 206–12.
3. Ren Y, Ren Y, Zhou Z, Guo X, Li Y, Feng L, et al. Complete Genome Sequence of *Enterobacter cloacae* subsp. *cloacae* Type Strain ATCC 13047. *J Bacteriol*. 2010; 192 (9): 2463-2464.
4. Elmer W. Koneman SA. Koneman Diagnóstico Microbiológico : Texto y Atlas en color. Editorial Médica Panamericana; 2008; 6ta Edición.
5. Eugene Sanders WE, Sanders CC. *Enterobacter* spp.: Pathogens poised to flourish at the turn of the century. Vol. 10, *Clinical Microbiology Reviews*. American Society for Microbiology; 1997; 10 (2): 220–41.
6. Matsumura Y, Peirano G, Devinney R, Bradford PA, Motyl MR, Adams MD, et al. Genomic epidemiology of global VIM-producing *Enterobacteriaceae*. *J Antimicrob Chemother*. 2017; 72 (8): 2249–58.
7. Yan JY, Zhao WS, Chen Z, Xing QK, Zhang W, Chethana KWT, et al. Comparative genome and transcriptome analyses reveal adaptations to opportunistic infections in woody plant degrading pathogens of *Botryosphaeriaceae*. *DNA Res*. 2017; 25 (1): 87-102.
8. Bastos M de S, Menegucci TC, Moreira RRB, Garcia LB, Cardoso CL, Tognim, Maria Cristina Bronharo. A rapid and simple method to detect ESBL in *Enterobacter cloacae* based on MIC of cefepime. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2015; 48 (2): 208–11.
9. Davin-Regli A, Pages, Jean-Marie. *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae*; versatile bacterial pathogens confronting antibiotic treatment. *Front Microbiol*. 2015; 18 (6): 392.
10. Wang Q, Zhang Y, Yao X, Xian H, Liu Y, Li H, et al. Risk factors and clinical outcomes for carbapenem-resistant *Enterobacteriaceae* nosocomial infections. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2016; 35 (10): 1679–89.

11. Streit JM, Jones RN, Sader HS, Fritsche TR. Assessment of pathogen occurrences and resistance profiles among infected patients in the intensive care unit: report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America, 2001). *Int J Antimicrob Agents*. 2004; 24 (2): 111–8.
12. Secretaría de Salud. Secretaría de Salud. Medición de la prevalencia de infecciones nosocomiales en hospitales generales de las principales instituciones Públicas de salud. 2011.
13. Muro S, Garza-González E, Camacho-Ortiz A, González GM, Llaca-Díaz JM, Bosques F, et al. Risk Factors Associated with Extended-Spectrum β -Lactamase-Producing Enterobacteriaceae Nosocomial Bloodstream Infections in a Tertiary Care Hospital: A Clinical and Molecular Analysis. *Chemotherapy*. 2012; 58 (3): 217–24.
14. Ares MÁ, Alcántar-Curiel MD, Jiménez-Galicia C, Rios-Sarabia N, Pacheco S, De la Cruz MÁ. Antibiotic Resistance of Gram-Negative Bacilli Isolated from Pediatric Patients with Nosocomial Bloodstream Infections in a Mexican Tertiary Care Hospital. *Chemotherapy*. 2013; 59 (5): 361–8.
15. Bocanegra-Ibarias P, Garza-González E, Morfín-Otero R, Barrios H, Villarreal-Treviño L, Rodríguez-Noriega E. Molecular and microbiological report of a hospital outbreak of NDM-1-carrying Enterobacteriaceae in Mexico. *PLoS One*. 2017; 12 (6):e0179651.
16. Qin X, Yang Y, Hu F, Zhu, D. Hospital clonal dissemination of *Enterobacter aerogenes* producing carbapenemase KPC-2 in a Chinese teaching hospital. *J Med Microbiol*. 2014; 63 (2): 222–8.
17. Guh AY, Bulens SN, Mu Y, Jacob JT, Reno J, Scott J, et al. Epidemiology of Carbapenem-Resistant Enterobacteriaceae in 7 US Communities, 2012-2013. *JAMA*. 2015; 314 (14): 1479-87.
18. Guillemot D, Crémieux AC, Courvalin P. Evolution of antimicrobial resistance: Impact on antibiotic use. Vol. 23, *Seminars in Respiratory and Critical Care Medicine*. 2002; 23 (5): 449–56.
19. Rice LB. Progress and Challenges in Implementing the Research on ESKAPE Pathogens. *Infect Control Hosp Epidemiol*. 2010; 31 (S1): S7–10.
20. Qi L, Li H, Zhang C, Liang B, Li J, Wang L, et al. Relationship between antibiotic

- resistance, biofilm formation, and biofilm-specific resistance in *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol.* 2016; 7:483.
21. Cassell GH, Mekalanos J. Development of antimicrobial agents in the era of new and reemerging infectious diseases and increasing antibiotic resistance. *J Am Med Assoc.* 2001; 285 (5): 601–5.
 22. Giammanco A, Calà C, Fasciana T, Dowzicky, Michael J. Global Assessment of the Activity of Tigecycline against Multidrug-Resistant Gram-Negative Pathogens between 2004 and 2014 as Part of the Tigecycline Evaluation and Surveillance Trial. *mSphere.* 2017; 2 (1).
 23. Krzywińska S, Mokracka J, Koczura R, Kaznowski, A. Cytotoxic activity of *Enterobacter cloacae* human isolates. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 2009; 56 (3): 248–52.
 24. Azevedo PAA, Furlan JPR, Oliveira-Silva M, Nakamura-Silva R, Gomes CN, Costa KRC, et al. Detection of virulence and β -lactamase encoding genes in *Enterobacter aerogenes* and *Enterobacter cloacae* clinical isolates from Brazil. *Brazilian J Microbiol.* 2018; 49 (Suppl 1): 224–8.
 25. Casadevall A, Pirofski, L A. Virulence factors and their mechanisms of action: the view from a damage-response framework. *J Water Health.* 2009; 7 (Suppl 1): S2–18.
 26. Barnes AI, Paraje MG, Orsilles M, Albasa, I. *Enterobacter cloacae* leukotoxin: modulation of reactive oxidant species generated by neutrophils. *Luminescence.* 2001; 16 (1): 33–8.
 27. Barnes AI, Ortiz C, Paraje MG, Balanzino LE, Albasa I. Purification and characterization of a cytotoxin from *Enterobacter cloacae*. *Can J Microbiol.* 1997; 43 (8): 729–33.
 28. Cox GM, Mukherjee J, Cole GT, Casadevall A, Perfect, J R. Urease as a virulence factor in experimental cryptococcosis. *Infect Immun.* 2000; 68 (2): 443–8.
 29. Krzywińska S, Koczura R, Mokracka J, Puton T, Kaznowski A. Isolates of the *Enterobacter cloacae* complex induce apoptosis of human intestinal epithelial cells. *Microb Pathog.* 2010; 49 (3): 83–9.
 30. Paraje MG, Barnes AI, Albasa I. An *Enterobacter cloacae* toxin able to generate oxidative stress and to provoke dose-dependent lysis of leukocytes. *Int J Med*

- Microbiol [Internet]. 2005; 295 (2): 109–16.
31. Donlan RM. Biofilms: Microbial Life on Surfaces. *Emerg Infect Dis*. 2002; 8 (9): 881–90.
 32. 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.
 33. Knight SD, Bouckaert, J. Structure, Function, and Assembly of Type 1 Fimbriae. In: *Topics in current chemistry*. 2009; 288: 67-107.
 34. Liu W-Y, Wong C-F, Chung KM-K, Jiang J-W, Leung, Frederick Chi-Ching. Comparative genome analysis of *Enterobacter cloacae*. *PLoS One*. 2013; 8 (9): e74487.
 35. Nuccio S-P, Bäumlér, Andreas J. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007; 71 (4): 551–75.
 36. Sauer FG, Fütterer K, Pinkner JS, Dodson KW, Hultgren SJ, Waksman, G. Structural basis of chaperone function and pilus biogenesis. *Science*. 1999; 285 (5430): 1058–61.
 37. Pugsley, A P . The complete general secretory pathway in gram-negative bacteria. *Microbiol Rev*. 1993; 57 (1): 50–108.
 38. Fronzes R, Remaut H, Waksman G. Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *EMBO J*. 2008; 27 (17): 2271–80.
 39. Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman, G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2017; 15 (6): 365-79.
 40. Green ER, Mecsas J. Bacterial Secretion Systems: An Overview. In: *Virulence Mechanisms of Bacterial Pathogens*, Fifth Edition. 2016; 4 (1).
 41. Papanikou E, Karamanou S, Economou A. Bacterial protein secretion through the translocase nanomachine. *Nat Rev Microbiol*. 2007; 5 (11): 839–51.
 42. Lee VT, Schneewind O. Protein secretion and the pathogenesis of bacterial infections. *Genes Dev*. 2001; 15 (14): 1725–52.
 43. Robinson C, Bolhuis A. Tat-dependent protein targeting in prokaryotes and chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*. 2004; 1694 (1–3): 135–47.
 44. Lavander M, Ericsson SK, Bröms JE, Forsberg A. The twin arginine translocation

- system is essential for virulence of *Yersinia pseudotuberculosis*. *Infect Immun*. 2006; 74 (3): 1768–76.
45. McDonough JA, McCann JR, Tekippe EM, Silverman JS, Rigel NW, Braunstein M. Identification of functional Tat signal sequences in *Mycobacterium tuberculosis* proteins. *J Bacteriol*. 2008; 190 (19): 6428–38.
 46. Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2015; 13 (5): 269–84.
 47. Hospenthal MK, Redzej A, Dodson K, Ukleja M, Frenz B, Rodrigues C, et al. Structure of a Chaperone-Usher Pilus Reveals the Molecular Basis of Rod Uncoiling. *Cell*. 2016; 164 (1–2): 269–78.
 48. Thanassi DG, Bliska JB, Christie PJ. Surface organelles assembled by secretion systems of Gram-negative bacteria: diversity in structure and function. *FEMS Microbiol Rev*. 2012; 36 (6): 1046–82.
 49. Proft T, Baker EN. Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria — structure, assembly and their role in disease. *Cell Mol Life Sci*. 2009; 66 (4): 613–35.
 50. Olsén A, Jonsson A, Normark S. Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*. 1989; 338 (6217): 652–5.
 51. Hospenthal MK, Costa TRD, Waksman G. A comprehensive guide to pilus biogenesis in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Microbiol*. 2017; 15 (6): 365–79.
 52. Kim S-M, Lee H-W, Choi Y-W, Kim S-H, Lee J-C, Lee Y-C, et al. Involvement of curli fimbriae in the biofilm formation of *Enterobacter cloacae*. *J Microbiol*. 2012; 50 (1): 175–8.
 53. Costa TRD, Felisberto-Rodrigues C, Meir A, Prevost MS, Redzej A, Trokter M, et al. Secretion systems in Gram-negative bacteria: structural and mechanistic insights. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13 (6): 343–59.
 54. Goyal P, Krasteva P V, Van Gerven N, Gubellini F, Van den Broeck I, Troupiotis-Tsaïlaki A, et al. Structural and mechanistic insights into the bacterial amyloid secretion channel CsgG. *Nature*. 2014; 516 (7530): 250–3.
 55. Robinson LS, Ashman EM, Hultgren SJ, Chapman MR. Secretion of curli fibre subunits is mediated by the outer membrane-localized CsgG protein. *Mol Microbiol*.

- 2006; 59 (3): 870–81.
56. Nenner AA, Robinson LS, Hultgren SJ. Localized and efficient curli nucleation requires the chaperone-like amyloid assembly protein CsgF. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2009; 106 (3): 900–5.
 57. Hammer ND, McGuffie BA, Zhou Y, Badtke MP, Reinke AA, Brännström K, et al. The C-terminal repeating units of CsgB direct bacterial functional amyloid nucleation. *J Mol Biol*. 2012; 422 (3): 376–89.
 58. Duhuid, J. P. Fimbriae and Adhesive Properties in *Klebsiella* Strains. *J Gen Microbiol*. 1959; 21: 271-286.
 59. Murphy CN, Clegg S. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol*. 2012; 7 (8): 991–1002.
 60. Murphy CN, Clegg, Steven. *Klebsiella pneumoniae* and type 3 fimbriae: nosocomial infection, regulation and biofilm formation. *Future Microbiol*. 2012; 7 (8): 991–1002.
 61. Morrissey B, Leney AC, Toste Rêgo A, Phan G, Allen WJ, Verger D, et al. The role of chaperone-subunit usher domain interactions in the mechanism of bacterial pilus biogenesis revealed by ESI-MS. *Mol Cell Proteomics*. 2012; 11 (7): M111.015289.
 62. Huang Y-J, Wu C-C, Chen M-C, Fung C-P, Peng, Hwei-Ling. Characterization of the type 3 fimbriae with different MrkD adhesins: Possible role of the MrkD containing an RGD motif. *Biochem Biophys Res Commun*. 2006; 350 (3): 537–42.
 63. Huang Y-J, Liao H-W, Wu C-C, Peng, Hwei-Ling. MrkF is a component of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae*. *Res Microbiol*. 2009; 160 (1): 71–9.
 64. Pakharukova N, Garnett JA, Tuittila M, Paavilainen S, Diallo M, Xu Y, et al. Structural Insight into Archaic and Alternative Chaperone-Usher Pathways Reveals a Novel Mechanism of Pilus Biogenesis. *PLoS Pathog*. 2015;11 (11): e1005269.
 65. Pakharukova N, Tuittila M, Paavilainen S, Malmi H, Parilova O, Teneberg S, et al. Structural basis for *Acinetobacter baumannii* biofilm formation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018; 115 (21): 5558–63.
 66. Pouttu R, Westerlund-Wikström B, Lång H, Alsti K, Virkola R, Saarela U. matB, a common fimbriin gene of *Escherichia coli*, expressed in a genetically conserved, virulent clonal group. *J Bacteriol*. 2001; 183 (16): 4727–36.
 67. Blackburn D, Husband A, Saldaña Z, Nada RA, Klena J, Qadri F, et al. Distribution

- of the *Escherichia coli* common pilus among diverse strains of human enterotoxigenic *E. coli*. *J Clin Microbiol*. 2009; 47 (6): 1781–4.
68. Lehti TA, Bauchart P, Kukkonen M, Dobrindt U, Korhonen TK, Westerlund-Wikström B. Phylogenetic group-associated differences in regulation of the common colonization factor Mat fimbria in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*. 2013; 87 (6): 1200–22.
 69. Petrova OE, Sauer K. Escaping the biofilm in more than one way: desorption, detachment or dispersion. *Curr Opin Microbiol*. 2016; 30: 67–78.
 70. Costerton JW, Stewart PS, Greenberg EP. Bacterial biofilms: A common cause of persistent infections. Vol. 284, *Science*. 1999; 284 (5418): 1318–22.
 71. Sanchez-Vizuite P, Le Coq D, Bridier A, Herry J-M, Aymerich S, Briandet R. Identification of *ypqP* as a New *Bacillus subtilis* biofilm determinant that mediates the protection of *Staphylococcus aureus* against antimicrobial agents in mixed-species communities. *Appl Environ Microbiol*. 2015; 81 (1): 109–18.
 72. Yin W, Wang Y, Liu L, He J. Biofilms: The microbial “protective clothing” in extreme environments. *Int J Mol Sci*. 2019; 20 (14): 3423.
 73. López D, Vlamakis H, Kolter R. Biofilms. Vol. 2, *Cold Spring Harbor perspectives in biology*. 2010; 2 (7): a000398.
 74. Stewart PS, Franklin MJ. Physiological heterogeneity in biofilms. Vol. 6, *Nature Reviews Microbiology*. 2008; 6 (3): 199–210.
 75. Stewart PS, Costerton JW. Antibiotic resistance of bacteria in biofilms. Vol. 358, *Lancet*. Elsevier Limited; 2001; 358 (9276): 135–8.
 76. Blair JMA, Webber MA, Baylay AJ, Ogbolu DO, Piddock LJ V. Molecular mechanisms of antibiotic resistanceBLAIR, Jessica M. A.; WEBBER, Mark A.; BAYLAY, Alison J.; et al. Molecular mechanisms of antibiotic resistance. *Nature Reviews Microbiology*. *Nat Rev Microbiol*. 2015; 13 (1): 42–51.
 77. Lewis K. Multidrug tolerance of biofilms and persister cells. Vol. 322, *Current Topics in Microbiology and Immunology*. 2008; 322: 107–31.
 78. Brauner A, Fridman O, Gefen O, Balaban NQ. Distinguishing between resistance, tolerance and persistence to antibiotic treatment. Vol. 14, *Nature Reviews Microbiology*. Nature Publishing Group; 2016; 14 (5): 320–30.

79. Stewart PS, Franklin MJ, Williamson KS, Folsom JP, Boegli L, James GA. Contribution of stress responses to antibiotic tolerance in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Antimicrob Agents Chemother*. 2015; 59 (7): 3838–47.
80. Haaber J, Cohn MT, Frees D, Andersen TJ, Ingmer H. Correction: Planktonic Aggregates of *Staphylococcus aureus* Protect against Common Antibiotics. *PLoS One*. 2012; 7 (10): e41075.
81. Bowler LL, Zhanel GG, Ball TB, Saward LL. Mature *Pseudomonas aeruginosa* biofilms prevail compared to young biofilms in the presence of ceftazidime. *Antimicrob Agents Chemother*. 2012; 56 (9): 4976–9.
82. Hall CW, Mah TF. Molecular mechanisms of biofilm-based antibiotic resistance and tolerance in pathogenic bacteria. Vol. 41, *FEMS Microbiology Reviews*. Oxford University Press; 2017; 41 (3): 276–301.
83. Fazekas AS, Funk G-C, Klobassa DS, R  ther H, Ziegler I, Zander R, et al. Evaluation of 36 formulas for calculating plasma osmolality. *Intensive Care Med*. 2013; 39 (2): 302–8.
84. Rossi-Fedele G, Guastalli AR. Osmolarity and root canal antiseptics [Internet]. Vol. 47, *International Endodontic Journal*. 2014; 47 (4): 314–20.
85. Chen Y, Norde W, van der Mei HC, Busscher HJ. Bacterial cell surface deformation under external loading. *MBio*. 2012; 3 (6): e00378.
86. Strateva T, Yordanov D. *Pseudomonas aeruginosa* - a phenomenon of bacterial resistance. *J Med Microbiol*. 2009; 58 (Pt 9): 1133–48.
87. Driscoll JA, Brody SL, Kollef MH. The epidemiology, pathogenesis and treatment of *Pseudomonas aeruginosa* infections. Vol. 67, *Drugs*. 2007; 67 (3): 351–68.
88. Gellatly SL, Hancock REW. *Pseudomonas aeruginosa*: new insights into pathogenesis and host defenses. *Pathog Dis*. 2013; 67 (3): 159–73.
89. Fluit AC, Schmitz FJ, Verhoef J, European SENTRY Participant Group. Frequency of isolation of pathogens from bloodstream, nosocomial pneumonia, skin and soft tissue, and urinary tract infections occurring in European patients. *Eur J Clin Microbiol Infect Dis*. 2001; 20 (3): 188–91.
90. Hooton TM. Recurrent urinary tract infection in women. In: *International Journal of Antimicrobial Agents*. 2001; 17 (4): 259–68.

91. Newman JW, Floyd RV FL. The contribution of *Pseudomonas aeruginosa* virulence factors and host factors in the establishment of urinary tract infections. - PubMed - NCBI. FEMS Microbiol Lett. 2017; (15) 364.
92. Zarza VMP, Mordani SM, Maldonado AM, Hernández DÁ, Georgina SGS, Vázquez-López R. *Pseudomonas aeruginosa*: Pathogenicity and antimicrobial resistance in urinary tract infection. Rev Chil Infectol. 2019; 36 (2): 180–9.
93. Mittal R, Aggarwal S, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Urinary tract infections caused by *Pseudomonas aeruginosa*: A minireview. Vol. 2, Journal of Infection and Public Health. J Infect Public Health. 2009; 2 (3): 101–11.
94. Mittal R, Sharma S, Chhibber S, Harjai K. Effect of osmolarity on virulence of uropathogenic *Pseudomonas aeruginosa*. Am J Biomed Sci 2009;1:12-26.
95. Lopardo HA, Garrahan JP. Manual de microbiología clínica de la asociación argentina de microbiología, Volumen I. Bacterias de Importancia Clínica Editores. 2016; (1): 1-429
96. Rentschler AE, Lovrich SD, Fitton R, Enos-Berlage J, Schwan WR. OmpR regulation of the uropathogenic *Escherichia coli* *fimB* gene in an acidic/high osmolality environment. Microbiology. 2013; 159 (Pt 2): 316–27.
97. Jubelin G, Vianney A, Beloin C, Ghigo J-M, Lazzaroni J-C, Lejeune P, et al. CpxR/OmpR interplay regulates curli gene expression in response to osmolarity in *Escherichia coli*. J Bacteriol. 2005; 187 (6): 2038–49.
98. Höltje J-V. Growth of the Stress-Bearing and Shape-Maintaining Murein Sacculus of *Escherichia coli*. Microbiol Mol Biol Rev. 1998; 62 (1): 181–203.
99. Turner RD, Vollmer W, Foster SJ. Different walls for rods and balls: the diversity of peptidoglycan. Mol Microbiol. 2014; 91 (5): 862–74.
100. Daly KE, Huang KC, Wingreen NS, Mukhopadhyay R. Mechanics of membrane bulging during cell-wall disruption in gram-negative bacteria. Phys Rev E Stat Nonlin Soft Matter Phys. 2011; 83 (4 Pt 1): 041922.
101. Cayley DS, Guttman HJ, Record MT. Biophysical characterization of changes in amounts and activity of *Escherichia coli* cell and compartment water and turgor pressure in response to osmotic stress. Biophys J. 2000; 78 (4): 1748–64.
102. Dover RS, Bitler A, Shimoni E, Trieu-Cuot P, Shai Y. Multiparametric AFM reveals

- turgor-responsive net-like peptidoglycan architecture in live streptococci. *Nat Commun.* 2015; 6: 7193.
103. Yan J, Nadell CD, Stone HA, Wingreen NS, Bassler BL. Extracellular-matrix-mediated osmotic pressure drives *Vibrio cholerae* biofilm expansion and cheater exclusion. *Nat Commun.* 2017; 8 (1): 327.
 104. Bremer E, Krämer R. Responses of Microorganisms to Osmotic Stress. *Annu Rev Microbiol.* 2019; 73 (1): 313–34.
 105. Mitra A, Palaniyandi S, Herren CD, Zhu X, Mukhopadhyay S. Pleiotropic roles of *uvrY* on biofilm formation, motility and virulence in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *PLoS One.* 2013; 8 (2): e55492.
 106. Hou B, Meng X-R, Zhang L-Y, Tan C, Jin H, Zhou R, et al. TolC promotes ExPEC biofilm formation and curli production in response to medium osmolarity. *Biomed Res Int.* 2014; 2014: 574274.
 107. Sambrook, J; Fritsch, E. F.; Maniatis T. No Title. In: *Molecular cloning: a laboratory manual*. 2 pp.xxxvi. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press; 1989: 1546.
 108. 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.
 109. O'Toole GA. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *J Vis Exp.* 2011; (47) 1-2.
 110. Mullis KB. The unusual origin of the polymerase chain reaction. *Sci Am.* 1990; 262 (4): 56–65.
 111. de Dios TL. Fundamentos de la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y de la PCR en tiempo real. *Tecnol en salud.* 2013; 2: 70–8.
 112. Livak KJ, Schmittgen TD. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. *Methods.* 2001; 25 (4): 402–8.
 113. González-y-Merchand JA, Estrada-García I, Colston MJ, Cox RA. A novel method for the isolation of mycobacterial DNA. *FEMS Microbiol Lett.* 1996; (135): 71-7.
 114. Song C, Yang CM, Sun XF, Xia PF, Qin J, Guo BB, et al. Influences of graphene oxide on biofilm formation of gram-negative and gram-positive bacteria. *Environ Sci*

- Pollut Res. 2018; 25 (3): 2853–60.
115. Song C, Yang CM, Sun XF, Xia PF, Qin J, Guo BB. Influences of graphene oxide on biofilm formation of gram-negative and gram-positive bacteria. *Environ Sci Pollut Res*. 2018; 25 (3): 2853–60.
 116. Schwan WR. Regulation of fim genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *World J Clin Infect Dis*. 2011; 1 (1): 17-25.
 117. Schwan WR, Lee JL, Lenard FA, Matthews BT, Beck MT. Osmolarity and pH growth conditions regulate fim gene transcription and type 1 pilus expression in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun*. 2002; 70 (3): 1391–402.
 118. Mattison K, Kenney LJ. Phosphorylation alters the interaction of the response regulator OmpR with its sensor kinase EnvZ. *J Biol Chem*. 2002 Mar 29; 277 (13): 11143–8.
 119. Oshima T, Aiba H, Masuda Y, Kanaya S, Sugiura M, Wanner BL. Transcriptome analysis of all two-component regulatory system mutants of *Escherichia coli* K-12. *Mol Microbiol*. 2002; 46 (1): 281–91.
 120. Lin TH, Chen Y, Kuo JT, Lai YC, Wu CC, Huang CF. Phosphorylated OmpR is required for type 3 fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* under hypertonic conditions. *Front Microbiol*. 2018; 9:2405.
 121. Müller CM, Åberg A, Strasevičiune J, Emody L, Uhlin BE, Balsalobre C. Type 1 fimbriae, a colonization factor of uropathogenic *Escherichia coli*, are controlled by the metabolic sensor CRP-cAMP. *PLoS Pathog*. 2009; 5 (2):e1000303.
 122. Kolenda R, Ugorski M, Grzymajlo K. Everything You Always Wanted to Know About *Salmonella* Type 1 Fimbriae, but Were Afraid to Ask. *Front Microbiol*. 2019; 10: 1017.
 123. McFarland KA, Lucchini S, Hinton JCD, Dorman CJ. The leucine-responsive regulatory protein, Lrp, activates transcription of the fim operon in *Salmonella enterica* serovar typhimurium via the fimZ regulatory gene. *J Bacteriol*. 2008; 190 (2): 602–12.
 124. Li Y, Wang H, Ren J, Chen L, Zhuge X, Hu L. The YfcO fimbriae gene enhances adherence and colonization abilities of avian pathogenic *Escherichia coli* in vivo and in vitro. *Microb Pathog*. 2016; 100: 56–61.

125. Ares MA, Fernández-Vázquez JL, Rosales-Reyes R, Jarillo-Quijada MD, von Bargen K, Torres J, et al. H-NS Nucleoid Protein Controls Virulence Features of *Klebsiella pneumoniae* by Regulating the Expression of Type 3 Pili and the Capsule Polysaccharide. *Front Cell Infect Microbiol*. 2016; 6: 13.
126. Lin TH, Tseng CY, Lai YC, Wu CC, Huang CF, Lin CT. IscR regulation of type 3 fimbriae expression in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Front Microbiol*. 2017; 8 (OCT).
127. Rendón MA, Saldaña Z, Erdem AL, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper JB. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007; 104 (25): 10637–42.
128. Ali A, Kolenda R, Khan MM, Weinreich J, Li G, Wieler LH. Novel Avian Pathogenic *Escherichia coli* Genes Responsible for Adhesion to Chicken and Human Cell Lines. *Appl Environ Microbiol*. 2020; 86 (20):e01068-20.
129. Martínez-Santos VI, Medrano-López A, Saldaña Z, Girón JA, Puente JL. Transcriptional regulation of the *ecp* operon by EcpR, IHF, and H-NS in attaching and effacing *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2012;194 (18): 5020–33.
130. Pannen D, Fabisch M, Gausling L, Schnetz K. Interaction of the RcsB response regulator with auxiliary transcription regulators in *Escherichia coli*. *J Biol Chem*. 2016; 291 (5): 2357–70.
131. Lehti TA, Heikkinen J, Korhonen TK, Westerlund-Wikström B. The response regulator RcsB activates expression of Mat fimbriae in meningitic *Escherichia coli*. *J Bacteriol*. 2012; 194 (13): 3475–85.
132. Guo XP, Sun YC. New insights into the non-orthodox two component Rcs phosphorelay system. *Frontiers in Microbiology*. 2017; 8:2014.
133. Pakharukova N, McKenna S, Tuittila M, Paavilainen S, Malmi H, Xu Y, et al. Archaic and alternative chaperones preserve pilin folding energy by providing incomplete structural information. *J Biol Chem*. 2018; 293 (44): 17070–80.
134. Bao R, Fordyce A, Chen YX, McVeigh A, Savarino SJ, Xia D. Structure of CfaA Suggests a New Family of Chaperones Essential for Assembly of Class 5 Fimbriae. *PLoS Pathog*. 2014; 10 (8):e1004316.
135. Robinson VH, Paterson S, Bennett C, Steen SI. Biofilm production of *Pseudomonas* spp. isolates from canine otitis in three different enrichment broths. *Vet Dermatol*.

- 2019; 30 (3): 218-e67.
136. Goller CC, Romeo T. Environmental influences on biofilm development. Vol. 322, Current Topics in Microbiology and Immunology. Curr Top Microbiol Immunol; 2008; 322: 37–66.
 137. Klemm P, Schembri M. Type 1 Fimbriae, Curli, and Antigen 43: Adhesion, Colonization, and Biofilm Formation. EcoSal Plus. 2004; 1 (1): 1-18.
 138. Muhammad MH, Idris AL, Fan X, Guo Y, Yu Y, Jin X, et al. Beyond Risk: Bacterial Biofilms and Their Regulating Approaches. Vol. 11, Frontiers in Microbiology. Frontiers Media S.A. 2020; 11: 928.
 139. Sharma G, Sharma S, Sharma P, Chandola D, Dang S, Gupta S, et al. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. Vol. 121, Journal of Applied Microbiology. Blackwell Publishing Ltd; 2016; 121 (2):309–19.
 140. Wang KC, Hsu YH, Huang YN, Yeh KS. A previously uncharacterized gene stm0551 plays a repressive role in the regulation of type 1 fimbriae in Salmonella enterica serotype Typhimurium. BMC Microbiol. 2012; 12: 111.
 141. Mills E, Pultz IS, Kulasekara HD, Miller SI. The bacterial second messenger c-di-GMP: Mechanisms of signalling. Vol. 13, Cellular Microbiology. Cell Microbiol. 2011; 13 (8): 1122–9.
 142. Schmidt AJ, Ryjenkov DA, Gomelsky M. The ubiquitous protein domain EAL is a cyclic diguanylate-specific phosphodiesterase: Enzymatically active and inactive EAL domains. J Bacteriol. 2005; 187 (14): 4774–81.
 143. Wang G, Zhao G, Chao X, Xie L, Wang H. The characteristic of virulence, biofilm and antibiotic resistance of klebsiella pneumoniae. International Journal of Environmental Research and Public Health. 2020; 17 (17), 1–17.
 144. Clegg S, Murphy CN. Epidemiology and Virulence of Klebsiella pneumoniae. Microbiol Spectr. 2016; 4 (1): UTI-0005-2012.
 145. Wilksch JJ, Yang J, Clements A, Gabbe JL, Short KR, Cao H, et al. MrKH, a novel c-di-GMP-dependent transcriptional activator, controls *klebsiella pneumoniae* biofilm formation by regulating type 3 fimbriae expression. PLoS Pathog. 2011; 7 (8):e1002204.
 146. Yang J, Wilksch JJ, Tan JWH, Hocking DM, Webb CT, Lithgow T, et al.

- Transcriptional activation of the *mrkA* promoter of the *Klebsiella pneumoniae* type 3 fimbrial operon by the c-di-GMP-dependent MrkH protein. *PLoS One*. 2013; 8 (11):e79038.
147. Lin CT, Lin TH, Wu CC, Wan L, Huang CF, Peng HL. CRP-Cyclic AMP regulates the expression of type 3 fimbriae via cyclic di-GMP in *klebsiella pneumoniae*. *PLoS One*. 2016; 11 (9):e0162884.
 148. Wu CC, Lin CT, Cheng WY, Huang CJ, Wang ZC, Peng HL. Fur-dependent MrkHI regulation of type 3 fimbriae in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *Microbiology*. 2012; 158 (4): 1045–56.
 149. Wu CC, Wang CK, Chen YC, Lin TH, Jinn TR, Lin CT. IscR regulation of capsular polysaccharide biosynthesis and iron-acquisition systems in *Klebsiella pneumoniae* CG43. *PLoS One*. 2014; 9 (9):e107812.
 150. Stella S, Falconi M, Lammi M, Gualerzi CO, Pon CL. Environmental control of the in vivo oligomerization of nucleoid protein H-NS. *J Mol Biol*. 2006; 355 (2): 169–74.
 151. Lehti TA, Bauchart P, Dobrindt U, Korhonen TK, Westerlund-Wikström B. The fimbriae activator MatA switches off motility in *Escherichia coli* by repression of the flagellar master operon *flhDC*. *Microbiol*. 2012; 158 (6): 1444–55.
 152. Alcántar-Curiel MD, Blackburn D, Saldaña Z, Gayosso-Vázquez C, Iovine NM, De la Cruz MA, et al. Multi-functional analysis of *Klebsiella pneumoniae* fimbrial types in adherence and biofilm formation. *Virulence*. 2013; 4 (2): 129–38.
 153. Stacy AK, Mitchell NM, Maddux JT, De la Cruz MA, Durán L, Girón JA, et al. Evaluation of the prevalence and production of *Escherichia coli* common pilus among avian pathogenic *E. coli* and its role in virulence. Chang Y-F, editor. *PLoS One*. 2014; 9 (1): e86565.
 154. Garnett JA, Martínez-Santos VI, Saldaña Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2012; 109 (10): 3950–5.
 155. Tomaras AP, Dorsey CW, Edelmann RE, Actis LA. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: Involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. 2003; 149 (12): 3473–84.
 156. Tomaras AP, Flagler MJ, Dorsey CW, Gaddy JA, Actis LA. Characterization of a two-

- component regulatory system from *Acinetobacter baumannii* that controls biofilm formation and cellular morphology. *Microbiology*. 2008; 154 (11): 3398–409.
157. Kishii K, Hamada M, Aoki K, Ito K, Onodera J, Ishii Y, et al. Differences in biofilm formation and transcription of biofilm-associated genes among *Acinetobacter baumannii* clinical strains belonging to the international clone II lineage. *J Infect Chemother*. 2020;26 (7): 693–8.
158. Ahmad I, Nygren E, Khalid F, Myint SL, Uhlin BE. A Cyclic-di-GMP signalling network regulates biofilm formation and surface associated motility of *Acinetobacter baumannii* 17978. *Sci Rep*. 2020; 10 (1):1991.
159. Moon KH, Weber BS, Feldmana MF. Subinhibitory concentrations of trimethoprim and sulfamethoxazole prevent biofilm formation by *acinetobacter baumannii* through inhibition of csu pilus expression. *Antimicrob Agents Chemother*. 2017; 61:e00778-17 .

XII. ANEXOS

12.1 Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias Tipo I

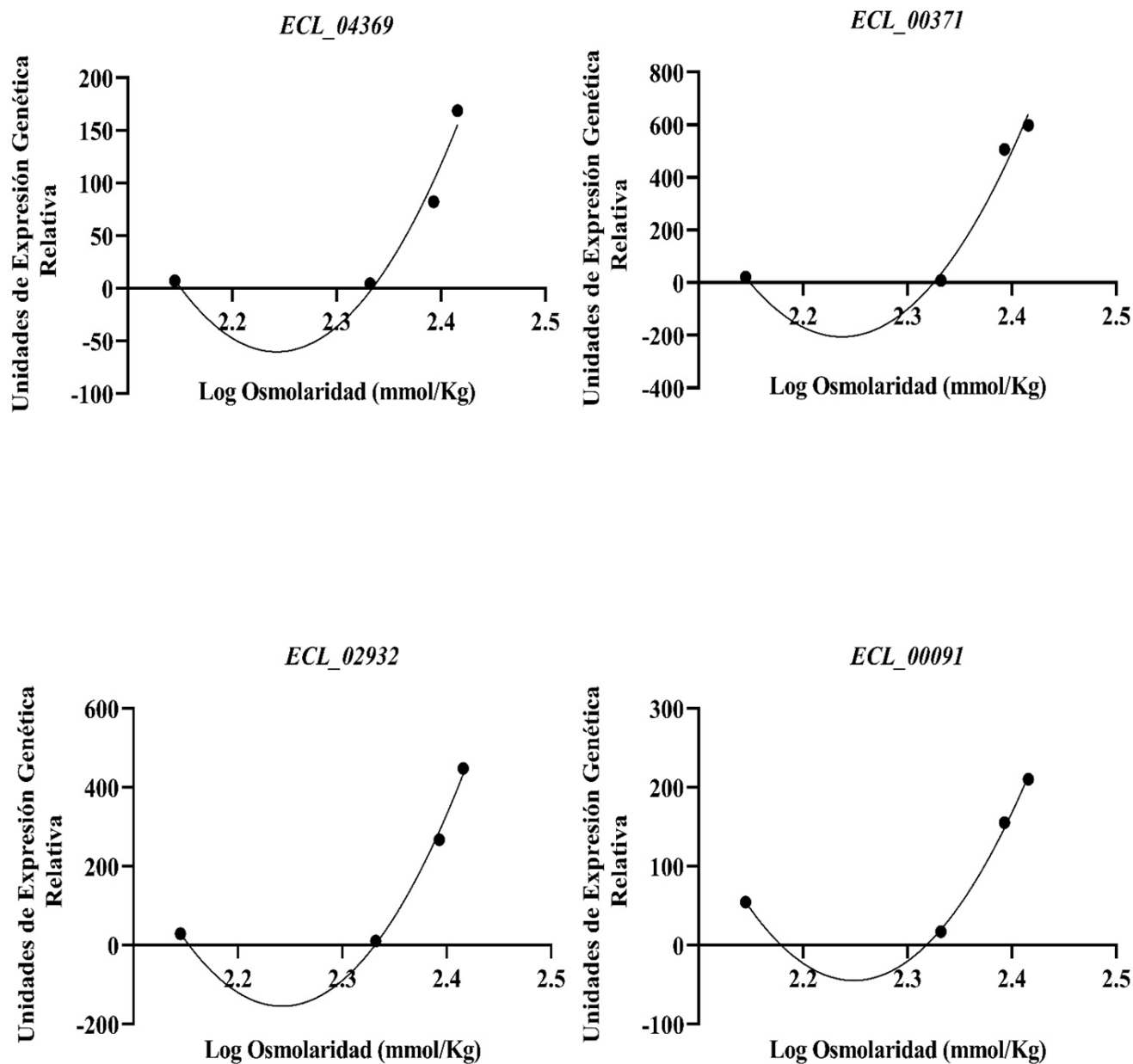


Figura 26: Gráficas de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética de los genes que codifican para las fimbrias Tipo I de *E. cloacae*.

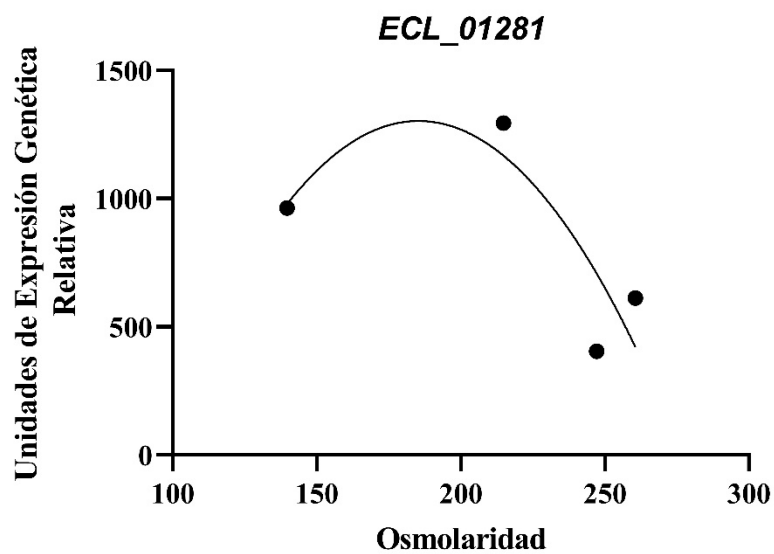


Figura 27: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética del gen que codifica para las fimbrias tipo I de *E. cloacae*.

12.2 Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias Tipo ECP

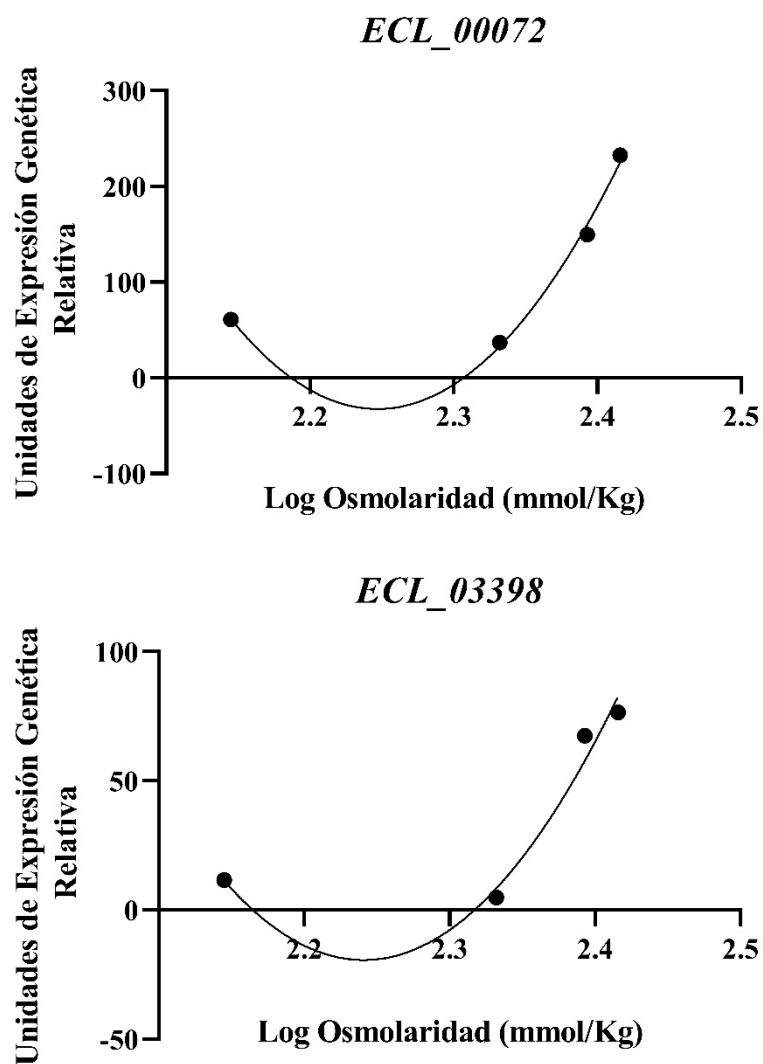


Figura 28: Gráficas de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética de los genes que codifican para las fimbrias ECP de *E. cloacae*.

12.3 Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias Tipo III

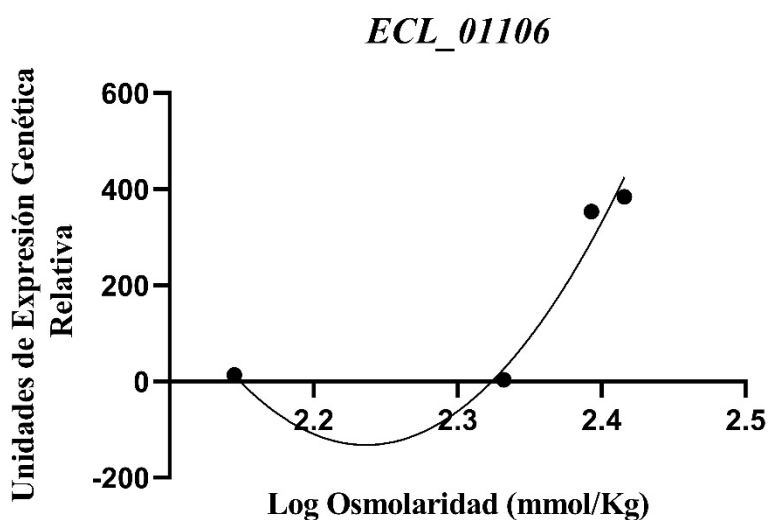


Figura 29: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética del gen que codifican para las fimbrias Tipo III de *E. cloacae*.

12.3.1 Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias Tipo Csu

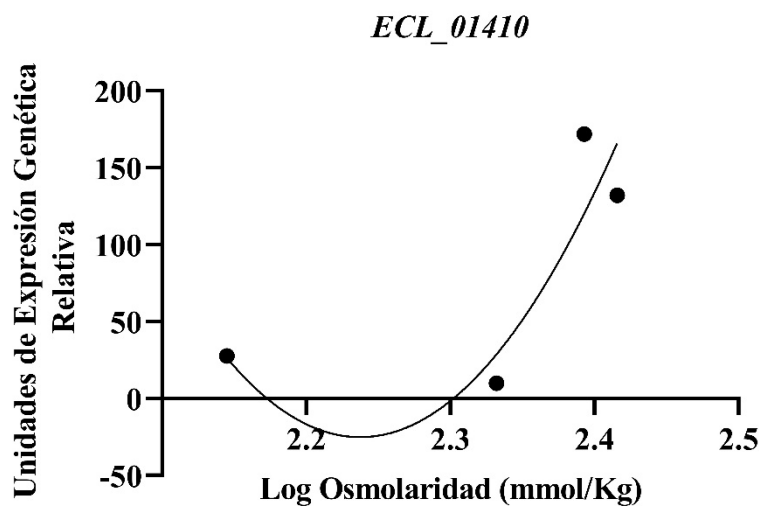


Figura 30: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión del gen que codifican para las fimbrias Tipo Csu de *E. cloacae*.

12.4 Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias sin Homología

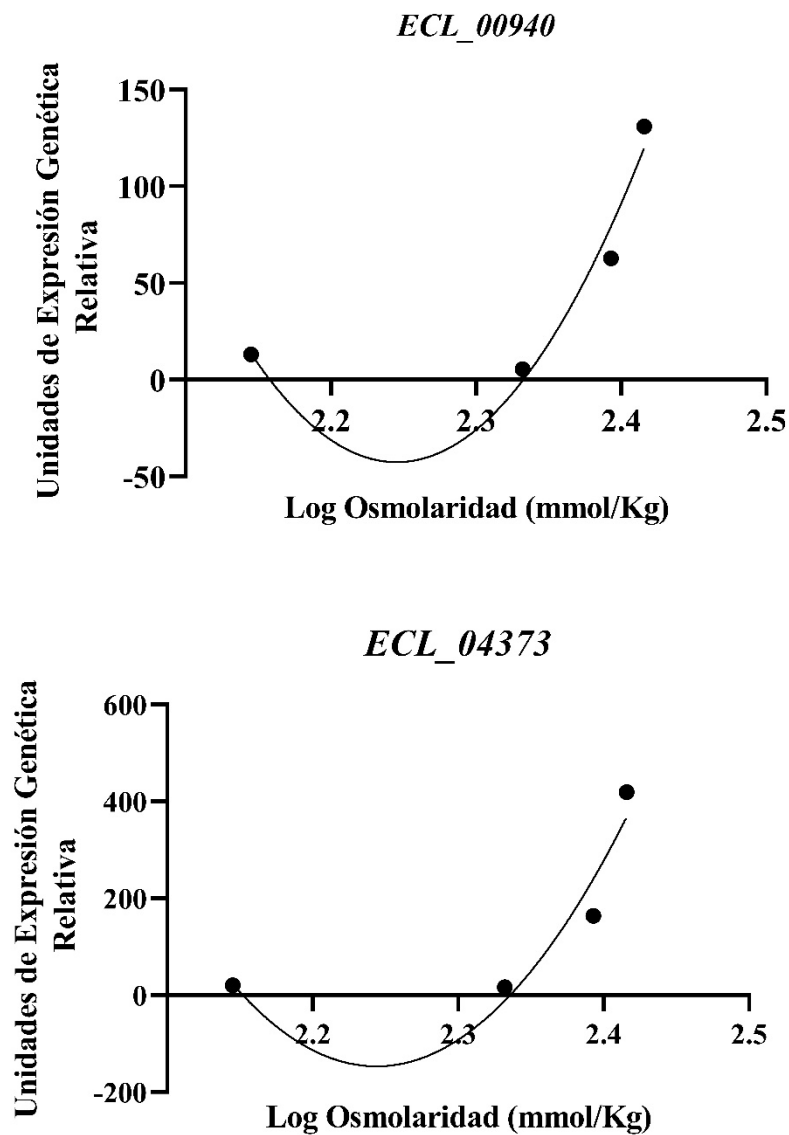


Figura 31: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética de los genes que codifican para las fimbrias sin Homología de *E. cloacae* que presentan mayor expresión en el medio TSB.

12.5 Correlación de osmolaridad y expresión genética Fimbrias sin Homología

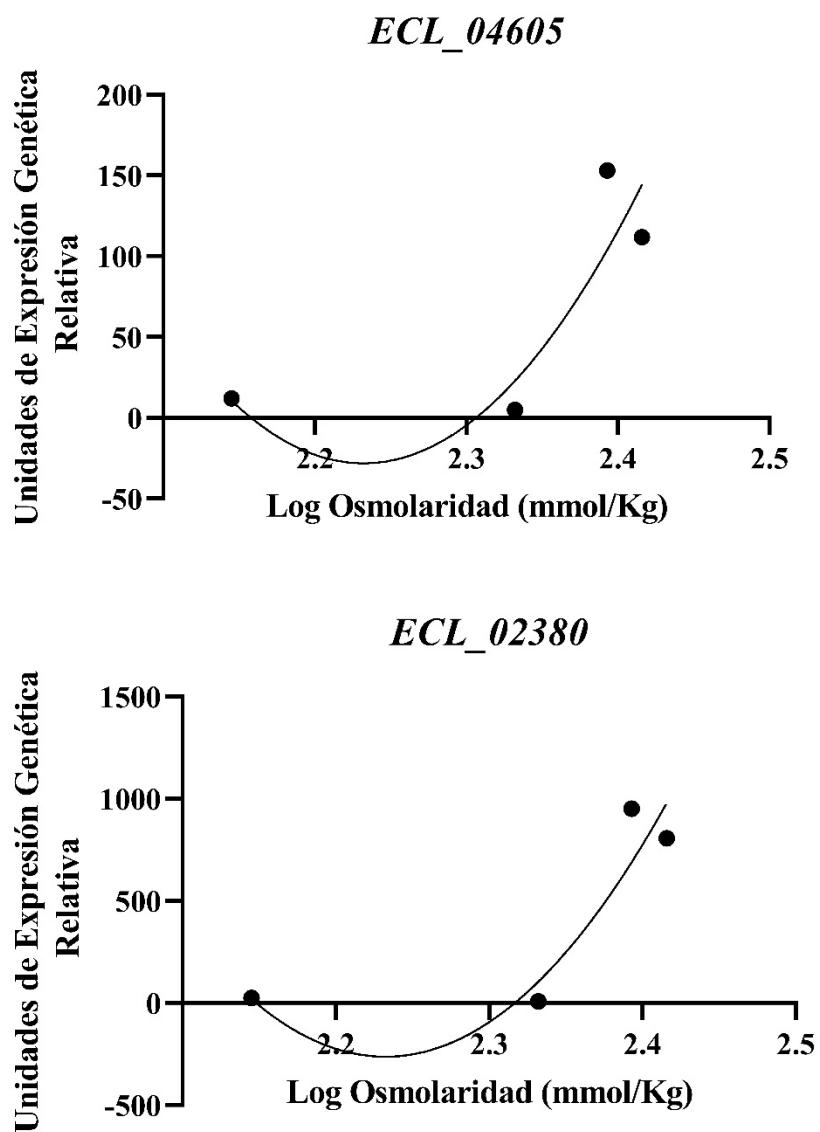


Figura 32: Gráfica de correlación entre la osmolaridad y la expresión genética de los genes que codifican para las fimbrias sin Homología de *E. cloacae* que presentan mayor expresión en el medio DMEM.

12.6 Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias Tipo

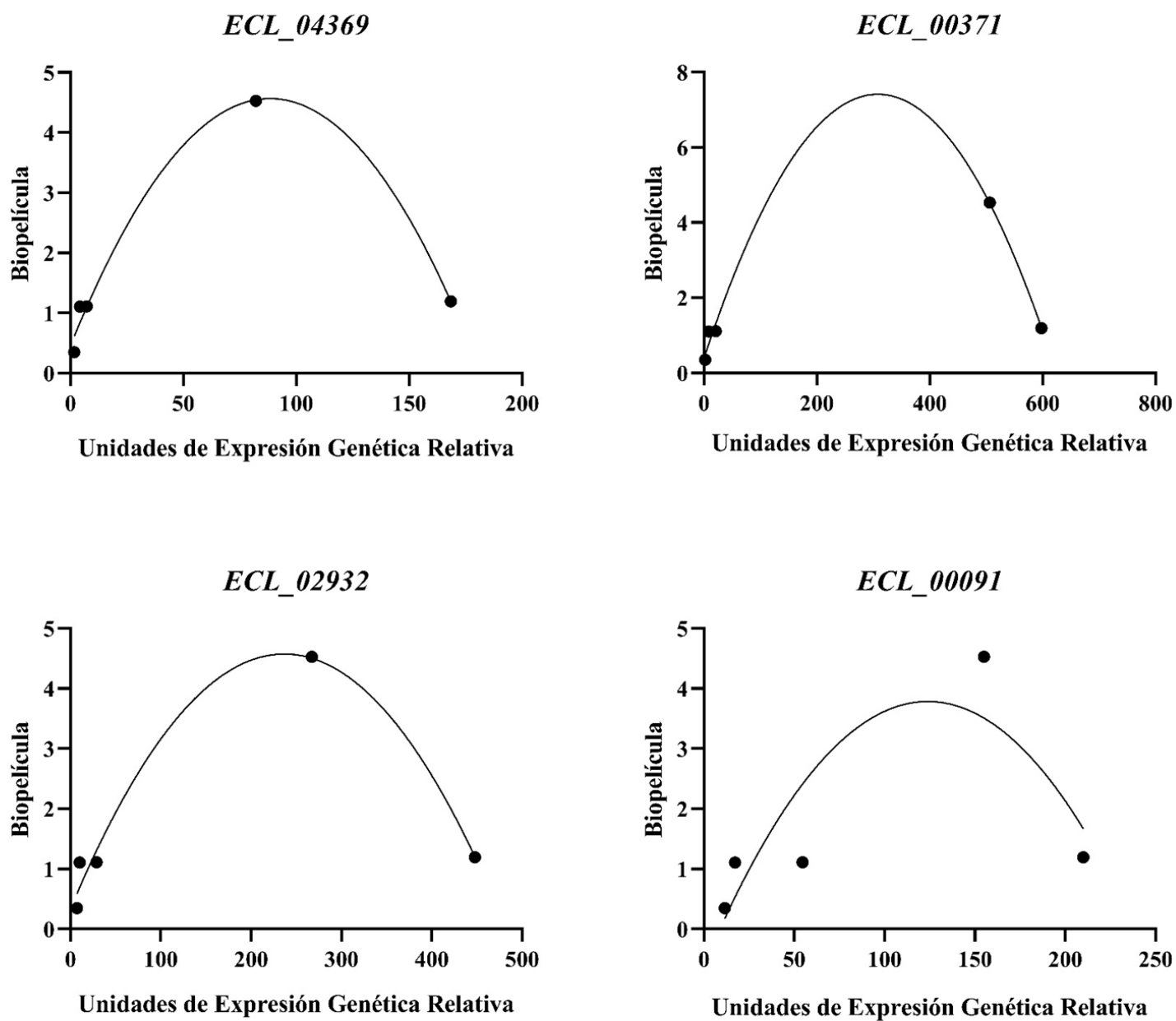


Figura 33: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias tipo I de *E. cloacae*.

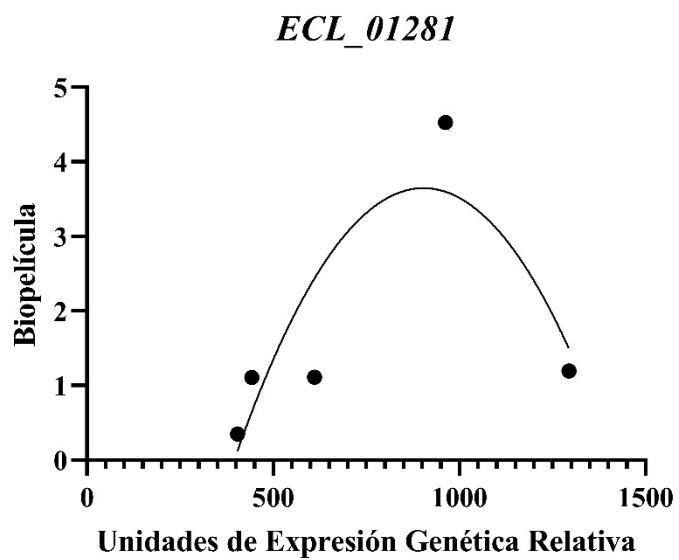


Figura 34: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética del gen que codifican para fimbrias tipo I de *E. cloacae*.

12.7 Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias Tipo ECP

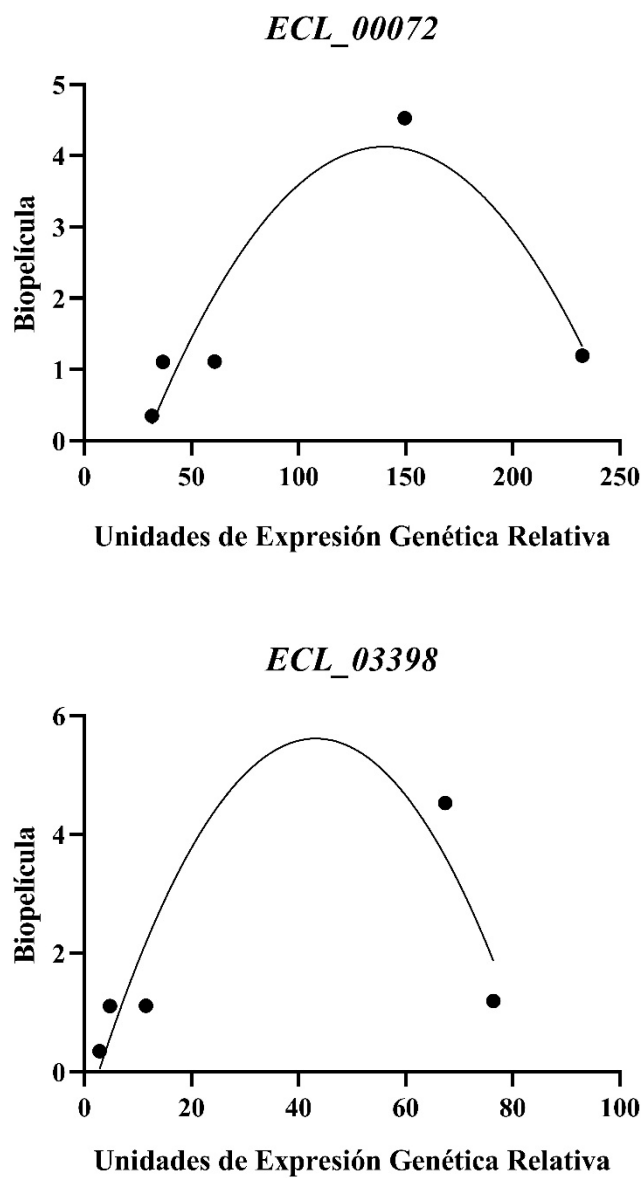


Figura 35: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias tipo ECP de *E. cloacae*.

12.8 Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias Tipo III

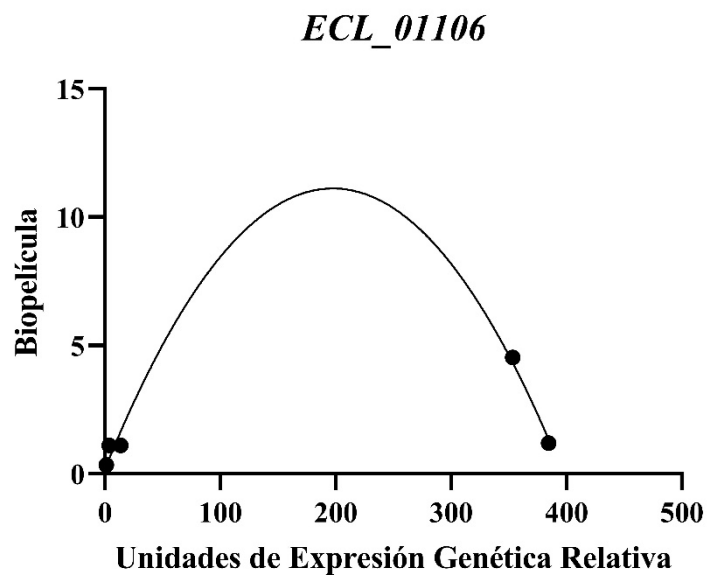


Figura 36: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética del gen que codifican para fimbrias tipo III de *E. cloacae*.

12.9 Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias Tipo Csu

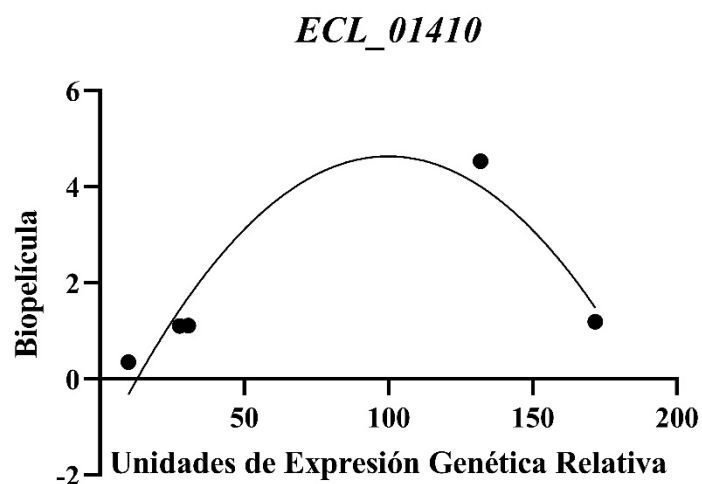


Figura 37: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética del gen que codifican para fimbrias tipo Csu de *E. cloacae*.

12.10 Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias sin Homología

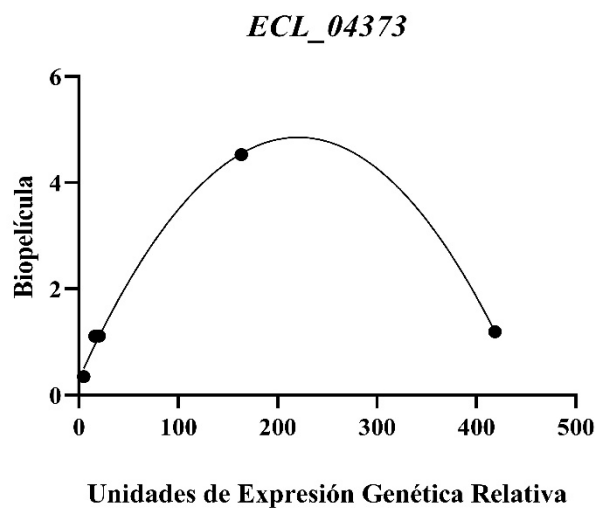
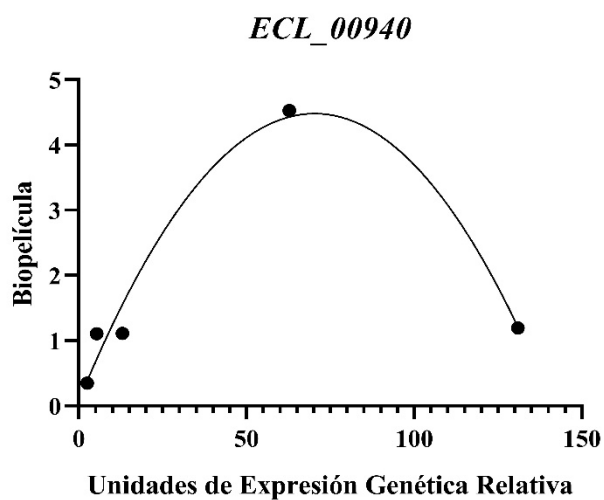


Figura 38: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias sin homología definida de *E. cloacae* que presentan mayor expresión en el medio TSB.

12.11 Correlación de biopelícula y expresión genética Fimbrias sin Homología

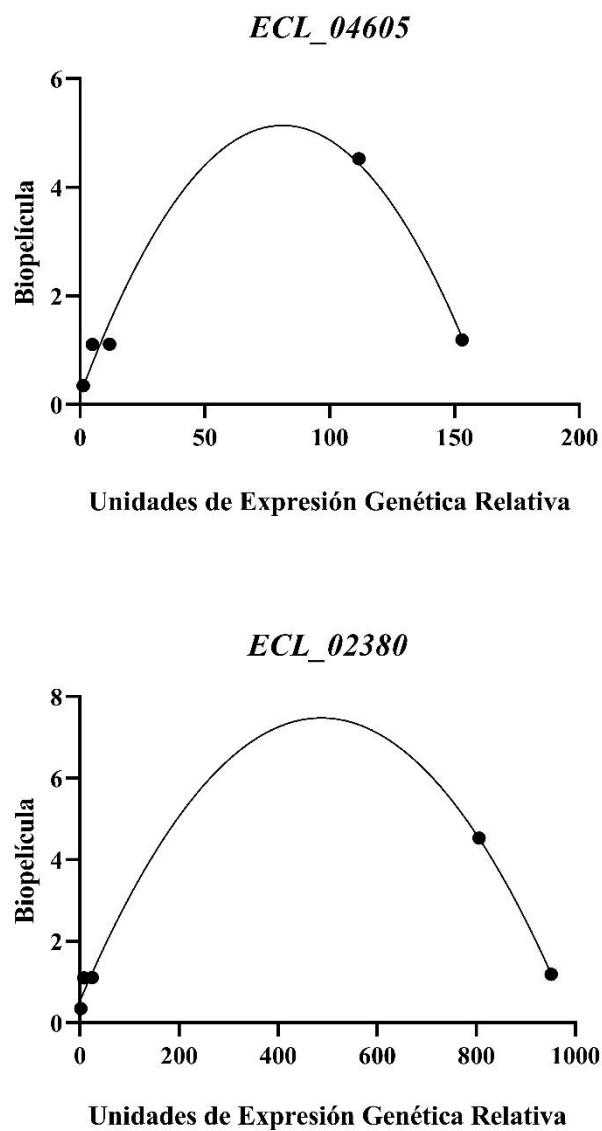


Figura 39: Gráficas de correlación entre la biopelícula y la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias sin homología definida de *E. cloacae* que presentan mayor expresión en el medio DMEM.

12.12 Dictamen del Comité de Ética e Investigación

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias de la Salud

School of Health Sciences

Comité de ética e investigación

Ethics and research committee

Pachuca de Soto, Hidalgo a 27 de Abril de 2020

DRA. JEANNETT ALEJANDRA IZQUIERDO VEGA
INVESTIGADORA ADSCRITA
INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA SALUD/ ÁREA ACADÉMICA DE MEDICINA

Asunto: DICTÁMEN DEL COMITÉ DE ÉTICA E INVESTIGACIÓN
APROBACIÓN

Título del Proyecto:

"Análisis de la expresión genética de los genes que codifican para fimbrias del patógeno oportunista *Enterobacter cloacae*"

Código asignado por el Comité: CEEI-012-2020

Le informamos que su proyecto de referencia ha sido evaluado por el Comité y las opiniones acerca de los documentos presentados se encuentran a continuación:

	No. y/o Fecha Versión	Decisión
Protocolo	Primero	Aprobado

Este protocolo tiene vigencia de Agosto 2018 a Agosto de 2020.

En caso de requerir una ampliación, le rogamos tenga en cuenta que deberá enviar al Comité un reporte del progreso al menos 60 días antes de la fecha de término de su vigencia.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Dr. José Sócrates López Noguera
Presidente

Circuito ex-Hacienda La Concepción s/n Carretera
Pachuca-Actopan, San Agustín Tlaxiaca, Hidalgo.
México. C.P. 42160
Teléfono: +52(771) 71 72000 ext.4300
comiteei.icsa@gmail.com

www.uaeh.edu.mx

Figura 40: Dictamen aprobatorio del Comité de Ética e Investigación, UAEH.