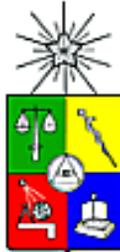


**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**



**BACTERIAS DE LA MICROBIOTA INTESTINAL PRESENTE  
EN NIÑOS CON INFECCIONES POR *E. COLI*  
DIARREOGENICAS MODULAN LA EXPRESION DE  
FACTORES VIRULENCIA DE EAEC Y STEC Y LA  
RESPUESTA INFLAMATORIA INDUCIDA SOBRE CELULAS  
INTESTINALES**

**MARIANA ANDREA IZQUIERDO TRAMON**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

**Directores de Tesis: Prof. Dr. Mauricio Farfán Urzúa  
Prof. Dr. Roberto Vidal Álvarez**

**2019**

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACION TESIS DE  
DOCTORADO EN CIENCIAS BIOMEDICAS**

Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Doctorado en Ciencias Biomédicas presentada por el candidato

**MARIANA ANDREA IZQUIERDO TRAMON**

ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de **Doctor en Ciencias Biomédicas** en Examen de Defensa de Tesis rendido el día \_\_\_\_\_ de Octubre de 2019.

**Prof. Dr. Mauricio Farfán**  
Director de Tesis  
Dpto. de Pediatría y Cirugía Infantil,  
Campus Oriente, Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile, Hospital Dr. Luis  
Calvo Mackenna

**Prof. Dr. Roberto Vidal**  
Director de Tesis  
Programa de Microbiología y Micología,  
ICBM, Facultad de Medicina,  
Universidad de Chile

**COMISION INFORMANTE DE TESIS**

**PROF. DR. MANUEL ÁLVAREZ**

**PROF. DRA. CECILIA TORO**

**PROF. DR. FABIEN MAGNE**

**PROF. DRA. MARCELA HERMOSO**  
Presidente Comisión de Examen

## **AGRADECIMIENTOS**

**ESTA TESIS CONTO CON EL FINANCIAMIENTO DE:**

Proyecto FONDECYT 1160426

Beca CONICYT de Doctorado Nacional 2015 (CONICYT-PCHA/Doctorado Nacional/2015-21150372), junto con los beneficios complementarios de Gastos Operacionales, Pasantía en el extranjero y extensión de beca.

## PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES EN CONGRESOS

### Publicaciones

Gallardo, P.\*, **Izquierdo, M.\***, Vidal, R.M., Chamorro-Veloso, N., Rosselló-Mora, R., O’Ryan, M. and Farfán, M.J. (2017). Indicative taxa of resident microbiota associated with diarrheagenic *Escherichia coli* infections in Chilean children. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7:424. doi: 10.3389/fcimb.2017.00424. \*Ambos autores contribuyeron de igual manera al trabajo.

### Presentaciones en congresos en modalidad de poster

Gallardo, P., **Izquierdo, M.**, Vidal, R., Rosselló- Móra, R., O’Ryan, M., Farfán, M. J. Identification of bacterial strains from gut microbiota associated with diarrheagenic *E. coli* infections. 7º Congreso de Microbiólogos Europeos (FEMS), 9-13 Julio 2017. Valencia, España

López J., **Izquierdo, M.**, Gallardo, P., Vidal, R., Farfán, M.J. Role of indicative bacterial taxa associated to diarrheagenic *Escherichia coli* infections in the STEC infection to intestinal cells. 10th International Symposium on Shiga Toxin (Verocytotoxin) Producing *Escherichia coli* Infections (VTEC), 6 al 9 de mayo de 2018. Florencia, Italia.

López J., **Izquierdo, M.**, Gallardo, P., Vidal, R., Farfán, M.J. Role of indicative bacterial taxa associated to diarrheagenic *Escherichia coli* infections in the STEC and EAEC infections to intestinal cells. XXIV Congreso Latinoamericano de Microbiología, 13 al 16 noviembre de 2018. Santiago, Chile.

**M. Izquierdo**, J. López, P. Gallardo, R. M. Vidal, J. C. Ossa, M. Olivares y M. J. Farfán. Bacteria associated to diarrheagenic *Escherichia coli* infections promotes IL-8 secretion mediated by Shiga toxin-producing and Enteroaggregative *Escherichia coli*. ASM Microbe 2019, 18 al 24 Junio, 2019. San Francisco, California, Estados Unidos

**M. Izquierdo, J. López, P. Gallardo, R. M. Vidal, J. C. Ossa, M. Olivares y M. J. Farfán.** Bacteria associated to diarrheagenic *Escherichia coli* infections promotes IL-8 secretion mediated by Shiga toxin-producing and Enteroaggregative *Escherichia coli*. XLI Reunión Anual de la Sociedad de Microbiología de Chile, 5 al 8 Noviembre, 2019. Puerto Varas, Chile.

## INDICE

RESUMEN	9
ABSTRACT	11
INTRODUCCIÓN	13
HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	22
METODOLOGÍA	
Objetivo Específico 1:	
Cálculo tamaño muestral	23
Muestras	24
Extracción ADN y amplificación del gen 16S rRNA	24
Análisis Bioinformático	25
Objetivo Específico 2:	
Cultivo celular	30
Cepas bacterianas	30
Curvas de crecimiento	31
Ensayos de infección	31
Análisis de expresión génica mediante secuenciación de ARN mensajero	32
Análisis estadístico	33
Objetivo Específico 3	
Construcción del modelo 3D	35
Infección del modelo 3D	37
Infección del modelo <i>in vivo</i> larva <i>G. mellonella</i>	37
Análisis de metabolómica	38
RESULTADOS	
Objetivo Específico 1:	
Muestras en estudio y análisis bioinformático	39
Comunidades microbianas identificadas taxonómicamente para cada grupo de estudio	42
Evaluación de las comunidades microbianas a través de análisis de redundancia	44
Identificación especies indicadoras	45
Objetivo Específico 2:	
Adherencia e inducción de secreción de IL-8 por bacterias de este estudio	47
Efecto de <i>E. albertii</i> en el crecimiento de STEC y EAEC	48
Efecto de <i>E. albertii</i> en la adhesión e inducción de secreción de IL8 de STEC y EAEC	50
Efecto del sobrenadante de <i>E. albertii</i> en la expresión de factores de virulencia	52
Participación de la fimbria Lpf en la secreción de IL8 inducida por STEC en presencia del sobrenadante de <i>E. albertii</i>	56

Objetivo Específico 3:	
Efecto de diluciones del sobrenadante de <i>E. albertii</i> en la secreción de IL8 inducida por STEC y EAEC	58
Análisis de la secreción de citoquinas utilizando un modelo intestinal 3D	59
Participación del sobrenadante de <i>E. albertii</i> en infección de modelo 3D	62
Ensayo de virulencia de cepas ECD utilizando modelo in vivo <i>G. mellonella</i>	64
Identificación de ácidos grasos de cadena corta en el sobrenadante de <i>E. albertii</i>	65
DISCUSIÓN	66
CONCLUSIÓN	84
BIBLIOGRAFÍA	85
ANEXO	
Aprobación comité de ética clínica las Condes y Universidad de Chile	91

## RESUMEN

Las cepas de *Escherichia coli* diarreogénicas (ECD) son importantes agentes etiológicos de diarrea en niños menores de 5 años. La capacidad de las cepas de ECD para colonizar el epitelio intestinal se relaciona con la expresión de factores de virulencia en el sitio de infección, un proceso altamente regulado y dependiente de la interacción del patógeno con su ambiente en el hospedero. A nivel intestinal, estos patógenos se encuentran con las bacterias de la microbiota y los metabolitos que éstas producen, que en condiciones de una microbiota saludable, son responsables de generar un ambiente que previene la colonización por patógenos entéricos. Sin embargo, estudios recientes demuestran que ciertas especies bacterianas de la microbiota intestinal pueden inducir un aumento en la expresión de genes de virulencia en cepas de ECD y favorecer el proceso infeccioso. Considerando estos antecedentes, en este trabajo se propuso como hipótesis que “Bacterias de la microbiota intestinal de niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas, inducen un aumento de la expresión de factores de virulencia de cepas de EAEC y STEC y la respuesta inflamatoria generada por estos patógenos sobre células intestinales en cultivo”. Para responder a esta hipótesis, se determinó la composición de la microbiota intestinal de niños entre 1 y 5 años agrupados en tres poblaciones: niños sanos (grupo Control), niños que presentan infecciones por ECD (grupo ECD) y niños que presentan infecciones por virus entéricos (grupo Virus). Para esto, se extrajo el ADN de muestras de deposición de niños pertenecientes a estos grupos y luego se amplificó y secuenció la región R1-R4 del gen que codifica el ARN ribosomal 16S. Con estas secuencias, se realizó un estudio bioinformático que permitió caracterizar la microbiota asociada a cada grupo de estudio. Este análisis mostró que en el grupo ECD existe un aumento de las bacterias pertenecientes al *phylum* Proteobacteria y una disminución de aquellas pertenecientes al *phylum* Firmicutes. Adicionalmente, un análisis de redundancia mostró que las muestras de este estudio se agrupan en comunidades de acuerdo al grupo al que pertenecen (Control, ECD o Virus), obteniendo diferencias significativas entre ellos. Finalmente, se identificaron 8 especies bacterianas, denominadas cepas indicadores, que se encontraron significativamente asociadas al grupo ECD en relación a los otros grupos. Se seleccionaron las 2 especies indicadoras cultivables con mayor significancia estadística, *Escherichia albertii* (*E. albertii*) y *Citrobacter werkmanii* (*C. werkmanii*), para estudiar el efecto que tienen sobre la virulencia de 2 patotipos de ECD: *E. coli* productor de toxina Shiga

(STEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC). Al evaluar la inducción de la secreción de IL-8 de las especies indicadoras, se encontró que *E. albertii*, a diferencia de *C. werkmanii*, no induce la secreción de IL-8 sobre células intestinales, mostrando niveles similares a los observados en células sin infectar, de manera que se continuó trabajando sólo con *E. albertii*. Se evaluó el efecto de *E. albertii* y del sobrenadante obtenido luego del cultivo de esta bacteria en (i) el crecimiento de STEC y EAEC, (ii) la adhesión de las 2 cepas ECD a células en cultivo y (iii) en la inducción de secreción de IL-8 de las cepas ECD sobre células intestinales. Se encontró que la infección de células intestinales con STEC o EAEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, produce un aumento significativo en la secreción de IL-8 comparado a la condición control. En vista de estos resultados, se analizaron los cambios en la expresión génica de las cepas de ECD luego de ser incubadas con el sobrenadante de *E. albertii*, mediante la técnica de secuenciación de ARN (RNA-Seq), observando cambios en la expresión de factores de virulencia para EAEC y STEC. Los principales resultados en EAEC, muestran un aumento en la expresión del gen que codifica la toxina Pet (*pet*) y una menor expresión del gen que codifica para Flagelina (*fliC*). Para STEC se observó una mayor expresión del regulador maestro Ler (gen *ler*) y en los genes que codifican la fimbria Lpf. Considerando que la fimbria Lpf participa en la respuesta inflamatoria inducida por STEC, se realizaron experimentos con la cepa mutante en la fimbria Lpf, observando la participación de este factor de virulencia en el aumento de secreción de IL-8 mediado por *E. albertii*. Posteriormente, se evaluó el uso de un modelo celular 3D organotípico de la mucosa intestinal para el estudio de la respuesta inflamatoria de las cepas ECD, encontrando que la infección por ECD produce un aumento en la secreción de IL-8, GRO, IP10, GM-CSF y TNF- $\alpha$ . La infección de este modelo con STEC, en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, confirmó el aumento en la secreción de IL-8. Finalmente, se realizaron experimentos con un modelo *in vivo* de virulencia, la larva *Galleria mellonella*, observando que las larvas co-infectadas con la cepa ECD y *E. albertii* muestran una menor supervivencia que la condición control, lo que se correlaciona con una mayor virulencia de la cepa ECD en presencia de *E. albertii*. En conjunto nuestros resultados muestran que metabolitos secretados por una bacteria de la microbiota intestinal asociada a la infección por ECD, inducen un aumento en la expresión de factores de virulencia en cepas de EAEC y STEC, lo que conlleva a una mayor inducción de secreción de IL-8 sobre células en cultivo y una mayor virulencia de las cepas ECD en un modelo *in vivo*.

## ABSTRACT

Diarrheagenic *E. coli* (DEC) are an important cause of diarrhea in children under five years old. The ability of DEC strains to colonize intestinal epithelium is related to the expression of virulence factors at the infection site. This process is highly regulated and relies on the interaction of pathogenic bacteria with environmental factors in the host. In the human gut, DEC strains interact with the host's resident microbiota and its metabolites, which are responsible for producing an environment that prevents colonization by enteric pathogens in healthy conditions. However, previous studies have shown that some components of the gut microbiota can modulate the expression of virulence factors in DEC strains and promote the infectious process. Considering the above, in this thesis we hypothesize that "Bacteria from the gut microbiota of children with DEC-positive diarrhea induce a higher expression of virulence factors in EAEC and STEC strains and a higher inflammatory response induced by these DEC pathotypes on intestinal cells". First, we determined the composition of the gut microbiota in children between 1 and 5 years old distributed in 3 groups: healthy children (Control group), children with DEC-positive diarrhea (DEC group) and children with diarrhea caused by an enteric virus (Viral group). DNA from the stool samples of children in these groups was obtained and the 16S rRNA gene was amplified and sequenced by pyrosequencing. To determine the gut microbiota composition associated with each group, sequences were processed by bioinformatics and phylogenetic analyses. These analyses showed an increase in sequences belonging to *phylum* Proteobacteria and a decrease in those belonging to *phylum* Firmicutes in the DEC group compared to the Viral and Control groups. Also, samples were grouped in statistically different communities by a redundancy analysis. Finally, eight indicative species mainly associated with the DEC group were identified. Two indicative species that showed the highest significance, *Escherichia albertii* (*E. albertii*) and *Citrobacter werkmanii* (*C. werkmanii*), were selected to study their effect on the virulence of two DEC pathotypes: Shiga toxin-producing *E. coli* (STEC) and enteroaggregative *E. coli* (EAEC). When the induction of IL-8 secretion by the indicative species on epithelial cells was evaluated, it was found that *E. albertii*, unlike *C. werkmanii*, does not induce the secretion of IL-8 on intestinal cells. Based on this result, *E. albertii* was chosen for further experiments. We examined the effect of *E. albertii* and the supernatant obtained after overnight culture on (i) EAEC and STEC growth, (ii) DEC adherence to intestinal cells and (iii) IL-8 secretion induced by DEC strains on intestinal cells. A significant increase in IL-8 secretion

was found when cells were infected with STEC or EAEC in the presence of *E. albertii* supernatant. Then, changes in the gene expression of DEC strains incubated with *E. albertii* supernatant were analyzed by RNA sequencing (RNA-seq), observing changes in the expression of virulence factors for EAEC and STEC. For EAEC a higher expression in the Pet toxin-encoding gene (*pet*) and a lower expression in the Flagellin protein-encoding gene (*fliC* gene) were found compared to the control condition. For STEC, we found a higher expression of the global virulence regulator Ler-encoding gene (*ler*) and the genes encoding Lpf fimbriae, with a decrease in the expression of the Shiga toxin-encoding gene (*stx*). Considering the participation of Lpf fimbriae in the STEC inflammatory response, using an Lpf mutant strain we confirmed the participation of this virulence factor in the induction of IL-8 secretion mediated by *E. albertii* supernatant. Additionally, an organotypic 3D model of intestinal mucosa was evaluated to study the inflammatory response induced by DEC strains. Using this model, we found an increase in IL-8, GRO, IP10, GM-CSF and TNF- $\alpha$  after infection with EAEC or STEC. Finally, *in vivo* experiments using the *Galleria mellonella* larvae model showed that larval co-infection with a DEC strain and *E. albertii* had a lower survival rate than the control condition, suggesting a higher virulence of STEC and EAEC strains in the presence of *E. albertii*. In summary, these results show that metabolites secreted by an indicative species of DEC-positive diarrhea induce a higher expression of virulence factors in EAEC and STEC strains, which produces a higher secretion of IL-8 on intestinal cells and a higher virulence in an *in vivo* model.

## INTRODUCCIÓN

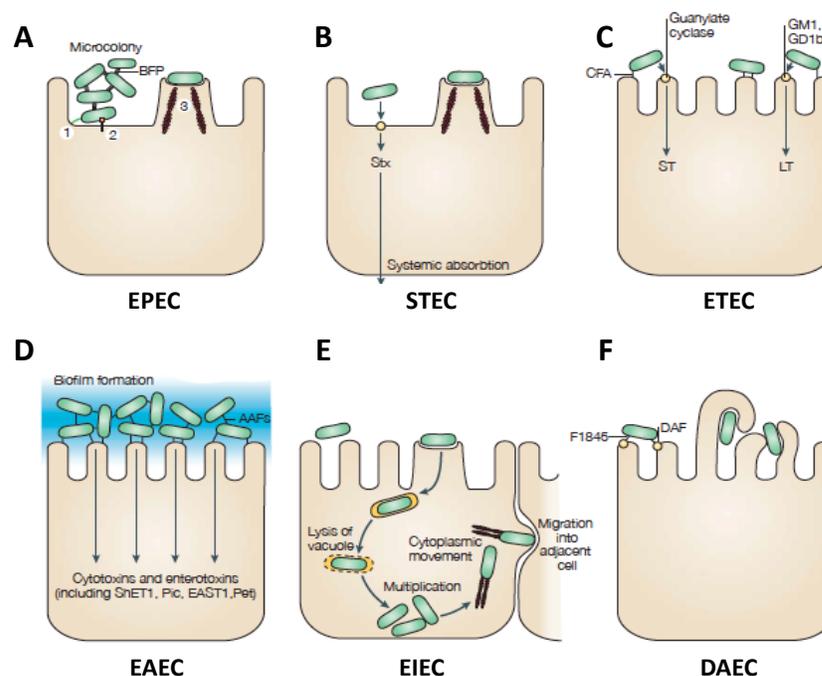
*Escherichia coli* (*E. coli*) es el anaerobio facultativo predominante de la microbiota intestinal humana. Este microorganismo coloniza el tracto gastrointestinal humano dentro de las primeras horas de vida y permanece en una relación de mutualismo con su hospedero (Blount, 2015; Nataro y Kaper, 1998). Las cepas de *E. coli* usualmente permanecen en el lumen intestinal sin causar daño, excepto en un hospedero inmunosuprimido o cuando las barreras gastrointestinales son alteradas (Nataro y Kaper, 1998). Sin embargo, hay varios clones de *E. coli* que producen factores de virulencia específicos, que le confieren una mayor capacidad para adaptarse a nuevos nichos y les permite causar un amplio espectro de enfermedades en individuos sanos (Kaper y cols., 2004). Estas cepas son clasificadas en grupos, llamados patotipos, dependiendo de dónde y cómo causan enfermedad (Blount, 2015). Tres síndromes clínicos pueden resultar de la infección con uno de estos patotipos: enfermedades entéricas, infecciones del tracto urinario y sepsis/meningitis (Kaper y cols., 2004).

Las cepas de *E. coli* causantes de enfermedades entéricas, denominadas cepas de *E. coli* diarreogénicas (ECD), son una causa importante de diarrea de origen bacteriano en el mundo y afectan principalmente a la población pediátrica menor a 5 años (World Health Organization, 2014). De acuerdo a los factores de virulencia expresados por las cepas de ECD, se han identificado seis patotipos: *E. coli* productor de toxina Shiga (STEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) (Fernandez-Prada y cols., 1998; Nataro y Kaper, 1998). Estudios recientes han mostrado una alta prevalencia de estos patotipos en muestras de diarrea, siendo los más prevalentes EPEC (22%), EAEC (7%) y ETEC (2%) (Buss y cols., 2015). De manera similar, un estudio realizado en Chile ha mostrado la presencia de patotipos de ECD en el 49% de muestras de deposición de pacientes con diarrea (Farfan y cols., 2016). Por otra parte, las cepas de ECD son responsables de importantes brotes de diarrea, como el reportado en el año 2011 en Europa, que afectó a más de 4.000 personas. El análisis de la cepa causante del brote determinó que ésta corresponde a una cepa híbrida que presenta características genómicas asociadas a EAEC y STEC, y se denominó *E. coli* enteroagregativa productora de toxina Shiga (ST-EAEC) (Rasko y cols., 2011). Estos antecedentes muestran que

las cepas de ECD continúan siendo un problema de salud pública, razón por la cual es importante estudiar sus mecanismos de patogenicidad.

### Mecanismo de patogenicidad en cepas de ECD

Cada uno de los patotipos de ECD tienen una manera específica de interactuar con la célula hospedera (Figura 1), como también su propia epidemiología y manifestaciones clínicas, sin embargo, comparten varias estrategias de virulencia (Kaper y cols., 2004). En la mayoría de ellos, el proceso infeccioso involucra 3 pasos: (i) Adherencia y colonización de la superficie intestinal, (ii) Producción y secreción de factores de virulencia y (iii) Producción de diarrea (con o sin sangre) e inflamación (Croxen y cols., 2013).



**Figura 1. Interacción de patotipos de ECD con la célula hospedera.** (A) *Escherichia coli* enteropatogénica (EPEC), caracterizada por la formación de microcolonias que se adhieren a la superficie y promueven la reorganización de los filamentos de actina que deforman la superficie celular asociado a la formación de pedestales en un proceso de adherencia y borrado de las vellosidades intestinales (lesión A/E por sus siglas en inglés). (B) *Escherichia coli* productora de shiga-toxina (STEC) también puede formar una lesión de adherencia y borrado, y lo que caracteriza a este grupo es la secreción de la toxina shiga (Stx). (C) *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), presenta una gran variedad de adhesinas fimbriales y no fimbriales y se caracteriza por la secreción de una toxina termo estable (ST) y/o una toxina termolábil (LT), que promueven el desarrollo de una diarrea acuosa. (D) *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), se adhiere a la superficie epitelial y entre ellas formando una biopelícula sobre el epitelio. (E) *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) es reconocida por invadir las células intestinales y moverse lateralmente a través del epitelio. (F) *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC), induce una cascada de señalización que favorece la formación de prolongaciones de la membrana celular que rodean la bacteria. Imagen modificada desde (Kaper y cols., 2004).

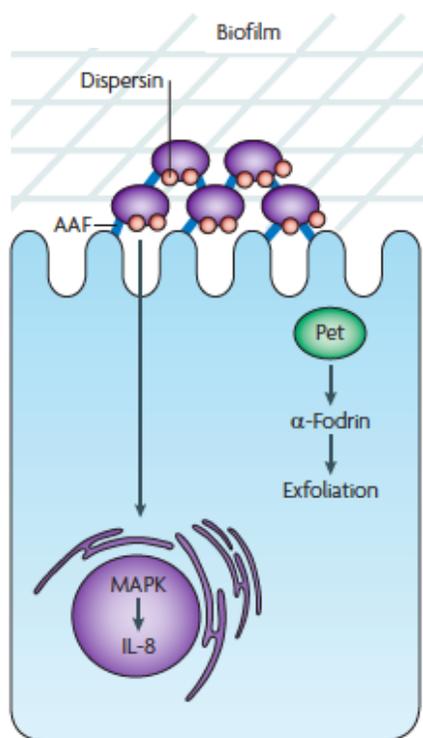
Debido a la importancia clínica de STEC y EAEC y la prevalencia de estos patotipos en muestras de diarrea, es que los estudios realizados en el laboratorio y en este trabajo de tesis se han enfocado en ellos.

El patotipo EAEC se describió en el año 1985, y se ha considerado como causa de diarrea persistente en niños y como la segunda causa más común de diarrea del viajero (Croxen y Finlay, 2010). La diarrea causada por EAEC es generalmente acuosa y suele estar acompañada de sangre y/o mucus (Croxen y Finlay, 2010). Estudios en explantes intestinales humanos indican que EAEC se adhiere a tejido de íleon y colon e induce significativos daños en la mucosa intestinal, siendo más severos en la sección del colon (Hicks y cols., 1996; Nataro y cols., 1996).

El proceso de adherencia al epitelio intestinal es un paso crítico en la infección por cepas de EAEC y en el resto de las ECD. Este proceso es llevado a cabo a través de estructuras de superficie, conocidas como adhesinas, capaces de interactuar con receptores celulares presentes en la superficie epitelial (Torres y cols., 2005). Las cepas de EAEC son reconocidas por adherirse a células HEp-2 en un patrón conocido como autoagregativo, en el cual las bacterias se adhieren una a la otra en una configuración de “ladrillos apilados”. Este proceso está dado por estructuras fimbriales conocidas como Fimbrias de Adherencia Agregativa (AAFs) (Czeczulin y cols., 1997). Trabajos previos en el laboratorio se enfocaron en la búsqueda de receptores celulares para la fimbria AAF encontrando que esta fimbria tiene la habilidad de reconocer la proteína de matriz extracelular fibronectina, la que produce un aumento en la adhesión de EAEC a células intestinales en cultivo (Farfan y cols., 2011; Farfan y cols., 2008). Posteriormente, se determinó que el complejo EAEC-fibronectina se puede unir al receptor celular integrina- $\alpha 5\beta 1$  (Izquierdo y cols., 2014).

Luego del proceso de colonización, la bacteria secreta varias toxinas y proteínas efectoras que intervienen en diversos procesos, como por ejemplo, en la evasión de la respuesta inmune, la inducción de citotoxicidad y en el desarrollo de diarrea y una respuesta inflamatoria (Kaper y cols., 2004). Las cepas de EAEC causan daño en la mucosa intestinal a través de la secreción de las toxinas Pet, ShET1 y EAST1, que globalmente contribuyen a la inducción de una diarrea acuosa y a la exfoliación celular (Kaper y cols., 2004).

Finalmente, el proceso de inflamación está caracterizado por la secreción de altos niveles de mediadores pro-inflamatorios. Estudios previos han demostrado que EAEC, a través de las fimbrias AAF, inducen un proceso inflamatorio que está asociado con la activación de las vías de señalización del factor nuclear kappa B (NF-kB) y las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK), promoviendo así la secreción de quimioattractantes como Interleuquina-8 (IL-8) y derivados eicosanoides que inducen la trans migración de neutrófilos al sitio de infección (Boll y cols., 2012b; Dahan y cols., 2002; Harrington y cols., 2005; Vergara y cols., 2014). Un esquema del mecanismo de patogenicidad de EAEC se muestra en la Figura 2.



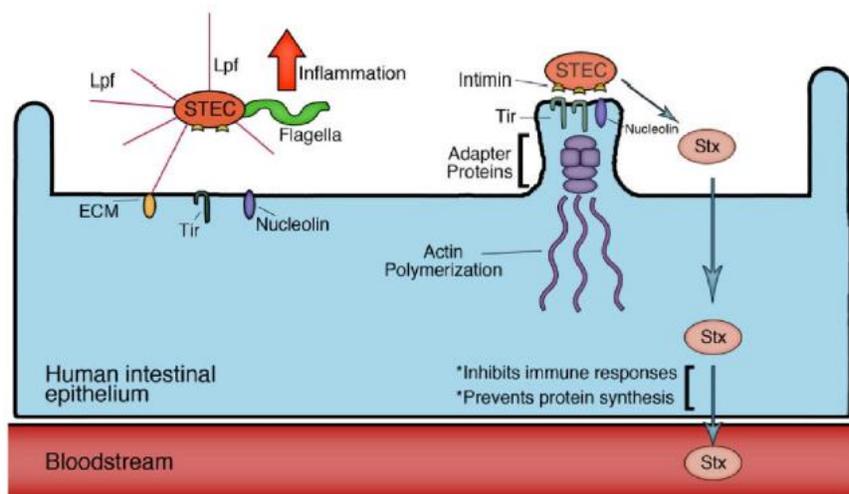
**Figura 2. Mecanismo de patogenicidad de EAEC.** EAEC se adhiere a la superficie epitelial del intestino grueso e intestino delgado a través de la fimbria de adhesión agregativa (AAF), promoviendo la formación de una bio-película en la superficie celular. La interacción de EAEC con la célula hospedera promueve una fuerte respuesta inflamatoria, que se caracteriza por la secreción de interleuquina-8 (IL-8). La toxina codificada en plásmido (Pet), es un autotransportador con actividad serin-proteasa, cuyo blanco es la proteína a-fodrin, por lo que promueve una disrupción del citoesqueleto de actina y la exfoliación celular. Imagen modificada de (Croxen y Finlay, 2010).

La infección por cepas de STEC, un patógeno zoonótico, es una de las principales causas de diarrea sanguinolenta y colitis hemorrágica. En algunos casos, producto de complicaciones sistémicas de la enfermedad se puede desarrollar Síndrome Hemolítico Urémico (SHU), caracterizado por trombocitopenia, anemia hemolítica y falla renal aguda (Barnett Foster, 2013).

La adherencia inicial de STEC al epitelio intestinal estaría dado por estructuras fimbriales, como por ejemplo, la fimbria polar larga (Lpf) (Torres y cols., 2002). Al igual que para EAEC, estudios previos realizados en el laboratorio han demostrado que la cepa de referencia de STEC, a través de la fimbria Lpf, interactúa con la proteína fibronectina, promoviendo un aumento en la adhesión a células epiteliales (Farfan y cols., 2011). Junto con lo anterior, la mayoría de las cepas de STEC asociadas a infección en humanos presentan en su genoma la isla de patogenicidad LEE, que codifica para un sistema de secreción tipo III (SST3), a través del cual se produce la inyección de Tir al citoplasma de la célula hospedera, proteína que estará posteriormente disponible en la superficie celular para actuar como receptor para la proteína de superficie bacteriana intimina, promoviendo así la adherencia de STEC a las células del epitelio intestinal. Además, el SST3 permite inyectar en el citoplasma de la célula hospedera proteínas efectoras que modulan distintas funciones celulares causando por ejemplo, reordenamiento del citoesqueleto y disrupción de uniones estrechas, activación de la respuesta inmune y producción de diarrea (Hueck, 1998; Ugalde-Silva y cols., 2016). Luego de producirse la colonización del epitelio intestinal, se produce la liberación de la toxina Shiga (Stx), el principal factor de virulencia de STEC y responsable del desarrollo de una colitis hemorrágica y del SHU (Nataro y Kaper, 1998). Esta toxina tiene la capacidad de atravesar la barrera epitelial y llegar a sus órganos blancos, como el riñón y el cerebro, donde es endocitada y una vez que alcanza el citoplasma puede inhibir la síntesis de proteínas al interactuar con la subunidad ribosomal 60S (Jubelin y cols., 2018).

La infección por STEC induce una respuesta inflamatoria caracterizada por la activación de las cascadas de señalización intracelular MAPK, NF-kB y AP-1, llevando a la secreción de marcadores pro-inflamatorios como IL-8 (Dahan y cols., 2002; Miyamoto y cols., 2006). Estudios realizados en el laboratorio proponen que la fimbria Lpf participa en la inducción de la secreción de IL-8 por células intestinales en cultivo y como consecuencia, favorece la

migración de polimorfonucleares a través de la monocapa de células epiteliales (Vergara y cols., 2014). Un esquema del mecanismo de patogenicidad de STEC se muestra en la Figura 3.



**Figura 3. Mecanismo de patogenicidad de STEC.** La adhesión inicial de STEC se produce por la interacción a través de estructuras fimbriales, como la fimbria Lpf, a la célula epitelial. Posteriormente, se produce la deformación de la superficie celular producto de la reorganización de los filamentos de actina, llevando a la formación de pedestales que favorecen la íntima adherencia de STEC, mediante la interacción de la proteína intimina con el receptor translocado Tir. La producción de la toxina Shiga, ocurre en el tracto gastrointestinal, y es translocada a través del epitelio intestinal al torrente sanguíneo, donde puede alcanzar los órganos blancos, como por ejemplo el riñón o el cerebro. Imagen modificada de (Farfan y Torres, 2012).

La capacidad de las cepas de ECD para colonizar el epitelio intestinal está relacionada con la expresión de factores de virulencia en el sitio de infección, un proceso que se encuentra altamente regulado y que depende de la interacción del patógeno con su ambiente en el hospedero (Vayssier-Taussat y cols., 2014). Al llegar al colon, estos patógenos se encuentran con las bacterias que componen la microbiota y los metabolitos que éstas producen para beneficiar al hospedero y protegerlo de la infección (Barnett Foster, 2013), por lo tanto, necesita interactuar y competir con las bacterias de la microbiota intestinal para encontrar un nicho de colonización. Respecto a este punto, estudios recientes sugieren que componentes de la microbiota intestinal pueden regular la virulencia de patógenos entéricos y el desarrollo de la enfermedad (Curtis y cols., 2014; Iversen y cols., 2015), sin embargo, el impacto que tiene la bacteria comensal en la patogénesis por ECD y en el desarrollo de enfermedades entéricas, aún no está definido. De esta forma, elucidar los procesos involucrados en la interacción entre hospedero, microbiota y patógenos es de gran importancia para el desarrollo de nuevas intervenciones terapéuticas.

## Microbiota intestinal

La microbiota intestinal humana es un ecosistema muy diverso que está localizado en el tracto gastrointestinal y que está compuesto por más de 400 especies bacterianas diferentes que tienen una relación simbiótica con el hospedero (Steinhoff, 2005). La colonización del tracto gastrointestinal comienza inmediatamente después del nacimiento por organismos anaerobio-facultativos, como *E. coli*. Estos microorganismos consumen los niveles iniciales de oxígeno de manera que el intestino se llega a ser un ambiente anaerobio que favorece el crecimiento de anaerobios estrictos como *Bifidobacterium*, *Clostridium* y *Bacteroides*, siendo *Bifidobacterium* el género bacteriano dominante en la microbiota intestinal infantil (Matamoros y cols., 2013). En los primeros años de vida la composición de la microbiota intestinal incrementa en diversidad y riqueza hasta alcanzar un estado similar al de adulto alrededor de los 3 años, dominado por especies bacterianas que pertenecen a los *phyla Bacteroidetes* y *Firmicutes* (Matamoros y cols., 2013).

La microbiota juega un rol importante en la salud humana al influenciar el estado fisiológico, nutricional e inmunológico del hospedero (Silva y cols., 2015), ya que participa en la fermentación de sustratos no digeribles de la dieta, en la protección contra bacterias patógenas al funcionar como barrera para la adherencia de patógenos al epitelio intestinal, y en el desarrollo de un sistema inmune competente producto de la interacción de la microbiota con el hospedero (Guarner y Malagelada, 2003). De esta manera, el conocimiento de las especies que componen la microbiota intestinal nos permite entender cómo las bacterias comensales interactúan con el hospedero y cómo los cambios a nivel de composición de la microbiota intestinal se relacionan con el desarrollo de enfermedad. Respecto a esto, varios grupos de estudios se han enfocado en determinar los cambios en la composición de la microbiota asociados a episodios de diarrea [mediante análisis bioinformáticos basados en la secuenciación del gen 16S ribosomal](#). A modo general, estos estudios muestran que las modificaciones en la abundancia relativa de ciertas especies varían de acuerdo a la población en estudio. La mayoría de estos estudios ha mostrado un incremento de las bacterias pertenecientes al *phylum* Proteobacteria y una disminución de los géneros bacterianos *Bifidobacterium* y *Lactobacillus* durante episodios de diarrea (Becker-Dreps y cols., 2015). [De la misma manera, mediante análisis bioinformáticos se podría determinar aquellas especies de la microbiota intestinal que están asociadas significativamente](#)

[a grupos con diarrea y que podrían ser utilizadas como especies indicadoras de los cambios en la composición de la microbiota](#) (De Cáceres y cols., 2010). Junto con esto, se ha observado que la infección por cepas patógenas genera una respuesta inflamatoria por parte del hospedero, y bajo estas condiciones de inflamación, se favorece el crecimiento de microorganismos anaerobios facultativos mientras que disminuyen los miembros anaerobios de la microbiota (Stecher, 2015).

Considerando que la expresión de factores de virulencia en bacterias patógenas está fuertemente regulada por las condiciones ambientales presentes en el sitio de infección, se postula que la composición de la microbiota tenga un rol en la regulación de los mecanismos patogénicos (Pacheco y Sperandio, 2015). Respecto a este punto, se ha observado que cepas de *Lactobacillus* y *Bifidobacterium* disminuyen la adhesión de enteropatógenos como *Salmonella* Typhimurium y ETEC en células Caco-2. Además, se demostró que estas cepas protegen a los enterocitos de una respuesta inflamatoria aguda, al disminuir los niveles de IL-8 secretados por células HT-29, luego de incubarlas con moléculas proinflamatorias (Candela y cols., 2008). También existen evidencias que componentes de la microbiota intestinal pueden inducir la expresión de factores de virulencia, promoviendo así la infección por patógenos entéricos. En un estudio donde se realizaron experimentos de co-incubación entre un componente de la microbiota intestinal, *Bacteroides thetaiotaomicron* (Bt), y una cepa prototipo de STEC (cepa 86-24), se observó un aumento en la expresión del 20% de los genes de STEC, incluyendo aquellos involucrados en el proceso patogénico, lo que produjo un aumento en el número de bacterias adheridas a células en cultivo. Adicionalmente, se realizaron ensayos con un modelo murino, en el cual se eliminó la microbiota y posteriormente, se reconstituyó con Bt o buffer PBS. Luego, se realizó una infección con *Citrobacter rodentium*, patógeno murino homólogo a STEC, obteniendo que aquellos ratones en los que se reconstituyó la microbiota con Bt presentaron mayor mortalidad y daño al hospedero con respecto a los ratones control (Curtis y cols., 2014). Un estudio similar evaluó la co-incubación de Bt con otra cepa STEC, obteniendo que la expresión de genes involucrados en metabolismo, colonización y virulencia son modulados en respuesta al contacto directo con Bt como a los factores solubles producidos por esta bacteria de la microbiota (Iversen y cols., 2015).

En relación a estos resultados, se ha planteado que la capacidad de las bacterias de la microbiota de metabolizar carbohidratos afectaría la colonización por patógenos, ya que actuaría como una fuente generadora de nutrientes promoviendo un ambiente en el que se favorece el crecimiento de otras bacterias como *E. coli*, y aumenta la posibilidad de encontrar un nicho en el hospedero (Baumler y Sperandio, 2016). Además, se ha observado que la presencia diferencial de carbohidratos en el intestino puede ser utilizado, por cepas de STEC, como señal para regular la expresión de factores de virulencia (Pacheco y Sperandio, 2015). Otro producto de la fermentación de carbohidratos son los ácidos grasos de cadena corta, producidos por el metabolismo de bacterias anaerobias de la microbiota intestinal. Estos ácidos grasos, contribuyen al funcionamiento normal del intestino y la prevención de enfermedad, sin embargo, se ha observado que alteraciones en la concentración de ácidos grasos pueden modular la expresión de genes de motilidad y virulencia en enteropatógenos (Nakanishi y cols., 2009; Tobe y cols., 2011). Lo anterior, sugiere que las bacterias de la microbiota pueden generar un ambiente que favorece la colonización por patógenos y de esta forma, pueden modular la expresión de factores de virulencia en enterobacterias.

A partir de los antecedentes planteados, se puede establecer que la virulencia de patógenos está regulada por las condiciones de infección, que existen cambios en la microbiota intestinal en episodios de diarrea y finalmente, que ciertas bacterias de la microbiota intestinal pueden modular la virulencia de cepas de ECD. Debido a esto, se plantearon las siguientes preguntas de investigación: ¿Existen componentes de la microbiota intestinal asociada a infecciones por ECD? ¿Bacterias intestinales de la microbiota asociada a ECD pueden inducir la expresión de factores de virulencia en cepas ECD?

De esta forma, en este trabajo se evaluó la composición de la microbiota en la infección por cepas de ECD y el rol de bacterias de esta microbiota en el proceso patogénico de STEC y EAEC, lo que nos permite comprender en mayor profundidad cómo están interactuando las cepas ECD con el hospedero para el desarrollo de enfermedad.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

“Bacterias de la microbiota intestinal de niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas, inducen un aumento de la expresión de factores de virulencia de cepas de EAEC y STEC y la respuesta inflamatoria generada por estos patógenos sobre células intestinales en cultivo”

### **Objetivo general**

Determinar la participación de bacterias de la microbiota intestinal de niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas en la expresión de factores de virulencia de cepas de STEC y EAEC y en la respuesta inflamatoria inducida sobre células intestinales en cultivo

### **Objetivos Específicos**

1. Identificar especies indicadoras de la microbiota intestinal asociada a niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas
2. Evaluar el efecto de bacterias indicadoras de la microbiota intestinal asociada a niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas en la expresión de factores de virulencia de cepas de STEC y EAEC.
3. Establecer el efecto de bacterias indicadoras de la microbiota intestinal asociada a niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas en la respuesta inflamatoria causada por las cepas de STEC y EAEC en modelos celulares intestinales.

## METODOLOGÍA

### **Objetivo Específico 1. Identificar especies indicadoras de la microbiota intestinal asociada a niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas**

Para cumplir con este objetivo, se utilizaron muestras de deposición de niños agrupados en 3 poblaciones: niños con diarrea positiva para cepas de *E. coli* diarreogénicas, niños con diarrea positiva para patógenos virales y niños sanos negativos para patógenos intestinales. A cada una de las muestras, se les realizó extracción de ADN y la amplificación por PCR de la región R1-R4 del gen que codifica el ARN ribosomal 16S (16S rRNA). Estos amplificados se enviaron a secuenciar mediante pirosecuenciación (Macrogen, Corea) y en el laboratorio se realizó el análisis bioinformático que permitió analizar la composición de la microbiota asociada a cada uno de los grupos. A partir de este análisis, se realizó la identificación de especies indicadoras asociadas al grupo de muestras con infección por ECD, seleccionando 2 bacterias cultivables de este grupo para su utilización en los siguientes objetivos.

### **Cálculo tamaño muestral**

Para determinar el número de muestras requeridas para este trabajo de tesis, se utilizó el programa G-Power (Faul y cols., 2007) considerando los siguientes valores estadísticos: (i) un error tipo I igual a 0,05, indicando que se acepta una probabilidad del 5% de rechazar incorrectamente la hipótesis nula y (ii) una potencia de 0,8, lo que indica que hay un 20% de probabilidad de aceptar la hipótesis nula siendo ésta incorrecta. El uso de ambos valores ha sido establecido convencionalmente para el cálculo de tamaño muestral (Bono y Arnaud, 1995). Finalmente, se utilizó un valor de tamaño de efecto de 0,4176, que representa la magnitud de la diferencia entre los diferentes grupos de estudio. Este valor se obtuvo a partir de un estudio piloto realizado previamente en el laboratorio, en el cual se compararon los mismos 3 grupos de este estudio, pero con sólo 10 muestras en cada uno de ellos. Con estos antecedentes, se obtuvo que para el presente trabajo se requiere de 60 muestras, es decir, un mínimo de 20 muestras en cada grupo de estudio.

## **Muestras**

Se utilizaron 63 muestras de deposición de niños entre 1 y 5 años con diarrea aguda, que se atendieron en la Clínica Las Condes. Estas muestras se analizaron por la plataforma Filmarray®, utilizando el panel Gastrointestinal (Filmarray-GI®), un test aprobado por la FDA que permite, a través la realización de un PCR múltiple, la detección cualitativa de 22 patógenos gastrointestinales entre virus (Adenovirus F40/41; Astrovirus; Norovirus GI/GII; Rotavirus A; y Sapovirus I/II/IV/V), parásitos (*Cryptosporidium*; *C. cayetanensis*; *E. histolytica* y *G. lamblia*) y bacterias (*C. jejuni*; *C. coli*; *C. upsaliensis*; *C. difficile*; *P. shigelloides*; *Salmonella*; *Yersinia enterocolitica*; *V. parahaemolyticus*; *V. vulnificus*; *V. cholera*; *Shigella* y los patotipos ECD, EAEC, EPEC, ETEC, STEC, y EIEC). De esta forma, se clasificaron las muestras de acuerdo con el patógeno presente y se continuó trabajando con los siguientes 2 grupos: Grupo ECD (32 muestras positivas exclusivamente para patotipos ECD) y Grupo Virus (31 muestras positivas para virus entéricos). Adicionalmente, se utilizaron 30 muestras de deposición de niños sanos entre 1 y 5 años, sin patógenos entéricos detectados (Grupo Control). Estas muestras se obtuvieron de un estudio de cohorte de niños sanos de la ciudad de Colina, realizado por el Dr. Miguel O’Ryan (O’Ryan y cols., 2013). El uso de todas estas muestras cuenta con la aprobación del comité de ética de la Clínica Las Condes y de la Universidad de Chile (Anexo).

## **Extracción de ADN y amplificación del gen 16S rRNA**

Se realizó la extracción de ADN total de las muestras de este estudio utilizando el kit QIAamp Fast DNA Stool Mini kit (Qiagen) y se cuantificaron con el espectrofotómetro Synergy-HT (Biotek™). Posteriormente, se llevó a cabo la amplificación del gen 16S rRNA en un proceso de 2 pasos. En primer lugar, se realizó la amplificación de un fragmento de ~ 1.400 pb con los partidores GM3 y 1492R, seguido de un PCR anidado que permitió la amplificación de un fragmento de ~900 pb del gen 16S rRNA (regiones R1-R4), utilizando el partidador GM3-PS y un partidador 907-PS diferente para cada muestra. Ambos partidores presentan las secuencias necesarias para llevar a cabo el proceso de secuenciación, y el partidador 907-PS presenta adicionalmente una secuencia identificadora que permite el reconocimiento de cada muestra. Los amplificadores de cada reacción se purificaron a partir de un gel de agarosa con el kit comercial E.Z.N.A. Gel Extraction kit (Omega) y se cuantificó el ADN del producto purificado. Se realizaron mezclas equimolares de los amplicones purificados (10-12 muestras por grupo) y

se enviaron a la empresa MacroGen Inc. en Corea, para la secuenciación del gen 16S rRNA mediante pirosecuenciación, utilizando la plataforma Roche 454- GS-FLX+ Titanium. Las secuencias de los partidores utilizados en esta parte del trabajo se encuentran descritos en la Tabla 1.

### **Análisis Bioinformático**

El análisis realizado incluye varias etapas detalladas a continuación y un esquema general del procedimiento se presenta en la Figura 4.

*Trimado de secuencias y Obtención de OTUs:* Con la información entregada por MacroGen, se realizó el procesamiento inicial y trimado de las secuencias utilizando el programa Mothur (Schloss y cols., 2009). Este proceso consistió, en primer lugar, en la agrupación de las secuencias correspondientes a cada muestra, de acuerdo al código presente en el partidor 907-PS. Posteriormente, se realizó la eliminación de las secuencias de baja calidad, es decir, aquellas secuencias menores de 300 pb, con más de 8 homopolímeros, secuencias ambiguas y aquellas que presentaron diferencias respecto a las secuencias de los partidores usados. Posteriormente, se realizó la agrupación de las secuencias trimadas con 99% de identidad en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs) utilizando el programa MacQiiME (Caporaso y cols., 2010). La secuencia más larga de cada grupo se seleccionó como la secuencia representativa de cada OTU.

*Obtención de OPUs:* Las secuencias representativas de cada OTU se alinearon utilizando la base de datos SILVA Ref 123 junto con la herramienta de alineamiento SINA del programa ARB 6.0 (Ludwig y cols., 2004; Pruesse y cols., 2012; Quast y cols., 2013) y las secuencias alineadas se insertaron en el árbol filogenético NJ\_30, generado previamente en el laboratorio. Posteriormente, las secuencias insertadas en el árbol se agruparon en Unidades Filogenéticas Operacionales (OPUs), donde cada OPU corresponde a la agrupación filogenética más pequeña que incluye secuencias representativas y al menos una secuencia de referencia (Yarza y cols., 2014). Mediante esta técnica, se realizan identificaciones taxonómicas más confiables y menos sobreestimadas, ya que se realiza una revisión manual de la identidad de las secuencias en relación a la secuencia de referencia con un origen monofilético (Yarza y cols., 2014). Cuando

la identidad entre las secuencias representativas con la secuencia de referencia era mayor del 98,7%, se consideró que correspondía a la misma especie, mientras que si el valor de identidad estaba entre 98.7% y 94,5%, se consideró que pertenecían al mismo género pero se clasificaron como especies diferentes.

*Análisis de la composición de la microbiota:* A partir del procesamiento bioinformático realizado, se obtuvo una matriz con los datos de presencia/ausencia y abundancia de cada uno de los OPUs presentes en las diferentes muestras de este estudio, junto con la taxonomía de cada uno de los OPUs identificados. Esta información se utilizó en primer lugar para evaluar la riqueza de especies mediante curvas de rarefacción, gráficos que relacionan el número de unidades operacionales (OTU u OPU) identificadas con respecto al número de secuencias analizadas para cada muestra.

Posteriormente, se comparó la composición de la microbiota de cada uno de los grupos a diferentes niveles taxonómicos. Todos los organismos vivos pueden ser clasificados de acuerdo a 8 niveles taxonómicos principales, los que corresponden a Dominio, Reino, *Phylum*, Clase, Orden, Familia, Género y Especie, siendo Dominio el nivel más general y especie el más específico (Tyler y cols., 2014). En este trabajo se estudió la composición de la microbiota a nivel de *Phylum*, Familia y Género.

Finalmente, mediante la realización de un análisis de redundancia (RDA), se analizaron las comunidades microbianas de cada uno de los grupos. Esta herramienta bioinformática nos permite visualizar gráficamente la organización de las muestras en estudio de acuerdo a la similitud que presentan en la composición de la microbiota en función de la composición de OPUs y del grupo al que pertenecen, y para determinar si estos grupos son significativamente diferentes se realiza un test estadístico como ANOVA (Zuur y cols., 2007). Estas determinaciones se llevaron a cabo con el paquete *vegan* del programa estadístico R-Studio (versión 1.0.136).

*Identificación de especies indicadoras:* [En este trabajo se utilizó la definición de especie indicadora publicada por](#) (De Cáceres y Legendre, 2009; De Cáceres y cols., 2010). [En estos artículos se define como una](#) especie indicadora [a](#) aquella especie que se encuentra limitada a un hábitat [en particular](#) y debido a su nicho de preferencia, pueden ser usadas como [un indicador](#)

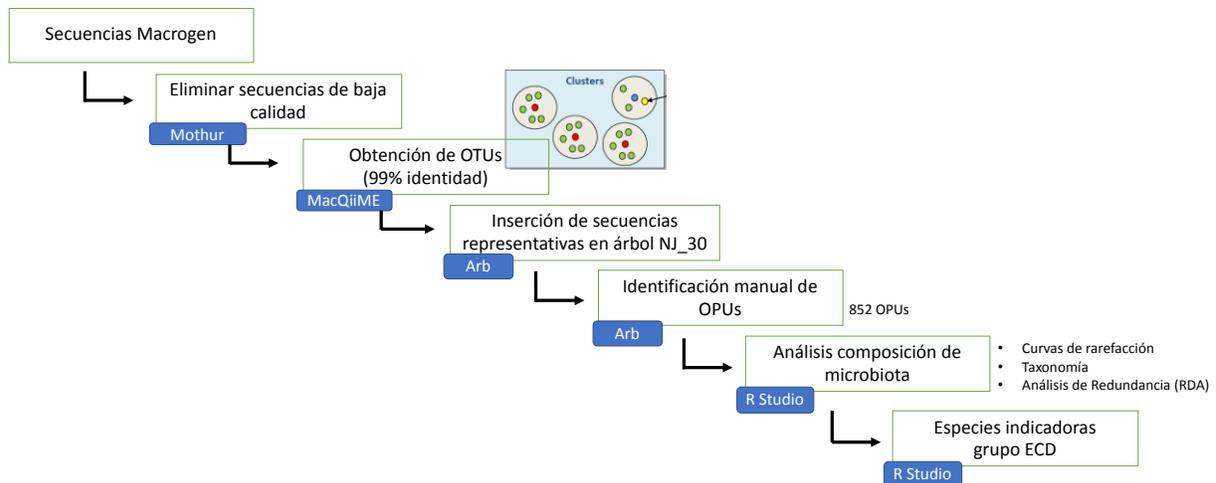
ecológico de comunidades bacterianas, condiciones de hábitat o cambios ambientales. La determinación de especies indicadoras se realiza estadísticamente de acuerdo a su presencia y abundancia tanto en las muestras como en los grupos estudiados (De Cáceres y Legendre, 2009; De Cáceres y cols., 2010). En relación a este trabajo, una especie indicadora del grupo ECD corresponde a aquella bacteria que, mediante una aproximación estadística, se encuentra asociada significativamente al grupo ECD, respecto a los grupos Control y Virus. Por esta razón, las especies indicadoras se encontrarán con mayor frecuencia asociadas al grupo ECD y pueden estar ausentes o en una proporción significativamente menor en los otros 2 grupos de estudio, de manera que su identificación en muestras de deposición podría eventualmente ser indicativa de [la disbiosis intestinal producto de una infección por cepas de ECD](#).

Para la identificación de especies indicadoras se utilizó el paquete *indicespecies* del programa estadístico RStudio, siguiendo un protocolo publicado previamente (De Cáceres y Legendre, 2009). Este análisis se llevó a cabo con la matriz con los datos de presencia/ausencia y abundancia de cada uno de los OPUs y permitió la identificación de aquellos grupos bacterianos que se encuentran mayormente asociados a las muestras del grupo ECD.

La selección de las especies indicadoras a utilizar en los siguientes objetivos se basó en 2 parámetros: En primer lugar, se seleccionaron aquellos OPUs en los que se logró la identificación hasta nivel de especie, de manera que la bacteria seleccionada pueda ser adquirida comercialmente y cultivada en el laboratorio. Luego, se evaluaron 2 parámetros estadísticos, el valor *IndVal*, que nos indican el nivel de asociación de las especies indicadoras a un grupo determinado y el valor *p*, que nos indica que corresponde a una asignación estadísticamente significativa ( $p < 0,05$ ) en relación a los otros 2 grupos de estudio (Control y Virus). De esta manera, se seleccionaron aquellas bacterias cultivables que presentan el mayor valor *IndVal* y menor valor *p*.

**Tabla 1. Partidores utilizados para la amplificación del gen que codifica para la subunidad ribosomal 16S (16S rRNA)**

<b>Paso 1: Amplificación fragmento ~1400 pb</b>	
<b>Partidor</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
<b>GM3</b>	AGAGTTTGATCMTGGC (Nossa y cols., 2010; Weisburg y cols., 1991)
<b>1492R</b>	GGTTACCTTGTTACGACTT (Weisburg y cols., 1991)
<b>Paso 2: Amplificación fragmento ~900 pb / 454® pirosecuenciación</b>	
<b>Partidor</b>	<b>Secuencia 5' - 3'</b>
<b>GM3-PS</b>	Adaptador B-TCAG-AGAGTTTGATCMTGGC
<b>907-PS R1</b>	Adaptador A-TCAG-ACGAGTGCGT CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R2</b>	Adaptador A-TCAG-ACGCTCGACA CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R3</b>	Adaptador A-TCAG-AGACGCACTC CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R4</b>	Adaptador A-TCAG-AGCACTGTAG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R5</b>	Adaptador A-TCAG-ATCAGACACG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R6</b>	Adaptador A-TCAG-ATATCGCGAG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R7</b>	Adaptador A-TCAG-CGTGTCTCTA CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R8</b>	Adaptador A-TCAG-CTCGCGTGTG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R9</b>	Adaptador A-TCAG-TAGTATCAGC CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R10</b>	Adaptador A-TCAG-TCTCTATGCG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R11</b>	Adaptador A-TCAG-TGATACGTCT CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R12</b>	Adaptador A-TCAG-TACTGAGCTA CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R13</b>	Adaptador A-TCAG-CATAGTAGTG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R14</b>	Adaptador A-TCAG-CGAGAGATAC CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R15</b>	Adaptador A-TCAG-ATACGACGTA CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R16</b>	Adaptador A-TCAG-TCACGTACTA CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R17</b>	Adaptador A-TCAG-CGTCTAGTAC CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R18</b>	Adaptador A-TCAG-TCTACGTAGC CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R19</b>	Adaptador A-TCAG-TGTACTACTC CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R20</b>	Adaptador A-TCAG-ACGACTACAG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R21</b>	Adaptador A-TCAG-CGTAGACTAG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R22</b>	Adaptador A-TCAG-TACGAGTATG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
<b>907-PS R23</b>	Adaptador A-TCAG-TACTCTCGTG CCGTCAATTCMTTGGAGTTT
Adaptador B: CCTATCCCCTGTGTGCCTTGGCAGTC	
Adaptador A: CCATCTCATCCCTGCGTGTCTCCGAC	
TCAG: Código pirosecuenciación	
Secuencia identificación muestra	
AGAGTTTGATCMTGGC / CCGTCAATTCMTTGGAGTTT: Partidores 16S rRNA	
(Nossa y cols., 2010; Weisburg y cols., 1991)	



**Figura 4. Esquema de análisis bioinformático realizado en este estudio.** Etapas realizadas para determinar la composición de la microbiota en los grupos de estudio de este trabajo a partir de las secuencias obtenidas de la empresa Macrogen. Estas incluyen: el trimado de secuencias, eliminando aquellas de baja calidad, y la agrupación de las secuencias con 99% de identidad en Unidades Taxonómicas Operacionales (OTUs). Las secuencias representativas de cada OTU se insertaron en el árbol filogenético NJ\_30 y se realizó la identificación manual de OPU's. Esta información, se utilizó para analizar la composición de la microbiota e identificar especies indicadoras asociadas al grupo ECD.

## **Objetivo Específico 2. Evaluar el efecto de bacterias indicadoras de la microbiota intestinal asociadas a niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas en la expresión de factores de virulencia de cepas de EAEC y STEC**

En este objetivo se estudió la participación de las bacterias indicadoras del grupo ECD seleccionadas en el objetivo anterior y del sobrenadante producido luego de ~18 h de crecimiento de estas bacterias indicadoras, en la virulencia de 2 cepas de referencia de ECD, EAEC 042 y STEC 86-24. Para ello, se evaluaron los efectos de la interacción ECD-bacteria y ECD-sobrenadante sobre el crecimiento, adherencia e inducción de secreción de IL-8 sobre células intestinales en cultivo de las cepas ECD. Finalmente, se evaluaron los cambios en la expresión génica de las cepas de EAEC y STEC luego de la interacción ECD-sobrenadante, mediante la secuenciación de ARN (RNA-seq). Este análisis se centró en los cambios de expresión de los principales factores de virulencia de ambas cepas ECD, como el regulador de virulencia Ler, la fimbria Lpf y la toxina shiga en STEC, y para EAEC el regulador de virulencia AggR, la fimbria AAF y la toxina Pet.

### **Cultivo celular**

Se utilizó la línea celular intestinal T84 (American Type Culture Collection (ATCC®) CCL-24), procedente de cáncer de colon humano. Este modelo celular ha sido descrito como modelo de estudio de la patogénesis por ECD (Nataro y cols., 1996). Las células se mantuvieron en medio de cultivo DMEM/F-12 (HyClone), suplementado con 10 % de Suero Fetal Bovino (SFB, Sigma), 2 mM L-Glutamina (Gibco) y 1% Penicilina/Estreptomicina (Sigma), a 37 °C en 5 % CO<sub>2</sub>.

### **Cepas bacterianas**

Se utilizaron las cepas de referencia de ECD, STEC 86-24 y EAEC 042; y la cepa de STEC 86-24 mutante en la fimbria Lpf (STEC AGT210 (Torres y cols., 2004)), las cuales pertenecen al cepario del Laboratorio de Biología Molecular del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. Las cepas se cultivaron en medio Luria-Bertani (LB), a 37 °C y en agitación (180 rpm). Por otra parte, se utilizaron las bacterias *E. albertii* (DSM-17582) y *C. werkmanii* (DSM-17579), adquiridas en la empresa DSMZ y cultivadas de acuerdo con el protocolo indicado por el fabricante. Para recuperar el sobrenadante del cultivo, las bacterias de la microbiota, *E. albertii* y *C. werkmanii*, se crecieron durante toda la noche en medio mínimo M9 suplementado

con 0,4 % de glucosa y 1 mM de sulfato de magnesio. Al día siguiente, los cultivos se centrifugaron a 5.000 rpm x 10 min, y el sobrenadante se filtró utilizando un filtro de 0,2 µm. Estos sobrenadantes se utilizaron para evaluar la interacción ECD - sobrenadante. Al mismo tiempo, el pellet de *E. albertii* y *C. werkmanii* se resuspendió en el mismo volumen de medio M9 fresco y esta bacteria se utilizó para evaluar la interacción ECD - Bacteria. Ambas cepas de ECD presentan resistencia al antibiótico estreptomicina, mientras que *E. albertii* y *C. werkmanii* son sensibles a este antibiótico, lo que permitió la diferenciación y estudio de las cepas ECD en la interacción con las bacterias indicadoras de la microbiota.

### **Curvas de crecimiento**

Para evaluar el crecimiento de las cepas de ECD en presencia del sobrenadante de *E. albertii* se realizó un cultivo de STEC y EAEC en medio LB durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó una dilución 1:50 de estos cultivos en medio DMEM-HG en presencia de diferentes concentraciones de sobrenadante de *E. albertii* (0,25X, 0,5X y 1X). Estos cultivos se incubaron a 37 °C en agitación por 6 h y se midió la densidad óptica a 600 nm (DO<sub>600nm</sub>) cada 30 min utilizando el equipo Synergy-HT. De manera similar, para evaluar el crecimiento de las cepas ECD en presencia de la bacteria *E. albertii*, se realizó una dilución 1:50 del cultivo de toda la noche en medio DMEM-HG en presencia de *E. albertii* en distintas proporciones respecto a la cepa ECD (1:10; 1:1 y 10:1). Estos cultivos se incubaron a 37°C en agitación (180 rpm) por 6 h y se recolectó muestra cada 1 h, para la realización de diluciones seriadas que se sembraron en placas de agar LB suplementadas con estreptomicina 100 µg/ml, donde se observa sólo el crecimiento de las cepas de ECD. Luego de incubarlas toda la noche a 37 °C, se realizó el conteo de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) para cada condición. En cada experimento, se verificó que *E. albertii* no presenta crecimiento en el medio LB suplementado con estreptomicina.

### **Ensayos de infección**

Para evaluar la adherencia de las cepas ECD e inducción de secreción de IL-8 sobre células en cultivo, se utilizaron células T84 crecidas en placas de 24 pocillos con un 100% de confluencia (aproximadamente  $6 \times 10^5$  células por pocillo). Estas células se lavaron tres veces con PBS (Sigma) y luego se agregaron 500 µl/pocillo de medio DMEM/F-12 sin suplementos y se incubó por 30 min a 37 °C. Luego se infectó con la cepa de STEC o EAEC utilizando una

multiplicidad de infección (MOI) igual a 10 bacterias/célula y se incubó la placa a 37 °C por 3 h. Para evaluar el comportamiento de la cepa ECD en presencia del sobrenadante de *E. albertii* al mismo tiempo de la infección, se agregó sobrenadante de *E. albertii* en concentración 1X o medio M9 como control, mientras que para evaluar la interacción ECD-bacteria indicadora, se co-infectó la cepa de ECD con la cepa *E. albertii* en una proporción 1:1. Posterior a la infección, se evaluó la adherencia de las cepas ECD y la inducción de la secreción de IL-8. Para los ensayos de adherencia, las células infectadas se lavaron tres veces con PBS 1X y se agregaron 500 µl/pocillo de Tritón X-100 al 0,5 % v/v. Después de homogenizar cada pocillo se realizaron diluciones seriadas que se sembraron en triplicado en placas con agar LB suplementado con estreptomicina 100 µg/ml. Las placas se incubaron toda la noche a 37 °C, para luego determinar el número de UFC asociadas a cada pocillo. En los experimentos de co-infección se verificó que *E. albertii* no presenta crecimiento en medio LB suplementado con estreptomicina. Para evaluar los niveles de secreción de IL-8 inducido por las cepas de ECD sobre las células epiteliales, una vez terminada la infección, las células se lavaron 3 veces con PBS 1X y se agregaron 500 µl/pocillo de medio DMEM-F12 suplementado con 50 µg/ml de gentamicina (Gibco). Se recuperó el sobrenadante luego de 3 h post-infección, contadas desde el momento que se agregó el medio suplementado con gentamicina. Se cuantificó el nivel de IL-8 presente en estos sobrenadantes mediante un ensayo de ELISA, siguiendo un protocolo reportado previamente (Harrington y cols., 2005). [En cada ensayo se incluyó una curva estándar de IL-8, que consiste en diluciones seriadas 1:2 de una solución estándar de IL-8 recombinante \(Sigma\). Esta curva presenta un rango lineal para la cuantificación de IL-8 entre los 30 y 2.000 pg/ml.](#)

### **Análisis de expresión génica mediante secuenciación de ARN mensajero**

Para evaluar los cambios en la expresión génica de las cepas ECD en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, se realizó un cultivo de STEC o EAEC en medio LB durante toda la noche. Al día siguiente, se realizó una dilución 1:50 de estos cultivos en medio DMEM-HG y se crecieron por aproximadamente 3 h a 37 °C en agitación (180 r.p.m.), hasta alcanzar una  $DO_{600nm} = 0.3$ . Luego, se centrifugaron los cultivos a 5.000 rpm por 10 min y se eliminó el sobrenadante. El pellet se resuspendió en el sobrenadante de *E. albertii* o en medio M9 como control y se incubó por 3 h a 37 °C en agitación (180 rpm). Se centrifugaron los cultivos a 5000 rpm por 10 min y el pellet se resuspendió en Trizol (Invitrogen) y se guardó a -80 °C.

Posteriormente, se realizó la extracción de ARN utilizando un protocolo descrito previamente (Yanez y cols., 2016) y las muestras se trataron con Dnasa I (Qiagen) para eliminar el contenido de ADN. Se confirmó la ausencia de ADN en las muestras mediante PCR y se evaluó la integridad del ARN en un gel de agarosa al 2% p/v. Las muestras se enviaron a la empresa MacroGen Inc, en Corea, para la secuenciación del ARN utilizando la plataforma Illumina y para el posterior análisis de las secuencias obtenidas. Este análisis incluye el perfil de expresión, para lo cual se utilizó el paquete HTseq Python y se compararon los valores obtenidos en las muestras incubadas con el sobrenadante de *E. albertii* con respecto al crecimiento de la bacteria en presencia de medio M9 (control). Se consideró un cambio significativo en la expresión en aquellos genes que presentaron un valor absoluto de veces de cambio mayor o igual a 2.

Para confirmar los resultados obtenidos por RNA-seq, se llevaron a cabo ensayos de PCR en tiempo real para los principales factores de virulencia de EAEC y STEC. Para esto, a las mismas muestras de ARN se les realizó la retrotranscripción de ARN mensajero (mRNA) a ADN complementario (cDNA) con el kit Transcriptor First Strand cDNA Synthesis kit, siguiendo las instrucciones del fabricante y luego se realizó la amplificación de los genes *ler*, *lpfA* y *stx2* para STEC y *aggR*, *aafA* y *pet* para EAEC utilizando los partidores señalados en la Tabla 2. Los niveles de expresión de los genes en estudio se normalizaron respecto a la expresión de los genes que codifican para la subunidad ribosomal 16S y para la RNA Polimerasa (*rpoA*), utilizando el promedio del Cq obtenido para ambos genes de referencia. Finalmente, para obtener los niveles de expresión relativa, se comparó el Cq de las muestras incubadas con el sobrenadante de *E. albertii* con respecto al observado en la condición control.

### **Análisis Estadístico**

Los resultados obtenidos se graficaron como el promedio más desviación estándar para un experimento representativo realizado en triplicado. Para evaluar la significancia estadística, se realizó análisis de varianza (ANOVA), seguido por un test de múltiples comparaciones de Bonferroni en el programa Graphpad Prism version 6.0. Se consideró una diferencia estadísticamente significativa cuando  $p < 0.05$ .

**Tabla 2. Partidores utilizados para la confirmación de resultados obtenidos mediante RNA-seq**

	<b>Gen</b>	<b>Secuencia</b>
<b>STEC</b>	<i>ler</i>	F: 5` - CGA CCA GGT CTG CCC TTC T -3` R: 5` - GCG CGG AAC TCA TCG AAA -3` (Walters y Sperandio, 2006)
	<i>lpfA</i>	F: 5` - GGC ACG GTT AAA TTT ACA GGC -3` R: 5` - TGA CCC AAC ACA ACT TCC TG -3`
	<i>stx2</i>	F: 5` -GCT GGA ATC TGC AAC CGT TAC T -3` R: 5` -CAC GAA TCA GGT TAT GCC TCA GT -3`
<b>EAEC</b>	<i>aggR</i>	F: 5` - CAG AAT CGT CAG CAT CAG CTA A -3` R: 5` - AAG GAT GCC CTG ATG ATA ATA TAC G -3`
	<i>aafA</i>	F: 5` -ATT CAC TCT GGC CTC TCC TAG GT -3` R: 5` -ACT TCA TAT AGG CCT GGT CGT A -3` (Hinthong y cols., 2015)
	<i>pet</i>	F: 5` -GTG GTG CCT ATG CCG TAA CC-3` R: 5` -CAG CCC CTC TTG TTT CCA CG-3` (Betancourt-Sanchez y Navarro-Garcia, 2009)
<b>Genes de referencia</b>	<i>rpoA</i>	F: 5` - GCG CTC ATC TTC TTC CGA AT -3` R: 5` - CGC GGT CGT GGT TAT GTG -3` (Walters y Sperandio, 2006)
	<i>16S</i>	F: 5` - AAT AAA TCA TAA ACT CCT ACG GGA GGC AGC AGT -3` R: 5` - AAT AAA TCA TAA CCT AGC TAT TAC CGC GGC TGC T- 3`

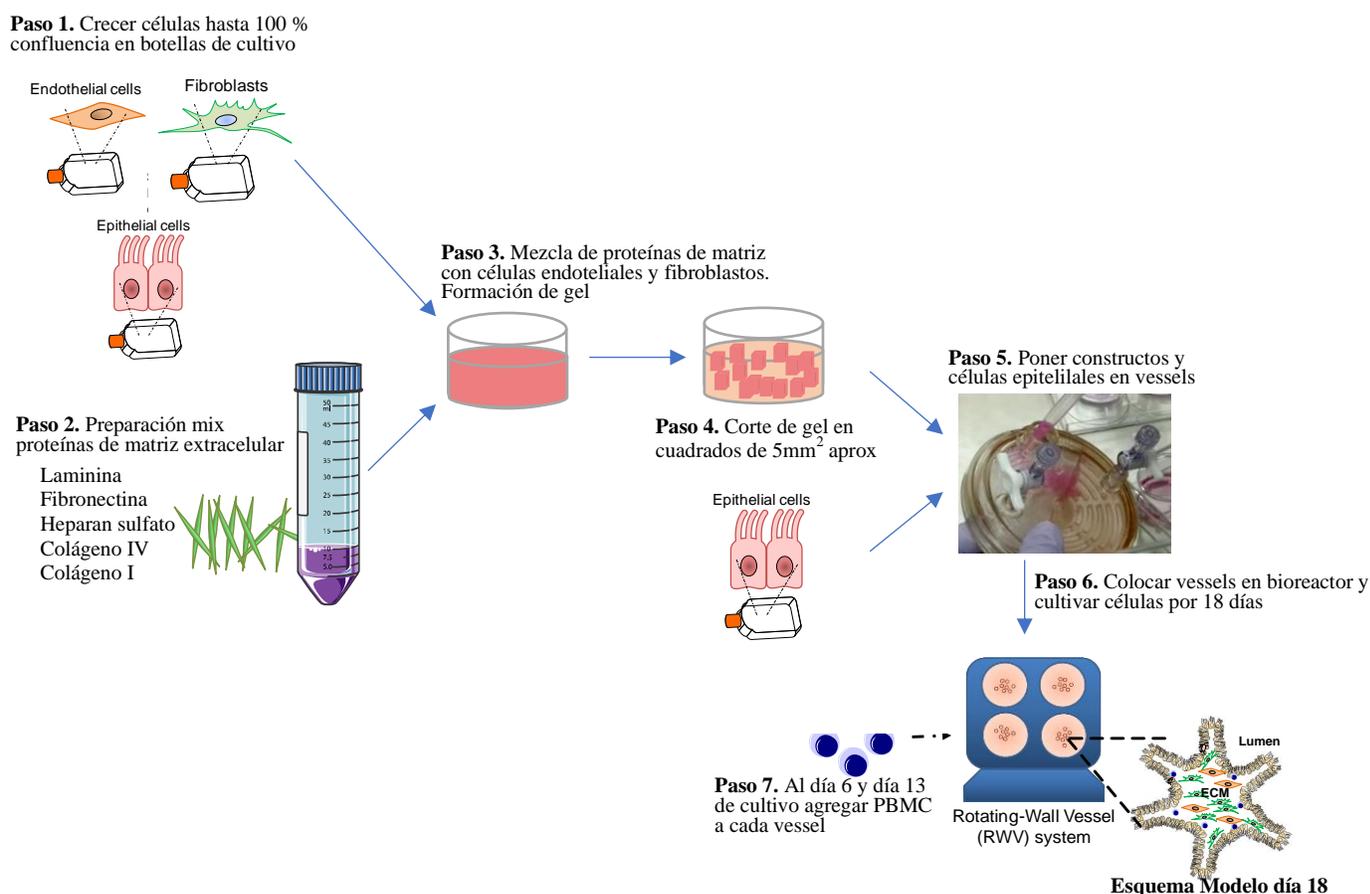
### **Objetivo Específico 3. Establecer el efecto de bacterias indicadoras de la microbiota intestinal asociada a niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas en la respuesta inflamatoria causada por las cepas de EAEC y STEC en modelos celulares intestinales.**

Para evaluar el efecto de las bacterias de la microbiota en la respuesta inflamatoria inducida por EAEC y STEC, se utilizaron 2 nuevos modelos de estudio. El primero de ellos consiste en un modelo 3D organotípico de la mucosa intestinal humana, que imita la diversidad fenotípica del intestino de manera que recrea la arquitectura celular y reproduce la función del microambiente intestinal. Por otra parte, se utilizó un modelo de virulencia *in vivo*, la larva *Galleria mellonella*, que permite relacionar la virulencia de bacterias patógenas con el nivel de supervivencia de las larvas, como consecuencia de la respuesta inmunológica de la larva hacia el patógeno.

#### **Construcción del modelo 3D**

Este modelo incluye los siguientes grupos celulares: Línea celular epitelial intestinal (células HCT-8, ATCC CCL-244); células endoteliales (Células HUVEC, ATCC CRL-1730); fibroblastos (Células CCD-18Co, ATCC CRL-1459) y linfocitos/monocitos aislados desde sangre humana. Las células epiteliales, endoteliales y fibroblastos se cultivaron en medio RPMI, EBM-2 y DMEM HG respectivamente, suplementado con 10 % Suero Fetal Bovino (Sigma), 2 mM L-Glutamina (Gibco), 1% Penicilina /Estreptomicina (Sigma), 10 mM HEPES (Gibco), 1 mM Piruvato de Sodio (Gibco), 100 µM Aminoácidos no esenciales (NEAA) (Gibco) y Gentamicina 50 µg/ml (Gibco). Una vez alcanzado el 100 % de confluencia, estas células se utilizaron para la construcción del modelo 3D. Para aprender y construir este modelo se realizó una pasantía en el laboratorio de la Dra. Rosangela Mezghanni, quien desarrolló este modelo en el año 2011 (Salerno-Goncalves y cols., 2011; Salerno-Goncalves y cols., 2016b), en el *Center for Vaccine Development School of Medicine*, en la ciudad de Baltimore, Maryland, Estados Unidos. Para la construcción de este modelo, se tripsinizaron las células endoteliales y los fibroblastos, y se colocaron en una matriz de colágeno tipo I (Invitrogen), enriquecida con las proteínas de la membrana basal laminina (Sigma), fibronectina (Sigma), colágeno tipo IV (Sigma) y heparán sulfato (Sigma) y se incubaron por 2 h hasta obtener un gel. Esta mezcla que contiene proteínas de matriz, células endoteliales y fibroblastos se cortó en cuadrados de 5 mm<sup>2</sup> aproximadamente (denominados constructos), los cuales se agregaron a unas vasijas rotatorias (Rotating wall vessels, Synthecon) junto con las células epiteliales. Estos constructos se cultivaron por 18 días en condiciones de microgravedad.

condición generada producto de la rotación de las vasijas en un biorreactor a una velocidad aproximada de 14 rotaciones por minuto. En los días 7 y 13 de cultivo, se agregaron linfocitos/monocitos previamente aislados desde voluntarios sanos. Se utilizó el modelo para los experimentos de esta tesis luego de 18 días de cultivo. En la Figura 5 se muestra un esquema de la construcción de este modelo.



**Figura 5. Esquema construcción modelo 3D organotípico de la mucosa intestinal humana.** Pasos realizados para la construcción del modelo 3D incluyen el crecimiento de las células endoteliales, fibroblastos y células epiteliales hasta que alcancen un 100% de confluencia, la preparación de una solución que contiene una mezcla de proteínas de matriz extracelular, enriquecida en colágeno I y la mezcla con las células endoteliales y fibroblastos previamente tripsinizados que se incubaron hasta la formación de un gel. Se realizó un corte del gel en cubos de ~5 mm<sup>2</sup>, denominados constructos. Los constructos y células epiteliales se agregaron a vasijas rotatorias (vessels), las cuales se colocaron en un biorreactor y se cultivaron por 18 días a 37 °C. A los días 7 y 13 de cultivo se agregaron PBMC, previamente aislados de sangre humana.

### **Infección del modelo 3D**

A los 18 días de cultivo, los constructos del modelo 3D se lavaron con medio RPMI y se infectaron con las cepas de ECD utilizando un MOI de 100. De acuerdo a estudios previos realizados con este modelo, se determinó mediante ensayos de citometría de flujo que los constructos presentes en cada vessel contienen en total  $20 \times 10^6$  de células HCT-8 aproximadamente (Salerno-Goncalves y cols., 2016b), de manera que se infectó cada condición con  $20 \times 10^8$  bacterias aproximadamente. Para evaluar la interacción ECD - sobrenadante, se agregó al momento de la infección con la cepa ECD, el sobrenadante de *E. albertii* o medio M9 como control y se incubaron las células por 3h a 37 °C y 5% CO<sub>2</sub>. Luego del tiempo de infección, las células se lavaron 3 veces con medio RPMI y se incubaron con medio RPMI suplementado con gentamicina 1:1000 por 18 h a 37 °C y 5% de CO<sub>2</sub>. Se recolectaron muestras de sobrenadante al término de las 3 h de infección y luego de 3 y 18 h post-infección, referido al tiempo transcurrido después de agregar el medio suplementado con gentamicina. Se cuantificaron los niveles de 38 citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento en las muestras de sobrenadante a los 3 tiempos de estudio, en un equipo Luminex 200, utilizando el kit HCYTOMAG-60K multiplex assay (Merck) siguiendo las instrucciones del fabricante.

### **Infección del modelo *in vivo* larva *Galleria mellonella***

Los ensayos de virulencia se realizaron siguiendo los protocolos previamente descritos para el estudio de la virulencia de STEC y EAEC (De la Cruz y cols., 2016; Jonsson y cols., 2017). Se cultivaron las cepas de STEC, EAEC, *E. albertii*, *E. coli* HB101 en medio LB toda la noche. Al día siguiente se centrifugaron a 5.000 rpm x 10 min y el pellet bacteriano se resuspendió en PBS de manera de tener  $10^4$  UFC en 10 µl. Para verificar el número de colonias presentes en la suspensión, se realizaron diluciones seriadas y se inocularon en placas de LB agar. Grupos de 10 larvas se infectaron con 10 µl de la suspensión bacteriana que contenía  $10^4$  UFC de las siguientes condiciones: (1) *E. coli* HB101, (2) *E. albertii*, (3) STEC & *E. coli* HB101, (4) STEC & *E. albertii*, (5) EAEC & *E. coli* HB101, (6) EAEC & *E. albertii*. La infección se realizó por inyección en la hemolinfa de la larva a través de la última pro-pata derecha. Como control de la infección o vehículo, un grupo de larvas se inyectó con 10 µl de PBS estéril. Las larvas inoculadas se colocaron en placas Petri y se incubaron a 37 °C por 5 días. Para evaluar la virulencia de cada condición, se determinó cada 24 h el porcentaje de supervivencia de las larvas, identificando una

larva como viva si es que ésta responde al tacto (De la Cruz y cols., 2016; Jonsson y cols., 2017; Morgan y cols., 2014).

### **Análisis de metabolómica**

Las muestras de sobrenadante de *E. albertii* se enviaron a la empresa MS-Omics para la identificación y cuantificación de ácidos grasos de cadena corta (SCFA) mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (GC-MS), utilizando un protocolo especializado para SCFA que incluye una columna de alta polaridad. Los datos obtenidos en la GC-MS se procesaron y analizaron en la misma empresa utilizando un software desarrollado por MS-Omics y colaboradores.

## RESULTADOS

### **Objetivo Específico 1. Identificar especies indicadoras de la microbiota intestinal asociada a niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas**

#### **Muestras en estudio y análisis bioinformático**

En este trabajo se utilizaron 93 muestras de deposición: 32 muestras provenientes de niños con diarrea positiva para algún patotipo de ECD (grupo ECD), 31 muestras de niños con diarrea positiva para patógenos virales (grupo Virus) y 30 muestras de niños sanos, negativas para patógenos entéricos (grupo Control). Información relacionada a las muestras utilizadas en este trabajo como los principales datos obtenidos luego del procesamiento bioinformático se encuentran descritos en la Tabla 3. A modo general, de la secuenciación se obtuvo un promedio de 12.500 secuencias por muestra, el cual se redujo a 6.900 secuencias luego del proceso de trimado (55% de las secuencias). Este número de secuencias permitió obtener un promedio de 220 OTUs por muestra, que corresponden a 85 OPUs en promedio para cada una de las muestras de este estudio.

Con la información obtenida del procesamiento bioinformático, se procedió a analizar la riqueza de especies para cada una de las muestras mediante curvas de rarefacción. En este análisis, se observó que al utilizar OPUs como unidad operacional (Figura 6B), las curvas obtenidas para la mayoría de las muestras alcanzan un punto de saturación más temprano que aquellas obtenidas al utilizar la identificación de OTUs (Figura 6A). Estos resultados sugieren que el uso de OTUs como unidad operacional podría estar sobreestimando el número de especies presente en cada una de las muestras, y apoyan el uso de OPUs respecto al uso de OTUs. Por esta razón, los análisis de microbiota realizados en este trabajo se llevaron a cabo mediante la identificación de OPUs.

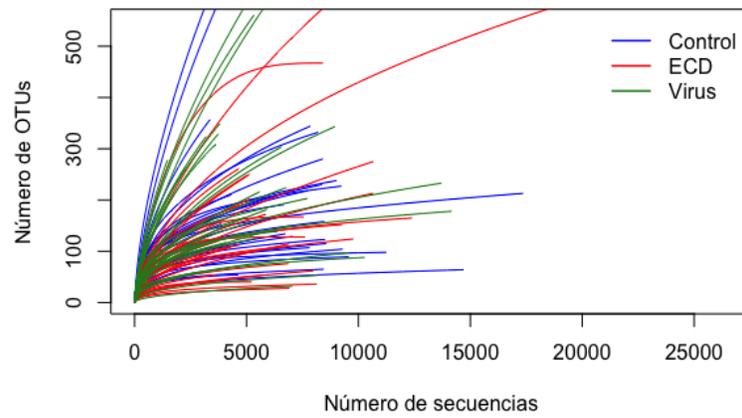
**Tabla 3. Características de las muestras utilizadas en este estudio e información obtenida luego de procesamiento bioinformático.**

<b>Características</b>	<b>Grupo ECD</b>	<b>Grupo Virus</b>	<b>Grupo control</b>
Número de muestras	32	31	30
Edad en meses (Mediana [IC])	19 [15-37,5]	29 [20-39]	42 [18-50]
Patógenos detectados (número de muestras)	EAEC (7) EAEC - EPEC (3) EIEC (1) EPEC (14) ETEC (4) STEC (3)	Adenovirus (2) Adenovirus, Norovirus (1) Astrovirus (2) Astrovirus, Norovirus (1) Norovirus (8) Norovirus, Sapovirus (2) Rotavirus (9) Sapovirus (6)	
Número de secuencias (Promedio ± DE)	12.014 ± 4.978	12.101 ± 7.850	13.255 ± 4.637
Secuencias después trimado (Promedio ± DE)	6.386 ± 3.628	6.435 ± 3.816	7.745 ± 3.116
OTUs (Promedio ± DE)	174 ± 147	266 ± 198	238 ± 159
OPUs (Promedio ± DE)	68 ± 33	87 ± 40	101 ± 46

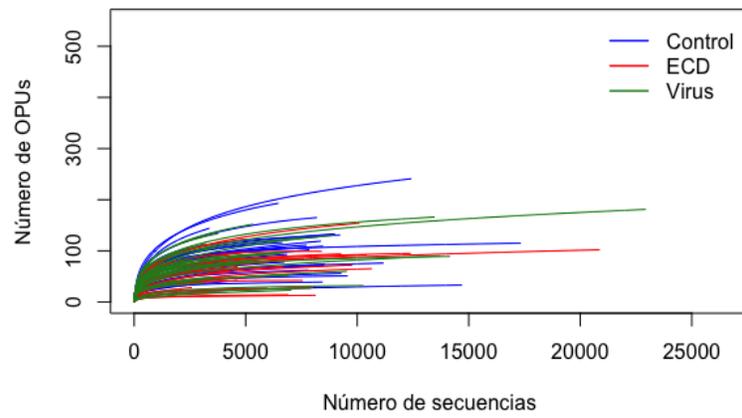
IC: rango intercuartílico

DE: Desviación estándar

**A.**



**B.**

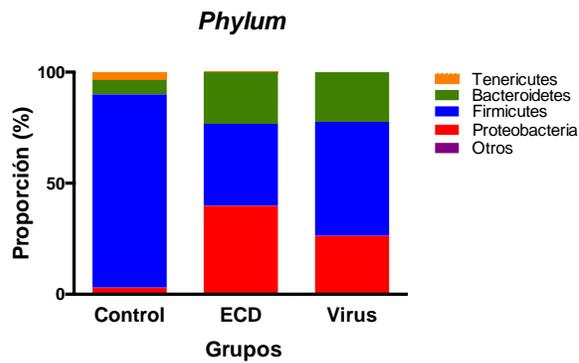


**Figura 6. Curvas de rarefacción para OTUs y OPUs.** Análisis del número de (A) OTUs y (B) OPUs identificados respecto al número de secuencias analizadas. Cada curva presentada en el gráfico representa una muestra independiente, y posee un color determinado dependiendo si pertenece al grupo Control (azul), ECD (rojo) o Virus (verde).

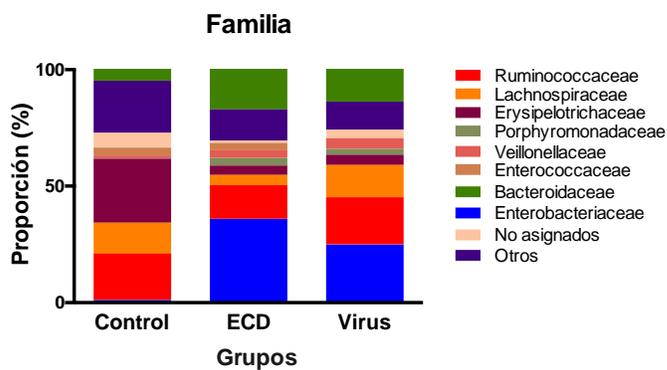
### **Comunidades microbianas identificadas taxonómicamente para cada grupo de estudio**

En este trabajo, se identificaron en total 852 OPUs y se logró la identificación taxonómica hasta nivel de especie en 340 OPUs, junto con 58 OPUs que se identificaron con más de una especie asociada. De los OPUs restantes, 300 se asociaron a un género caracterizado, mientras que sólo en 154 OPUs no se logró la identificación taxonómica hasta el nivel de género. Con la información obtenida a partir de la identificación taxonómica de cada uno de los OPUs junto con los datos de presencia relativa y abundancia de cada OPU en las diferentes muestras, se realizó la comparación de las comunidades microbianas de los tres grupos de estudio a diferentes niveles taxonómicos (Figura 7). A nivel de *phylum* (Figura 7A), se observó una menor proporción de Firmicutes en el grupo ECD, comparado con el grupo Virus (36% vs 51%,  $p < 0,001$ ) y el grupo Control (36% vs 86%,  $p < 0,001$ ). Adicionalmente, se observó que el grupo ECD tiene una mayor proporción de Proteobacterias comparado a los grupos Control (40% vs 3%,  $p < 0,001$ ) y Virus (40% vs 26%,  $p < 0,001$ ); y una mayor proporción de Bacteroidetes en relación con el grupo Control (23% vs 6%,  $p < 0,001$ ). Por otra parte, se observó que las familias predominantes en el grupo ECD son *Enterobacteriaceae* (36%), *Bacteroidaceae* y *Ruminococcaceae*, siendo las Enterobacterias más abundantes en el grupo ECD comparado a los grupos Control (36% vs 1%,  $p < 0,001$ ) y Virus (36% vs 25%,  $p = 0,0067$ ) (Figura 7B). A nivel de género (Figura 7C), se encontró que las muestras del grupo ECD, en comparación al grupo Control, tienen mayor abundancia de *Pseudocitrobacter* (19.3% vs 1%,  $p < 0,001$ ), *Bacteroides* (17% vs 4.7%,  $p = 0,008$ ) y *Escherichia-Shigella* (12% vs 0,1%,  $p = 0,001$ ), mientras que comparado con el grupo Virus, tiene mayor abundancia de *Escherichia-Shigella* (12% vs 0,6%,  $p = 0,0016$ ).

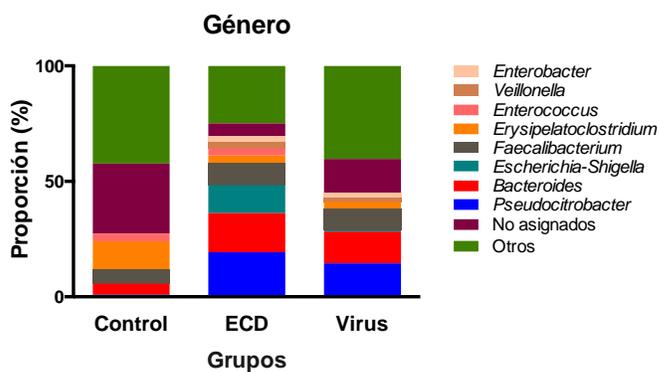
A.



B.



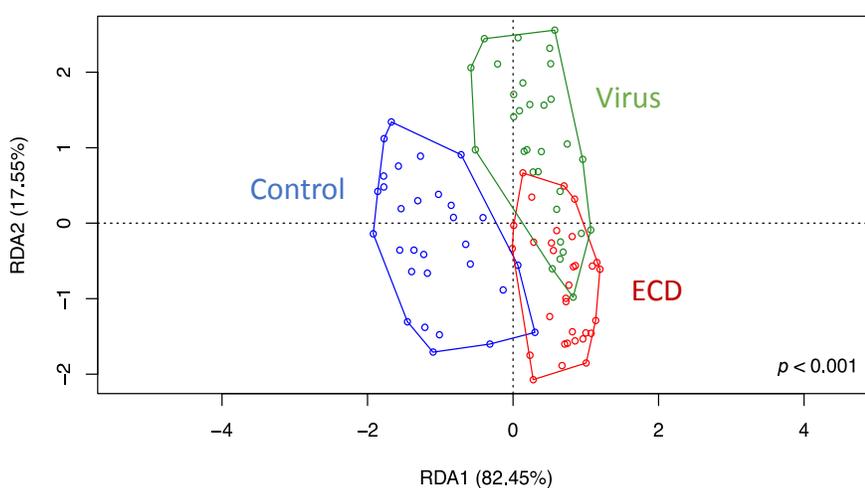
C.



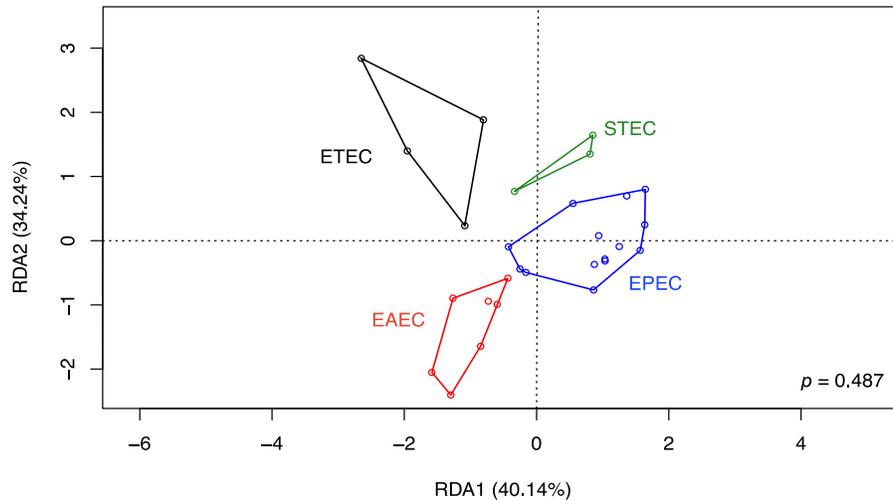
**Figura 7. Comunidad microbiana en diferentes niveles taxonómicos.** Representación de la abundancia relativa de diferentes unidades taxonómicas, para los 3 grupos de este estudio, a nivel de (A) *Phylum*, (B) Familia y (C) Género. Para cada gráfico se representaron las 8 unidades taxonómicas más abundantes, mientras que aquellas menos abundantes se agruparon como Otros. Las secuencias en las que no se logró la identificación taxonómica a nivel de familia o género respectivamente, se clasificaron en el grupo No asignados.

## Evaluación de las comunidades microbianas a través de análisis de redundancia

Para evaluar cómo se distribuyen en un plano las muestras de este estudio en función de la composición de la microbiota y del grupo al que pertenecen, se realizó un análisis de redundancia (RDA). A partir de este análisis, se observó que las 93 muestras de este trabajo se organizan de acuerdo al grupo de estudio del cual provienen (Control, Virus o ECD), y se encontró que existe una diferencia significativa entre estas comunidades (ANOVA  $p < 0,001$ ) (Figura 8). De manera adicional, se realizó un análisis de RDA utilizando sólo las muestras del grupo ECD, encontrando que éstas se agrupan de acuerdo al patotipo de ECD presente, sin embargo, no se encontraron diferencias significativas entre estas comunidades (ANOVA  $p = 0,436$ ) (Figura 9).



**Figura 8. Análisis de Redundancia (RDA).** Análisis de correlación entre las diferentes muestras de este estudio que permiten observar la distribución de las comunidades microbianas y su organización de acuerdo al grupo al que pertenecen. El análisis estadístico de la agrupación de las muestras se determinó mediante ANOVA utilizando el programa estadístico R Studio.



**Figura 9. Análisis de Redundancia (RDA) muestras grupo ECD.** Análisis de correlación entre las muestras pertenecientes al grupo ECD que permiten observar la distribución de las comunidades microbianas y su organización de acuerdo patotipo presente en la muestra. El análisis estadístico de la agrupación de las muestras se determinó mediante ANOVA utilizando el programa estadístico R Studio.

### Identificación de especies indicadoras

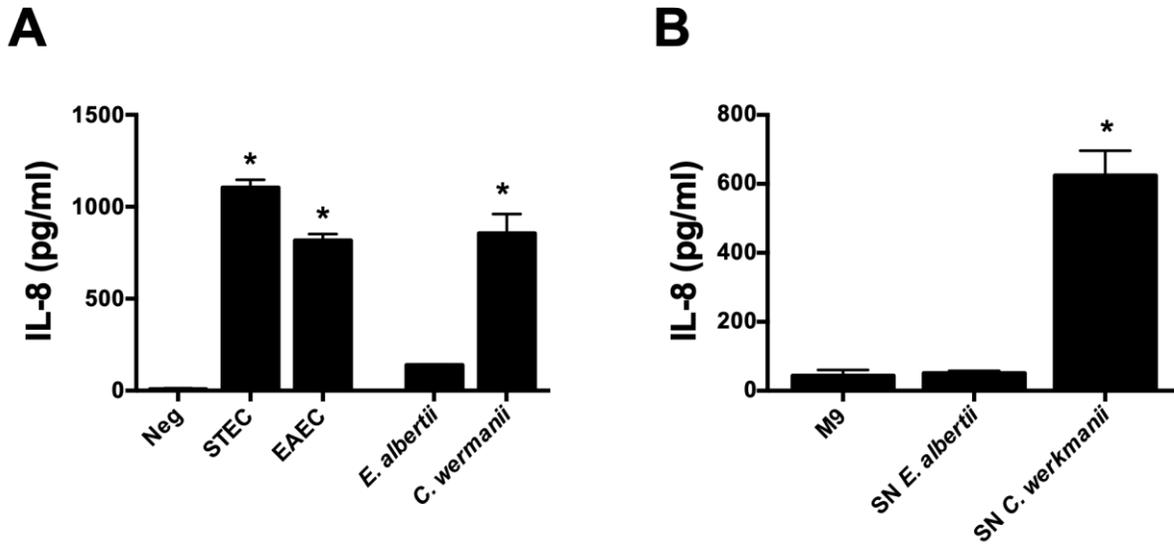
Con el objetivo de identificar las especies bacterianas principalmente asociadas al grupo ECD se realizó un análisis estadístico de especies indicadoras siguiendo un protocolo publicado previamente (De Caceres y Legendre, 2009). Con este procedimiento se identificaron 8 OPUs indicadores del grupo ECD, los cuales han sido asociados a las siguientes bacterias más cercanas: bacteria no cultivable del género *Escherichia*, bacteria no cultivable del género *Escherichia-Shigella*, *Escherichia albertii* (*E. albertii*), *Citrobacter werkmanii* (*C. werkmanii*), bacteria no cultivable del género *Klebsiella*, *Enterobacter* sp., *Haemophilus sputorum* y *Yersinia enterocolitica*. Todas las bacterias indicadoras pertenecen al *phylum* Proteobacteria y 7 de ellas comparten taxonomía hasta el nivel de familia (Proteobacteria, Gammaproteobacteria, Enterobacteriales, Enterobacteriaceae). En la Figura 10, se presenta un *heatmap* de las especies indicadoras, observando que estas bacterias están presentes mayormente en las muestras del grupo ECD. De estas especies indicadoras, se decidió continuar trabajando en los siguientes objetivos con 2 de ellas, *E. albertii* y *C. werkmanii*. La selección de estas bacterias se debe a que son las 2 especies cultivables con mayor valor estadístico *IndVal* y menor valor *p* (Figura 10). De esta forma, los siguientes experimentos se enfocaron en evaluar el efecto de *E. albertii* y *C. werkmanii* indicadoras en la virulencia de las cepas de ECD, en cuanto a expresión de factores de virulencia e inducción de una respuesta inflamatoria.



**Objetivo Específico 2. Evaluar el efecto de bacterias indicadoras de la microbiota intestinal asociadas a niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas en la expresión de factores de virulencia de cepas de EAEC y STEC.**

#### **Adherencia e inducción de secreción de IL-8 por bacterias utilizadas en este estudio**

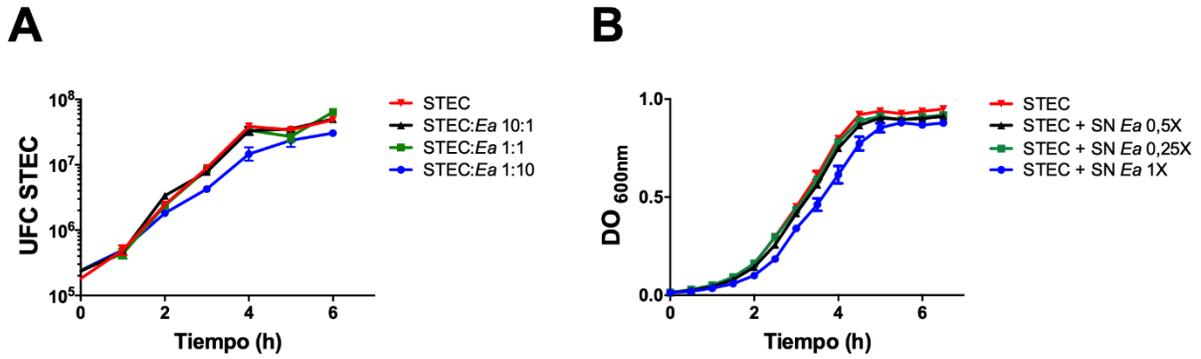
Como primer paso para el estudio del efecto que presentan las bacterias de la microbiota en la virulencia de las cepas ECD, se evaluó la adherencia a células epiteliales intestinales y la inducción de secreción de IL-8 a las 3 h post-infección de las 2 cepas de referencia de ECD, STEC y EAEC, y de las bacterias de la microbiota *E. albertii* y *C. werkmanii* (Figura 11). A partir de este estudio preliminar, se obtuvo que *E. albertii* como *C. werkmanii* tienen la capacidad de adherirse a células intestinales de manera similar a lo observado por las cepas ECD. Además, se observó que tanto la cepa *E. albertii*, como el sobrenadante de esta misma bacteria, no inducen la secreción de IL-8 de parte de las células epiteliales intestinales, mostrando niveles de IL-8 similares a los observados en células sin infectar. En cambio, para *C. werkmanii* se observó que la incubación de células intestinales con la bacteria o con el sobrenadante de *C. werkmanii* inducen la secreción de altos niveles de IL-8, similares a los observados por la cepa de STEC. A partir de estos resultados, se seleccionó la cepa de *E. albertii* para los ensayos posteriores ya que no induce la secreción de IL-8, de manera de observar el efecto producido sobre la virulencia de las cepas ECD e interpretar adecuadamente los resultados.



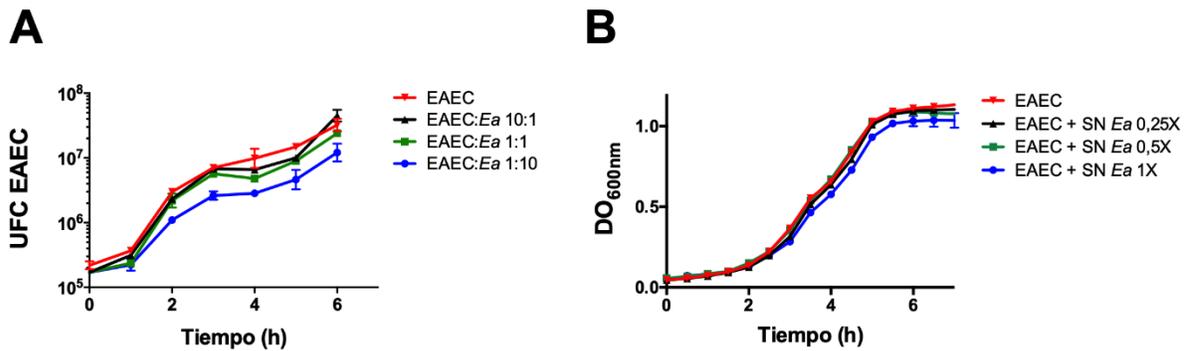
**Figura 11. Adhesión e inducción de secreción de IL-8 por bacterias utilizadas en este estudio.** (A) Se infectaron células T84 con las bacterias STEC, EAEC, *E. albertii* y *C. werkmanii*. Luego de 3 h de infección, se determinó el número de bacterias adheridas mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de LB. (B) Se incubaron células T84 con las bacterias STEC, EAEC, *E. albertii* y *C. werkmanii*, como también con los sobrenadantes del crecimiento de *E. albertii* y *C. werkmanii*. Se utilizó como control células sin infectar (DMEM) y células incubadas con M9, medio utilizado para la preparación de los sobrenadantes. Se evaluó el nivel de IL-8 secretado por células T84 mediante un test de ELISA para IL-8. Los datos graficados corresponden al promedio más desviación estándar para un experimento realizado en triplicado. \*  $p < 0.05$  en comparación a la condición control correspondiente.

### Efecto de *E. albertii* en el crecimiento de STEC y EAEC

Para determinar la participación de *E. albertii* en el crecimiento de las cepas de referencia de STEC y EAEC, se realizaron ensayos de co-cultivo entre la cepa ECD y *E. albertii* en distintas proporciones, como también una co-incubación entre la cepa ECD y diluciones del sobrenadante de *E. albertii*. En estos experimentos, se observó que el co-cultivo de las cepas ECD con *E. albertii* no afecta el crecimiento de STEC y EAEC en las proporciones 10:1 y 1:1, sin embargo, al co-cultivarlas en proporción 1:10 se observó una leve disminución en la tasa de crecimiento de las 2 cepas ECD (Figuras 12A y 13A). Adicionalmente, se observó que la incubación de STEC y EAEC con el sobrenadante *E. albertii* no afecta el crecimiento de las cepas ECD en las distintas condiciones estudiadas (Figuras 12B y 13B).



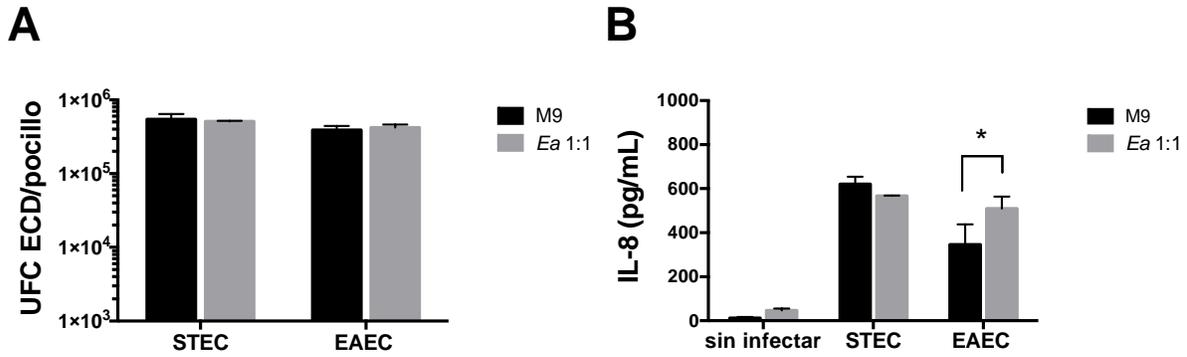
**Figura 12. Curva de crecimiento de STEC en presencia de *E. albertii*.** (A) Crecimiento de STEC en co-cultivo con *E. albertii* (*Ea*) en las proporciones 10:1, 1:1 y 1:10 en relación al inóculo inicial de STEC. Se monitoreó el crecimiento de STEC cada 1 h realizando el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de STEC en placas de LB con estreptomicina 100  $\mu\text{g/ml}$ . (B) Crecimiento de STEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (SN *Ea*) en las diluciones 1X, 0,5X y 0,25X, monitoreado mediante la lectura de densidad óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) cada 30 min. Los datos graficados corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo realizado en duplicado.



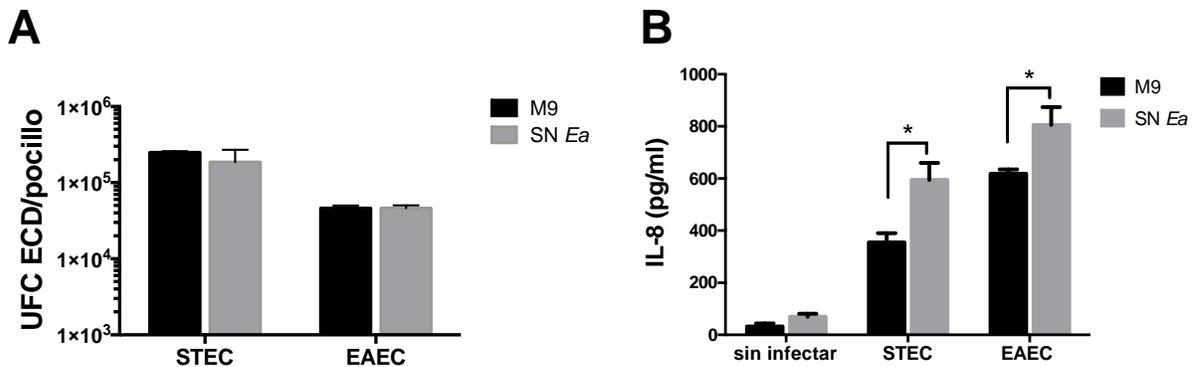
**Figura 13. Curva de crecimiento de EAEC en presencia de *E. albertii*.** (A) Crecimiento de EAEC en co-cultivo con *E. albertii* (*Ea*) en las proporciones 10:1, 1:1 y 1:10 en relación con el inóculo inicial de EAEC. Se monitoreó el crecimiento de EAEC realizando cada 1 h el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) de EAEC en placas de LB con estreptomicina 100  $\mu\text{g/ml}$ . (B) Crecimiento de EAEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (SN *Ea*) en las diluciones 1X, 0,5X y 0,25X, monitoreado mediante la lectura de densidad óptica a 600 nm ( $\text{DO}_{600\text{nm}}$ ) cada 30 min. Los datos graficados corresponden al promedio  $\pm$  desviación estándar de un experimento representativo realizado en duplicado.

### **Efecto de *E. albertii* en la adhesión e inducción de secreción de IL-8 de STEC y EAEC**

Se evaluó la participación de *E. albertii* en la adherencia a células intestinales en cultivo y en la secreción de la citoquina IL-8 inducida por las cepas STEC y EAEC sobre células intestinales, luego de 3 h post-infección. Al estudiar la interacción ECD-bacteria, no se observaron cambios en la adhesión a células intestinales de STEC y EAEC en presencia de *E. albertii* (Figura 14A). Al evaluar la inducción de secreción de IL-8, se observó un aumento significativo en los niveles de IL-8 para EAEC en presencia de *E. albertii*, en comparación con la infección sólo con EAEC, mientras que no se observaron cambios en la infección por STEC (Figura 14B). En los experimentos realizados para evaluar la interacción ECD-sobrenadante, se encontró que el sobrenadante de *E. albertii* no produce cambios en la adhesión de ambas cepas de ECD a células intestinales en cultivo (Figura 15A), sin embargo, se observó en STEC y EAEC un aumento significativo en los niveles de IL-8 secretados en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (Figura 15B). Considerando que el sobrenadante de *E. albertii* no induce la secreción de IL-8 por sí solo, estos resultados sugieren que componentes presentes en este sobrenadante podrían promover que las cepas de ECD induzcan una mayor secreción de IL-8 en células intestinales.



**Figura 14. Adhesión de STEC y EAEC a células en cultivo y secreción de IL-8 por células T84 inducida por ambos patotipos en presencia de *E. albertii*.** Se co-infectaron células T84 con las cepas de referencia de STEC o EAEC y la bacteria *E. albertii* (*Ea*) en proporción 1:1 en relación con la cepa ECD. Luego de 3 h de infección, se determinó el número de bacterias ECD adheridas mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de LB agar suplementado con estreptomicina 100 µg/ml (**A**) y se evaluó el nivel de IL-8 secretado por células T84 luego de 3h post-infección mediante un test de ELISA para IL-8 (**B**). Como control de inflamación, se utilizó células sin infectar (DMEM) y células infectadas con *E. albertii*. Los datos graficados corresponden al promedio más desviación estándar para un experimento representativo realizado en triplicado. \* diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre las condiciones señaladas en el gráfico, analizado por ANOVA y test de múltiples comparaciones.



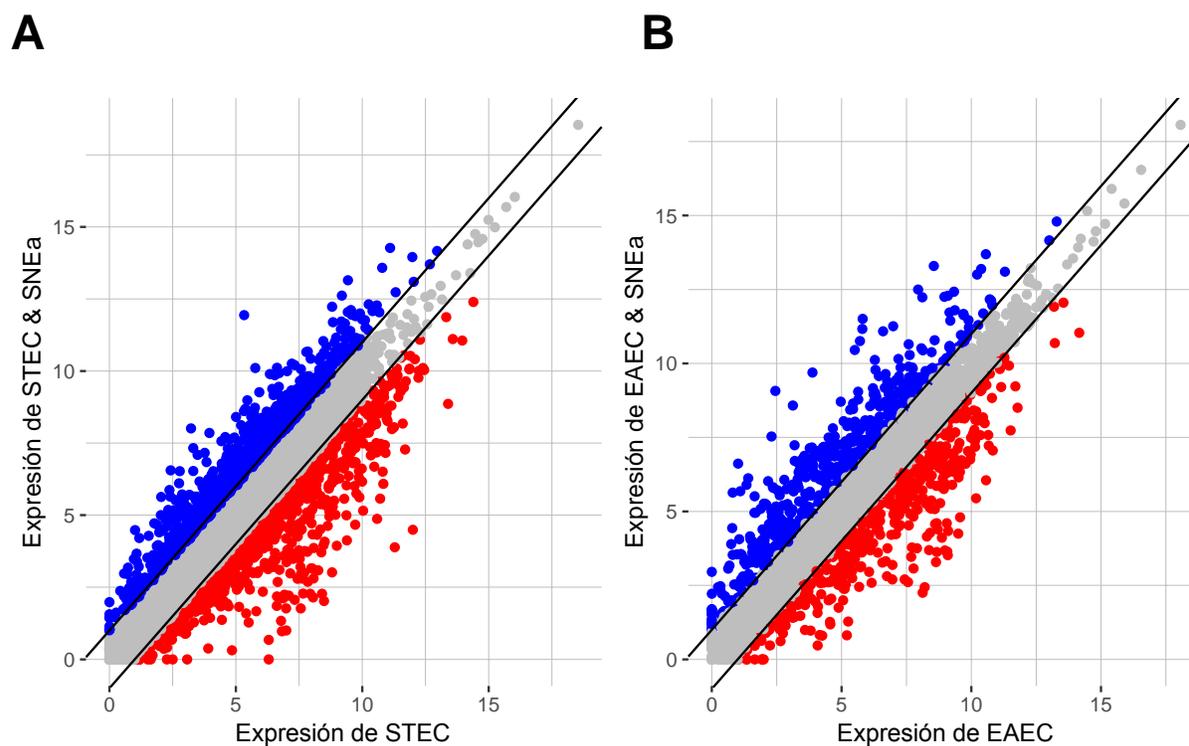
**Figura 15. Adhesión de STEC y EAEC a células en cultivo y secreción de IL-8 por células T84 inducida por ambos patotipos en presencia de sobrenadante de *E. albertii*.** Se infectaron células T84 con las cepas de referencia de STEC o EAEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (SN *Ea*) en concentración 1X. Luego de 3 h de infección, se determinó el número de bacterias ECD adheridas mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de LB agar (**A**) y se evaluó el nivel de IL-8 secretado por células T84 a las 3h post-infección, mediante un test de ELISA para IL-8 (**B**). Se utilizó como control de inflamación, células sin infectar (DMEM) y células infectadas con el sobrenadante de *E. albertii*. Los datos graficados corresponden al promedio más desviación estándar para un experimento representativo realizado en triplicado. \* diferencias significativas ( $p < 0.05$ ), entre las condiciones señaladas en el gráfico, analizado por ANOVA y test de múltiples comparaciones.

## **Efecto del sobrenadante de *E. albertii* en la expresión factores de virulencia**

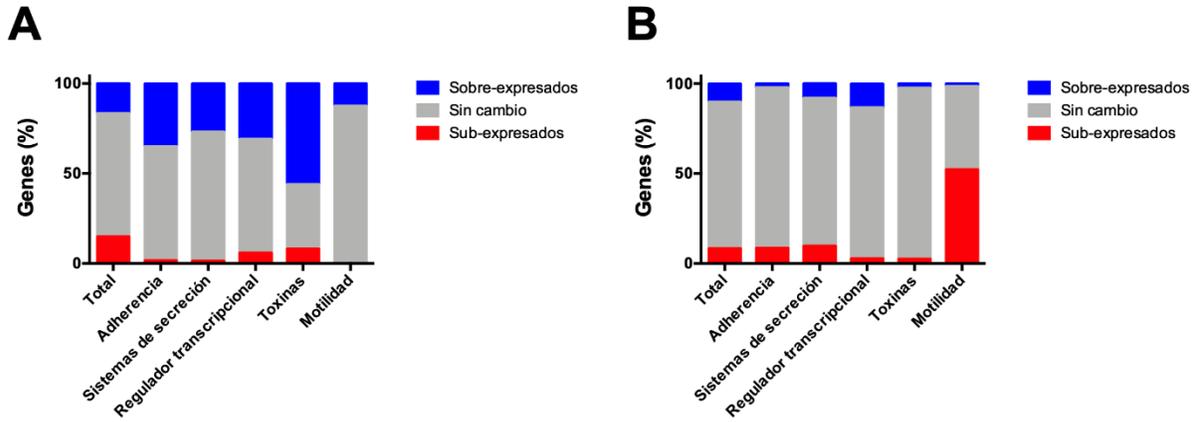
Para evaluar si el sobrenadante de *E. albertii* produce cambios en la expresión de factores de virulencia de las cepas de ECD, se incubaron las cepas de referencia de STEC y EAEC con el sobrenadante de *E. albertii* y se realizó la extracción de ARN de estas muestras, las cuales se analizaron mediante RNA-seq. Los niveles de expresión relativa se compararon con los obtenidos para la situación control que corresponde a la incubación de STEC y EAEC con medio mínimo M9, el mismo utilizado para la preparación del sobrenadante de *E. albertii*. A partir de este análisis, se obtuvo que la incubación de STEC y EAEC con el sobrenadante de *E. albertii* produce un cambio en la expresión en el 30 % y 18 % de los genes, respectivamente (Figura 16). Posteriormente, se evaluaron los cambios en la expresión génica considerando su participación en determinadas categorías de virulencia como adherencia, sistemas de secreción, toxinas y motilidad. A partir de estos resultados se puede destacar que la incubación de EAEC con el sobrenadante de *E. albertii* disminuye la expresión del 50% de las proteínas asociadas a flagelo, mientras que la incubación de STEC con este mismo sobrenadante produce un aumento en la expresión de proteínas de adherencia (34%), sistemas de secreción (26.9%), reguladores transcripcionales (30%) y toxinas (56%) (Figura 17). Adicionalmente, se analizaron los cambios en la expresión de los factores de virulencia característicos de una infección por ECD. Para STEC, se encontró un aumento de 17,6 veces en la expresión del gen que codifica la subunidad mayor de la fimbria Lpf (lpfA) junto con un aumento entre 2,6 y 4,1 veces para otros genes pertenecientes a este mismo operón (*lpfB,D,E*). Además, se observó un aumento de 3,9, 3,3 y 2,4 veces de los genes codificantes del regulador de virulencia de STEC Ler, la metaloproteasa StcE y la enterohemolisina EhxA, respectivamente. Por último, se identificó una disminución en los niveles de RNA que codifican la toxina Shiga (*stx2*) (Figura 18A, Tabla 4). Para EAEC, se encontró que la incubación con el sobrenadante de *E. albertii* disminuyó 8,7 veces los niveles de RNA mensajero de *fliC*, involucrado en la motilidad de la bacteria y aumentó 2 veces el gen que codifica la toxina Pet. Los niveles de expresión de los demás factores de virulencia característicos de esta bacteria, como por ejemplo el regulador AggR, la subunidad mayor de la fimbria AAF (*aafA*), proteínas de la fimbria tipo I (*fimC,F,H,I*), la mucinasa Pic o el transportador de dispersina (*aat*), no presentaron cambios significativos en la expresión (Figura 18B, Tabla 5). Como control de los resultados obtenidos, se analizó la expresión de algunos genes de expresión constitutiva en *E. coli*, encontrando que no hubo cambios en los niveles de

expresión de los genes que codifican para el factor RpoD de la RNA Polimerasa (*rpoD*), las proteínas de unión al ADN ArcA (*arcA*), Tus (*tus*) y la enzima 6-fosfofructokinasa (*pfkA*).

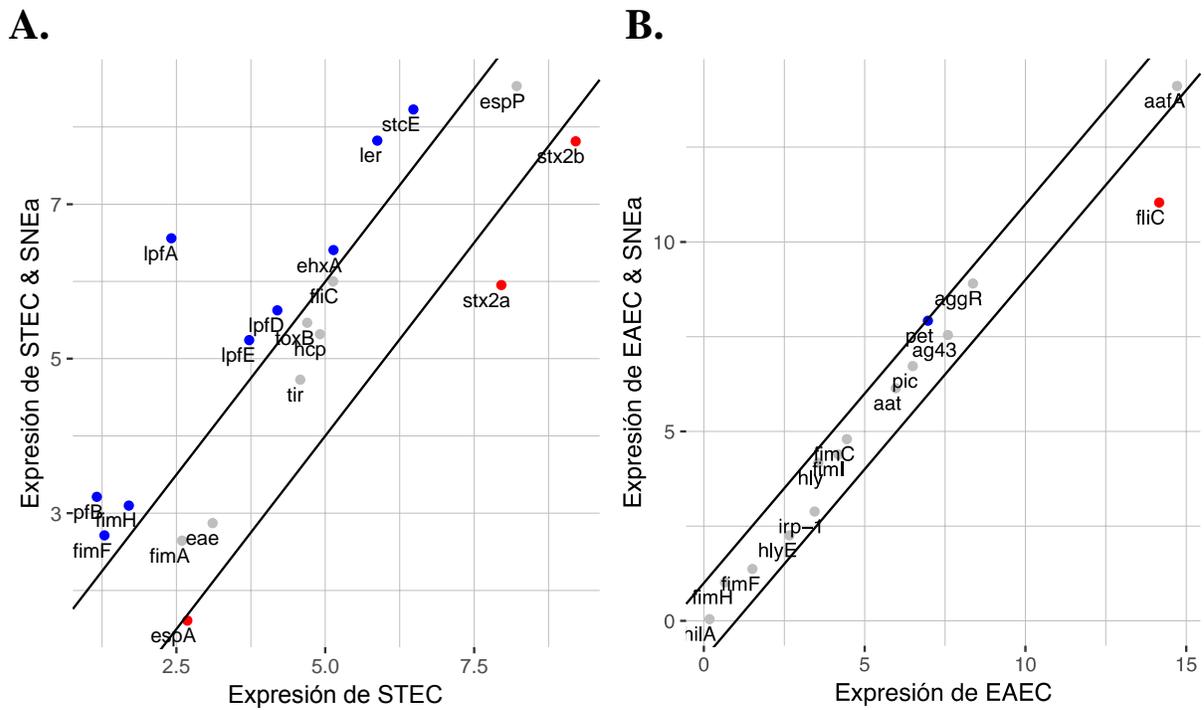
Finalmente, y como manera de confirmar los resultados presentados, se analizó mediante RT-PCR en la misma muestra de RNA, el nivel de expresión del regulador Ler, la subunidad mayor de la fimbria Lpf y la toxina Shiga en STEC, mientras que para EAEC, se analizó el nivel de expresión de los genes que codifican para el regulador AggR, la subunidad mayor de la fimbria AafA y la toxina Pet (Tabla 6). En estos experimentos, se confirmó el aumento en la expresión de los genes que codifican Ler y LpfA en STEC y, se corroboró la mayor expresión del gen que codifica la toxina Pet en EAEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii*.



**Figura 16. Cambios en la expresión génica para cepas ECD crecidas en presencia de sobrenadante de *E. albertii*.** Las cepas de referencia de STEC (A) y EAEC (B) se incubaron con el sobrenadante de *E. albertii* (SNEa) o con medio M9 (Control) y luego se realizó la extracción de ARN y análisis mediante RNA-Seq. El nivel de expresión de cada gen de la cepa ECD se encuentra representado en el gráfico con un patrón coloreado dependiendo si está sobreexpresado (azul), sin cambio (gris), o subexpresado (rojo) en comparación con el control.



**Figura 17. Cambios en la expresión génica para cepas ECD crecidas en presencia de sobrenadante de *E. albertii* agrupados por categoría.** Porcentaje de genes de STEC (A) y EAEC (B) en los que se observaron cambios en los niveles de expresión luego de ser incubadas en presencia del sobrenadante de *E. albertii* con respecto a la incubación con medio M9. Se muestran los cambios observados en el total de genes y clasificados de acuerdo a su participación dentro del proceso patogénico de las cepas ECD.



**Figura 18. Expresión de los principales factores de virulencia para STEC y EAEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii*.** Se incubaron las cepas de ECD con el sobrenadante de *E. albertii* o con medio M9 (control) y se analizó la expresión de los principales factores de adherencia asociados a la infección por STEC (A) y EAEC (B). El nivel de expresión de cada factor de virulencia es representado con un punto en el gráfico, que se encuentra coloreado dependiendo de si esta sobreexpresado (azul), sin cambio (gris), o subexpresado (rojo) respecto a la condición control.

**Tabla 4. Cambios de expresión génica en los principales factores de Virulencia de STEC.** Nivel de expresión, representado como veces de cambio respecto al control, de diferentes genes que codifican para factores de virulencia característicos de STEC, luego de incubar esta bacteria en presencia del sobrenadante de *E. albertii*. Los genes que presentan un valor de veces de cambio igual o mayor a dos veces se muestran en azul mientras que aquellos que presentan una disminución igual o mayor a dos veces se representan en rojo.

Gen	Producto / Factor de Virulencia	Función	Veces de cambio
<i>ler</i>	Ler	Regulador maestro isla LEE	<b>3.9</b>
<i>eae</i>	Intimina	Adhesina	-1.2
<i>tir</i>	Tir	Receptor para Intimina	1.1
<i>lpfA</i>	LpfA - Fimbria Lpf	Subunidad fimbrial	<b>17.7</b>
<i>lpfB</i>	LpfB - Fimbria Lpf	Chaperona	<b>4.1</b>
<i>lpfD</i>	LpfD - Fimbria Lpf	Subunidad fimbrial	<b>2.7</b>
<i>lpfE</i>	LpfE - Fimbria Lpf	Subunidad fimbrial	<b>2.9</b>
<i>fliC</i>	FliC o flagelina - Flagelo	Subunidad flagelar	1.8
<i>toxB</i>	Toxina B	Contribuye a la expresión y secreción proteínas SST3	1.7
<i>stx2a</i>	Stx2 subunidad A - Toxina Shiga 2	Inhibe proceso de traducción	<b>-4.0</b>
<i>stx2b</i>	Stx2 subunidad B - Toxina Shiga 2	Unión a receptor celular	<b>-2.6</b>
<i>fimA</i>	FimA - Fimbria tipo I	Subunidad fimbrial	1.0
<i>fimF</i>	FimF - Fimbria tipo I	Subunidad fimbrial	<b>2.7</b>
<i>fimH</i>	FimH - Fimbria tipo I	Subunidad fimbrial - adhesina	<b>2.6</b>
<i>espA</i>	EspA – Sistema secreción tipo III	Subunidad fimbrial	<b>-2.1</b>
<i>espP</i>	EspP	Serin-proteasa	1.3
<i>hcp</i>	Hcp – Sistema secreción tipo VI	Subunidad estructural	1.3
<i>ehxA</i>	EhxA	Enterohemolisina	<b>2.4</b>
<i>stcE</i>	StcE	Metaloproteasa	<b>3.4</b>

**Tabla 5. Cambios de expresión génica en los principales factores de Virulencia de EAEC.** Nivel de expresión, representado como veces de cambio respecto al control, de diferentes genes que codifican para factores de virulencia característicos de EAEC, luego de incubar esta bacteria en presencia del sobrenadante de *E. albertii*. Los genes que presentan un valor de veces de cambio igual o mayor a dos veces se muestran en azul mientras que aquellos que presentan una disminución igual o mayor a dos veces se representan en rojo.

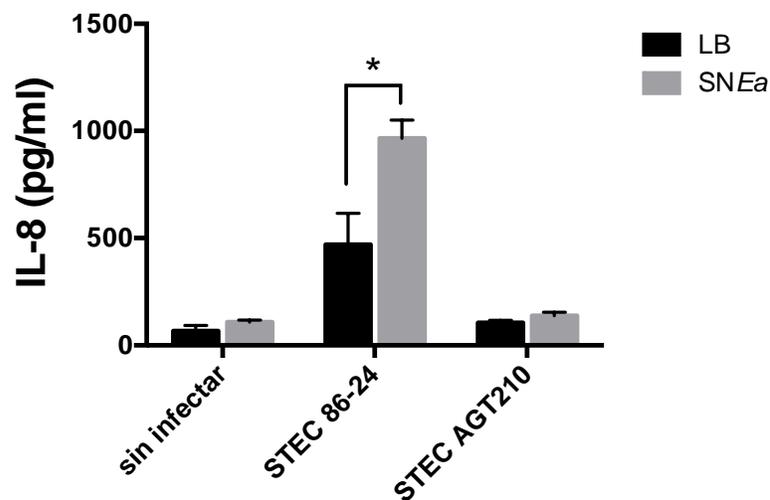
Gen	Producto - Factor de Virulencia	Función	Veces de cambio
<i>aggR</i>	AggR	Regulador transcripcional	1.4
<i>aafA</i>	AafA - Fimbria AAF	Adhesina	-1.5
<i>fliC</i>	FliC - Flagelo	Subunidad flagelar	<b>-8.7</b>
<i>pet</i>	Pet: Plasmid encoded toxin	Toxina serin-proteasa	<b>2.0</b>
<i>pic</i>	Pic: Protein involved in colonization	Mucinasas	1.2
<i>aat</i>	Sistema transportador ABC	Transportador dispersina	1.1
<i>ag43</i>	Antígeno 43	Adhesina	1.1
<i>fimC</i>	FimC - Fimbria tipo I	Chaperona	1.3
<i>fimF</i>	FimF - Fimbria tipo I	Subunidad fimbrial	-1.1
<i>fimH</i>	FimH - Fimbria tipo I	Subunidad fimbrial - Adhesina	1.3
<i>hlyE</i>	HlyE	Hemolisina	-1.3
<i>hilA</i>	HilA	Regulador transcripcional	-1.1
<i>irp-1</i>	IRP-1: Iron regulatory protein	Regulación traducción	-1.5

**Tabla 6. Expresión principales factores de virulencia de STEC y EAEC mediante RT-PCR.**

	Gen	Factor de Virulencia	Veces de cambio RT-PCR	Veces de cambio RNA-Seq
STEC	<i>ler</i>	Regulador transcripcional Ler	6.3	3.8
	<i>lpfA</i>	Subunidad LpfA, fimbria Lpf	38.3	17.7
	<i>stx2</i>	Toxina Shiga	-1.7	-4.0
EAEC	<i>aggR</i>	Regulador transcripcional AggR	1.3	1.4
	<i>aafA</i>	Subunidad AafA, fimbria AAF	-1.2	-1.5
	<i>pet</i>	Toxina serin-proteasa Pet	13.0	2.0

### **Participación de la fimbria Lpf en la secreción de IL-8 inducida por STEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii***

Considerando que la fimbria Lpf participa en la inducción de una respuesta inflamatoria de STEC sobre células intestinales en cultivo (Vergara y cols., 2014), se evaluó la participación de la fimbria Lpf en el aumento de secreción de IL-8 mediado por el sobrenadante de *E. albertii*. Para esto, se realizaron experimentos de infección de células T84, con la cepa de referencia de STEC como control y una cepa doble mutante en las fimbrias Lpf (STEC AGT210), en presencia del sobrenadante de *E. albertii*. En este experimento se obtuvo que, a diferencia de lo observado para la cepa de referencia, la cepa de STEC AGT210 no presenta cambios en la inducción de secreción de IL-8 en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (Figura 19). De esta forma, estos resultados sugieren que Lpf podría estar participando en el aumento de secreción de IL-8 mediado por el sobrenadante de *E. albertii*.

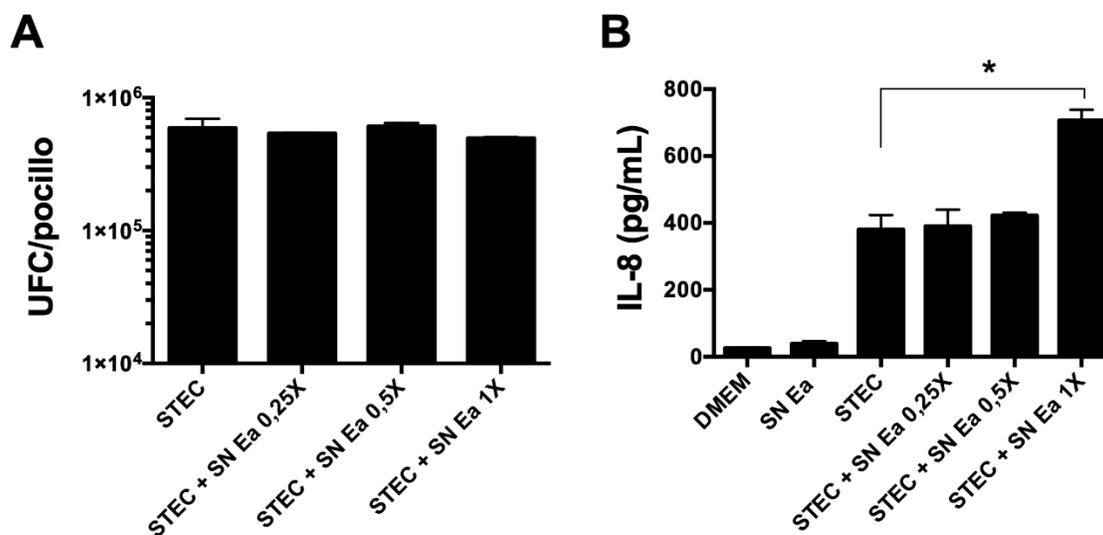


**Figura 19. Nivel de secreción de IL-8 inducido por STEC 86-24 y STEC AGT210 en presencia del sobrenadante de *E. albertii*.** Se infectaron células T84 con la cepa de referencia STEC 86-24 y la cepa STEC AGT210, doble mutante en la fimbria Lpf, en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (SN *Ea*) o medio LB (control) durante 3 h. Se evaluó el nivel de IL-8 secretado por células T84 después de 3h post-infección mediante un test de ELISA para IL-8. Los datos graficados corresponden al promedio más desviación estándar para un experimento representativo realizado en triplicado. \*Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las condiciones señaladas en el gráfico.

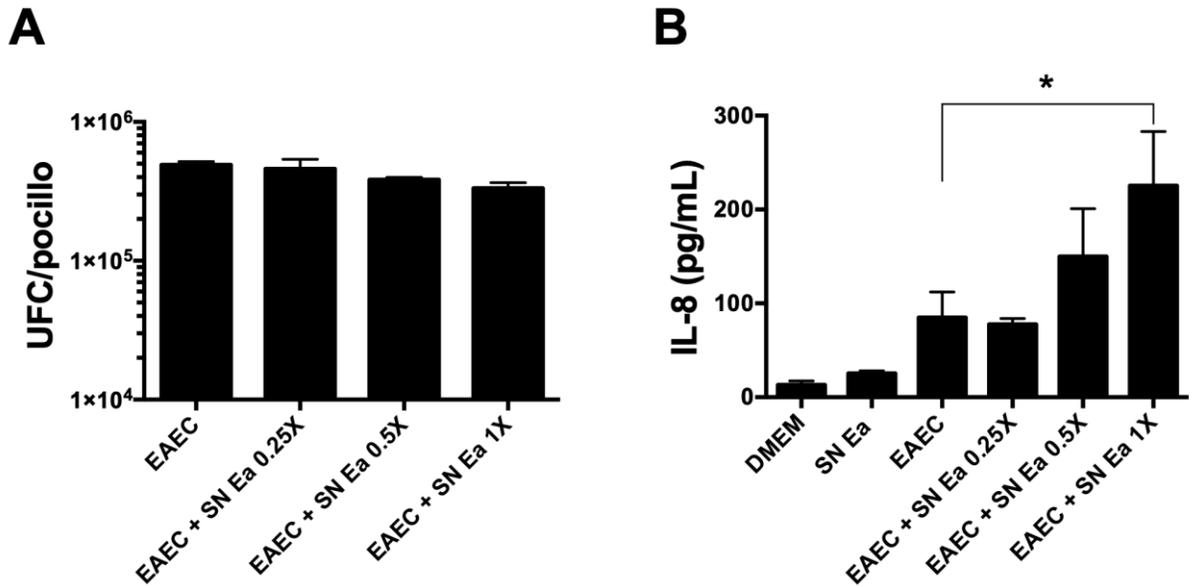
**Objetivo Específico 3. Establecer el efecto de bacterias indicadoras de la microbiota intestinal asociadas niños con infecciones por *E. coli* diarreogénicas en la respuesta inflamatoria causada por las cepas de EAEC y STEC en modelos celulares intestinales.**

### **Efecto de diluciones del sobrenadante de *E. albertii* en la secreción de IL-8 inducida por STEC y EAEC**

Para caracterizar en mayor detalle la respuesta observada en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, se evaluó la adhesión de STEC y EAEC como la inducción de secreción de IL-8 sobre células epiteliales intestinales en cultivo en presencia de distintas diluciones del sobrenadante de *E. albertii*. En estos experimentos, no se encontraron diferencias en la adhesión de STEC respecto a la condición control, y se observó un aumento significativo en la secreción de IL-8 al infectar con STEC en presencia del sobrenadante en concentración 1X, mientras que este efecto no fue observado al utilizar diluciones del sobrenadante (Figura 20). De manera similar, para la cepa de EAEC, se encontró que la incubación con el sobrenadante no produce cambios en la adhesión respecto a la condición control, mientras que el aumento en la secreción de IL-8 se observó solo al utilizar el sobrenadante más concentrado (Figura 21).



**Figura 20. Adhesión a células en cultivo y secreción de IL-8 por células T84 inducida por STEC en presencia de diluciones del sobrenadante de *E. albertii*.** Se infectaron células T84 con la cepa de referencia de STEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (SN Ea) en concentraciones 0,25X, 0,5X y 1X durante 3 h. Se evaluó la adherencia de STEC mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de LB-agar (A) y el nivel de IL-8 secretado luego de 3 h post-infección mediante un test de ELISA para IL-8 (B). Los datos graficados corresponden al promedio más desviación estándar para un experimento representativo realizado en triplicado. \*Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las condiciones señaladas en el gráfico.



**Figura 21. Adhesión a células en cultivo y secreción de IL-8 por células T84 inducida por EAEC en presencia de diluciones del sobrenadante de *E. albertii*.** Se infectaron células T84 con la cepa de referencia de EAEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (SN Ea) en concentraciones 0,25X, 0,5X y 1X durante 3 h. Se evaluó la adherencia de EAEC mediante el conteo de unidades formadoras de colonias (UFC) en placas de LB-agar (A) y el nivel de IL-8 secretado luego de 3 h post-infección mediante un test de ELISA para IL-8 (B). Los datos graficados corresponden al promedio más desviación estándar para un experimento representativo realizado en triplicado. \* Diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre las condiciones señaladas en el gráfico.

### **Análisis secreción citoquinas pro-inflamatorias utilizando un modelo intestinal 3D**

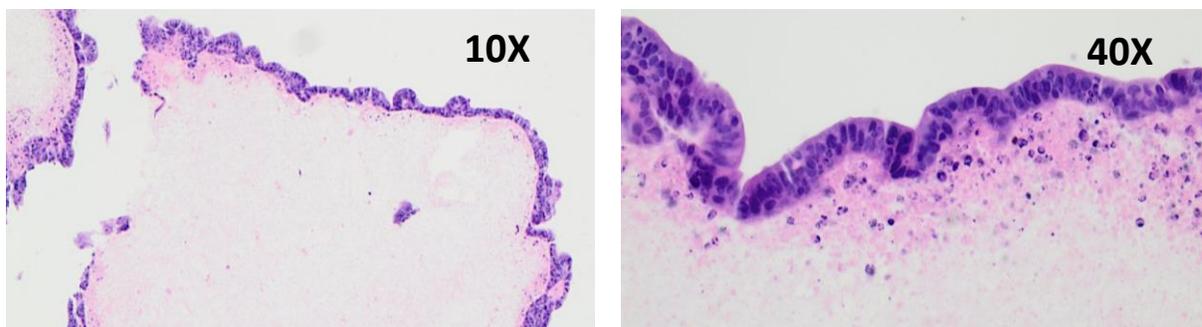
Para evaluar el efecto del sobrenadante de *E. albertii* sobre la respuesta inflamatoria inducida por cepas de referencia de ECD en un ambiente similar al encontrado a nivel intestinal, se utilizó un modelo 3D organotípico de la mucosa intestinal humana. En primer lugar, se estudió la factibilidad del uso de este modelo organotípico en el estudio de la respuesta inflamatoria inducida por cepas de ECD, y para ello se evaluaron los niveles de citoquinas, quimioquinas y factores de crecimiento que podrían ser producidos en respuesta a la infección por ECD y se comparó con los resultados obtenidos en la línea celular T84 (Figura 22).

En células T84, se observó que la infección con STEC y EAEC induce la secreción de las siguientes 7 citoquinas, en comparación a las células sin infectar: TGF-alfa, GM-CSF, GRO, MDC, IL-8, IP10 y VEGF. De la misma manera, se identificó en el modelo 3D, que la infección por cepas de ECD también induce la secreción de GM-CSF, GRO, IL-8, IP10, TNF-alpha y VEGF, de manera que se obtiene una respuesta similar a la encontrada en el actual modelo de

estudio de la patogenicidad de ECD. Adicionalmente, se observó que la infección por cepas de ECD puede inducir en el modelo 3D la secreción de las citoquinas MCP-3, IL-4, IL6, MCP-1, MIP-1a, MIP-1b, las cuales son observadas en distintos niveles dependiendo del tiempo de infección estudiado (Figura 22). Sin embargo, a diferencia de lo observado en células T84, en el modelo 3D no se observó la secreción de las citoquinas TGF-alfa y MDC, presentes en el sobrenadante obtenido luego de 18h post-infección en la monocapa de células epiteliales.



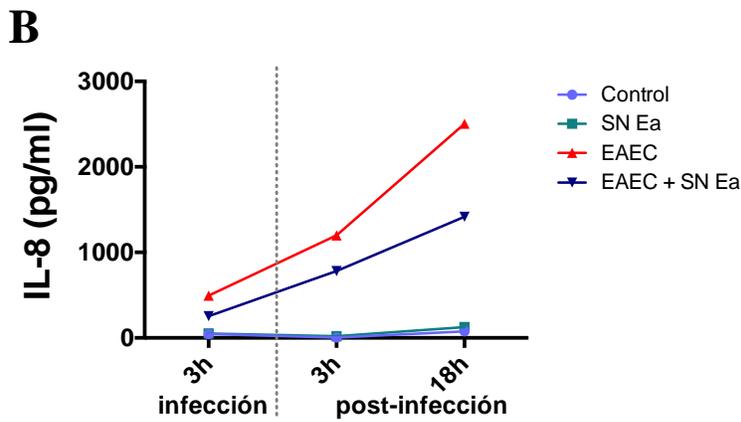
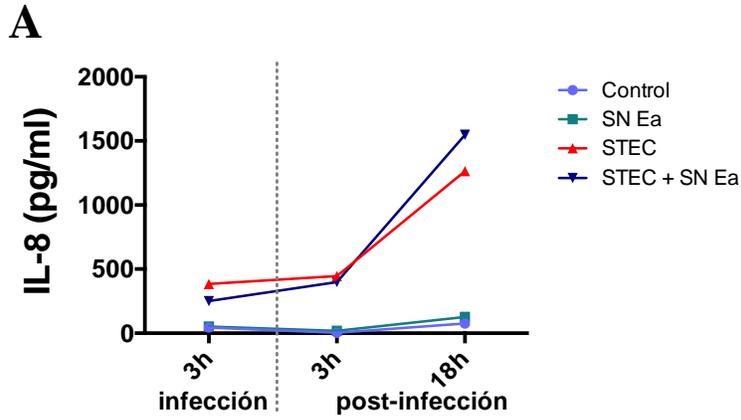
Para evaluar la organización de las células en el modelo 3D, se recuperaron constructos de la condición control (sin infectar) y se realizó la tinción con hematoxilina/eosina (Figura 23). En esta imagen es posible observar la formación de una monocapa de células epiteliales en la superficie del gel que contiene proteínas de matriz, y además se puede distinguir la presencia de monocitos bajo la superficie epitelial.



**Figura 23.** Tinción hematoxilina/eosina de constructo obtenido luego de 18 días de cultivo del modelo 3D.

### **Participación sobrenadante *E. albertii* en infección de modelo 3D**

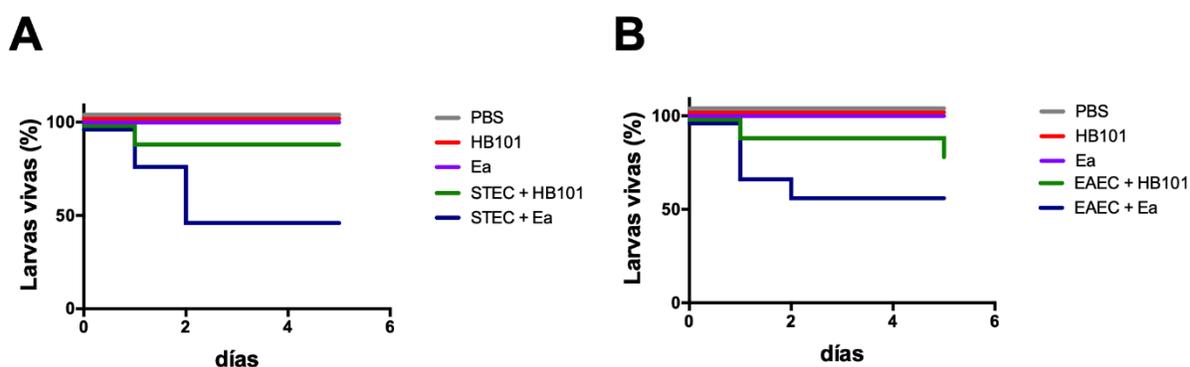
Se utilizó el modelo 3D para evaluar el cambio en la respuesta inflamatoria de STEC y EAEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii*. Para esto, se infectaron las células del modelo 3D con STEC y EAEC en presencia de M9 (control) o el sobrenadante de *E. albertii* y se recuperaron muestras de sobrenadante a las 3 h de infección, y luego de 3 y 18 h post-infección. Se cuantificaron los niveles de IL-8 en los 3 tiempos mencionados, observando que la presencia del medio M9 o el sobrenadante de *E. albertii* por sí solos no inducen la secreción de IL-8 en este modelo. Para ambas cepas de ECD, se observó un aumento en los niveles de IL-8 en el tiempo del experimento, alcanzando el mayor nivel luego de 18 h post-infección. Al realizar la infección con la cepa de STEC en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, se observó una tendencia de mayor secreción de IL-8 a las 18 h post-infección en comparación al control, mientras que no se observaron cambios a las 3 h post-infección. Por otra parte, para EAEC se observó en los 3 tiempos de estudio una menor secreción de IL-8 en relación con el control (Figura 24).



**Figura 24. Secreción de IL-8 inducido por STEC y EAEC en el modelo intestinal 3D.** Se infectaron células del modelo 3D con las cepas de referencia de STEC (A) o EAEC (B) en presencia del sobrenadante de *E. albertii* (SN Ea) en concentración 1X o medio M9. Se evaluó el nivel de IL-8 secretado por las células de este modelo al término de las 3h de infección y luego de 3 y 18h post-infección. Los datos graficados corresponden a los datos obtenidos para un experimento.

## Ensayos de virulencia cepas ECD utilizando modelo *in vivo* *Galleria mellonella*

Para evaluar el efecto *E. albertii* en la virulencia de las cepas ECD en un modelo *in vivo*, se utilizó la larva *G. mellonella*. Para este trabajo, se infectaron grupos de 10 larvas de manera de evaluar las siguientes condiciones: la virulencia de la cepa ECD (STEC o EAEC) co-infectada con la bacteria *E. albertii* (condición 1), la cual se comparó con la virulencia observada producto de la infección con la cepa ECD y la cepa *E. coli* HB101 (condición 2). Como control, se realizó la infección con *E. albertii* (condición 3) o *E. coli* HB101 (condición 4) de manera individual. Finalmente, como control del proceso de infección, un grupo de larvas se inyectó con PBS (condición 5), utilizado como vehículo para la preparación de las muestras. A partir de estos experimentos, se observó para STEC y EAEC, que al realizar la co-infección con HB101, la supervivencia de las larvas es de un 80-90% mientras que la co-infección con *E. albertii* disminuye la supervivencia de las larvas en un 50%. En ambos experimentos se observó que la inyección con *E. albertii* o *E. coli* HB101 por sí solas no produjo la muerte de las larvas en las concentraciones utilizadas (Figura 25).



**Figura 25. Infección modelo de virulencia larva *G. mellonella*.** Grupos de 10 larvas se infectaron con 10 µl de la suspensión bacteriana que contenía  $10^4$  UFC de las siguientes condiciones: **(A)** *E. coli* HB101, *E. albertii*, STEC & *E. coli* HB101 y STEC & *E. albertii*. **(B)** *E. coli* HB101, *E. albertii*, EAEC & *E. coli* HB101 y EAEC & *E. albertii*. En ambos experimentos, se utilizó como control de la infección o vehículo, la inyección de 10 µl de PBS estéril. Se determinó cada 24 h, durante 5 días, el porcentaje de supervivencia de las larvas, identificando una larva como viva si es que ésta responde al tacto.

### Identificación de ácidos grasos de cadena corta en el sobrenadante de *E. albertii*

Con el objetivo de identificar los componentes en el sobrenadante de *E. albertii* que pueden ser responsables de los cambios observados en las cepas de ECD, se realizó un estudio de metabolómica con la empresa MS-Omics, mediante el cual se identificaron diversos metabolitos, dentro de los que destacan la identificación ácidos grasos de cadena corta (SCFA). A partir de este análisis, se identificó en el sobrenadante de *E. albertii* la presencia de los SCFA ácido acético y ácido fórmico, mientras que los demás ácidos grasos como ácido propanoico, ácido isobutírico, ácido butanoico, ácido pentanoico, ácido hexanoico y ácido heptanoico se encontraron en cantidades inferiores al límite de detección del equipo (Tabla 7).

**Tabla 7. Identificación de ácidos grasos presentes en el sobrenadante de *E. albertii*.**

SCFA	Concentración (mM)
Ácido acético	3.61
Ácido fórmico	2.67
Ácido propanoico	<LOD
Ácido 2-metil-propanoico	<LOD
Ácido butanoico	<LOD
Ácido 3-metil-butanoico	<LOD
Ácido pentanoico	<LOD
Ácido 4-metil-pentanoico	<LOD
Ácido hexanoico	<LOD
Ácido heptanoico	<LOD

<LOD: Bajo el límite de detección (0,01 – 0,3 mM)

## DISCUSIÓN

En los últimos años, se ha propuesto que la composición de la microbiota intestinal puede determinar la susceptibilidad a la infección por patógenos. Se ha reportado, que la microbiota intestinal puede promover la resistencia a la colonización por especies patogénicas mientras que también hay evidencia de cómo algunas especies de la microbiota pueden llevar a la expansión o al aumento de la virulencia de enteropatógenos (Baumler y Sperandio, 2016). En este trabajo, se identificó una microbiota asociada a niños con infecciones por ECD significativamente diferente a la microbiota presente en niños con infecciones virales y niños sanos. Además, se encontraron especies indicadoras asociadas significativamente al grupo ECD que podrían tener un rol en la respuesta inflamatoria inducida por ECD sobre células epiteliales intestinales.

Para los análisis de microbiota, de forma general, se utiliza una estrategia basada en la identificación de OTUs, ya que permite una identificación rápida de los grupos bacterianos presentes en la muestra, mediante la comparación de la secuencia representativa de cada OTU con una base de datos de referencia. Para la identificación taxonómica de OTUs hasta nivel de especie, se considera un porcentaje de similitud de las secuencias de un 97% (Tyler y cols., 2014), sin embargo, se ha reportado que para propósitos taxonómicos se requiere de un porcentaje de identidad mínimo entre las 2 secuencias del 98,7% para ser consideradas una misma especie (Yarza y cols., 2014). De esta forma, al realizar la agrupación de secuencias en OTU podríamos tener múltiples taxas dentro de un mismo grupo o bien, realizar una identificación apropiada sólo hasta el nivel de género. En este trabajo se utilizó la identificación de OPU, una estrategia metodológica que resulta en una identificación taxonómica más clara y confiable que aquella derivada del análisis de OTUs, debido a que se realiza la revisión manual de la identidad entre las secuencias representativas de cada OTU con las secuencias de referencia presentes en el árbol filogenético utilizado (Yarza y cols., 2014). Esta revisión manual favorece la identificación taxonómica hasta el nivel de especie, considerando para ello un porcentaje de identidad mínimo entre las 2 secuencias del 98,7%. Al realizar el análisis mediante la identificación de OPU, las curvas de rarefacción presentan una saturación más temprana para la mayoría de las muestras de este estudio que cuando se realiza este mismo análisis con OTUs (Figura 6). Cuando la curva de rarefacción de una muestra alcanza un punto de saturación, indica

que con el número de secuencias analizadas se logró la identificación de la mayoría de OTUs u OPU, y si aumentamos el número de secuencias disponibles es probable que no cambie significativamente el número de unidades taxonómicas identificadas. Resultados similares se han reportado en un trabajo realizado previamente con esta misma metodología (Vidal y cols., 2015), validando así los resultados obtenidos y proponiendo una sobreestimación en el número de especies al utilizar la identificación de OTUs. En este estudio, se identificaron en promedio 220 OTU por muestra, lo cual es cercano al promedio de 160 especies por organismo, reportado en la literatura (Qin y cols., 2010). Este valor se redujo a un promedio de 85 OPU por muestra, lo que está en concordancia con los valores reportados previamente para análisis de microbiota utilizando esta metodología (Vidal y cols., 2015).

A través del uso de un análisis de redundancia, se observó la separación significativa de las 93 muestras de este estudio de acuerdo al grupo que pertenecen (Figura 8). Esto nos indicaría que existen diferencias significativas en la composición de la microbiota entre niños sanos, niños con infecciones virales y niños con infecciones por ECD, proponiendo que existe una microbiota intestinal característica asociada a niños con infecciones por ECD y además sugiere que la composición de la microbiota intestinal en episodios de diarrea dependerá probablemente del tipo de patógeno causante de enfermedad. Por lo tanto, sería interesante evaluar qué ocurre con la composición de la microbiota en muestras de niños con diarrea asociada a otros patógenos bacterianos, parásitos o bien, muestras de diarrea negativas para patógenos entéricos. En este sentido, mediante este mismo análisis, se observaron diferencias en la composición de la microbiota de las muestras del grupo ECD, las cuales se agruparon de acuerdo al patotipo ECD presente (Figura 9). Sin embargo, para corroborar esta distribución y validar esta diferencia sería necesario en primer lugar que exista un número similar de muestras en los diferentes grupos y probablemente se necesitaría aumentar el número de muestras en cada uno de ellos. Un análisis de tamaño muestral para las muestras del grupo ECD señala que serían necesarias 24 muestras en cada grupo para poder aplicar test estadísticos adecuadamente.

La microbiota intestinal de individuos sanos se caracteriza por estar compuesta principalmente de bacterias pertenecientes al *phylum* Firmicutes y en menor medida de bacterias del *phylum* Bacteroidetes y Proteobacterias (Palmer y cols., 2007; Tojo y cols., 2014). Además,

en los niños menores de 3 años existe un gran porcentaje (aproximadamente 40%) de bacterias asociadas al *phylum* Actinobacteria, que va disminuyendo gradualmente a lo largo de la vida de un individuo. Durante episodios de diarrea, se ha observado un aumento en los niveles de Proteobacteria y Bacteroidetes y la disminución en los niveles de Firmicutes (Braun y cols., 2017). En relación a esto, la microbiota intestinal de los grupos analizados en este trabajo se comporta de acuerdo a la información descrita en la literatura, destacando un aumento en el nivel de Proteobacterias y disminución de Firmicutes en las muestras de niños con diarrea en relación al grupo control (Figura 7). Sería importante realizar un estudio que permita evaluar la composición de la microbiota de niños una vez terminado los episodios de diarrea y realizar un seguimiento que permita determinar el tiempo que transcurre hasta que la microbiota muestre una distribución similar a la observada en niños sanos.

Adicionalmente, se ha observado que durante infecciones intestinales, hay un aumento en el porcentaje de bacterias pertenecientes a la familia *Enterobacteriaceae* (Hill y Artis, 2010; Stecher y cols., 2007). Esta situación se observó para el grupo ECD al realizar el análisis a nivel de Familia (Figura 7), encontrando que *Enterobacteriaceae* es la familia más abundante dentro de este grupo, lo cual puede ser atribuido en parte a la presencia de enteropatógenos pertenecientes a esta familia en las muestras del grupo ECD. Es importante mencionar que mediante la obtención de OPUs podemos llegar a la identificación de especie, pero no podemos discriminar si el aumento observado en las bacterias de la familia *Enterobacteriaceae* o género *Escherichia* se debe a la presencia de cepas de *E. coli* patógenas o a un aumento de bacterias de este grupo pertenecientes a la microbiota intestinal. Por otro lado, al realizar la identificación de especies indicadores del grupo ECD, se determinó que la mayoría de las especies identificadas pertenecen a la familia *Enterobacteriaceae* (Figura 10). Respecto a este mismo punto, un estudio realizado el 2014 identificó la presencia de los géneros *Escherichia/Shigella*, *Citrobacter*, *Enterobacter* y *Haemophilus* asociadas a muestras de diarrea (Pop y cols., 2014), todos ellos presentes en las especies indicadoras asociadas al grupo ECD.

En relación a las especies indicadoras seleccionadas, se ha descrito a *C. werkmanii* como parte de la microbiota intestinal de seres humanos y animales, y probablemente, como consecuencia de la excreción fecal también se encuentra en el medio ambiente, por lo que se

pueden recuperar a partir de aguas residuales y suelo (Borenshtein y Schauer, 2006; Brenner y cols., 1993). En general, las especies del género *Citrobacter* se aíslan con frecuencia desde las heces y de forma ocasional causan infecciones en personas y animales. No obstante, la significancia clínica de las especies de *Citrobacter*, así como el mecanismo de patogenicidad aún no ha sido determinado (Borenshtein y Schauer, 2006). Por otra parte, *E. albertii* se ha descrito como un enteropatógeno emergente ya que comparte con cepas ECD la capacidad de promover la formación de lesiones de adherencia y borrado de las vellosidades intestinales, debido a la presencia de genes de la isla LEE (Yamamoto y cols., 2017). Pese a esto, el OPU asociado a *E. albertii* también se encontró presente en muestras del grupo ECD, asociadas a patógenos que carecen de genes de la isla LEE, como EAEC.

La identificación de las especies indicadoras se realizó en base una determinación bioinformática que considera análisis estadísticos basados en datos de presencia/ausencia y abundancia de OPUs en cada grupo. De esta manera, bacterias que estaban en mayor proporción tanto en la microbiota de niños con diarrea asociada ECD como a patógenos virales, no se seleccionaron como una especie indicadora. Un ejemplo de esto es lo que ocurre el *B. tethaiotaomicron*, que se encontró aumentado en ambos grupos con diarrea respecto al grupo control y se ha asociado en estudios previos con aumentar la virulencia de cepas de STEC (Curtis y cols., 2014). Además, sería interesante poder aislar estas bacterias indicadoras a partir de muestras de deposición y de esta forma confirmar los resultados obtenidos mediante el análisis bioinformático. Por otra parte, la identificación de estos microorganismos se realizó en muestras de diarrea aguda, de las cuales no se cuenta con los antecedentes si se encontraban en una fase inicial de la enfermedad o ya en un proceso de recuperación. Por lo tanto, no podemos reconocer el momento preciso en que estas bacterias se empiezan a identificar en la microbiota de niños con infecciones por ECD. Para investigar la participación de estas bacterias indicadoras en el curso de la infección, sería necesario realizar un estudio de cohorte prospectivo, de manera de poder realizar un seguimiento de cepas indicadoras antes, durante y después del episodio de diarrea. Es importante mencionar que en este estudio no se contó con la posibilidad de acceder a la ficha clínica de estos pacientes, de manera que no se ha podido realizar un estudio que permita asociar la presencia de bacterias indicadoras de la microbiota del grupo ECD con la sintomatología o gravedad de la enfermedad.

Esta parte del trabajo de tesis presenta limitaciones, siendo una de ellas el uso de criterios de inclusión poco estrictos para las distintas muestras utilizadas en este estudio, ya que sólo se consideró el uso de muestras de niños menores de 5 años con diarrea para su inclusión en el estudio. Por otra parte, se cuenta con un grupo control de niños sanos provenientes de Colina, una comuna con distinto nivel socioeconómico que la de los niños que presentaron episodios de diarrea y se atendieron en la Clínica las Condes; y se ha reportado que existen distintos factores como edad, tratamiento con antibióticos, el tipo de alimentos consumidos y estatus socioeconómico que pueden influenciar la composición de la microbiota (Baumler y Sperandio, 2016; Sartor, 2012). Por lo tanto, sería importante considerar en futuros estudios diferentes variables como la comuna de donde proviene el paciente, la dieta, la ingesta de antibióticos, y el pareo de las muestras por edad con las muestras de niños sanos. Respecto a esto, y para validar las diferencias observadas en la composición de la microbiota al contar con una población más homogénea de muestras en cuanto a sector socioeconómico, durante este tiempo se han analizado muestras de deposición de niños sanos que provienen de distintos sectores de Santiago y que asisten al jardín infantil del Hospital Dr. Luis Calvo Mackenna. Junto con esto, se han recolectado muestras de diarrea positivas para los patógenos de este estudio en niños que son atendidos en este mismo hospital. De manera preliminar, se ha observado, mediante análisis de redundancia, que existen diferencias significativas en la composición de la microbiota de niños sanos y de niños con diarrea asociada a infecciones por ECD (datos no mostrados), validando los resultados presentados en este trabajo.

Otra importante limitante de nuestro estudio se refiere a la identificación de OPUs pertenecientes al género *Bifidobacterium* y al *phylum* Actinobacteria, uno de los mayores componentes de la microbiota de niños sanos (Roger y McCartney, 2010; Rogers y Bruce, 2010). En ninguna de las muestras analizadas se encontró un OTU u OPU asociado a este género. Una situación similar se observó en otro estudio realizado en nuestro grupo donde también se presentaron problemas en la identificación de este género bacteriano, pese a haber realizado la cuantificación de este grupo de bacterias mediante PCR (Ossa y cols., 2018), sugiriendo que existe una limitación en el procedimiento realizado que disminuyen la identificación de este grupo bacteriano. Trabajos previos también han reportado una subestimación de Bifidobacterias en estudios de microbiota y esta situación ha sido asociada a

que los partidores universales utilizados para la amplificación de la región V3-V4 del gen 16S rRNA, no presentan 100% de identidad con la secuencia de ADN presente en este grupo de bacterias (Becker-Dreps y cols., 2015; Pop y cols., 2014; Sim y cols., 2012). Para solucionar esta limitante, se han diseñado nuevos partidores que optimizan la amplificación del gen 16S rRNA de *Bifidobacterium* en muestras de deposición, sin modificar la identificación de los otros géneros presentes (Sim y cols., 2012), sin embargo, el uso de la plataforma de secuenciación Roche 454-GS-FLX+ se discontinuó el año 2017. Por lo tanto, con el objetivo de analizar la presencia de *Bifidobacterium* en las muestras utilizadas en este estudio, y al mismo tiempo probar otra metodología para futuros estudios de microbiota, algunas muestras se analizaron mediante Illumina MiSeq, obteniendo la identificación del género *Bifidobacterium* en todas las muestras reanalizadas (datos no mostrados).

Considerando que las alteraciones en la composición de la microbiota intestinal han sido asociadas con cambios en la susceptibilidad a una infección, y que existen bacterias de la microbiota intestinal capaces de promover la colonización de patógenos, se continuó este trabajo evaluando el efecto que presentan 2 bacterias indicadoras de la microbiota intestinal en la virulencia de EAEC y STEC.

La utilización de las bacterias indicadoras del grupo ECD en ensayos de infección a células en cultivo postula que la presencia de metabolitos secretados por *C. werkmanii* inducen la secreción de IL-8 por parte de las células epiteliales, sin necesidad de agregar la bacteria completa, [sin embargo, no existen mayores antecedentes acerca del mecanismo asociado a la infección por \*C. werkmanii\* y que puedan estar desencadenando una respuesta inflamatoria por parte de células en cultivo.](#) Esto no es observado al infectar con *E. albertii* o el sobrenadante producido por esta bacteria, por lo que para realizar una adecuada interpretación de los resultados, se seleccionó esta bacteria para los siguientes experimentos. Considerando la asociación de *E. albertii* como un enteropatógeno por la presencia de genes de la isla LEE y manera de confirmar los resultados obtenidos, sería interesante evaluar qué ocurre con la inducción de secreción de IL-8 al utilizar cepas de *E. albertii* aisladas desde muestras de deposición de pacientes con infección por ECD.

La infección de células epiteliales en cultivo con las cepas ECD en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, mostró una mayor secreción de IL-8 en comparación al control (Figura 14). Considerando que la infección con *E. albertii*, como la incubación de las células con el sobrenadante de esta bacteria, no producen la secreción de IL-8 por parte de las células intestinales, se puede atribuir que el aumento de IL-8 observado sería producido por las cepas de ECD y esta mayor inducción de IL-8 podría estar asociada a un aumento en la expresión de genes de virulencia involucrados en la inducción de la respuesta inflamatoria de la cepa ECD. Debido a que este aumento en la secreción de IL-8 se observa en presencia del sobrenadante de *E. albertii* se puede plantear como hipótesis que el aumento en la secreción de IL-8 se debe a la presencia de un factor soluble que estaría modulando la actividad proinflamatoria de STEC y EAEC. La secreción de IL-8 genera un gradiente quimiotáctico que promueve la migración de neutrófilos al tejido subepitelial, logrando atravesar la barrera epitelial hasta el sitio de infección (Godaly y cols., 1997). Se ha reportado que la presencia de neutrófilos en el sitio de infección puede contribuir a un aumento en la colonización de EAEC, reflejado en una mayor adhesión de esta bacteria a células en cultivo, favoreciendo de esta forma la patogénesis de EAEC (Boll y cols., 2012a). Por esta razón, una mayor secreción de IL-8 en presencia del sobrenadante de *E. albertii* podría estar favoreciendo la colonización de las cepas ECD.

Para caracterizar el posible mecanismo involucrado en una mayor inducción de secreción de IL-8, se evaluaron los cambios en la expresión génica de las cepas ECD en presencia del sobrenadante de *E. albertii*. A partir de experimentos de RNA-seq, se identificó que al incubar STEC con el sobrenadante de *E. albertii* existe un aumento en la expresión del regulador maestro Ler y el regulador LrhA, que controlan positivamente la expresión de los genes de la isla LEE (García y cols., 2012; Honda y cols., 2009), de manera que puede modular positivamente la virulencia de STEC *in vitro*. De acuerdo con esta información, se observó un aumento de la expresión de genes asociados a los sistemas de secreción, toxinas, proteínas involucradas en la adherencia y motilidad (Figura 17A), sugiriendo que bacterias indicadoras de la microbiota intestinal de niños con infecciones por ECD pueden regular la expresión de factores de virulencia en STEC. Un estudio similar en los que se realizaron ensayos de co-incubación de STEC con los componentes de la microbiota de individuos sanos *B. thetaiotaomicron* o *E. faecalis* también han reportado un aumento en la expresión del regulador Ler (Curtis y cols.,

2014; Iversen y cols., 2015). Dentro de los factores de virulencia cuya expresión es regulada por Ler, se encuentra el gen que codifica para la metaloproteasa StcE, que se ha asociado al corte de la proteína inhibidora de C1-esterasa, un importante regulador de la respuesta inflamatoria. Se ha descrito que mediante el corte de glicoproteínas estaría contribuyendo a la íntima adherencia de STEC a la célula epitelial y la evasión de la respuesta inmune (Grys y cols., 2005; Lathem y cols., 2002). Además, en este trabajo se observó un aumento en la expresión de las distintas subunidades de la fimbria Lpf (*lpfA*, *lpfB*, *lpfD* y *lpfE*). A partir de estos resultados, y la asociación de estos factores de virulencia con la patogenicidad de STEC se esperaría que una mayor expresión de estos genes se refleje en una mayor virulencia de la cepa de STEC.

Trabajos previos del laboratorio, han reportado a la fimbria Lpf como uno de los factores mediadores de inflamación en la infección por STEC, ya que se asoció la presencia de esta fimbria con la inducción de una respuesta inflamatoria a través de la activación de la vía NF- $\kappa$ B. Además, se asoció esta fimbria a la secreción de citoquinas proinflamatorias, como IL-8, y a la migración transepitelial de neutrófilos en células intestinales polarizadas (Farfan y cols., 2013; Vergara y cols., 2014). A partir de estos antecedentes, se procedió a evaluar la participación de este factor de virulencia en el aumento de la secreción de IL-8 mediado por *E. albertii*, encontrando que la cepa mutante en la fimbria Lpf no presentó el aumento en la inducción de secreción de IL-8 observado para la cepa silvestre (Figura 19). Esto sugiere que una mayor expresión de este factor de virulencia en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, podría explicar en parte el aumento en la secreción de IL-8. Sin embargo, los receptores involucrados en el reconocimiento de la fimbria Lpf y que activan la respuesta inflamatoria por este factor de virulencia no han sido reconocidos hasta la fecha. Se ha encontrado que la fimbria Lpf se adhiere a proteínas de matriz extracelular como fibronectina, laminina y colágeno IV (Farfan y cols., 2011), sin embargo, no se ha estudiado su relación con la activación de una respuesta inflamatoria en esta bacteria. Estudios con EAEC, que también presenta la capacidad de adherirse a fibronectina, han mostrado que la unión a esta proteína de matriz extracelular sólo estaría promoviendo una mayor adhesión a células epiteliales, pero no participaría en la respuesta inflamatoria de células infectadas con este patógeno (Yanez y cols., 2016). Por otro lado, se ha observado que EAEC puede inducir la secreción de IL-8 a través del receptor TLR4, en un proceso mediado por la fimbria AAF (Alvestegui y cols., 2019). El receptor TLR4 ha sido

asociado previamente al reconocimiento de fimbrias de diferentes patógenos, por lo que es probable que el mecanismo descrito para EAEC también pueda estar siendo utilizado por STEC a través de la fimbria Lpf, sin embargo, se requieren futuros estudios en esta área que nos permitan confirmar esta propuesta y determinar el mecanismo asociado a la secreción de IL-8 inducido por la fimbria Lpf.

Para el caso de EAEC, no se observaron mayores cambios en la expresión de los factores de virulencia característicos de una infección por este patógeno (Figura 18B, Tabla 5), destacando una disminución en la expresión génica de factores asociados a la motilidad de la bacteria, como por ejemplo *fliC*. Estudios previos han descrito que la proteína FliC tiene la capacidad de inducir la secreción de IL-8 a través de la interacción con el receptor celular TLR5 (Khan y cols., 2004), por lo que se esperaría una disminución en la secreción de IL-8 en nuestros resultados. Sin embargo, se observó un aumento en la secreción de IL-8, por lo que otro factor de virulencia sería el responsable del aumento observado. Respecto a esto, se encontró que existe un aumento en la expresión de la toxina Pet, un autotransportador con actividad serin-proteasa que causa la disrupción del citoesqueleto de actina y pérdida de uniones focales en células epiteliales, disminuyendo la resistencia eléctrica en muestras de jejunio de rata, causando daño a la mucosa intestinal, la exfoliación de células y el desarrollo de abscesos en criptas intestinales (Navarro-García y cols., 2010). Junto con lo anterior, se ha reportado que Pet induce la secreción de las citoquinas pro-inflamatorias IL-8 y TNF-alfa de macrófagos (Rocha-Ramírez y cols., 2016). De esta manera, Pet se ha asociado con daño a la mucosa intestinal y un aumento en la respuesta inflamatoria, por lo que el aumento en la expresión de esta toxina en EAEC podría asociarse con el aumento de IL-8 observado en nuestros experimentos. Para comprobar esta hipótesis, sería necesario realizar experimentos con una cepa de EAEC mutante en la toxina Pet para confirmar su participación en la secreción de IL-8 mediada por *E. albertii*. Adicionalmente, se puede evaluar el daño a la mucosa epitelial causado por la toxina Pet mediante estudios de inmunofluorescencia y evaluar si el fenotipo asociado a la presencia de Pet se ve aumentado en presencia del sobrenadante de *E. albertii*.

Es importante mencionar, que en los resultados de RNA-seq se registraron cambios en la expresión génica de alrededor de 900 y 1500 genes luego de incubar con el sobrenadante de

*E. albertii* las cepas de referencia de EAEC y STEC, respectivamente. Por lo tanto, quedan varios potenciales candidatos que podrían estar ayudando en la regulación de la respuesta inflamatoria de las cepas ECD, ya sea mediante la regulación de algún proceso metabólico o la expresión de otros factores bacterianos no considerados en este estudio, por lo que será necesario continuar evaluando los datos obtenidos mediante esta metodología.

Para evaluar qué sucede con la secreción de citoquinas proinflamatorias en un ambiente similar a lo que ocurriría a nivel intestinal es que se procedió a utilizar un modelo organotípico 3D de la mucosa intestinal humana. Hasta la fecha no ha sido descrito un modelo animal para el estudio de estas cepas *in vivo*, por lo que el uso de modelos que imiten el ambiente intestinal es de gran interés para el estudio del mecanismo de patogenicidad de cepas de ECD. Este modelo presenta similitud estructural y funcional con la mucosa intestinal humana, presentando distintos grupos celulares como fibroblastos, linfocitos, células endoteliales y células epiteliales (Salerno-Goncalves y cols., 2011), siendo de gran interés para el estudio de la interacción patógeno-hospedero. Hasta la fecha, este modelo se ha utilizado para el estudio de la respuesta inflamatoria causada por cepas de *Salmonella* y bacterias de la microbiota intestinal (Salerno-Goncalves y cols., 2011; Salerno-Goncalves y cols., 2016b), sin embargo, no ha sido reportado su uso con cepas de ECD.

Utilizando este modelo, se encontró que las cepas de ECD son capaces de causar una respuesta inflamatoria en este modelo intestinal 3D, ya que promueven la secreción de las citoquinas GM-CSF, GRO, IL-8, IP10, TNF-alpha y VEGF, previamente identificadas en la infección de una monocapa de células T84 (Figura 22). Respecto a estas citoquinas se ha descrito que la proteína inducida por interferón- $\gamma$  o IP10, se comporta como quimioattractante para macrófagos, células dendríticas, células NK y linfocitos T activados hacia el área infectada (Liu y cols., 2011). Adicionalmente, se encontró un aumento en la expresión de GRO e IL-8, que contribuyen a la migración de neutrófilos hacia el sitio de la infección (Stadnyk, 2002; Wu y cols., 1995). Por otra parte, GM-CSF es secretado en respuesta a estímulos pro-inflamatorios, como por ejemplo LPS, y promueve la diferenciación y activación de granulocitos y macrófagos, participantes de la defensa del hospedero frente a patógenos (Egea y cols., 2010). Estos resultados están en concordancia con trabajos publicados previamente, donde se encontró

que luego de una infección por cepas de ECD se produce un aumento en la secreción de las citoquinas IL-8, TNF-alfa, GRO y GM-CSF (Boll y cols., 2012a; Harrington y cols., 2005). Adicionalmente, se identificó la secreción de las citoquinas MCP-3, IL-4, IL6, MCP-1, MIP-1a y MIP-1b, las cuales han sido asociadas en su mayoría a un aumento en la respuesta inflamatoria ya que actúan como quimioattractante de linfocitos, macrófagos y neutrófilos (Abbas y cols., 2015). Por ejemplo, MCP-1, secretado por células epiteliales y de la lámina propia promueve la migración de monocitos y macrófagos durante un proceso inflamatorio (Takada y cols., 2010); IL-4 es una citoquina pleiotrópica con efectos regulatorios en el crecimiento y función de células B y células T, células hematopoyéticas y células tumorales. Hay evidencia que está involucrado en una respuesta inmune tipo Th2 pero en algunos casos puede promover respuestas Th1, siendo por lo tanto asociado a procesos anti- y pro- inflamatorios en modelos experimentales de inflamación intestinal (Van Kampen y cols., 2005). IL-6 es una citoquina con funciones pleiotrópicas que promueve el desarrollo de una respuesta inflamatoria en el intestino, mediante la regulación de la diferenciación de células T, activación y resistencia frente a apoptosis y de este modo controla el balance entre las células T proinflamatorias Th1 o Th17 y células T reguladoras (Waldner y Neurath, 2014). Además, se ha observado que puede promover la permeabilidad celular en situaciones de inflamación (Al-Sadi y cols., 2014), pero hacia el término de un proceso inflamatorio esta citoquina promueve la proliferación epitelial y reparación de daño (Kuhn y cols., 2014). De acuerdo a nuestros resultados, IL-6, junto con MCP3 e IP10, presentaron niveles detectables luego de 18h post-infección, por lo que podrían estar jugando un rol más a largo plazo durante la infección. Se ha planteado que la secreción de citoquinas por las células del modelo 3D se debería principalmente a la presencia de las células epiteliales en el modelo, mientras que el nivel de contribución de macrófagos, fibroblastos y células endoteliales en la secreción de citoquinas proinflamatorias hacia el sobrenadante no ha sido completamente estudiada (Salerno-Goncalves y cols., 2016b).

A partir de estos resultados, se observa que tanto STEC como EAEC promueven un aumento de la respuesta inflamatoria en este modelo intestinal, en comparación a la condición sin infectar. Se ha reportado que cambios en el ambiente intestinal producto de la respuesta inflamatoria del hospedero podría influenciar la colonización de patógenos intestinales. Además, se ha asociado un aumento en la inflamación intestinal con un desbalance en la

microbiota, caracterizado con una reducida abundancia de anaerobios obligados y una expansión de bacterias anaerobio-facultativas, principalmente de la familia *Enterobacteriaceae* (Lupp y cols., 2007). Esto ocurriría como consecuencia a cambios en la disponibilidad de especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno en el ambiente intestinal, creando un nicho que favorece el crecimiento de enterobacterias por sobre anaerobios obligados. Estos cambios se podrían reflejar en un ambiente nutricional alterado, cómo por ejemplo, cambios en la composición de los carbohidratos que componen el mucus en situaciones de inflamación, cambiando la disponibilidad de nutrientes en el ambiente intestinal y favoreciendo su expansión (Baumler y Sperandio, 2016).

Como paso siguiente, se evaluó qué ocurre con la secreción de IL-8 al infectar el modelo 3D con STEC y EAEC, en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, confirmando que la presencia de este sobrenadante produce una mayor respuesta inflamatoria en STEC. Este resultado se observó luego de 18 h post-infección, [mientras que a las 3h post-infección no se observaron cambios](#), por lo que el tiempo de respuesta observado en este modelo podría ser en tiempos más largos que lo observado en el modelo de células en monocapa. Por el contrario, para EAEC, se observó una disminución en los niveles de IL-8 en presencia del sobrenadante en los diferentes tiempos de estudio. [De esta manera, los resultados preliminares obtenidos en el modelo 3D mostraron para STEC un aumento en la secreción de IL-8 en un tiempo post-infección diferente al observado por las células en monocapa, mientras que para EAEC se observaron resultados opuestos en la secreción de IL-8. Si bien estos experimentos se llevaron a cabo sin replicado y es necesario repetirlos para confirmar el resultado,](#) un factor que podría estar asociado a estas diferencias son las células epiteliales utilizadas, las cuales en el modelo 3D corresponden a la línea celular HCT-8, provenientes de un adenocarcinoma colorectal – ileocecal (HCT-8 [HRT-18] (ATCC® CCL-244™)) mientras que las células T84 utilizadas en el modelo en monocapa provienen de un adenocarcinoma de colon con metástasis en el pulmón (T84 (ATCC® CCL-248™)). Ambas [líneas](#) celulares tienen la capacidad de crecer hasta confluencia y formar uniones estrechas y desmosomas, sin embargo, sólo al realizar la construcción del modelo 3D podemos distinguir la formación de una monocapa de células polarizadas, observando una cara apical y una basolateral. La elección de las células HCT8 en este modelo se realizó debido a su capacidad de crecer en condiciones de microgravedad

(Salerno-Goncalves y cols., 2011). Otro factor que considerar es la condición de microgravedad en la que se lleva a cabo el modelo 3D. [condición en la que se ha propuesto que las células adoptan una auto-organización similar a lo que ocurre en el intestino, debido a que se ha observado que la microgravedad incrementa la diferenciación celular de cultivos de células epiteliales y endoteliales](#) (Salerno-Goncalves y cols., 2016a). De esta manera, la infección también se lleva a cabo en condición de microgravedad y podría ser una de las razones por la que observamos una respuesta diferente en comparación a la infección en monocapa en cuanto a tiempo de respuesta y resultado obtenido. Sería interesante evaluar qué ocurre con la expresión de factores de virulencia en condiciones de microgravedad considerando que se ha reportado que la exposición de bacterias Gram-negativas a estas condiciones puede [regular](#) la virulencia de enteropatógenos, [incrementando por ejemplo la capacidad de infección de \*E. coli\* enteroinvasiva, la invasión de \*Salmonella\* Typhimurium a células en cultivo y una mayor secreción de fluidos mediada por ETEC en un modelo de asa ligada de rata](#) (Rosenzweig y cols., 2014). En relación a esto, también se ha observado una alteración en la respuesta del hospedero a la infección por estos patógenos en condiciones de microgravedad, reflejado en una [mayor secreción de citoquinas como IL-8, IL-6 y TNF- \$\alpha\$  en condiciones simuladas de microgravedad](#) (Chopra y cols., 2006; Kruger y cols., 2019) lo que podría explicar nuestros resultados luego de la infección con cepas de ECD en presencia del sobrenadante de *E. albertii*.

Experimentos preliminares utilizando un modelo *in vivo* mostraron una menor supervivencia de la larva *G. mellonella*, al co-infectar con la cepa ECD y *E. albertii* en comparación a la condición control. Se ha reportado que existe una asociación entre la virulencia del patógeno y la supervivencia de la larva, donde bacterias que causan severas infecciones en humanos también son altamente virulentas en el modelo de *Galleria* (Ramarao y cols., 2012). Estudios previos han descrito que este insecto presenta una respuesta inmune innata similar a la encontrada en vertebrados, distinguiendo una respuesta mediada por células fagocíticas, denominadas hemocitos; y una respuesta caracterizada por la secreción de moléculas efectoras como péptidos antimicrobianos y proteínas tipo complemento. De esta manera, producto de la infección con patógenos, la larva genera una respuesta inmune que ayude a inmovilizar y eliminar el patógeno, [sin embargo](#) cuando esta respuesta [no puede controlar la infección](#) se correlaciona con la muerte de la larva al poco tiempo después (Tsai y cols., 2016). En relación

a esto, nuestros resultados indicarían que la coinfección con *E. albertii* es más virulenta que al realizar la co-infección con *E. coli* HB101. Considerando que al infectar tanto *E. albertii* como con la cepa HB101 se obtiene un 100 % de sobrevivencia de las larvas, es probable que el efecto que estamos observando se debe a una mayor virulencia de la cepa de ECD. [En los últimos años, se han generado nuevas aplicaciones y usos para](#) este modelo, como el análisis de expresión de péptidos antimicrobianos en distintos tiempos de infección, medición de la proliferación del microorganismo al interior de la larva, y evaluar la producción de lactato deshidrogenasa como marcador de daño celular (Tsai y cols., 2016), de manera que sería interesante evaluar estos parámetros y caracterizar de mejor manera cómo se está viendo afectada la respuesta inmune en este modelo de virulencia. De la misma manera, también sería interesante evaluar el efecto que tendría el sobrenadante de *E. albertii* sobre la virulencia de la cepa ECD en este modelo *in vivo*.

Esta sección del trabajo de tesis también cuenta con limitaciones. La primera de ellas es que no se contó con el uso de una bacteria comensal o sobrenadante que actuase como control en los experimentos realizados, de manera de descartar que los efectos observados se deban a la presencia de metabolitos secretados por cualquier otra bacteria de la microbiota intestinal. De la misma manera, sería importante evaluar si este efecto puede ser observado al utilizar cepas de *E. albertii* aisladas desde muestras de deposición. En relación al modelo 3D utilizado, se realizó un experimento sin replicado, a la espera de poder montar este modelo en el laboratorio y de esta manera confirmar los resultados obtenidos con el modelo 3D. Al mismo tiempo, se espera evaluar otras variables como concentración de sobrenadante, el MOI utilizado y el estudio de citoquinas proinflamatorias en otros tiempos post-infección de manera de caracterizar de mejor manera la respuesta inflamatoria causada por cepas de ECD en este modelo 3D. Por otro lado, hasta la fecha no se han reportado los mecanismos que estarían participando en la regulación de una respuesta inflamatoria, como la interacción entre los distintos componentes presentes en el modelo 3D, de manera que sería interesante estudiar la participación de cada uno de los factores participantes de este modelo en la secreción de citoquinas proinflamatorias cómo también los mecanismos involucrados en la regulación de la respuesta inflamatoria. [Otro punto para considerar en este trabajo, han sido los resultados obtenidos en la cuantificación de los niveles de IL-8 secretados por células epiteliales, luego de ser infectadas con STEC o EAEC. Estos resultados mostraron variabilidad en los niveles de IL-8 cuantificados entre los diferentes](#)

experimentos realizados. A pesar de esto, los resultados presentados siempre muestran el mismo patrón de aumento de IL-8 en presencia del sobrenadante de *E. albertii* y nos permiten realizar las conclusiones de este trabajo. Sin embargo, en estos experimentos no se consideraron variables como el número del pasaje de la línea celular T84 con la que se realizaron los experimentos y que podrían tener un efecto en la variabilidad de los resultados. Otra variable en consideración es el método utilizado para la cuantificación de IL-8, que corresponde a un ensayo de ELISA montado en el laboratorio, y no a un kit comercial, que hasta la fecha ha sido utilizado por varios grupos de investigación (Harrington y cols., 2005; Zhou y cols., 2003) pero que podría contribuir a las variaciones observadas de un experimento a otro. Por lo tanto, sería interesante evaluar mediante la utilización de un kit comercial si los cambios en los niveles de IL-8 dependen de variables del ensayo de infección o bien, del ensayo utilizado para cuantificar los niveles de IL-8.

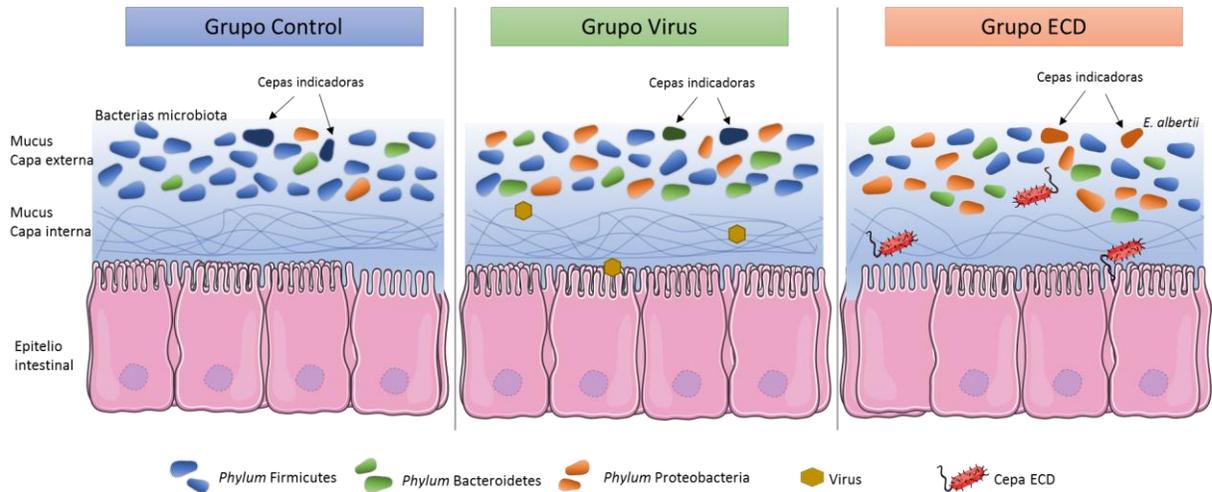
Finalmente, con el objetivo de determinar la naturaleza de los metabolitos presentes en los sobrenadantes, se realizaron experimentos con el sobrenadante hervido de *E. albertii*, obteniendo el mismo aumento en la secreción de IL-8 observado con el sobrenadante control (dato no mostrado), lo que apoya la hipótesis que un factor de naturaleza no proteica podría ser el responsable del efecto observado. Paralelamente, en estudios de metabolómica del sobrenadante de *E. albertii* se encontró la presencia de los SCFA ácido acético y ácido fórmico. Estudios previos han mostrado que al exponer *E. coli* a acetato, produce cambios en la expresión génica asociado a la utilización de este componente como fuente de carbono, destacando un aumento en la expresión de enzimas encargadas de la activación del acetato y su metabolismo a través del ciclo de los ácidos tricarbónicos (Bernal y cols., 2016; Oh y cols., 2002). En nuestros resultados es posible observar para EAEC un aumento en la expresión de estas enzimas metabólicas al ser incubada con el sobrenadante de *E. albertii* (dato no mostrado), lo que podría estar indicando el ingreso y uso de acetato por parte de esta bacteria. Por otra parte, se ha demostrado la participación de los SCFA en la virulencia de patógenos entéricos. Por ejemplo, para STEC se ha observado que la incubación de esta bacteria con una mezcla de ácidos grasos puede modular la motilidad de la bacteria, la cual, dependiendo de la concentración de ácidos grasos, se puede ver aumentada o disminuida respecto a la condición control (Lackraj y cols., 2016). Junto con esto, se ha demostrado que el crecimiento de EPEC en presencia de acetato

regula positivamente la expresión de genes de la isla LEE y genes flagelares a través de los reguladores Ler y FliA respectivamente (Yang y cols., 2018). También se ha encontrado que el acetato, propionato y butirato inducen la expresión de la proteína FliC afectando la motilidad de la bacteria, de una manera dependiente de los activadores transcripcionales FlhC y FlhDs y que la presencia de butirato aumenta la expresión de genes de la isla LEE (Tobe y cols., 2011). De acuerdo a estos antecedentes, se podría proponer que la presencia de acetato en el sobrenadante de *E. albertii* induce en STEC el aumento de expresión del gen regulador *ler*, y el aumento de la expresión de genes flagelares como los que codifican el regulador FlhC, el activador de la transcripción FlhD y las proteína flagelar FlhE y FlgL. Sin embargo, serán necesarios futuros experimentos para evaluar el rol del acetato en la expresión de factores de virulencia de las cepas ECD y la posterior inducción de la respuesta inflamatoria en células en cultivo, junto con evaluar si la presencia de este componente en el sobrenadante de *E. albertii* es uno de los responsable del aumento de la respuesta inflamatoria observada con las cepas ECD. De esta manera, sería posible demostrar que los SCFA pueden tener un rol en la virulencia de patógenos entéricos y que la respuesta puede cambiar dependiendo de los niveles de éstos en la mucosa intestinal.

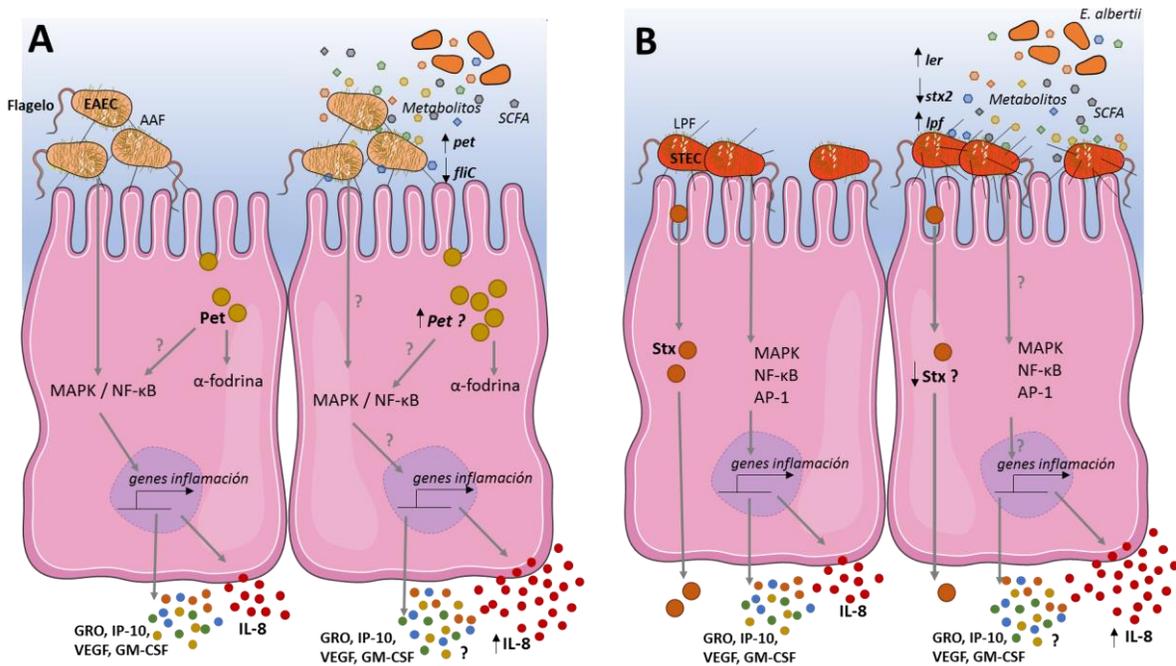
Considerando que existen cambios en la microbiota intestinal en pacientes con infecciones por ECD se espera que existan cambios en los niveles de SCFA a nivel intestinal. Respecto a esto, análisis de muestras de diarrea asociada a antibióticos han reportado una disminución en los niveles de SCFA (Binder, 2010), sin embargo, no hay muchos antecedentes de los niveles de estos ácidos grasos en diarrea por patógenos bacterianos, por lo que sería interesante evaluar los niveles de estos metabolitos en muestras de deposición de niños con infecciones por ECD y si estos cambios pueden afectar la colonización por cepas de ECD.

En este trabajo de tesis, se ha identificado una microbiota asociada a infecciones por ECD que presenta diferencias significativas de la microbiota de niños sanos o con infecciones virales. Junto con esto, se identificaron especies indicadoras del grupo ECD, seleccionando *E. albertii* para evaluar su rol en la virulencia de cepas de ECD, y así determinar de manera *in vitro* el impacto que presenta esta bacteria en la infección por ECD. Nuestros resultados muestran que el sobrenadante de *E. albertii* induce cambios en la expresión de factores de virulencia de cepas de ECD incluyendo reguladores de virulencia, toxinas y fimbrias, lo que podría modificar

la adhesión a células en cultivo y la respuesta inflamatoria causada por estas bacterias. Aunque no se observaron mayores cambios en la adhesión de cepas de ECD a células epiteliales si se encontró un aumento en la secreción de IL-8 al infectar células epiteliales en presencia del sobrenadante de *E. albertii* y que para el caso de STEC, estaría mediado por la presencia de la fimbria Lpf. La secreción de IL-8 actúa como quimioattractante a nivel intestinal promoviendo la migración de neutrófilos al sitio de la infección y, por lo tanto, estaría aumentando la respuesta inflamatoria generada a nivel intestinal. De esta manera, se ha observado que la presencia de bacterias de la microbiota intestinal modula cambios en la virulencia de cepas ECD y promueve un aumento en la respuesta inflamatoria, reflejado en un aumento de la secreción de IL-8 por células epiteliales. Considerando que los cambios observados en la virulencia de ECD ocurren en presencia del sobrenadante de *E. albertii*, se postula que metabolitos secretados por *E. albertii* serían responsables del efecto observado. En este sentido, se encontró la presencia del SCFA acetato en este sobrenadante, el cual ha sido asociado por [regular](#) la expresión génica en enteropatógenos [de manera dependiente de la concentración de este componente en solución](#). Los principales resultados obtenidos en este trabajo de tesis se presentan en las Figuras 26 y 27.



**Figura 26. Modelo microbiota intestinal en los 3 grupos de estudio.** Composición de la microbiota intestinal a nivel de *phylum*, para los grupos Control, Virus y ECD, de acuerdo a los resultados obtenidos en la primera parte de este trabajo de tesis. Se destaca la presencia de especies indicadoras en cada uno de ellos.



**Figura 27. Modelo de infección de EAEC y STEC en presencia de *E. albertii*.** De acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo se plantea que *Escherichia albertii*, a través de la secreción de metabolitos, modula la expresión de factores de virulencia en cepas EAEC (A) y STEC (B). En EAEC, se distingue un aumento en la expresión de los genes que codifican para la toxina Pet, y una disminución de aquellos que codifican para flagelina (FliC), mientras que en STEC, se observa un aumento en la expresión de los genes que codifican para el regulador Ler y para la fimbria Lpf, mientras que existe una disminución de los genes que codifican para la toxina Stx. Estos cambios se asocian a un aumento en la respuesta inflamatoria inducida por EAEC y STEC, caracterizado por un aumento en la secreción de IL-8 por las células epiteliales intestinales.

## CONCLUSIÓN

A partir de los resultados obtenidos en esta tesis, se puede concluir que:

1. Existe una microbiota característica asociada a la infección por cepas de *E. coli* diarreogénicas, que es significativamente diferente de la microbiota de niños sanos o con infecciones por patógenos virales. Esta diferenciación permitió identificar especies bacterianas indicadoras de esta microbiota.
2. Una de las especies bacterianas indicadoras de la microbiota asociada a infecciones por ECD, *E. albertii*, es capaz de modular la expresión de factores de virulencia en las cepas de referencia de STEC y EAEC.
3. La exposición de EAEC y STEC al sobrenadante de un cultivo bacteriano de *E. albertii* genera que ambas cepas ECD induzcan una mayor secreción de IL-8 en modelos celulares intestinales.

Estos resultados apoyan la hipótesis que existe una microbiota característica en niños con infección por cepas de *E. coli* diarreogénicas y que la presencia de componentes bacterianos asociados a esta microbiota puede contribuir en la regulación de la patogenicidad de cepas de ECD. Se propone que las bacterias indicadoras de esta microbiota intestinal, como *E. albertii*, estarían contribuyendo en la secreción de factores solubles al lumen intestinal. Estos metabolitos favorecerían el aumento en la expresión de factores de virulencia asociados a inflamación en las cepas ECD, lo que produciría una mayor respuesta inflamatoria luego de la infección por estos patógenos, reflejado principalmente por un aumento en la secreción de IL-8.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. (2015). Cellular and molecular immunology (Eighth edition. ed.). Philadelphia, PA: Elsevier Saunders.
- Al-Sadi R, Ye D, Boivin M, Guo S, Hashimi M, Ereifej L, Ma TY. (2014). Interleukin-6 modulation of intestinal epithelial tight junction permeability is mediated by JNK pathway activation of claudin-2 gene. *PLoS One*, 9: e85345.
- Alvestegui A, Olivares-Morales M, Munoz E, Smith R, Nataro JP, Ruiz-Perez F, Farfan MJ. (2019). TLR4 Participates in the Inflammatory Response Induced by the AAF/II Fimbriae From Enteroaggregative *Escherichia coli* on Intestinal Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*, 9: 143.
- Barnett Foster D. (2013). Modulation of the enterohemorrhagic *E. coli* virulence program through the human gastrointestinal tract. *Virulence*, 4: 315-323.
- Baumler AJ, Sperandio V. (2016). Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. *Nature*, 535: 85-93.
- Becker-Dreps S, Allali I, Monteagudo A, Vilchez S, Hudgens MG, Rogawski ET, Carroll IM, Zambrana LE, Espinoza F, Azcarate-Peril MA. (2015). Gut Microbiome Composition in Young Nicaraguan Children During Diarrhea Episodes and Recovery. *Am J Trop Med Hyg*, 93: 1187-1193.
- Bernal V, Castano-Cerezo S, Canovas M. (2016). Acetate metabolism regulation in *Escherichia coli*: carbon overflow, pathogenicity, and beyond. *Appl Microbiol Biotechnol*, 100: 8985-9001.
- Betancourt-Sanchez M, Navarro-Garcia F. (2009). Pet secretion, internalization and induction of cell death during infection of epithelial cells by enteroaggregative *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155: 2895-2906.
- Binder HJ. (2010). Role of colonic short-chain fatty acid transport in diarrhea. *Annu Rev Physiol*, 72: 297-313.
- Blount ZD. (2015). The unexhausted potential of *E. coli*. *Elife*, 4.
- Boll EJ, Struve C, Sander A, Demma Z, Krogfelt KA, McCormick BA. (2012a). Enteroaggregative *Escherichia coli* promotes transepithelial migration of neutrophils through a conserved 12-lipoxygenase pathway. *Cell Microbiol*, 14: 120-132.
- Boll EJ, Struve C, Sander A, Demma Z, Nataro JP, McCormick BA, Krogfelt KA. (2012b). The fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli* induce epithelial inflammation in vitro and in a human intestinal xenograft model. *J Infect Dis*, 206: 714-722.
- Bono R, Arnaur J. (1995). Consideraciones generales en torno a los estudios de potencia. *anales de psicología*, 11: 193-202.
- Borenshtein D, Schauer DB. (2006). The Genus *Citrobacter* (3rd ed.). New York ; London: Springer.
- Braun T, Di Segni A, BenShoshan M, Asaf R, Squires JE, Farage Barhom S, Glick Saar E, Cesarkas K, Smollan G, Weiss B, Amit S, Keller N, Haberman Y. (2017). Fecal microbial characterization of hospitalized patients with suspected infectious diarrhea shows significant dysbiosis. *Sci Rep*, 7: 1088.
- Brenner DJ, Grimont PA, Steigerwalt AG, Fanning GR, Ageron E, Riddle CF. (1993). Classification of Citrobacteria by DNA hybridization: designation of *Citrobacter farmeri* sp. nov., *Citrobacter youngae* sp. nov., *Citrobacter braakii* sp. nov., *Citrobacter werkmanni* sp. nov., *Citrobacter sedlakii* sp. nov., and three unnamed *Citrobacter* genomospecies. *Int J Syst Bacteriol*, 43: 645-658.
- Buss SN, Leber A, Chapin K, Fey PD, Bankowski MJ, Jones MK, Rogatcheva M, Kanack KJ, Bourzac KM. (2015). Multicenter evaluation of the BioFire FilmArray gastrointestinal panel for etiologic diagnosis of infectious gastroenteritis. *J Clin Microbiol*, 53: 915-925.
- Candela M, Perna F, Carnevali P, Vitali B, Ciati R, Gionchetti P, Rizzello F, Campieri M, Brigidi P. (2008). Interaction of probiotic Lactobacillus and Bifidobacterium strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Int J Food Microbiol*, 125: 286-292.
- Caporaso JG, Kuczynski J, Stombaugh J, Bittinger K, Bushman FD, Costello EK, Fierer N, Pena AG, Goodrich JK, Gordon JI, Huttley GA, Kelley ST, Knights D, Koenig JE, Ley RE, Lozupone CA, McDonald D, Muegge BD, Pirrung M, Reeder J, Sevinsky JR, Turnbaugh PJ, Walters WA, Widmann J, Yatsunencko T, Zaneveld J, Knight R. (2010). QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data. *Nat Methods*, 7: 335-336.
- Chopra V, Fadl AA, Sha J, Chopra S, Galindo CL, Chopra AK. (2006). Alterations in the virulence potential of enteric pathogens and bacterial-host cell interactions under simulated microgravity conditions. *J Toxicol Environ Health A*, 69: 1345-1370.
- Croxen MA, Finlay BB. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*, 8: 26-38.

- Croxen MA, Law RJ, Scholz R, Keeney KM, Wlodarska M, Finlay BB. (2013). Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 26: 822-880.
- Curtis MM, Hu Z, Klimko C, Narayanan S, Deberardinis R, Sperandio V. (2014). The gut commensal *Bacteroides thetaiotaomicron* exacerbates enteric infection through modification of the metabolic landscape. *Cell Host Microbe*, 16: 759-769.
- Czczulin JR, Balepur S, Hicks S, Phillips A, Hall R, Kothary MH, Navarro-Garcia F, Nataro JP. (1997). Aggregative adherence fimbria II, a second fimbrial antigen mediating aggregative adherence in enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 65: 4135-4145.
- Dahan S, Busuttill V, Imbert V, Peyron JF, Rampal P, Czerucka D. (2002). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* infection induces interleukin-8 production via activation of mitogen-activated protein kinases and the transcription factors NF-kappaB and AP-1 in T84 cells. *Infect Immun*, 70: 2304-2310.
- De Cáceres M, Legendre P. (2009). Associations between species and groups of sites: indices and statistical inference. *Ecology*, 90: 3566-3574.
- De Cáceres M, Legendre P, Moretti M. (2010). Improving indicator species analysis by combining groups of sites. *Oikos*, 119: 1674-1684.
- De la Cruz MA, Morgan JK, Ares MA, Yanez-Santos JA, Riordan JT, Giron JA. (2016). The Two-Component System CpxRA Negatively Regulates the Locus of Enterocyte Effacement of Enterohemorrhagic *Escherichia coli* Involving sigma(32) and Lon protease. *Front Cell Infect Microbiol*, 6: 11.
- Egea L, Hirata Y, Kagnoff MF. (2010). GM-CSF: a role in immune and inflammatory reactions in the intestine. *Expert Rev Gastroenterol Hepatol*, 4: 723-731.
- Farfan MJ, Cantero L, Vergara A, Vidal R, Torres AG. (2013). The long polar fimbriae of STEC O157:H7 induce expression of pro-inflammatory markers by intestinal epithelial cells. *Vet Immunol Immunopathol*, 152: 126-131.
- Farfan MJ, Cantero L, Vidal R, Botkin DJ, Torres AG. (2011). Long polar fimbriae of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 bind to extracellular matrix proteins. *Infect Immun*, 79: 3744-3750.
- Farfan MJ, Inman KG, Nataro JP. (2008). The major pilin subunit of the AAF/II fimbriae from enteroaggregative *Escherichia coli* mediates binding to extracellular matrix proteins. *Infect Immun*, 76: 4378-4384.
- Farfan MJ, Piemonte P, Labra Y, Henriquez J, Candia E, Torres JP. (2016). Panel Filmarray GI® en la detección de patógenos entéricos en deposiciones: experiencia preliminar. *Rev Chilena Infectol*, 33: 3.
- Farfan MJ, Torres AG. (2012). Molecular mechanisms that mediate colonization of Shiga toxin-producing *Escherichia coli* strains. *Infect Immun*, 80: 903-913.
- Faul F, Erdfelder E, Lang AG, Buchner A. (2007). G\*Power 3: a flexible statistical power analysis program for the social, behavioral, and biomedical sciences. *Behav Res Methods*, 39: 175-191.
- Fernandez-Prada C, Tall BD, Elliott SE, Hoover DL, Nataro JP, Venkatesan MM. (1998). Hemolysin-positive enteroaggregative and cell-detaching *Escherichia coli* strains cause oncosis of human monocyte-derived macrophages and apoptosis of murine J774 cells. *Infect Immun*, 66: 3918-3924.
- García J, Cordeiro TN, Prieto MJ, Pons M. (2012). Oligomerization and DNA binding of Ler, a master regulator of pathogenicity of enterohemorrhagic and enteropathogenic *Escherichia coli*. *Nucleic Acids Res*, 40: 10254-10262.
- Godaly G, Proudfoot AE, Offord RE, Svanborg C, Agace WW. (1997). Role of epithelial interleukin-8 (IL-8) and neutrophil IL-8 receptor A in *Escherichia coli*-induced transuroepithelial neutrophil migration. *Infect Immun*, 65: 3451-3456.
- Grys TE, Siegel MB, Latham WW, Welch RA. (2005). The StcE protease contributes to intimate adherence of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 to host cells. *Infect Immun*, 73: 1295-1303.
- Guarner F, Malagelada JR. (2003). Gut flora in health and disease. *Lancet*, 361: 512-519.
- Harrington SM, Strauman MC, Abe CM, Nataro JP. (2005). Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*, 7: 1565-1578.
- Hicks S, Candy DC, Phillips AD. (1996). Adhesion of enteroaggregative *Escherichia coli* to pediatric intestinal mucosa in vitro. *Infect Immun*, 64: 4751-4760.
- Hill DA, Artis D. (2010). Intestinal bacteria and the regulation of immune cell homeostasis. *Annu Rev Immunol*, 28: 623-667.
- Hinthong W, Indrawattana N, Pitaksajakul P, Pipattanaboon C, Kongngoen T, Tharnpoophasiam P, Worakhunpiset S. (2015). Effect of Temperature on Fimbrial Gene Expression and Adherence of Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Int J Environ Res Public Health*, 12: 8631-8643.

- Honda N, Iyoda S, Yamamoto S, Terajima J, Watanabe H. (2009). LrhA positively controls the expression of the locus of enterocyte effacement genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* by differential regulation of their master regulators PchA and PchB. *Mol Microbiol*, 74: 1393-1341.
- Hueck CJ. (1998). Type III protein secretion systems in bacterial pathogens of animals and plants. *Microbiol Mol Biol Rev*, 62: 379-433.
- Iversen H, Lindback T, L'Abée-Lund TM, Roos N, Aspholm M, Stenfors Arnesen L. (2015). The gut bacterium *Bacteroides thetaiotaomicron* influences the virulence potential of the enterohemorrhagic *Escherichia coli* O103:H25. *PLoS One*, 10: e0118140.
- Izquierdo M, Alvestegui A, Nataro JP, Ruiz-Perez F, Farfan MJ. (2014). Participation of integrin alpha5beta1 in the fibronectin-mediated adherence of enteroaggregative *Escherichia coli* to intestinal cells. *Biomed Res Int*, 2014: 781246.
- Jonsson R, Struve C, Jenssen H, Krogfelt KA. (2017). The wax moth *Galleria mellonella* as a novel model system to study Enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Virulence*, 8: 1894-1899.
- Jubelin G, Desvaux M, Schuller S, Etienne-Mesmin L, Muniesa M, Blanquet-Diot S. (2018). Modulation of Enterohaemorrhagic *Escherichia coli* Survival and Virulence in the Human Gastrointestinal Tract. *Microorganisms*, 6.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*, 2: 123-140.
- Khan MA, Kang J, Steiner TS. (2004). Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires Toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology*, 112: 651-660.
- Kruger M, Pietsch J, Bauer J, Kopp S, Carvalho DTO, Baatout S, Moreels M, Melnik D, Wehland M, Egli M, Jayashree S, Kobbero SD, Corydon TJ, Nebuloni S, Gass S, Evert M, Infanger M, Grimm D. (2019). Growth of Endothelial Cells in Space and in Simulated Microgravity - a Comparison on the Secretory Level. *Cell Physiol Biochem*, 52: 1039-1060.
- Kuhn KA, Manieri NA, Liu TC, Stappenbeck TS. (2014). IL-6 stimulates intestinal epithelial proliferation and repair after injury. *PLoS One*, 9: e114195.
- Lackraj T, Kim JI, Tran SL, Barnett Foster DE. (2016). Differential modulation of flagella expression in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7 by intestinal short-chain fatty acid mixes. *Microbiology*, 162: 1761-1772.
- Latham WW, Grys TE, Witowski SE, Torres AG, Kaper JB, Tarr PI, Welch RA. (2002). StcE, a metalloprotease secreted by *Escherichia coli* O157:H7, specifically cleaves C1 esterase inhibitor. *Mol Microbiol*, 45: 277-288.
- Liu M, Guo S, Hibbert JM, Jain V, Singh N, Wilson NO, Stiles JK. (2011). CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. *Cytokine Growth Factor Rev*, 22: 121-130.
- Ludwig W, Strunk O, Westram R, Richter L, Meier H, Yadukumar, Buchner A, Lai T, Steppi S, Jobb G, Forster W, Brettske I, Gerber S, Ginhart AW, Gross O, Grumann S, Hermann S, Jost R, König A, Liss T, Lussmann R, May M, Nonhoff B, Reichel B, Strehlow R, Stamatakis A, Stuckmann N, Vilbig A, Lenke M, Ludwig T, Bode A, Schleifer KH. (2004). ARB: a software environment for sequence data. *Nucleic Acids Res*, 32: 1363-1371.
- Lupp C, Robertson ML, Wickham ME, Sekirov I, Champion OL, Gaynor EC, Finlay BB. (2007). Host-mediated inflammation disrupts the intestinal microbiota and promotes the overgrowth of Enterobacteriaceae. *Cell Host Microbe*, 2: 204.
- Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere MF. (2013). Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol*, 21: 167-173.
- Miyamoto Y, Iimura M, Kaper JB, Torres AG, Kagnoff MF. (2006). Role of Shiga toxin versus H7 flagellin in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* signalling of human colon epithelium in vivo. *Cell Microbiol*, 8: 869-879.
- Morgan JK, Ortiz JA, Riordan JT. (2014). The role for TolA in enterohemorrhagic *Escherichia coli* pathogenesis and virulence gene transcription. *Microb Pathog*, 77: 42-52.
- Nakanishi N, Tashiro K, Kuhara S, Hayashi T, Sugimoto N, Tobe T. (2009). Regulation of virulence by butyrate sensing in enterohaemorrhagic *Escherichia coli*. *Microbiology*, 155: 521-530.
- Nataro JP, Hicks S, Phillips AD, Vial PA, Sears CL. (1996). T84 cells in culture as a model for enteroaggregative *Escherichia coli* pathogenesis. *Infect Immun*, 64: 4761-4768.
- Nataro JP, Kaper JB. (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev*, 11: 142-201.
- Navarro-García F, Sonnested M, Teter K. (2010). Host-Toxin Interactions Involving EspC and Pet, Two Serine Protease Autotransporters of the Enterobacteriaceae. *Toxins (Basel)*, 2: 1134-1147.

- Nossa CW, Oberdorf WE, Yang L, Aas JA, Paster BJ, Desantis TZ, Brodie EL, Malamud D, Poles MA, Pei Z. (2010). Design of 16S rRNA gene primers for 454 pyrosequencing of the human foregut microbiome. *World J Gastroenterol*, 16: 4135-4144.
- O'Ryan ML, Rabello M, Cortes H, Lucero Y, Pena A, Torres JP. (2013). Dynamics of *Helicobacter pylori* detection in stools during the first 5 years of life in Chile, a rapidly developing country. *Pediatr Infect Dis J*, 32: 99-103.
- Oh MK, Rohlin L, Kao KC, Liao JC. (2002). Global expression profiling of acetate-grown *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 277: 13175-13183.
- Organization WH. (2014). *World Health Statistics*. In: Geneva: WHO Press.
- Ossa JC, Yanez D, Valenzuela R, Gallardo P, Lucero Y, Farfan MJ. (2018). Intestinal Inflammation in Chilean Infants Fed With Bovine Formula vs. Breast Milk and Its Association With Their Gut Microbiota. *Front Cell Infect Microbiol*, 8: 190.
- Pacheco AR, Sperandio V. (2015). Enteric Pathogens Exploit the Microbiota-generated Nutritional Environment of the Gut. *Microbiol Spectr*, 3.
- Palmer C, Bik EM, DiGiulio DB, Relman DA, Brown PO. (2007). Development of the human infant intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5: e177.
- Pop M, Walker AW, Paulson J, Lindsay B, Antonio M, Hossain MA, Oundo J, Tamboura B, Mai V, Astrovskaya I, Corrada Bravo H, Rance R, Stares M, Levine MM, Panchalingam S, Kotloff K, Ikumapayi UN, Ebruke C, Adeyemi M, Ahmed D, Ahmed F, Alam MT, Amin R, Siddiqui S, Ochieng JB, Ouma E, Juma J, Mailu E, Omoro R, Morris JG, Breiman RF, Saha D, Parkhill J, Nataro JP, Stine OC. (2014). Diarrhea in young children from low-income countries leads to large-scale alterations in intestinal microbiota composition. *Genome Biol*, 15: R76.
- Pruesse E, Peplies J, Glockner FO. (2012). SINA: accurate high-throughput multiple sequence alignment of ribosomal RNA genes. *Bioinformatics*, 28: 1823-1829.
- Qin J, Li R, Raes J, Arumugam M, Burgdorf KS, Manichanh C, Nielsen T, Pons N, Levenez F, Yamada T, Mende DR, Li J, Xu J, Li S, Li D, Cao J, Wang B, Liang H, Zheng H, Xie Y, Tap J, Lepage P, Bertalan M, Batto JM, Hansen T, Le Paslier D, Linneberg A, Nielsen HB, Pelletier E, Renault P, Sicheritz-Ponten T, Turner K, Zhu H, Yu C, Li S, Jian M, Zhou Y, Li Y, Zhang X, Li S, Qin N, Yang H, Wang J, Brunak S, Dore J, Guarner F, Kristiansen K, Pedersen O, Parkhill J, Weissenbach J, Meta HITC, Bork P, Ehrlich SD, Wang J. (2010). A human gut microbial gene catalogue established by metagenomic sequencing. *Nature*, 464: 59-65.
- Quast C, Pruesse E, Yilmaz P, Gerken J, Schweer T, Yarza P, Peplies J, Glockner FO. (2013). The SILVA ribosomal RNA gene database project: improved data processing and web-based tools. *Nucleic Acids Res*, 41: D590-596.
- Ramarao N, Nielsen-Leroux C, Lereclus D. (2012). The insect *Galleria mellonella* as a powerful infection model to investigate bacterial pathogenesis. *J Vis Exp*: e4392.
- Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra R, Chin CS, Iliopoulos D, Klammer A, Peluso P, Lee L, Kislyuk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyert SR, Fridmodt-Moller J, Struve C, Petersen AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE, Waldor MK. (2011). Origins of the *E. coli* strain causing an outbreak of hemolytic-uremic syndrome in Germany. *N Engl J Med*, 365: 709-717.
- Rocha-Ramirez LM, Hernandez-Chinas U, Banos-Rojas D, Xicohtencatl-Cortes J, Chavez-Berrocal ME, Rico-Rosillo G, Kretschmer R, Eslava CA. (2016). Pet serine protease from enteroaggregative *Escherichia coli* stimulates the inflammatory response activating human macrophages. *BMC Microbiol*, 16: 158.
- Roger LC, McCartney AL. (2010). Longitudinal investigation of the faecal microbiota of healthy full-term infants using fluorescence in situ hybridization and denaturing gradient gel electrophoresis. *Microbiology*, 156: 3317-3328.
- Rogers GB, Bruce KD. (2010). Next-generation sequencing in the analysis of human microbiota: essential considerations for clinical application. *Mol Diagn Ther*, 14: 343-350.
- Rosenzweig JA, Ahmed S, Eunson J, Jr., Chopra AK. (2014). Low-shear force associated with modeled microgravity and spaceflight does not similarly impact the virulence of notable bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol*, 98: 8797-8807.
- Salerno-Goncalves R, Fasano A, Szein MB. (2011). Engineering of a multicellular organotypic model of the human intestinal mucosa. *Gastroenterology*, 141: e18-20.
- Salerno-Goncalves R, Fasano A, Szein MB. (2016a). Development of a Multicellular Three-dimensional Organotypic Model of the Human Intestinal Mucosa Grown Under Microgravity. *J Vis Exp*.

- Salerno-Goncalves R, Safavie F, Fasano A, Sztein MB. (2016b). Free and complexed-secretory immunoglobulin A triggers distinct intestinal epithelial cell responses. *Clin Exp Immunol*, 185: 338-347.
- Sartor RB. (2012). Gut microbiota: Diet promotes dysbiosis and colitis in susceptible hosts. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 9: 561-562.
- Schloss PD, Westcott SL, Ryabin T, Hall JR, Hartmann M, Hollister EB, Lesniewski RA, Oakley BB, Parks DH, Robinson CJ, Sahl JW, Stres B, Thallinger GG, Van Horn DJ, Weber CF. (2009). Introducing mothur: open-source, platform-independent, community-supported software for describing and comparing microbial communities. *Appl Environ Microbiol*, 75: 7537-7541.
- Silva MJ, Carneiro MB, dos Anjos Pultz B, Pereira Silva D, Lopes ME, dos Santos LM. (2015). The multifaceted role of commensal microbiota in homeostasis and gastrointestinal diseases. *J Immunol Res*, 2015: 321241.
- Sim K, Cox MJ, Wopereis H, Martin R, Knol J, Li MS, Cookson WO, Moffatt MF, Kroll JS. (2012). Improved detection of bifidobacteria with optimised 16S rRNA-gene based pyrosequencing. *PLoS One*, 7: e32543.
- Stadnyk AW. (2002). Intestinal epithelial cells as a source of inflammatory cytokines and chemokines. *Can J Gastroenterol*, 16: 241-246.
- Stecher B. (2015). The Roles of Inflammation, Nutrient Availability and the Commensal Microbiota in Enteric Pathogen Infection. *Microbiol Spectr*, 3.
- Stecher B, Robbiani R, Walker AW, Westendorf AM, Barthel M, Kremer M, Chaffron S, Macpherson AJ, Buer J, Parkhill J, Dougan G, von Mering C, Hardt WD. (2007). *Salmonella* enterica serovar typhimurium exploits inflammation to compete with the intestinal microbiota. *PLoS Biol*, 5: 2177-2189.
- Steinhoff U. (2005). Who controls the crowd? New findings and old questions about the intestinal microflora. *Immunol Lett*, 99: 12-16.
- Takada Y, Hisamatsu T, Kamada N, Kitazume MT, Honda H, Oshima Y, Saito R, Takayama T, Kobayashi T, Chinen H, Mikami Y, Kanai T, Okamoto S, Hibi T. (2010). Monocyte chemoattractant protein-1 contributes to gut homeostasis and intestinal inflammation by composition of IL-10-producing regulatory macrophage subset. *J Immunol*, 184: 2671-2676.
- Tobe T, Nakanishi N, Sugimoto N. (2011). Activation of motility by sensing short-chain fatty acids via two steps in a flagellar gene regulatory cascade in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 79: 1016-1024.
- Tojo R, Suarez A, Clemente MG, de los Reyes-Gavilan CG, Margolles A, Gueimonde M, Ruas-Madiedo P. (2014). Intestinal microbiota in health and disease: role of bifidobacteria in gut homeostasis. *World J Gastroenterol*, 20: 15163-15176.
- Torres AG, Giron JA, Perna NT, Burland V, Blattner FR, Avelino-Flores F, Kaper JB. (2002). Identification and characterization of lpfABCC'DE, a fimbrial operon of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Infect Immun*, 70: 5416-5427.
- Torres AG, Kanack KJ, Tutt CB, Popov V, Kaper JB. (2004). Characterization of the second long polar (LP) fimbriae of *Escherichia coli* O157:H7 and distribution of LP fimbriae in other pathogenic *E. coli* strains. *FEMS Microbiol Lett*, 238: 333-344.
- Torres AG, Zhou X, Kaper JB. (2005). Adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains to epithelial cells. *Infect Immun*, 73: 18-29.
- Tsai CJ, Loh JM, Proft T. (2016). *Galleria mellonella* infection models for the study of bacterial diseases and for antimicrobial drug testing. *Virulence*, 7: 214-229.
- Tyler AD, Smith MI, Silverberg MS. (2014). Analyzing the human microbiome: a "how to" guide for physicians. *Am J Gastroenterol*, 109: 983-993.
- Ugalde-Silva P, Gonzalez-Lugo O, Navarro-Garcia F. (2016). Tight Junction Disruption Induced by Type 3 Secretion System Effectors Injected by Enteropathogenic and Enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Front Cell Infect Microbiol*, 6: 87.
- Van Kampen C, Gauldie J, Collins SM. (2005). Proinflammatory properties of IL-4 in the intestinal microenvironment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 288: G111-117.
- Vayssier-Taussat M, Albina E, Citti C, Cosson JF, Jacques MA, Lebrun MH, Le Loir Y, Ogliastro M, Petit MA, Roumagnac P, Candresse T. (2014). Shifting the paradigm from pathogens to pathobiome: new concepts in the light of meta-omics. *Front Cell Infect Microbiol*, 4: 29.
- Vergara AF, Vidal RM, Torres AG, Farfan MJ. (2014). Long polar fimbriae participates in the induction of neutrophils transepithelial migration across intestinal cells infected with enterohemorrhagic *E. coli* O157:H7. *Front Cell Infect Microbiol*, 4: 185.

- Vidal R, Ginard D, Khorrami S, Mora-Ruiz M, Munoz R, Hermoso M, Diaz S, Cifuentes A, Orfila A, Rossello-Mora R. (2015). Crohn associated microbial communities associated to colonic mucosal biopsies in patients of the western Mediterranean. *Syst Appl Microbiol*, 38: 442-452.
- Waldner MJ, Neurath MF. (2014). Master regulator of intestinal disease: IL-6 in chronic inflammation and cancer development. *Semin Immunol*, 26: 75-79.
- Walters M, Sperandio V. (2006). Autoinducer 3 and epinephrine signaling in the kinetics of locus of enterocyte effacement gene expression in enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun*, 74: 5445-5455.
- Weisburg WG, Barns SM, Pelletier DA, Lane DJ. (1991). 16S ribosomal DNA amplification for phylogenetic study. *J Bacteriol*, 173: 697-703.
- Wu X, Dolecki GJ, Lefkowitz JB. (1995). GRO chemokines: a transduction, integration, and amplification mechanism in acute renal inflammation. *Am J Physiol*, 269: F248-256.
- Yamamoto D, Hernandez RT, Liberatore AM, Abe CM, Souza RB, Romao FT, Sperandio V, Koh IH, Gomes TA. (2017). *Escherichia albertii*, a novel human enteropathogen, colonizes rat enterocytes and translocates to extra-intestinal sites. *PLoS One*, 12: e0171385.
- Yanez D, Izquierdo M, Ruiz-Perez F, Nataro JP, Giron JA, Vidal RM, Farfan MJ. (2016). The Role of Fibronectin in the Adherence and Inflammatory Response Induced by Enteroaggregative *Escherichia coli* on Epithelial Cells. *Front Cell Infect Microbiol*, 6: 166.
- Yang F, Yang L, Chang Z, Chang L, Yang B. (2018). Regulation of virulence and motility by acetate in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Int J Med Microbiol*, 308: 840-847.
- Yarza P, Yilmaz P, Pruesse E, Glockner FO, Ludwig W, Schleifer KH, Whitman WB, Euzéby J, Amann R, Rossello-Mora R. (2014). Uniting the classification of cultured and uncultured bacteria and archaea using 16S rRNA gene sequences. *Nat Rev Microbiol*, 12: 635-645.
- Zhou X, Giron JA, Torres AG, Crawford JA, Negrete E, Vogel SN, Kaper JB. (2003). Flagellin of enteropathogenic *Escherichia coli* stimulates interleukin-8 production in T84 cells. *Infect Immun*, 71: 2120-2129.
- Zuur AF, Ieno EN, Smith GM. (2007). *Analysing ecological data*. New York ; London: Springer.