



UNIVERSIDAD DE CHILE

Facultad de Ciencias Químicas y Farmacéuticas

Departamento de Bioquímica y Biología Molecular

Memoria para optar al Título Profesional de Bioquímico

**Estudio de la reactividad de anticuerpos anti-CS20 con
los factores de colonización CS27 y CS30 de
Escherichia coli enterotoxigénica**

IGNACIO FRANCISCO MUÑOZ ASTETE

Director de Memoria:

Dr. Felipe Del Canto Fuentes

Programa de Microbiología y
Micología, ICBM

Facultad de Medicina, Universidad
de Chile

Profesor Patrocinante:

Dr. Sergio Álvarez Armijo

Departamento de Bioquímica y
Biología Molecular

Facultad de Ciencias Químicas y
Farmacéuticas, Universidad de Chile

Santiago, 2021

Este trabajo fue realizado en el programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas, en la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. Fue financiado por el Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT) proyecto 11150966 y Líneas de Apoyo a la Investigación del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina, Universidad de Chile.

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CONTENIDOS	iii
ÍNDICE DE FIGURAS	vi
ÍNDICE DE TABLAS	vii
RESUMEN	viii
ABSTRACT	ix

ÍNDICE DE CONTENIDOS

1. INTRODUCCIÓN	1
1. 1 <i>Escherichia coli</i> y su rol como patógeno.....	1
1. 2 <i>Escherichia coli</i> diarreogénicas	1
1. 3 <i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC).....	3
1. 4 Factores de colonización (CFs) de ETEC.....	4
1. 5 Pili CU.....	5
1. 6 CFs de ETEC de la Familia λ	7
1. 7 Vacunas para ETEC	8
1. 8 Reactividad cruzada de anticuerpos en la familia de los CFs- λ	11
2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	14

iii

2. 1 Hipótesis.....	14
2. 2 Objetivo general.....	14
2. 3 Objetivos específicos.....	14
3. MATERIALES Y MÉTODOS.....	15
3. 1 Cepas bacterianas.....	15
3. 2 Preparación de las cepas <i>E. coli</i> utilizadas.....	18
3. 2. 1 Deleción de loci codificantes de CFs en cepas ETEC.....	18
3. 2. 2 Clonamiento de loci codificantes de CFs.....	23
3. 3 Electroforesis de extractos proteicos de superficie y <i>Western blot</i>	26
3. 4 Inmunomarcación con oro coloidal y microscopía electrónica de transmisión	29
3. 5 Ensayos de adherencia a células Caco-2.....	30
3. 6 Ensayos de bloqueo de adherencia a células Caco-2 con anticuerpos anti-CsnA.....	32
3. 7 Análisis estadístico	33
4. RESULTADOS.....	34
4. 1 Anticuerpos anti-CsnA reaccionan con subunidades estructurales principales de CS27 y CS30.....	34
4. 2 CS27 y CS30 son determinantes de adherencia de ETEC	43

4. 3 Anticuerpos anti-CsnA no alteran los niveles de adherencia de ETEC productoras de CS27 y CS30	45
5. DISCUSIÓN	47
5. 1 Reactividad de los anticuerpos anti-CsnA con los pili CS27 y CS30	48
5. 2 Rol de CS27 y CS30 en adherencia de ETEC y DH10B	51
5. 3 Anticuerpos anti-CsnA no bloquean la adherencia de ETEC a células Caco-2	53
5. 4 Importancia de la funcionalidad de CS27 como determinante de adherencia de ETEC	54
6. CONCLUSIONES	56
7. REFERENCIAS	57

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Mecanismo de ensamblaje de Pili CU.....	5
Figura 2. Matriz de identidad de subunidades estructurales principales de los CFs- 2	13
Figura 3. Esquematización de las distintas versiones de los loci de CS27 y CS30.....	26
Figura 4. Identificación y chequeo por PCR de cepas ETEC mutantes.	35
Figura 5. Chequeo del clonamiento de locus codificante de CS30 en vector pEZ-BAC.....	37
Figura 6. Detección de CS27 en extractos de superficie de cepas ETEC y DH10B separados por SDS-PAGE.....	39
Figura 7. Detección de CS30 en extractos de superficie de cepas ETEC y DH10B separados por SDS-PAGE.....	40
Figura 9. Determinación del nivel de adherencia bacteriana a células Caco-2.	44
Figura 10. Ensayos de bloqueo de adherencia con anticuerpos anti-CsnA, sobre células Caco-2.	46

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. CFs de ETEC asociadas a humanos, en las distintas familias de pili CU	6
Tabla 2. Cepas de <i>E. coli</i> utilizadas en este trabajo.	15
Tabla 3. Plásmidos utilizados en este trabajo.....	16
Tabla 4. Lista de partidores de PCR utilizados en este trabajo	16

RESUMEN

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es uno de los principales patógenos causantes de diarrea en el mundo, siendo responsable de miles de muertes anuales. Los factores de colonización (CFs) son importantes por su rol en la patogenicidad de ETEC y, de ellos, los que pertenecen a la familia α_2 (CF- α_2) han sido de interés recientemente. En este trabajo, se estudió la reactividad cruzada de anticuerpos policlonales dirigidos contra CsnA, la subunidad estructural principal de CS20, un CF- α_2 , con las cepas ETEC 603388 y 702947, productoras de CS27 y CS30, respectivamente, además de analizar la funcionalidad de CS27. Ensayos de *Western blot* muestran que hay reactividad con el anticuerpo anti-CsnA en las cepas silvestres y no en las mutantes carentes de CS27 o CS30. Ensayos de inmunomarcación con oro coloidal también evidenciaron reactividad cruzada. Ensayos sobre células Caco-2 mostraron que hubo disminuciones significativas en el nivel de adherencia de las cepas mutantes de CS27 y CS30 con respecto a las silvestres, y estos niveles fueron restablecidos con la complementación de CS27, pero no de CS30. El efecto de los anticuerpos a nivel funcional también fue evaluado en ensayos de adherencia. Los resultados indican que los anticuerpos no alteran significativamente la adherencia de las cepas ETEC productoras de CS27 o CS30. En este trabajo se comprueba la funcionalidad de CS27 como pilus de adherencia de ETEC y se confirma la reactividad cruzada entre los anticuerpos anti-CsnA con CS27 y CS30.

**Study of the reactivity of anti-CS20 antibodies with CS27 and CS30
colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli***

ABSTRACT

Enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) is one of the leading causes of diarrhea in the world, causing to thousands of deaths per year. Colonization factors (CFs) are important because of their role in ETEC pathogenicity, and those of the α_2 family (CFs- α_2) in particular have recently been of interest. In this work, the cross-reactivity between polyclonal antibodies developed against CsnA, the major structural subunit of CS20, a CF- α_2 , and ETEC strains 603388 and 702947, producing CS27 and CS30, respectively, was studied, along with the analysis of the functionality of CS27. Western blot assays showed the reactivity between the anti-CsnA antibodies and the wild-type strains, and not in the mutant strains lacking CS27 or CS30. Immunogold staining assays gave similar results, indicating that there is indeed cross-reactivity. Cell adherence assays on Caco-2 cells showed that there were significant decreases in the mutant strains compared to the wild strains, and these levels were restored with the complementation of CS27, but not of CS30. The functional effect of the antibodies was evaluated in similar adherence assays. The results indicated that the antibodies do not significantly alter the adherence of ETEC producing CS27 or CS30. In this work, the function of CS27 as an ETEC adherence determinant was proven, along with the cross-reactivity of anti-CsnA antibodies with CS27 and CS30.

1. INTRODUCCIÓN

1. 1 Escherichia coli y su rol como patógeno

Escherichia coli es la especie modelo del género *Escherichia*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*. Es un bacilo gramnegativo y uno de los anaerobios facultativos más abundantes en la microbiota intestinal del ser humano [1, 2, 3]. Como un organismo mutualista, es generalmente inocuo y benéfico para el hospedero, aunque potencialmente dañino en individuos inmunodeprimidos [1, 3]. Sin embargo, la alta variabilidad genómica de *E. coli* dada por su propensión a ganar o perder contenido genético por vías como la transferencia horizontal de genes, determinada en parte por la presencia de elementos móviles como plásmidos y bacteriófagos [3], ha dado origen a cepas patogénicas altamente especializadas, productoras de diversos factores de virulencia, entre ellos adhesinas, toxinas y sistemas de adquisición de hierro, entre otros [4, 5]. Estas *E. coli* patogénicas son capaces de colonizar prácticamente todos los tejidos del cuerpo, siendo los más frecuentes el tracto gastrointestinal, las vías urinarias y el torrente sanguíneo, pudiendo ocasionar enfermedades tan variadas como diarrea, infecciones urinarias, septicemia y meningitis, entre otras [2, 5, 6].

1. 2 Escherichia coli diarreogénicas

De especial importancia es la diarrea, que es un gran problema de salud pública a nivel mundial. Considerada la quinta causa de muerte temprana más

frecuente en el mundo [7], esta enfermedad se encuentra distribuida globalmente, aunque existe un mayor índice de morbilidad y mortalidad en países donde el acceso a agua potable es restringido y las condiciones de salud e higiene son precarios, especialmente de Asia y África subsahariana [8, 9, 10]. Aunque puede ser contraída a cualquier edad, los niños menores de cinco años son el grupo etario proporcionalmente más afectado, en los que se tienen 1700 millones de casos por año en todo el mundo y entre 400.000 y 500.000 muertes anuales, representando a más de un cuarto de la cifra total de casos [11, 12, 13].

La diarrea puede ser causada por diversos factores, pero el más importante es la infección por agentes parasitarios, virales o bacterianos [8, 9, 10], entre los que *Escherichia coli* es uno de los principales. Colectivamente conocidas como *Escherichia coli* diarreogénicas (DEC, del inglés *diarrheagenic E. coli*) [1, 2, 3, 6], éstas son un subgrupo de las *Escherichia coli* patogénicas que se caracteriza por colonizar y adherirse a la superficie mucosa del intestino, causando diarrea [1]. En base a sus factores de virulencia y a su mecanismo patogénico, se han definido seis patotipos o patovares: *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteropatogénica (EPEC) y *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) [1, 2, 6]. Además, es posible encontrar cepas híbridas que son más difíciles de clasificar debido a que pueden presentar factores de virulencia correspondientes a más de un grupo y podrían ser potencialmente más virulentas que una cepa de una categoría pura [2].

1. 3 Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC)

Escherichia coli enterotoxigénica (ETEC) es uno de los agentes infecciosos de diarrea más importantes y es especialmente prevalente en los países donde la diarrea es un problema de salud prioritario. También es causante de hasta el 60% de los casos de la diarrea del viajero, un cuadro clínico desarrollado por personas que visitan regiones de Asia, África y Latinoamérica donde el patógeno es endémico [13, 14]. Solo en el año 2016, ETEC fue responsable de más de 50.000 muertes, de las que 18.000 correspondieron a niños menores a cinco años [9].

La principal característica de ETEC es la producción de enterotoxinas, que pueden ser de tipo termoestable (ST) o de tipo termolábil (LT). Una cepa ETEC puede producir solo un tipo o ambos simultáneamente [1, 2, 13]. Las enterotoxinas provocan un aumento en los niveles intracelulares de cAMP o cGMP (LT y ST, respectivamente), lo que tiene como resultado la estimulación de canales de cloruro, como el regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR), además de la inhibición de la absorción de sodio y cloruro [13, 15]. Esto lleva al desbalance y la salida de electrolitos y agua desde el citoplasma de los enterocitos hacia el lumen intestinal, siendo este el principal componente de la diarrea acuosa no inflamatoria propia del cuadro clínico causado por ETEC [2, 3].

1. 4 Factores de colonización (CFs) de ETEC

El mecanismo patogénico de ETEC requiere de un primer paso esencial, que consiste en la colonización de la superficie del epitelio del intestino delgado. Para hacerlo, ETEC cuenta con una amplia variedad de adhesinas y, entre ellas, están los factores de colonización (CFs), pili o fimbrias que pueden tener diversas morfologías [1, 2, 15]. Un pilus (plural: *pili*) es una estructura accesoria de la bacteria, de naturaleza proteica, que se proyecta hacia el espacio extracelular y permite, entre otras funciones, la adherencia a superficies. Una cepa dada es capaz de adherirse a una superficie específica de acuerdo al repertorio de pili que posea [2, 15]. Un ejemplo de esto es que, si bien la presencia de pili es una característica que comparten tanto las *E. coli* patogénicas como las cepas no patogénicas, ETEC se ha especializado en colonizar el epitelio del intestino delgado, a diferencia de las *E. coli* comensales que se encuentran principalmente en el colon, lo que es favorable para ETEC debido a la menor competencia por nutrientes a causa de la menor densidad de población de la microbiota local [1, 15]. Para dar cuenta de su relación filogénica, los pili se han clasificado en base a su mecanismo de ensamblaje, definiéndose cuatro grupos: pili conjugativos, pili tipo IV, pili ensamblados por la vía de nucleación extracelular y pili ensamblados por la vía chaperona-ujier (pili CU) [15].

Hasta el momento, se han descrito 24 CFs de ETEC. A excepción del primer CF descubierto, CFA/I, todos han sido denominados de acuerdo a un sistema de nomenclatura que consta de las letras CS (por *coli surface antigen*,

antígeno de superficie de *coli*) más un número asociado al orden en que fue descubierto (por ejemplo, CS1, CS2, CS3, etc.) [14]. La gran mayoría de los CFs de ETEC son ensamblados por la vía CU y solo dos corresponden a pili tipo IV [15].

1. 5 Pili CU

La vía CU es responsable de ensamblar 20 de los 24 CFs de ETEC [15]. Consta esencialmente de una o más proteínas chaperonas que se encargan de plegar y estabilizar a las pilinas, las unidades proteicas del pilus, en el periplasma, y transportarlas hacia el ujier, una proteína integral de la membrana externa que sirve de andamio de ensamblaje para el pilus, y donde las pilinas son polimerizadas (**Figura 1**) [16, 17].

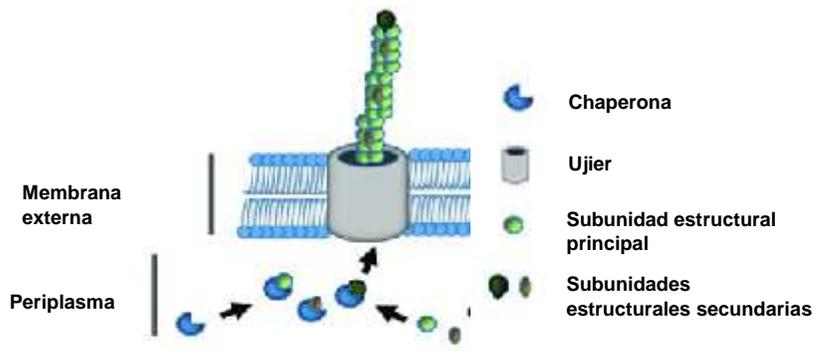


Figura 1. Mecanismo de ensamblaje de Pili CU. Las chaperonas transportan las subunidades estructurales (pilinas) hasta el ujier, una proteína transmembrana utilizada como base para armar el pilus en la superficie de la bacteria. Modificado de Del Canto y cols., 2017 [18].

En ETEC, todos los pili CU están compuestos por más de una pilina [15], con la más abundante denominada subunidad estructural principal, y el resto como subunidad estructural secundaria o accesoria. A nivel genético, los pili CU suelen ser codificados por operones en los que, además de los genes de las pilinas, también se encuentran codificados las chaperonas y el ujier [15, 17]. Un operón o clúster genético codifica más de una pilina y puede codificar más de una chaperona, por lo que la clasificación de los pili CU se basa en la secuencia de la proteína ujier, ya que en todos los casos solo existe un gen codificante para ella [15]. En base a este sistema, se han designado las familias α , β , γ (siendo esta subdividida adicionalmente en γ_1 , γ_2 , γ_3 y γ_4 , por ser la más numerosa), δ , ϵ y ζ [16, 17, 18]. Esta clasificación da cuenta de la relación filogénica entre los distintos pili CU y en algunos casos también permite predecir la organización génica de los operones en fases iniciales de su estudio [16]. En cepas ETEC que infectan humanos, solo se han detectado CFs pertenecientes a las familias α , β , γ_1 , γ_2 , γ_3 y ζ (**Tabla 1**) [15, 19, 20, 21].

Tabla 1. CFs de ETEC asociadas a humanos, en las distintas familias de pili CU

	2	3	
CFA/I	CS12	CS3	CS13
CS1	CS18	CS6	CS23
CS2	CS20		
CS4	CS26		
CS5	CS27*		
CS14	CS28*		
CS17	CS30		
CS19			

*Su funcionalidad aún no ha sido confirmada experimentalmente.

1. 6 CFs de ETEC de la Familia 2

La probabilidad de encontrar un CF determinado en un aislado clínico de ETEC varía entre las distintas familias de pili CU. Por ejemplo, se ha reportado que el 50-80% de los casos en los que se detecta un CF en aislados clínicos de ETEC corresponden a miembros de las familias (principalmente CFA/I, CS1, CS5 y CS14) y 3 (CS3 y CS6) [22]. Sin embargo, un problema importante a considerar en la epidemiología de ETEC es el porcentaje relativamente alto de aislados en los que no se detectan CFs conocidos, llegando a ser el 25-30% del total de casos [23, 24]. Entre estos casos de ETEC carentes de CFs conocidos, se han encontrado con frecuencia cepas que portan nuevos loci de CFs, no descritos previamente, homólogos a loci de fimbrias la familia 2[18]. Esto, junto con el descubrimiento y caracterización reciente de nuevos miembros de la familia, como CS26 y CS30 [19, 20, 21], ha llevado a considerar a los CFs 2 como un subgrupo de CFs de ETEC cuya importancia podría estar siendo subestimada. En adición a los integrantes mejor conocidos de la familia, CS12, CS18 y CS20 (junto con 987P, que es otro miembro de la familia, presente solo en cepas ETEC que infectan porcinos [15]), en 2011 se describieron secuencias parciales de genes que codificarían posibles pili asociados a la familia, siendo denominados preliminarmente como CS26, CS27 y CS28 [20]. De estos tres, la funcionalidad de CS26 como un pilus de adherencia fue confirmada en 2018 [19]. La identificación y caracterización de CS30 en 2017 [21], sumado a los hallazgos ya mencionados, han aumentado el número de representantes de la familia 2.

Por otra parte, en 2017, se identificaron cepas de ETEC que poseen loci de potenciales CF-₂, y aunque su funcionalidad no fue estudiada en profundidad, el hallazgo sugiere que el número total de integrantes de la familia ₂ sería aún mayor [18, 25].

1. 7 Vacunas para ETEC

Actualmente no existen vacunas licenciadas para prevenir los efectos de la infección por ETEC [26]. Se ha recomendado como medida preventiva provisional la utilización de vacunas contra el cólera como Dukoral® debido a la similitud en secuencia y estructura entre las enterotoxinas LT y la toxina del cólera [27, 28], aunque solo confiere protección limitada [27]. Un obstáculo importante para el desarrollo de una vacuna eficaz es la diversidad de factores de virulencia y posibles inmunógenos que pueden encontrarse en distintas cepas ETEC [27, 29]. Varias formulaciones han sido ensayadas en pruebas clínicas. Una vacuna generada a partir de la cepa prototipo ETEC H10407 (cepa muerta), junto con ACE527, compuesta por tres cepas atenuadas, y rCTb-CF, compuesta por cinco cepas inactivadas con formalina, además de ser algunas de las primeras vacunas desarrolladas, también han sido las más importantes y han sido los principales representantes de la tecnología de vacuna de célula entera [26, 30]. Las desventajas asociadas a este tipo de vacunas, como una respuesta inmune amplia y dispersa ante múltiples antígenos bacterianos, la presencia de posibles componentes tóxicos y el potencial desarrollo de efectos adversos, ha impulsado la investigación de alternativas basadas en el uso de antígenos puntuales, bien

caracterizados, que apunten con mayor precisión a la interferencia de los mecanismos de patogenicidad [30]. Los CFs han sido candidatos importantes debido a que son componentes indispensables en la patogenia de ETEC, junto con las enterotoxinas, y bloquear su capacidad de adherencia sería esencial para prevenir la enfermedad [21, 31]. Se han evaluado distintas preparaciones de CFs que hacen uso de su capacidad inmunogénica: pili purificados, ETEC atenuadas o inactivadas que expresen CFs, subunidades estructurales de los CFs, o ETEC mutantes que sobreexpresan CFs en su superficie, entre otras [23, 32, 33]. Sin embargo, un obstáculo importante es la amplia variedad de CFs encontrados en distintas cepas y que presentan una diversa distribución geográfica, lo que implica que un CF en particular puede encontrarse más frecuentemente en una región que en otras en donde es raro o no está presente [21,30]. Una de las alternativas para afrontar este problema es la tecnología de las vacunas de antígeno de fusión multiepítopo (MEFA), en las que se construye una proteína quimérica inmunogénica a partir de varios epítomos, con el objetivo de inducir respuestas de anticuerpos contra múltiples blancos. Este tipo de candidatos a vacunas ya ha mostrado resultados prometedores, en fases preclínicas, contra cepas de ETEC productoras de los CFs CFA/I, CS1, CS2, CS3, CS4, CS5 y CS6 [29]. En este escenario, la utilización de antígenos representativos, capaces de generar una respuesta inmunológica contra varios CFs, sería importante para construir una vacuna de amplio alcance y fácil desarrollo. Ya que la subunidad estructural principal de un pili CU es la proteína más abundante en su estructura

y que los CFs son producidos particularmente por cepas ETEC (no por cepas comensales), resulta lógico considerarla como un componente idóneo de una vacuna que generará una respuesta inmune específica contra ETEC.

Avances en este tipo de estrategia ya han sido reportados, particularmente en los CFs- α . La reactividad de anticuerpos monoclonales obtenidos contra las subunidades estructurales de CFA/I no solo ocurre con el mismo CFA/I, sino que también con CS4, y además producen resultados positivos en ensayos de protección *in vivo* contra bacterias portadoras de CS4 [57]. Todo esto sugiere reactividad cruzada entre anticuerpos anti-CFA/I y CS4, ambos CFs- α . Sin embargo, también se ha notado que no siempre existe reactividad cruzada entre CFs de una misma familia. En 1989, se reportó la ocurrencia de reactividad cruzada de anticuerpos anti-CS4 (y en menor medida de anticuerpos anti-CFA/I) con otros CFs de la misma familia como CFA/I, CS1, CS2 y CS17, pero el mismo estudio observó que los anticuerpos anti-CS2 solo reaccionaban débilmente con CFA/I, y no reaccionaban con CS1 y CS4 [34]. Junto a esto, la reactividad de anticuerpos contra CFA/I con otros CFs- homólogos fue reforzada, pero también se encontró que el reconocimiento de CS5 era significativamente inferior, un resultado que se condice con la ausencia de reactividad cruzada de los anticuerpos anti-CS4 con este CF [34, 58]. CS5 es un CFs- de acuerdo al sistema de clasificación descrito anteriormente, pero posee algunas diferencias con otros miembros de la familia, como su morfología y la organización de su

operón [15]. Esto sugiere que la reactividad cruzada no es una regla dentro de las familias de pili CU y que, por lo tanto, debería ser analizada caso a caso.

1. 8 Reactividad cruzada de anticuerpos en la familia de los CFs- 2

Anteriormente se describió la creciente relevancia de los CF- 2 en la epidemiología de ETEC. Tomando esto en cuenta, la importancia de probar en este grupo el principio de la reactividad cruzada de anticuerpos que se observó en la familia de los CFs- se hace evidente. Ya existen antecedentes de esto con algunos CFs- 2, como es el caso de CS26, que es reconocido por anticuerpos anti-CsnA, la subunidad estructural principal de CS20 [19]. Cabe destacar que la utilización de CsnA como antígeno representativo de los CFs- 2 es conveniente porque CS20 es el representante de la familia mejor estudiado y uno de los más frecuentes entre cepas ETEC. En este escenario, CS20 fue usado como modelo para estudiar un posible mecanismo de la interacción entre anticuerpos y el pilus: los anticuerpos afectarían las propiedades mecánicas del pilus, interfiriendo con su plegamiento y desplegado, lo que se traduciría en una menor capacidad de adherencia de ETEC al epitelio intestinal [35]. La funcionalidad de CS27, inicialmente descrito junto con CS26, aún no ha sido determinada, pero ya ha sido detectado en varias cepas ETEC en el mundo [18, 28]. Este último, junto con CS30, otro CF- 2 de ETEC caracterizado recientemente, y que también ha sido detectado en aislados clínicos desde su descubrimiento [23], son buenos candidatos para estudiar la reactividad cruzada de anticuerpos en la familia de los CFs- 2.

El grado de identidad entre las subunidades estructurales de los distintos CFs- 2 es información relevante al momento de evaluar la reactividad cruzada de anticuerpos con otros miembros de la familia. Un primer análisis *in silico* (**Figura 2**), utilizando la herramienta Clustal Omega para hacer alineamientos múltiples de secuencias de aminoácidos [36], muestra que CsmA, la subunidad estructural principal de CS30 (número de acceso en GenBank: CZQ23821) posee un porcentaje de identidad del 73,2% con respecto a CsnA (número de acceso en GenBank: AF438155). En el caso de CmaH, la subunidad estructural principal de CS27 (número de acceso en GenBank: WP_074524684), se presenta un 55,85% de identidad con CsnA. Además, hay un 62,18% de identidad entre CsmA y CmaH. A modo de referencia, el porcentaje de identidad entre CsnA y CrsA, la subunidad estructural principal de CS26 (número de acceso en GenBank: OKT91845) es del 56,08%. Como la reactividad de CsnA con CrsA ya fue confirmada experimentalmente [19], este valor podría servir como guía para pronosticar posibles reacciones de CsnA con otros miembros de la familia.

	CswA	FasA	CrsA	CmaH	FotA	CsnA	CsmA	
CswA	100,00	47,31	44,32	44,02	39,88	50,00	51,34	CswA: CS12
FasA	47,31	100,00	47,62	48,94	51,70	53,16	55,21	FotA: CS18
CrsA	44,32	47,62	100,00	76,65	62,29	56,08	61,66	CsnA: CS20
CmaH	44,02	48,94	76,65	100,00	60,92	55,85	62,18	CrsA: CS26
FotA	39,88	51,70	62,29	60,92	100,00	57,39	63,54	CmaH: CS27
CsnA	50,00	53,16	56,08	55,85	57,39	100,00	73,20	CsmA: CS30
CsmA	51,34	55,21	61,66	62,18	63,54	73,20	100,00	FasA: 987P

Figura 2. Matriz de porcentajes de identidad entre subunidades estructurales principales de los CFs- 2. La matriz fue obtenida luego de realizar la comparación mediante alineamiento de las secuencias aminoacídicas maduras. A la derecha de la matriz se indica a que CF corresponde cada subunidad estructural principal.

De acuerdo a todo lo anteriormente expuesto, el objetivo de este trabajo fue comprobar la reactividad entre anticuerpos anti-CsnA y los pili CS27 y CS30. Adicionalmente, se propuso caracterizar funcionalmente a CS27, que no había sido hecho aún. Esto se refiere a confirmar su rol para conferirle a ETEC la capacidad de adherirse a la superficie de células epiteliales del intestino cuando es expresada.

2. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2. 1 Hipótesis

Anticuerpos anti-CsnA se unen a los factores de colonización CS27 y CS30 de la familia α_2 de los pili-CU de *Escherichia coli* enterotoxigénica e inhiben la adherencia bacteriana a células Caco-2.

2. 2 Objetivo general

Determinar si anticuerpos anti-CsnA se unen a las subunidades estructurales principales de CS27 y CS30, y si esta unión inhibe la adherencia de ETEC a células Caco-2.

2. 3 Objetivos específicos

1.- Evaluar la reactividad de anticuerpos anti-CsnA con CS27 y CS30 de ETEC.

2.-Evaluar si CS27 es un determinante de la capacidad de adherencia de ETEC.

3.- Determinar si anticuerpos anti-CsnA bloquean la adherencia de cepas ETEC productoras de CS27 y CS30 a células Caco-2.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Cepas bacterianas

Las distintas cepas de *E. coli* que se usaron en el transcurso del trabajo se describen en la **Tabla 2**.

Tabla 2. Cepas de *E. coli* utilizadas en el trabajo.

Cepa	Características relevantes	Referencia
ETEC 603388	ETEC CS27+. Aislada en Bangladesh. Serotipo ONT (no tipificable), productora de enterotoxina LT, tipo de secuencia ST-616.	[18]
ETEC 603388 CS27	ETEC 603388 <i>cmaHBCDEFG::aph</i> (CS27-).	Este trabajo
ETEC 603388 CS27/pEZ-BAC	ETEC 603388 CS27 transformada con el vector pEZ-BAC vacío.	Este trabajo
ETEC 603388 CS27/CS27	ETEC 603388 CS27 complementada <i>in trans</i> con pEZ-BAC/ <i>cmaHBCDEFG</i> .	Este trabajo
ETEC 702947	ETEC CS30+. Aislada en Pakistán. Serotipo O8:H21, productora de enterotoxina LT, tipo de secuencia desconocido.	[19]
ETEC 702947 CS30	ETEC 702947 <i>csmABCDEF::aph</i> (CS30-).	Este trabajo
	ETEC 702947 CS30 transformada con el vector pEZ-BAC vacío.	Este trabajo
ETEC 702947 CS30/CS30	ETEC 702947 CS30 que ha sido complementada <i>in trans</i> con pEZ-BAC/ <i>csmABCDEF</i> .	Este trabajo
E. coli DH10B	Cepa de <i>Escherichia coli</i> no patógena. Posee el gen <i>trfA</i> , lo que permite inducir la expresión de plásmidos al agregar L-arabinosa al medio de cultivo de la bacteria.	[37]
DH10B/pEZ-BAC	DH10B transformada con el vector pEZ-BAC vacío.	Este trabajo
DH10B/CS27-SV	DH10B transformada con el vector pEZ-BAC/ <i>cmaHBCDEF</i> (CS27-SV).	Este trabajo
DH10B/CS27-LV	DH10B transformada con el vector pEZ-BAC/ <i>cmaSTHBCDEF</i> (CS27-LV).	Este trabajo
DH10B/CS30-SV	DH10B transformada con el vector pEZ-BAC/ <i>csmABCDEF</i> (CS30-SV).	Este trabajo
DH10B/CS30-LV	DH10B transformada con el vector pEZ-BAC/ <i>csmSTABCDEF</i> (CS30-LV).	Este trabajo

Tabla 3. Plásmidos utilizados en el estudio.

Nombre	Uso	Referencia
pKD4	Molde para amplificación de gen de resistencia a kanamicina (<i>aph</i>) utilizado para procedimientos de mutación por intercambio alélico.	[38]
pSIM9	Codifica sistema de recombinasas Red (Exo, Beta, Gam), necesario para que se puedan reemplazar los loci de los CFs en el cromosoma de la bacteria por gen de resistencia a kanamicina (<i>aph</i>), mediante recombinación genética. Presenta adicionalmente un gen de resistencia a cloranfenicol (<i>cat</i>).	[39]
pEZ-BAC	Vector capaz de mantener inserciones de gran tamaño (bácmido). Posee el gen <i>lacZ</i> , que codifica a -galactosidasa y que permite seleccionar colonias bacterianas recombinantes en base coloración blanco o azul. Presenta un gen de resistencia a cloranfenicol (<i>cat</i>).	[37]

Tabla 4. Lista de partidores utilizados.

Partidores	Secuencia (5'-3')	Uso	Referencia
BEZ-F1	CACTTTATGCTTCCG GCTCGTATG	Verificación de clonamientos en vector pEZ-BAC.	[37]
BEZ-R1	GGGATGTGCTGCAA GGCGATTAAG	Verificación de clonamientos en vector pEZ-BAC.	[37]
CS18-locF	ACTTCTATCCACACA TGCTAAG	Clonar y verificar el clonamiento de la versión corta del locus de CS30. Incluye adicionalmente en su secuencia el sitio de restricción de la enzima de restricción <i>Bam</i> H1.	Este trabajo
CS18-locF0	TACTCTTTTGAGTGA GTTATGTGC	Clonar y verificar el clonamiento de la versión larga del locus de CS30. Incluye adicionalmente en su secuencia el sitio de restricción de la enzima <i>Bam</i> H1.	Este trabajo
CS18-mutR	TAATATACCGATAAA AATCATTTCCTGATG GGAAAGCTGA	Confirmar mutaciones en cepa CS30 (ETEC 702947).	Este trabajo
CS30-locR	CCACTACACAAGTA ATTCCATTTG	Clonar el locus completo de CS30. Adicionalmente incluye en su secuencia el sitio de restricción de la enzima <i>Bam</i> H1.	Este trabajo

Tabla 4 (continuación). Lista de partidores utilizados.

Partidores	Secuencia (5'-3')	Uso	Referencia
G2c-checkR	AGTATACCAGTTGC CTCAACAG	Confirmar transformaciones de cepas con vector pEZ-BAC y locus CS27.	Este trabajo
G2c-F	CCATTCTATTGGTTA AATCCAGC	Clonar la versión corta del locus de CS27.	Este trabajo
G2c-F0	GACGGCGGTTACTA TTTTATTGAC	Clonar la versión larga del locus de CS27.	Este trabajo
G2c-mutF	ATGAAAAAGACAATT ATGTCTCTGGCTGT GGTTTCAGCTT	Remover el locus de CS27.	[18]
G2c-mutR	TAATGTATCAATAAA AATAATCTCCCGATG GGAGAACTAG	Remover el locus de CS27.	[18]
G2c-R	GCAACCACTTTTGAT CGCTTG	Clonar el locus completo de CS27.	Este trabajo.
K1	CAGTCATAGCCGAA TAGCCT	Chequear cepas mutantes en las que el locus fimbrial fue reemplazado por el gen de resistencia a kanamicina (<i>aph</i>).	[38]
Rev-csmA	CCTTGGTACCATTG CTGGTT	Chequear cepas transformadas con el vector pEZ-BAC que incluía el locus CS30.	Este trabajo
LT-A	GCACACGGAGCTCC TCAGTC	Detectar gen codificante de la enterotoxina LT (<i>eltB</i>).	[55]
LT-B	TCCTTCATCCTTTCA ATGGCTTT	Detectar gen codificante de la enterotoxina LT (<i>eltB</i>).	[55]
ST1aF	CCTCGACATATAACA TGATGCAACTC	Detectar gen <i>sta1</i> , que codifica a la enterotoxina ST1a (o STh).	[23]
ST1aR	AAATTGCCAACATTA GCTTTTTCA	Detectar gen <i>sta1</i> , que codifica a la enterotoxina ST1a.	[23]
ST1bF	TTCTTTCTGTATTGT CTTTTTCAACC	Detectar gen <i>sta2</i> , que codifica a la enterotoxina ST1b (o STp).	[56]
ST1bR	TAATAGCACCCGGT ACAAGCAG	Detectar gen <i>sta2</i> , que codifica a la enterotoxina STp.	[56]

Comentado [FDC1]: Aquí falta una parte de la secuencia, que es lo que amplifica en el vector pKD4. Lo mismo en el R

3. 2 Obtención de cepas mutantes y de cepas recombinantes productoras de CS27 y CS30.

3. 2. 1 Delección de loci codificantes de CFs en cepas ETEC

Para construir mutantes de las cepas ETEC 603388 (CS27+) y 702947 (CS30+), por delección de los loci de ambos CFs, se utilizó la metodología de intercambio alélico descrita por Datsenko y Wanner [38]. Se utilizó el vector pSIM9 [39] que codifica el sistema de recombinasas Red. Mediante la recombinación facilitada por este sistema, los loci de CS27 y CS30 fueron reemplazados por un gen de resistencia a kanamicina (Kan), obtenido por PCR desde el plásmido pKD4. La PCR fue realizada usando una mezcla de reacción de 25 μ L consistente en 5 μ L de buffer de reacción (5X), 1,5 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs (cada uno), 0,4 μ M de cada partidor, 0,6 U de la enzima Taq polimerasa y aproximadamente 100 ng del DNA templado (en este caso era el plásmido pKD4 purificado). Cada volumen fue multiplicado de acuerdo al número de reacciones necesarias para cada experimento. La PCR se hizo en un termociclador, siguiendo un programa estándar de 30 ciclos: etapa inicial de desnaturalación: 94°C por 5 min, seguida por 30 ciclos de desnaturalación por 30 s a 94°C, alineamiento por 30 s y temperatura dependiente de los partidores utilizados, y elongación por 90 s a 72°C, seguidos finalmente por una etapa de elongación final de 10 min a 72°C. La obtención del gen de resistencia a Kan en particular se hizo con una temperatura de alineamiento de 52°C. Los partidores G2c-mutF y G2c-mutR (**Tabla 4**) le proporcionaron al cassette amplificado

extremos de 40 nt idénticos a los loci de CS27 y de CS30, lo que permitió la recombinación mediada por el sistema Red. La obtención de los productos de PCR de los tamaños esperados se analizó mediante separación mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% y posterior visualización por tinción con bromuro de etidio.

Las cepas ETEC se dejaron creciendo en caldo LB (Lennox) por toda la noche, a 37°C. Este cultivo se diluyó en proporción 1:100 y se incubó nuevamente a 37°C hasta alcanzar una densidad óptica a una longitud de onda de 600 nm (OD_{600}) de 0,4-0,6. Una vez alcanzada, las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación a 10.000 xg durante 2 min, lavadas en tres ocasiones con H₂O a 4°C, y se concentraron 100X para poder transformarlas. Entre cada lavado se sedimentaron las bacterias mediante centrifugación en las condiciones recién indicadas. Luego, las bacterias fueron mezcladas con 100 ng de pSIM9 y electroporadas a 2500 V. Tras ello, la mezcla se llevó a un volumen de 1 mL con caldo LB y se dejó recuperando a 30°C por 2 h. Luego, se tomaron 100 µL del cultivo y se sembraron en una placa de agar LB conteniendo cloranfenicol (Cm) 12,5 µg/mL. El volumen restante se centrifugó a 3000 xg por 10 min. El sedimento resultante se resuspendió en 100 µL del caldo LB y se sembró en otra placa de agar LB con Cm 12,5 µg/mL, de manera que se sembraron dos suspensiones bacterianas, una diluida (1X) y otra concentrada (9X), para así incrementar la probabilidad de obtener colonias discretas aisladas.

Luego, las cepas portadoras de pSIM9, seleccionadas desde las colonias crecidas en placas, se sembraron en caldo LB y se dejaron creciendo a 30°C hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,4-0,6. Para inducir la expresión del sistema de recombinasa (Red), los cultivos se mantuvieron a 42°C por 15 min y luego en hielo por otros 15 min adicionales. Trascurrido este tiempo, las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación a 10.000 xg durante 2 min y suspendidas en H₂O a 4°C. Este paso se repitió hasta un total de tres lavados y, posteriormente, las bacterias se concentraron 100X, para realizar la electroporación con el producto de PCR consistente en el gen de resistencia a Kan flanqueado por regiones de identidad a los loci CS27 o CS30. Luego, se completó un volumen de 1mL con caldo LB y la suspensión se dejó incubando a 37°C por 2 h. Se realizó una siembra similar a la del paso anterior, pero en esta ocasión utilizando placas de agar LB con Kan 50 µg/mL (solo se realizó la siembra con el cultivo concentrado 10X). Las colonias que crecieron al día siguiente se seleccionaron, tomando cada colonia con una varilla de vidrio (Pipeta Pasteur), para sembrarse en placas de agar LB conteniendo Kan 50 µg/mL y además, se llevaron a un tubo de microcentrífuga que contenía Tritón X-100 0,1% para obtener un lisado bacteriano. La lisis se realizó calentando la solución por 5 min a 100°C, agitando los tubos brevemente, calentando nuevamente a 100°C por otros 5 min y finalmente centrifugando a 8000 rpm por 8 min. Para chequear que la transformación de las bacterias produjo las mutaciones debidamente, se realizó una PCR siguiendo el mismo protocolo descrito anteriormente, aunque la mezcla

de reacción fue modificada para este caso, consistiendo en 5 μ L de buffer de reacción, 3 mM de $MgCl_2$, 0,2 mM de dNTPs (cada uno), 0,4 μ M de cada partidor, 0,6 U de la enzima Taq polimerasa y 2 μ L del lisado bacteriano (libre de debris) como fuente de DNA. Se utilizaron los partidores CS18-locF (CS30) o G2c-F (CS27) como partidores directos y K1 como partidor reverso (temperatura de alineamiento de 52°C en ambos casos) (**Tabla 4**). Adicionalmente, se realizó una PCR con las colonias de las cepas mutantes para verificar que efectivamente corresponden a cepas ETEC y que conservan el mismo perfil de genes de toxinas que las cepas silvestres. Se realizó la detección de los genes codificantes de ST1a, ST1b y LT [6]. En el caso de los genes de LT y ST1b, el programa consistió en una desnaturalización inicial de 94°C por 8 min, 35 ciclos de desnaturalización por 90 s a 94°C, alineamiento por 75 s a 60°C, y elongación por 60 s a 68°C, seguidos por una etapa de elongación final de 5 minutos a 72°C. Para el gen de ST1a, el programa fue igual al estándar descrito anteriormente, pero con una temperatura de alineamiento de 64°C para ST1a. El mismo programa de PCR se repitió usando el DNA genómico purificado de las bacterias para una confirmación final de la mutación. La purificación de DNA se realizó a partir de 1 mL de cultivo, incubado durante la noche a 37°C. Las bacterias fueron sedimentadas por centrifugación a 13.000 xg durante 2 min y tratadas con una solución de lisis a 80°C por 5 min. La solución se dejó enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 3 μ L de RNasa al lisado y el tubo fue mezclado por inversión 5 veces para luego ser incubado a 37°C por 60 min. Se agregaron 200

μL de solución de precipitación de proteínas y se mezcló por agitación a alta velocidad (en agitador tipo Vortex) por 20 s. Esta solución fue incubada en hielo por 5 min, tras lo que se centrifugó nuevamente a 13.000 xg por 3 min. El sobrenadante fue transferido a un tubo de microcentrífuga que contenía 600 μL de isopropanol, a temperatura ambiente, y se mezcló por inversión suavemente hasta que se pudieran observar hebras de DNA a simple vista. El tubo se centrifugó a 13.000 xg por 2 min y luego se descartó con cuidado el sobrenadante, para poder drenar el tubo invertido sobre papel absorbente limpio. Se agregó 600 μL de etanol 70% a temperatura ambiente, y el tubo fue invertido con cuidado varias veces para poder lavar el sedimento de DNA. Se hizo una centrifugación final a 13.000 xg por 2 min y se eliminó el etanol con cuidado. El tubo fue drenado nuevamente con papel absorbente limpio y el sedimento se dejó secando, dejando abierto el tubo por 10 – 15 min. Se agregaron 100 μL de solución de rehidratación de DNA y el tubo se dejó incubando a 65°C por 1 hr, mezclando periódicamente el tubo suavemente hasta disolver completamente.

Finalmente, las cepas mutantes fueron curadas del vector pSIM9 incubando cultivos líquidos en caldo LB a 42°C por 12 h y sembrándolos en placas de agar LB, que se dejaron incubando a 42°C por toda la noche. De esta placa, se seleccionó 52 colonias, sembrándolas por separado en placas de agar LB con y sin Cm 12,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Entre aquellos clones que no crecieron en presencia de Cm y que, por lo tanto, habrían perdido el plásmido pSIM9, se seleccionó uno para los pasos siguientes de este trabajo.

3. 2. 2 Clonamiento de loci codificantes de CFs

Se purificó el DNA genómico de ETEC 603388 y de ETEC 702947, siguiendo el protocolo anteriormente descrito, para posteriormente obtener los loci de CS27 y CS30, respectivamente, mediante amplificación por PCR y posterior purificación de los productos. Se consideraron cuatro versiones en total de los loci, con dos correspondientes para cada CF (**Figura 2**). En el caso de CS27, se amplificó el locus en dos versiones, *cmaSTHBCDEFG* (CS27-SV, del inglés *short version*, versión corta) y *cmaHBCDEFG* (CS27-LV, del inglés *long version*, versión larga). La diferencia entre ellos es que CS27-SV carece de los genes *cmaS* y *cmaT*, que codifican recombinasas que participan en la inversión de la región promotora de los genes fimbriales, actuando como reguladores transcripcionales [40]. Para CS30, se realizó lo mismo, amplificando los loci *csmSTABCDEF* (CS30-LV) y *csmABCDEF* (CS30-SV). El locus de CS27 ya se encontraba clonado al momento de iniciar esta memoria de título, pero en el caso de CS30, se usaron los partidores CS18-locF y CS30-locR para amplificar CS30-SV, y CS18-locF0 y CS30-locR para amplificar CS30-LV (temperaturas de alineamiento de 60°C para CS30-SV, y 67°C para CS30-LV), con todos los partidores portando sitios de corte para la enzima de restricción *Bam*HI en sus extremos 5' (**Tabla 4**). Para las amplificaciones por PCR, se siguió el mismo protocolo descrito previamente, aunque las etapas de desnaturalización se hicieron a 98°C con una duración de 30 s para la etapa inicial y 10 s para los ciclos. Además, en lugar de Taq polimerasa, se usó la enzima DNA polimerasa

Phusion®, una enzima similar a la DNA polimerasa de *Pyrococcus* (Pfu), pero con una mayor procesividad y fidelidad [41]. Para obtener el DNA genómico de ETEC 702947, esta fue cultivada en caldo CFA (*colonization factor antigen*), compuesto de 1% casaminoácidos, 0,15% de extracto de levadura, 0,005% de MgSO₄ y 0,0005% MnCl₂ [42]. Se utilizó este medio de cultivo ya que la expresión de CS30 se da en estas condiciones [21], lo que permitiría obtener el promotor en la orientación permisiva para la expresión del locus. En paralelo, se purificó el vector pEZ-BAC mediante el método de lisis alcalina, utilizando un kit comercial y éste junto a los loci amplificados de CS30 fueron digeridos con la enzima de restricción *Bam*HI, en una reacción de 2 h a 37°C, usando aproximadamente 1 µg de DNA y 6 µL de *Bam*HI (FastDigest, Thermo Scientific) en reacciones de 60 µL. El vector pEZ-BAC, digerido con *Bam*HI, fue tratado con fosfatasa alcalina por 30 min a 37°C, para impedir su recircularización. Los productos de la digestión fueron purificados luego de ser separados por electroforesis desde un gel de agarosa de bajo punto de fusión. Los insertos y el vector lineal fueron ligados con T4 DNA ligasa [43], en una reacción que consistió en aproximadamente 100 ng de vector lineal, 500 ng de inserto y 5 U de ligasa, por 1 h a 22°C. La reacción se detuvo al incubar por 5 min a 70°C para inactivar a la enzima y el producto de ligación (pEZ-BAC/CS30-SV o pEZ-BAC/CS30-LV) fue usado para transformar *E. coli* DH10B, hospedero compatible para selección de colonias recombinantes por coloración blanco/azul en un medio que contenga X-GAL [44]. Las suspensiones bacterianas fueron sembradas en placas Petri con

agar LB suplementado con Cm (12,5 µg/mL), X-GAL (40 µg/mL) e IPTG (0,4 mM), y se seleccionaron las colonias blancas que indicaban que el plásmido incluía un inserto. Para chequear la ligación, se purificó DNA plasmidial a partir de al menos tres colonias blancas, para realizar una PCR bajo las mismas condiciones estándares descritas previamente, con los partidores BEZ-F1 y Rev-CsmA, o bien BEZ-R1 y Rev-CsmA (ambas temperaturas de alineamiento de 56°C) (**Tabla 4**), para detectar la presencia del locus de CS30 inserto en el vector. Esto considerando que el clonamiento utilizó solo un sitio de restricción (clonamiento no-direccional), pudiendo quedar el inserto orientado en dos sentidos posibles. Por lo tanto, las reacciones de PCR permiten detectar la presencia de inserto en cualquiera de las dos orientaciones. Las construcciones recombinantes de pEZ-BAC con ambas versiones del locus, fueron utilizadas para transformar la cepa mutante de CS30 (complementación *in trans*), además de transformar la misma cepa con pEZ-BAC vacío. Este procedimiento también fue hecho para el caso de la cepa mutante en CS27, con lo que se completó el set de cepas a utilizar en los siguientes pasos.

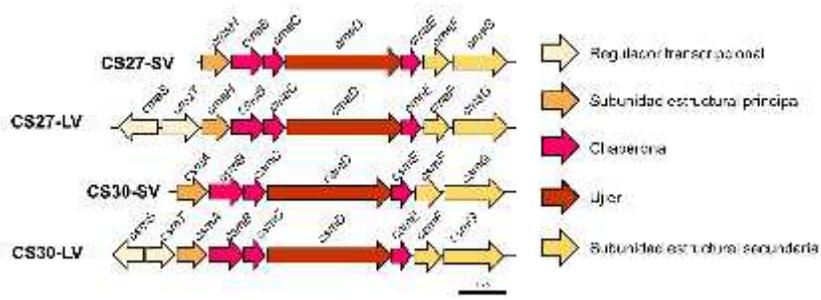


Figura 3. Esquemización de las distintas versiones de los loci de CS27 y CS30. Los loci *cmaSTHBCDEFG* (CS27-LV) y *csmSTABCDEFG* (CS30-LV) representan como están codificados naturalmente los genes de ambos pili en las cepas ETEC silvestres 603388 y 702947, respectivamente. *cmaS*, *cmaT*, *csmS* y *csmT* son genes que codifican recombinasas que regulan la transcripción del locus y, por tanto, la expresión de los CFs. La extensión de cada gen en pares de base fue representada a escala.

3. 3 Electroforesis de extractos enriquecidos en proteínas de superficie y

Western blot

Las cepas de *E. coli*, tanto ETEC como DH10B, se dejaron creciendo durante toda la noche a 37 °C, en 20 mL de caldo LB en el caso de las cepas portadoras de CS27, o CFA, en el caso de las cepas productoras de CS30, suplementados con Cm 12,5 µg/mL y Kan 50 µg/mL, dependiendo del caso. Se agregó L-arabinosa 10 mM en el caso de *E. coli* DH10B, sobre ambos tipos de caldos de cultivo. Se realizó una extracción de proteínas de superficie para confirmar la expresión, presencia o ausencia de CFs en cada cepa. Los cultivos fueron centrifugados a 3000 xg por 10 min a temperatura ambiente. Los sedimentos fueron resuspendidos suavemente en 1 mL de PBS 1X y se repitió la

centrifugación en las mismas condiciones. El sedimento de esta centrifugación se resuspendió en 100 μ L de PBS 1X y se incubó a 60°C por 30 min. Tras la incubación, se centrifugó nuevamente a 3000 xg por 10 min y el sobrenadante se llevó a un tubo nuevo, el cual fue centrifugado a 3000 xg por 10 min para eliminar posibles bacterias contaminantes. El sobrenadante final, recuperado en un tubo nuevo, representó el extracto enriquecido en proteínas de superficie [31]. Las proteínas en estos extractos fueron cuantificadas por el método de Bradford [45] usando albúmina de suero bovino (BSA) como estándar para construir una curva de calibración. Los extractos de proteínas fueron separados mediante SDS-PAGE (electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico), usando poliacrilamida al 40%. Cada gel se hizo por duplicado, a 100V por al menos 90 min. Uno de los geles se destinó a tinción con azul de Coomassie G-250 [46] y el otro a electrotransferencia para detección por *Western blot*. De acuerdo a la medición por el método de Bradford, se tomó 1 μ g de extracto de proteínas (o 4 μ g para el caso de la detección de CS30 en la línea derivada de *E. coli* DH10B) para las detecciones por *Western blot*, y 4 μ g para los geles teñidos con azul de Coomassie (20 μ g en el caso de la detección de CS30 en la línea derivada de *E. coli* DH10B). Para la detección por *Western blot*, las proteínas en el gel se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa, en una electroforesis de 1 h a 100V en frío, tras lo que se realizó una breve observación preliminar de las proteínas en la membrana mediante tinción con rojo Ponceau [47]. Luego, la membrana se dejó durante la noche a 4°C en una solución de BSA 1% en buffer

Tris salino conteniendo Tween 20 0,05% (TBS-T/BSA), para bloquear sitios de unión inespecíficos en la membrana. Al día siguiente, se eliminó la solución y se incubó la membrana con anticuerpos policlonales anti-CsnA. Estos anticuerpos fueron obtenidos a través del servicio PolyExpress Premium™ de Genscript, que incluyó la inmunización de dos conejos con la proteína CsnA madura, purificada y sintetizada por la misma empresa, por lo que se obtuvieron dos anticuerpos policlonales purificados por afinidad al mismo antígeno. La incubación con los anticuerpos anti-CsnA se hizo con una dilución 1:1000 de los anticuerpos en TBS-T/BSA, por 1 h a temperatura ambiente. Luego, se retiró la solución de anticuerpo y se realizaron tres lavados con TBS-T en agitación, de 10 min cada uno. Tras los lavados, se incubó la membrana en agitación por 1 h con el anticuerpo secundario IgG de cabra anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina (Sigma Aldrich Co., EEUU), en una dilución de 1:1000 en TBS-T/BSA. Se repitieron los lavados con TBS-T y se hizo uno adicional con H₂O destilada por 30 s. Finalmente, se adicionaron 5mL de sustrato de fosfatasa alcalina (NBT/BCIP, nitroazul de tetrazolio y 5-bromo-4-cloro-indolilfosfato) y se incubó la membrana a temperatura ambiente hasta que se observaran bandas inmunorreactivas discretas, momento en el que se agregó H₂O destilada para detener la reacción.

3. 4 Inmunomarcación con oro coloidal y microscopía electrónica de transmisión

Se dejaron cultivos de las cepas ETEC en caldo LB, o CFA, a 37°C durante toda la noche. Al día siguiente, los cultivos fueron centrifugados a 3000 xg por 10 min y el sedimento fue resuspendido en caldo LB, usando ahora un 1/10 del volumen. De esta suspensión se tomó una alícuota de 10µL, se depositó sobre una grilla de níquel cubierta con carbono-formvar y se dejó incubando por 20 min a temperatura ambiente, dentro de una cámara húmeda. Transcurrido el periodo, se eliminó el volumen sobrante con papel absorbente. Luego, se agregaron 10µL de solución de bloqueo (BSA 1% + glicina 10mM en PBS 1X) y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. La grilla se lavó por 1 min dejándola sobre una gota de PBS-BT (BSA 0,2%, Tween-20 0,05% en PBS 1X), con la cara de la película de carbono-formvar hacia abajo. Luego de eliminar el PBS-BT, se agregó el anticuerpo primario anti-CsnA (policlonal, desarrollado en conejo) en una dilución 1:10 en PBS-BT sobre la grilla y se dejó incubando por 1 h a temperatura ambiente en la misma cámara húmeda. Se repitieron los lavados de la grilla seis veces, tras lo cual se agregó el anticuerpo secundario (IgG anti-IgG de conejo conjugado con partículas de oro de 10nm de diámetro, Sigma Aldrich Co., EEUU) en una dilución de 1:100 en PBS-BT y se incubó por 1 h a temperatura ambiente en la cámara húmeda. Tras la incubación, la grilla se lavó nuevamente seis veces, tras lo cual las bacterias en la grilla fueron fijadas con 10µL de glutaraldehído 2% por 10 min a temperatura ambiente. Se realizaron seis lavados depositando las

grillas sobre gotas de 10 μ L H₂O Milli-Q durante 1 min. La tinción negativa se realizó con ácido fosfotúngstico 0,5% por 30 s. Se lavó la grilla sumergiéndola tres veces en un tubo de microcentrífuga con 1mL de H₂O por 1 min en cada lavado. Finalmente, la grilla se dejó a 37°C por 1 h para secarla del exceso de residuos líquidos. Todo el procedimiento se hizo en duplicado para cada cepa analizada.

3. 5 Ensayos de adherencia a células Caco-2

Para los ensayos de adherencia bacteriana se usaron células Caco-2, una línea celular proveniente de adenocarcinoma de colon humano, que se ha usado como modelo de estudio de enterocitos del intestino delgado debido a las similitudes funcionales que poseen [48]. Las células Caco-2 se cultivaron en medio DMEM (medio de Eagle modificado por Dulbecco) con concentración alta en glucosa (4500 mg/L), suplementado con suero fetal bovino 10% y antibiótico/antimicótico 1%, a 37°C y una atmósfera compuesta de 95% aire y 5% CO₂. Las células se mantuvieron creciendo en estas condiciones por 7-14 d en placas de cultivo celular de 24 pocillos (2 cm² de superficie por pocillo), hasta alcanzar 100% de confluencia. El medio de cultivo fue renovado al menos dos veces durante este periodo.

El día anterior al ensayo de adherencia, las cepas bacterianas fueron inoculadas en 1,5 mL de medio DMEM con concentración baja de glucosa (1000 mg/L), y se dejaron creciendo durante la noche. Se estimó la cantidad de

bacterias crecidas midiendo la OD₆₀₀ y, en base a este valor, se calculó la cantidad necesaria para infectar la capa de células Caco-2 con un MOI (multiplicidad de infección) de 10 bacterias/célula. Se agregó antibiótico en los casos de cepas mutantes o portando vectores. Por otra parte, se eliminó el medio DMEM de los cultivos de células Caco-2 y éstas se lavaron una vez con PBS 1X. Se realizó la infección de las células con 500 µL del cultivo bacteriano por pocillo, en duplicado para cada cepa. Una vez inoculadas, las placas fueron incubadas a 37°C en atmósfera con 5% de CO₂ por 3 h.

Transcurrido el periodo del ensayo, se recuperaron las placas y se eliminó el medio, de modo que solo se mantuvieran las bacterias que lograron establecerse en la capa celular y descartando las bacterias que no lo hicieron. Los pocillos se lavaron cuidadosamente cinco veces con 1 mL de PBS 1X y, tras los lavados, se agregó 1 mL de Tritón X-100 0,1% a 37°C por pocillo, y las placas se dejaron a 37°C hasta que observar lisis de la capa celular. Ocurrido esto, el contenido de cada pocillo fue traspasado a un tubo de microcentrífuga de 1,5mL.

Para medir los resultados de los ensayos, se realizó recuento bacteriano en placas Petri con agar LB suplementado con el antibiótico correspondiente, utilizando el método de microgotas [19, 31]. Las placas se dejaron durante la noche a temperatura ambiente y, al día siguiente, el área cubierta por cada gota tendría un número de colonias crecidas que fue considerada como número de unidades formadoras de colonia (UFC) para la cuantificación del resultado,

considerando los factores de dilución. Para expresar los resultados, se consideró una razón entre las bacterias asociadas a la superficie de la capa de Caco-2 al término del ensayo, y la cantidad de bacterias medidas en los inóculos iniciales. Los ensayos de adherencia fueron repetidos por lo menos cuatro veces de forma independiente.

3. 6 Ensayos de bloqueo de adherencia a células Caco-2 con anticuerpos anti-CsnA

El protocolo de los ensayos de bloqueo con anticuerpo fue similar al de los ensayos de adherencia descritos en el punto anterior, salvo algunas modificaciones. En estos ensayos, se utilizaron placas de cultivo celular de 96 pocillos, con pocillos de 0,32 cm² de superficie c/u. Antes de infectar las células, las suspensiones bacterianas fueron incubadas con los anticuerpos en una dilución final de 1:10, por 20 min a temperatura ambiente. Esto se realizó en un volumen final de 100 µL, compuestos por 90 µL de DMEM con concentración baja en glucosa conteniendo la cantidad de bacterias necesarias para infectar con un MOI de 1 bacteria/célula, y 10 µL de los anticuerpos anti-CsnA, anticuerpo anti-MrkA como control de isotipo (MrkA es la subunidad estructural principal del pilus tipo 3 de *Klebsiella pneumoniae*, ausente en cepas ETEC), o suero preinmune. Para estos ensayos, el tiempo de infección fue de 30 min. Los lavados posteriores y los cultivos en placas se hicieron tal como fueron descritos para los ensayos de adherencia, aunque ajustando los volúmenes utilizados.

3. 7 Análisis estadístico

Los análisis estadísticos fueron realizados con el programa GraphPad Prism 8 de GraphPad Software, Inc. Para las comparaciones múltiples entre distintos grupos de datos de los ensayos de adherencia y los ensayos de bloqueo, se utilizó la prueba de análisis de varianza de Kruskal-Wallis para datos no paramétricos corregida con la prueba de Dunn, considerando un valor $p < 0,05$ para establecer las diferencias significativas.

4. RESULTADOS

4. 1 Anticuerpos anti-CsnA se unen a subunidades estructurales principales de CS27 y CS30

Para el trabajo, se contó con dos cepas clínicas de ETEC, 603388 y 702947 (**Tabla 2**), en las que se había detectado la presencia de los loci codificantes de CS27 y CS30, respectivamente. A ambas cepas se les removió el locus fimbrial, mediante deleciones por recombinación. Para confirmar que la mutación tuvo lugar, se realizó una verificación por PCR, utilizando por un lado el partidor K1, el cual tiene una secuencia correspondiente a un segmento del gen de resistencia a Kan, que reemplazó al locus blanco de la mutación, y por otro a G2c-F o CS18-locF (en ETEC 603388 y 702497, respectivamente), cuyas secuencias correspondientes se ubicaban cerca de la región mutada. Las cepas mutantes fueron identificadas por el producto amplificado por la PCR, indicando que la recombinación tuvo éxito, y que fue respaldado por la ausencia de producto de amplificación en las cepas silvestres, que carecen del gen de Kan (**Figuras 4A y 4B**). Para corroborar que las mutantes se trataban de las mismas cepas ETEC, se les comparó el perfil de genes de enterotoxinas con respecto a las cepas silvestres. En ambos casos se confirmó que poseían el gen de la enterotoxina LT, y no los de ST1a ni ST1b, correspondiendo con los perfiles de las cepas silvestres (**Figuras 4C y 4D**).

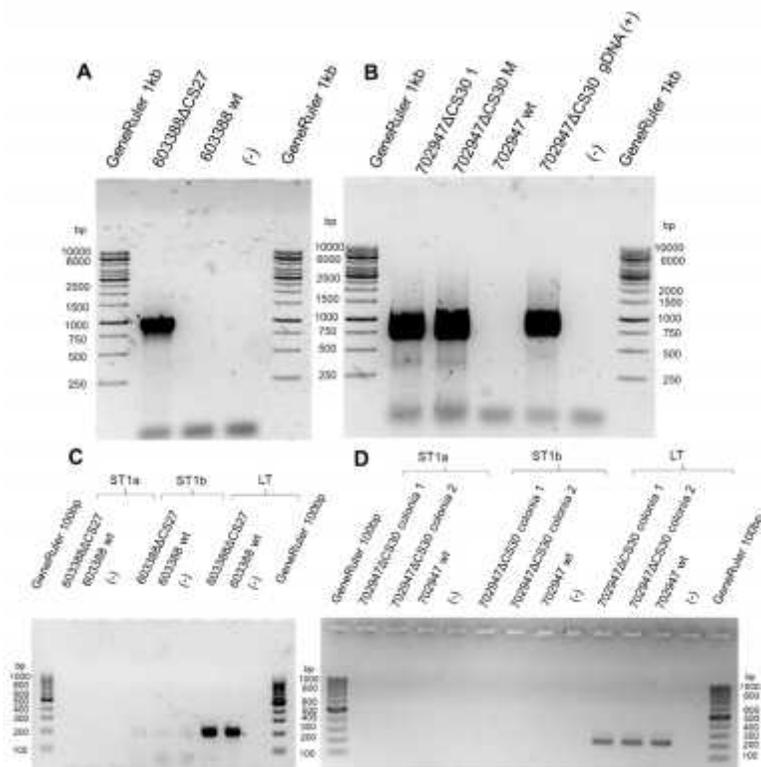


Figura 4. Identificación y verificación por PCR de cepas ETEC mutantes. Las cepas ETEC 603388 y 702947 fueron mutadas por recombinación, eliminando los loci codificantes de CS27 y CS30, respectivamente, y reemplazándolos por genes de resistencia a antibióticos. Se realizó la detección de los genes de enterotoxinas en las cepas mutantes, con el fin de comprobar su identidad como cepas ETEC, de acuerdo al perfil de las cepas silvestres. **(A)** Identificación de mutante ETEC 603388 CS27 con partidores K1 y G2c-F. **(B)** Identificación de mutante ETEC 702947 CS30 con partidores K1 y CS18-locF. Los carriles 702947 CS30 1 y 702947 CS30 M

corresponden a dos cultivos de la misma cepa. (C) Productos de detección de genes de enterotoxinas en la cepa ETEC 603388 CS27. **(D)** Productos de detección de genes de enterotoxinas en la cepa ETEC 702947 CS30.

Las cepas mutantes también fueron transformadas con vectores recombinantes que restablecieron cada loci por complementación en *trans*. Para conseguir los vectores recombinantes, se clonaron las dos versiones del locus de CS30 (CS30-SV y CS30-LV) en DH10B (**figura 3**), usando el vector pEZ-BAC (los vectores correspondientes a CS27 ya se habían preparado antes del inicio de este trabajo). Tanto pEZ-BAC como las dos versiones del locus de CS30 fueron tratadas con una sola enzima de restricción, *Bam*HI, por lo que la ligación entre ellos podría haber quedado en dos sentidos posibles. Con esto en cuenta, se realizó una PCR de verificación en la que se usaron dos sets de partidores que consideraran ambos sentidos de ligación, BEZ-F1 o BEZ-R1, y Rev-CsmA. Además, se incluyó un par de partidores, Rev-CsmA y CS18-locF, cuyas secuencias alinean en una región interna del locus de CS30. En ambas cepas transformadas con las dos versiones del locus fimbrial se obtuvo un producto de amplificación indicativo de la presencia del locus de CS30 que sug, y además se evidenció que las ligaciones de cada versión del inserto con el vector quedaron en sentidos opuestos, una con respecto a la otra, según el producto de amplificación obtenido en cada caso (**Figura 5**).

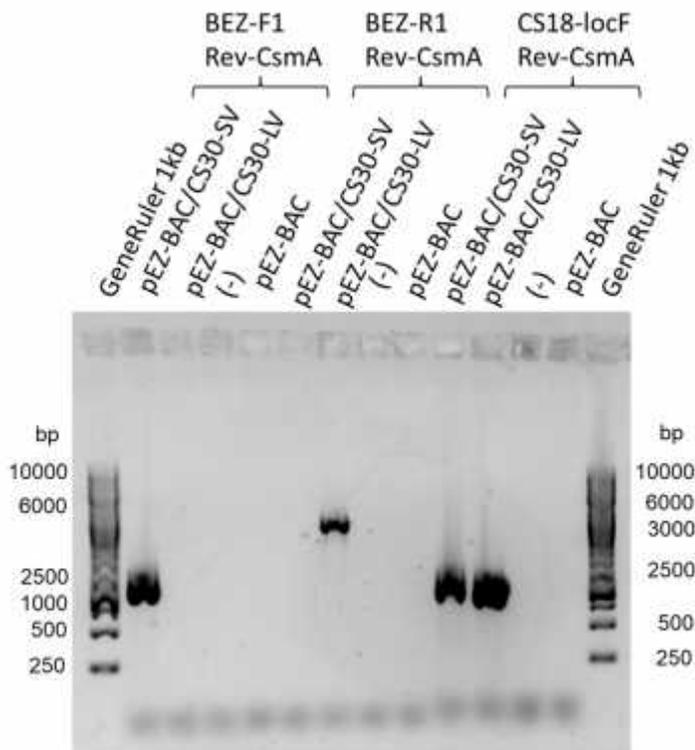


Figura 5. Verificación del clonamiento del locus codificante de CS30 en el vector pEZ-BAC.

Ambas versiones de CS30 fueron clonadas a partir de la cepa ETEC 702947. Se insertaron en el vector pEZ-BAC tras haber sido digeridas con una enzima de restricción y posteriormente fueron ligadas con el vector. Debido a que podrían haberse ligado en cualquiera de los dos sentidos posibles, se utilizaron pares de partidores que consideraran ambos sentidos. Las secuencias homologas a BEZ-F1 y BEZ-R1 se encuentran en los extremos del sitio de múltiple clonamiento del vector, mientras que la de Rev-CsmA se ubica dentro de la secuencia de CS30, lo mismo que para la de CS18-locF. (-) corresponde a la mezcla de reacción para la PCR sin DNA presente, sirviendo como control negativo.

Para determinar la presencia e inmunorreactividad de CS27 y CS30 con anticuerpos anti-CsnA, se prepararon extractos de proteínas de superficie a partir del repertorio de cepas, y éstos fueron separados por SDS-PAGE, en dos geles para cada caso. Uno de los geles de poliacrilamida fue teñido con azul de Coomassie para analizar el patrón de migración de proteínas de acuerdo a su masa molecular, mientras que el otro gel fue destinado a transferencia a una membrana de nitrocelulosa y posterior detección mediante *Western blot* utilizando anticuerpos anti-CsnA. Los resultados obtenidos con extractos de las cepas silvestres productoras de ambos CFs siguen el mismo patrón: en los geles teñidos con azul de Coomassie, se observan bandas discretas en los tamaños esperados para cada subunidad estructural principal madura (18,02 kDa para CsmA y 18,25 kDa para CmaH) (**Figuras 6 y 7**). Los ensayos de *Western blot* corroboraron esto, con la aparición de bandas inmunorreactivas en los mismos tamaños al usar los anticuerpos anti-CsnA. En los casos de DH10B, se observaron bandas de los mismos tamaños para ambos CFs, en las cepas transformadas con la versión corta de cada locus (**Figuras 6A y 7A**). Nótese la ausencia de banda inmunorreactiva en la cepa DH10B transformada con la versión larga de CS27 (**Figura 6A**). En el caso de DH10B transformada con el locus de CS30, se observaron bandas inmunorreactivas en los extractos de las cepas con ambas versiones del locus, pero solo al aumentar la cantidad de proteínas cargada por carril, (**Figuras 7A**, 20 µg por carril, y **7B**, 4 µg por carril). Así mismo, los extractos de cepas mutantes por delección de los loci de CFs no

presentaron bandas inmunorreactivas en los tamaños esperados (**Figura 6B y 7B**), al igual que las cepas mutantes transformadas con el vector pEZ-BAC vacío (**Figuras 6B y 7B**). Sin embargo, en los extractos de las cepas mutantes complementadas con la versión corta de cada locus, se observó una banda discreta con una movilidad similar a la presente en el carril de la cepa silvestre (**Figuras 6B y 7B**).

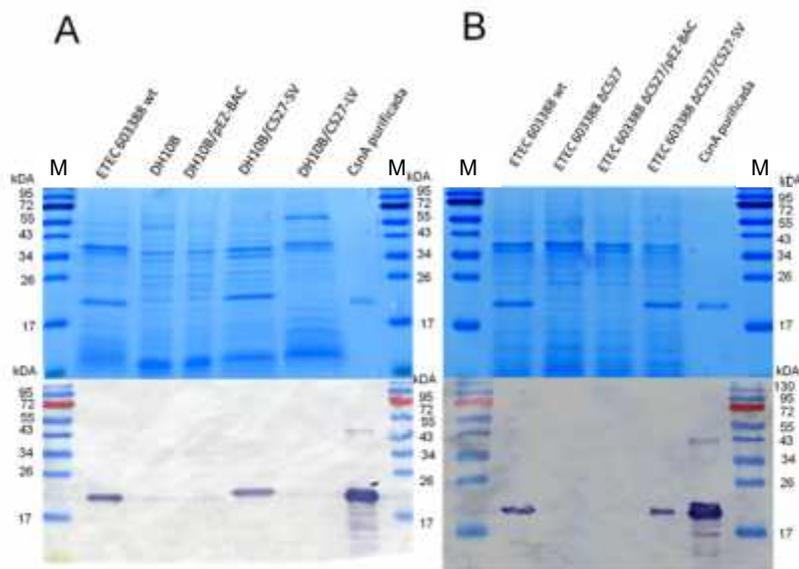


Figura 6. Detección de CS27 en extractos enriquecidos en proteínas de superficie de cepas ETEC y DH10B separados por SDS-PAGE. Para estos ensayos, se hicieron extracciones de proteínas de superficie desde cada cepa indicada en la parte superior de la figura. La estimación del contenido total de proteínas de cada extracto se realizó mediante el método de Bradford. Para el *Western blot* se usó anti-CsnA como anticuerpo primario. M: Marcador de peso molecular. **(A)**

Detección de CS27 en cepas DH10B recombinantes. Se cargaron 4 µg de proteína por carril para tinción con azul de Coomassie y 1 µg para detección por *Western blot*. **(B)** Cepas ETEC 603388 mutantes y complementadas *in trans*. Se cargaron 4 µg de proteína por carril para tinción con azul de Coomassie y 1 µg por carril para detección por *Western blot*.

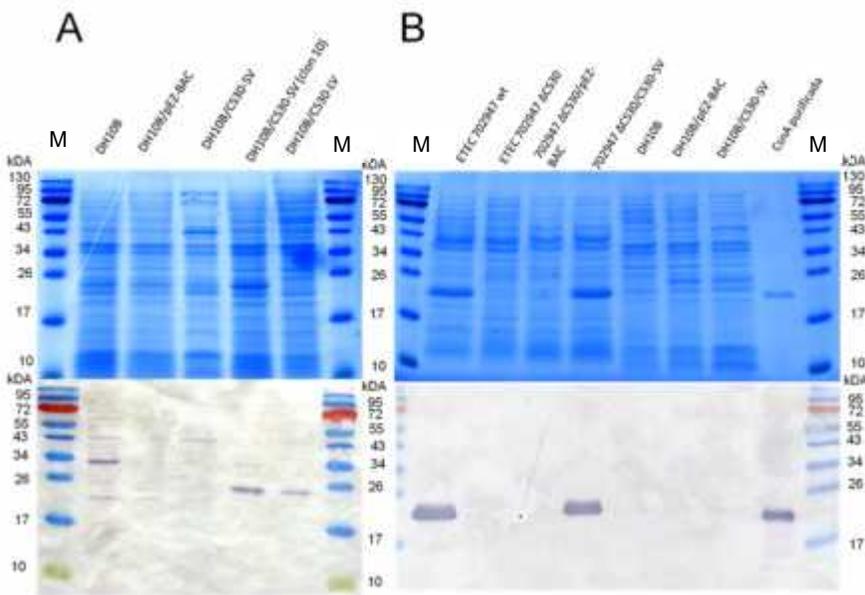


Figura 7. Detección de CS30 en extractos enriquecidos en proteínas de superficie de cepas ETEC y DH10B separados por SDS-PAGE. M: Marcador de peso molecular. **(A)** Detección de CS30 en cepas DH10B recombinantes. Se cargó 20 µg de proteína por carril para tinción con azul de Coomassie y 4 µg para detección por *Western blot*. DH10B/CS30-SV clon 10 fue obtenido en la misma transformación que dio origen a la cepa DH10B/CS30-SV **(B)** Cepas ETEC 702947

mutantes y complementadas con locus de CS30. 4 µg de proteína por carril para tinción con azul de Coomassie y 1 µg por carril para detección por *Western blot*.

En base a los resultados obtenidos hasta esta etapa, que indican que las cepas transformadas con las versiones largas de ambos loci no producían sus respectivos CFs, o lo hicieron a muy bajo nivel, se decidió no utilizar estas cepas, ni sus vectores recombinantes, en los pasos posteriores. Debido a esto, las cepas transformadas con CS27-SV y CS30-SV se denominarán de aquí en adelante como CS27 y CS30, respectivamente

Para corroborar los resultados del SDS-PAGE, la reactividad entre los anticuerpos anti-CsnA con CS27 y CS30 fue realizada mediante la técnica de inmunomarcación con oro coloidal, sobre bacterias no permeabilizadas. Esto permitió además determinar si los anticuerpos anti-CsnA reconocen CS27 y CS30 en su estado nativo. Para ello, se prepararon cultivos bacterianos a los que se les agregó los anticuerpos anti-CsnA como anticuerpo primario y luego se añadieron anticuerpos secundarios conjugados por partículas de oro, para hacer visibles la distribución del anticuerpo reactivo al observarlas con un microscopio electrónico de transmisión. En las cepas ETEC 603388 y 702947 silvestres se observó partículas de oro indicativas de inmunoreactividad de los anticuerpos con la superficie bacteriana (**Figuras 8A y 8D**, respectivamente). En el caso de la cepa mutante de CS27 no se observaron partículas de oro (**Figura 8B**), pero sí en el caso de la mutante de CS30, aunque en menor abundancia en comparación con la respectiva cepa silvestre (**Figura 8E**). Esto cambia en ambas

cepas mutantes complementadas con los loci de los respectivos CFs, en las que se observó una cantidad mayor de partículas de oro (**Figuras 8C y 8F**).

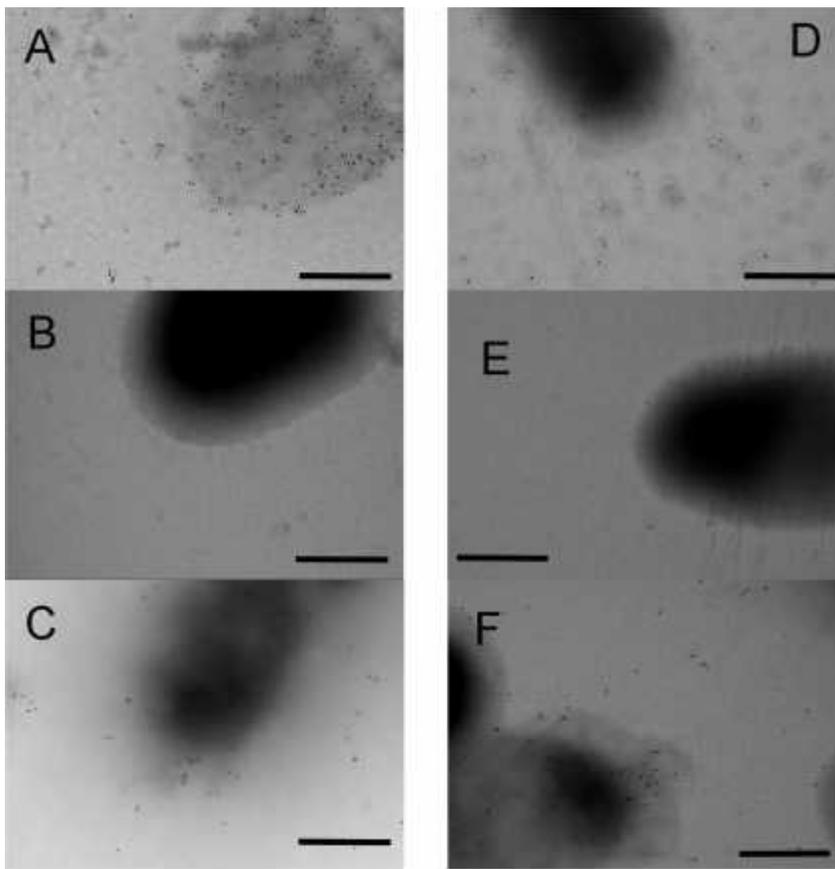


Figura 8. Inmunomarcación con oro coloidal para la detección de CS27 y CS30 utilizando anticuerpos anti-CsnA, analizada por. Se usaron anticuerpos secundarios conjugados con partículas de oro de 10nm de diámetro y las muestras fueron analizadas mediante microscopía

electrónica de transmisión. Amplificación: 43000X, Barra: 500nm. **(A)** ETEC 603388 silvestre. **(B)** ETEC 603388 CS27. **(C)** ETEC 603388 CS27/CS27-SV. **(D)** ETEC 702947 silvestre. **(E)** ETEC 702947 CS30. **(F)** 702947 CS30/CS30.

4. 2 CS27 y CS30 son determinantes de adherencia de cepas ETEC

Para evaluar la potencial capacidad de adherencia conferida por los CFs CS27 y CS30 a *E. coli*, se realizaron ensayos de adherencia a monocapas de la línea celular Caco-2. Tras ser infectadas, las placas se incubaron por tres horas que correspondieron al tiempo total de los ensayos. Inicialmente, se analizó la adherencia conferida por CS27 a la cepa DH10B, pero no hubo diferencias significativas en los niveles de adherencia de la cepa DH10B/CS27 con respecto a la cepa sin transformar o portando el vector pEZ-BAC vacío (**Figura 9A**). Un ensayo similar de DH10B con CS30 fue considerado, pero finalmente fue descartado, principalmente por motivos de tiempo. Posteriormente, se realizaron los ensayos con las cepas ETEC 603388 y 702947. En ambos casos se observó la pérdida de adherencia en las cepas mutantes carentes de los CFs correspondientes y la recuperación en las cepas mutantes complementadas (**Figuras 9B y 9C**). Algo importante a considerar es que la diferencia en el porcentaje de adherencia de las cepas complementadas con respecto a las cepas mutantes solo es significativa en el caso de CS27 (**Figura 9B**) y no en CS30 (**Figura 9C**), de acuerdo con el análisis estadístico realizado.

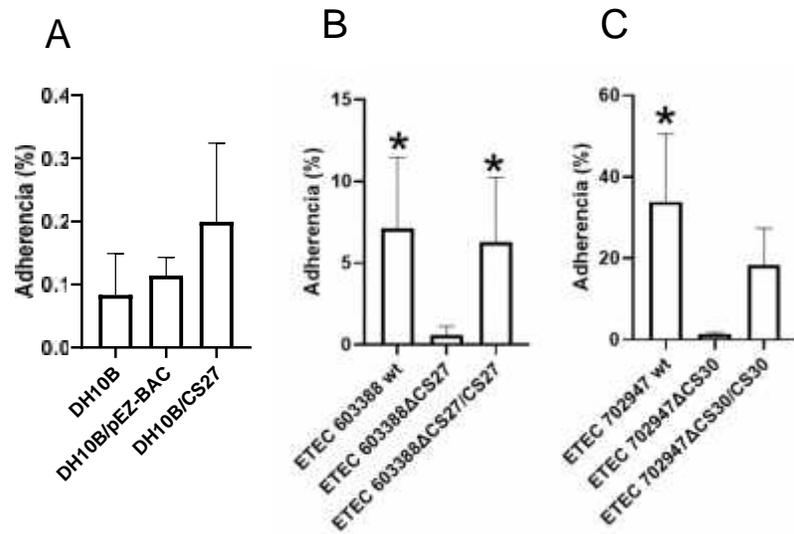


Figura 9. Determinación del nivel de adherencia bacteriana a células Caco-2. El porcentaje de adherencia representa la razón obtenida entre el número de bacterias en el inóculo inicial y el número de bacterias adheridas a la capa celular tras el período de tres horas del ensayo. Los porcentajes de adherencia para cada cepa son el promedio de 5 experimentos distintos (n=5). Las barras de error representan la desviación estándar. El asterisco (*) indica diferencias significativas con respecto a la cepa mutante de acuerdo al test de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn para comparaciones múltiples ($p < 0,05$). **(A)** DH10B, DH10B transformada con pEZ-BAC y con pEZ-BAC/CS27-SV. **(B)** ETEC 603388 silvestre (wt), mutante por delección de locus de CS27 y mutante complementada con vector pEZ-BAC/CS27-SV **(C)** ETEC 702947 silvestre (wt), mutante por delección de locus CS30 y mutante complementada con vector pEZ-BAC/CS30-SV.

4. 3 Anticuerpos anti-CsnA no alteran los niveles de adherencia de ETEC productoras de CS27 y CS30 a células Caco-2

Para evaluar el potencial inhibitorio de los anticuerpos anti-CsnA sobre la adherencia de las bacterias que producen CS27 y CS30, se hicieron nuevos ensayos de adherencia sobre células Caco-2, esta vez considerando en el ensayo la presencia de anticuerpos anti-CsnA en el medio. En este ensayo se utilizó además el suero preinmune proveniente de los conejos inmunizados para obtener los anticuerpos, así como también se usaron anticuerpos anti-MrkA como control de isotipo, es decir, un anticuerpo primario del mismo tipo que pero que reconoce otro antígeno ausente en nuestras cepas bacterianas estudiadas.

Como se observa en la **figura 10**, los resultados de los ensayos indican que los anticuerpos anti-CsnA no afectan significativamente la adherencia a Caco-2 ni en el caso de ETEC 603388 (**Figura 10A**), ni en ETEC 702947 (**Figura 10B**).

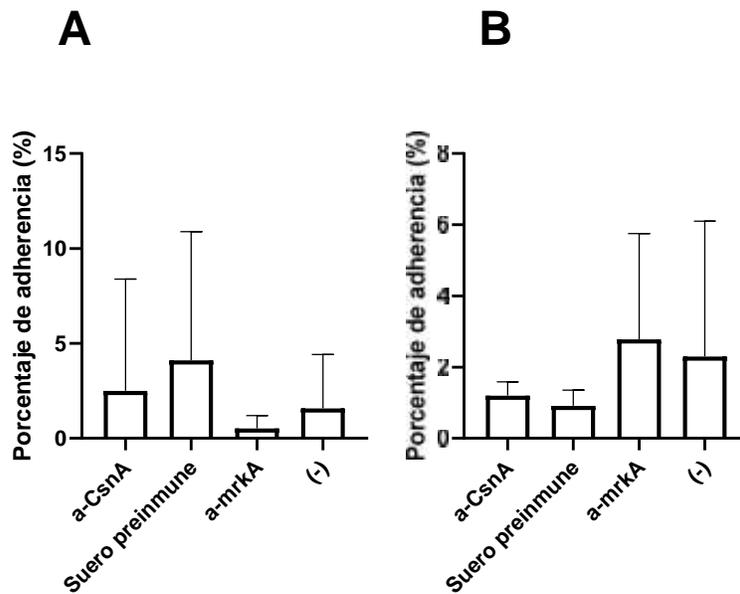


Figura 10. Ensayos de bloqueo de adherencia con anticuerpos anti-CsnA, sobre células Caco-2. (A) ETEC 603388 (CS27); (B) ETEC 702947 (CS30). Porcentajes de adherencia de cepas ETEC silvestres a células Caco-2, luego de 30 minutos de infección. Previo a la infección, se agregaron los anticuerpos anti-CsnA a la suspensión de las cepas ETEC para observar su efecto en la adherencia de estas. El suero preimmune proviene de los animales de los que se obtuvieron los anticuerpos anti-CsnA, pero no poseen anticuerpos que reaccionen con CS27 o CS30. Anti-MrkA es un control de isotipo y MrkA es una subunidad estructural de un pilus no presente en estas cepas. Las barras de error representan la desviación estándar. Se realizaron 8 ensayos, pero solo en 4 se utilizó suero preimmune, y en los otros 4 se usó el anticuerpo anti-MrkA como control. Los resultados fueron analizados mediante la prueba de Kruskal-Wallis con corrección de Dunn para comparaciones múltiples

Comentado [FDC2]: Es cierto que la calidad de la imagen no es la mejor. Probaste pegándola con "pegado especial" y luego "mapa de bits independiente del formato"? Anti-MrkA parece estar en negrita.

5. DISCUSIÓN

La infección por ETEC y sus efectos a nivel mundial han impulsado la búsqueda de terapias preventivas, ya sea promoviendo la respuesta inmune, o interfiriendo con la patogenicidad de la bacteria. Los CFs son pili que permiten a ETEC adherirse a la superficie del epitelio intestinal y así iniciar su mecanismo patogénico, por lo que son blancos de interés en la búsqueda de métodos para prevenir la infección. A causa de la diversidad estructural y antigénica existente entre los distintos CFs, el desarrollo de estrategias preventivas de un espectro amplio y transversal se ve obstaculizado. Por lo tanto, agrupar los CFs en familias, de acuerdo al grado de identidad de sus componentes y a la similitud estructural que poseen, se hace conveniente. De acuerdo a esto último, la familia ₂ de los CFs ensamblados por la vía chaperona-ujier ha llamado la atención en la última década, t por su creciente relevancia en la epidemiología actual de ETEC. Es relevante indicar que, hasta la fecha, no se ha reportado el diseño ni la evaluación de formulaciones vaccinales conteniendo componentes de CFs- ₂, contrario a lo que ocurre con representantes de los CFs- ₁ y CFs- ₃, que incluyen las estructuras más estudiadas de ETEC humanas. En este escenario, estudios como el realizado en esta tesis, cobran particular relevancia.

Este trabajo fue realizado con el objetivo de determinar si anticuerpos anti-CsnA, la subunidad estructural principal de CS20, un CF- ₂, reaccionarían con

las subunidades estructurales principales de CS27 y CS30, CFs de la misma familia, y evaluar su capacidad para bloquear la adherencia a células intestinales.

5. 1 Reactividad de los anticuerpos anti-CsnA con los pili CS27 y CS30

El primer resultado importante de este trabajo fue el reconocimiento de las subunidades estructurales principales de CS27 y CS30 por parte de los anticuerpos anti-CsnA. En efecto, un estudio previo hecho en el laboratorio y publicado en 2018, reportó la unión de anti-CsnA con la subunidad estructural principal de CS26, otro CF-2 [19]. El alto grado de identidad existente entre las distintas pilinas de los (**Figura 2**), , indicaban que la reacción cruzada era esperable.

La reactividad de los anticuerpos anti-CsnA con CS27 y CS30 fue evidente mediante Western blot sobre extractos de cepas ETEC y DH10B expresando ambos CFs. Solamente no se observó reactividad en la cepa DH10B transformada con la versión larga del locus de CS27 pero, en este caso, tampoco se detectó la banda correspondiente a la subunidad estructural principal por tinción con azul de Coomassie, lo que indicó que la fimbria no se estaba produciendo. Cabe señalar que la versión larga del locus de CS27 contenía genes de reguladores transcripcionales que no se encuentran en la versión corta.(**Figura 6A**). Las condiciones de crecimiento fueron equivalentes para todos los casos, incluyendo a la cepa DH10B portadora de la versión corta del locus que si produjo la fimbria, descartándose así alguna influencia de las

condiciones de cultivo. Una posible razón es que la función de los reguladores transcripcionales dependa de factores presentes en las cepas silvestres, los cuales no están presentes en la cepa DH10B. Fue debido a esto que las cepas mutantes fueron complementadas solo con las versiones cortas de cada locus, ya que solo con ellas se detectaron bandas inmunorreactivas en los tamaños esperados para cada subunidad estructural principal. En el caso de CS30, y no de CS27, la cepa DH10B transformada con la versión larga del locus fimbrial sí determinaría la producción del CF debido a que se observa una banda inmunorreactiva, aunque en mucha menor intensidad (**Figura 7A**). En base a estas observaciones es interesante notar la oportunidad de estudiar a futuro el proceso de regulación de la expresión de los loci de CFs-₂ y su importancia en la patogenicidad de ETEC.

Los resultados del análisis de inmunomarcación con oro coloidal reafirman la conclusión que existe interacción entre el anticuerpo y las proteínas estructurales de CS27 y CS30. La marca con partículas de oro fue detectable tanto en las cepas silvestres como en las mutantes complementadas. Es importante mencionar que la marca observable no parece seguir la morfología propia de un pili, sino que más bien parece dispersa de manera aleatoria. Este patrón de marca observado corresponde con el descrito por primera vez en el estudio que caracterizó a CS20 [49], y que fue suficiente para mostrar la relación entre los pili en la superficie de la bacteria con las partículas de oro. Este patrón fue encontrado nuevamente en estudios posteriores, como la caracterización de

CS26 [19, 31]. Tanto en los estudios de CS20 como en el de CS26, los anticuerpos escogidos se obtuvieron a partir de la subunidad estructural principal purificada (de hecho, los mismos anticuerpos anti-CsnA utilizados para caracterizar CS26 fueron usados en este trabajo). Aunque esta metodología fue utilizada con resultados satisfactorios para previas caracterizaciones [19, 31, 49], una consideración importante a tener en cuenta son las diferencias en resultados que se obtendrían al usar anticuerpos generados con el pilus completo, en los que la estructura tridimensional y la interacción entre las pilinas podrían ser estudiados a partir de diseños experimentales diferentes. En otros trabajos, se han generado anticuerpos obtenidos desde preparaciones purificadas de pili completos [50, 51], en los que la ubicación de la marca de las partículas de oro, asociadas a epitopos encontrados naturalmente en la superficie del pilus, sigue un patrón más característico de la estructura de este. En ensayos de microscopía electrónica sin inmunomarcación con oro coloidal (imágenes no mostradas), no se logró visualizar CS27. El motivo por el que ocurre esto no ha sido determinado, incluso tras modificar el protocolo e intentar en reiteradas ocasiones y con otras cepas ETEC CS27+. Como se observa principalmente en las **Figuras 8A y 8F**, la gran mayoría de las partículas de oro se observan sobre la bacteria y disminuyen de manera considerable en sus alrededores. Esto podría relacionarse con el protocolo utilizado, que contempla una etapa de centrifugación de la suspensión bacteriana, lo que podría fracturar las estructuras fimbriales o bien dejarlas adosadas estrechamente a la bacteria, dificultando la visualización de

los pili. Se proyecta la utilización de pili en suspensión, separados de la superficie de la bacteria mediante calentamiento a 60°C, lo que permitiría, entre otras cosas, calibrar las condiciones necesarias para poder hacer visible la estructura fimbrial en el microscopio.

5. 2 Rol de CS27 y CS30 en adherencia de ETEC y DH10B

Con los ensayos en células Caco-2, se examinó la capacidad de adherencia conferida por los CFs CS27 y CS30 a las cepas ETEC. Para ambos casos, el nivel de adherencia detectado en cepas mutantes por delección de sus respectivos loci fue significativamente menor en comparación a las cepas silvestres. En base a las comparaciones hechas por el análisis estadístico, la capacidad de adherencia dada por el pilus fue evidente en el caso de CS27, ya que la restauración de los niveles de adherencia de la cepa complementada en *trans* fue observada por un aumento significativamente mayor con respecto a la cepa mutante carente de pilus (**Figura 9B**). Las diferencias significativas halladas entre la cepa silvestre y la mutante, y entre la mutante y la cepa complementada, avalan la funcionalidad de CS27 como determinante de adherencia de ETEC. En el caso de CS30, hubo una disminución significativa en los niveles de adherencia de la cepas mutante que no expresaba al CF con respecto a la cepas silvestre que sí lo hacía, indicando que la ausencia de CS30 implica una incapacidad de ETEC a adherirse a superficies epiteliales. Sin embargo, a diferencia de lo observado en el caso de CS27, la cepa mutante complementada en *trans* con el locus fimbrial no demostró un aumento significativo en el porcentaje de

adherencia con respecto a la cepa mutante (**Figura 9C**). Los datos crudos obtenidos muestran que todos los ensayos dieron resultados similares: los porcentajes de adherencia de la cepa silvestre y la mutante complementada eran siempre mayores a los de la mutante. Pese a ello, el test de Kruskal-Wallis para comparaciones múltiples determinó que la diferencia no era significativa. Es probable que aumentando el número de ensayos ($n > 5$), esta diferencia se vuelva significativa, en base a que los datos que se obtuvieron en este trabajo siguieron siempre la misma tendencia. De todas formas, la disminución observada en la cepa mutante carente de CS30 con respecto a la silvestre indica que este CF si es necesario para la adherencia de ETEC, corroborando lo reportado en la literatura [21].

En 2018, cuando se caracterizó CS26 realizando el mismo procedimiento detallado en este trabajo, la cepa DH10B, que naturalmente no expresa CFs-₂, logró adquirir la capacidad para adherirse a células Caco-2, al transformarse con el locus de CS26 [19]. Sin embargo, de acuerdo a los resultados obtenidos en este trabajo, el locus de CS27 por sí solo no es capaz de conferir la capacidad de adherencia a DH10B (**Figura 9A**). Aunque esto podría deberse a diversos factores, es importante recalcar que CS27 sí es producido por las cepas recombinantes, de acuerdo a los resultados obtenidos por tinción con azul de Coomassie de extractos de superficie, ensayos de *Western blot* e inmunomarcación con oro coloidal (**Figuras 6 y 8**). En cepas ETEC silvestres, se ha descrito la existencia de factores adicionales que regulan a los CFs. Entre

ellos se pueden encontrar, por ejemplo: Rns, una proteína perteneciente a la familia AraC de reguladores transcripcionales (AFTR), y que regula la transcripción tanto de pili como de otros factores de virulencia [15], IscR y Fnr, reguladores que actúan de acuerdo a los niveles de hierro y O₂, respectivamente, disponibles en el medio [52, 53], y HldE, una proteína asociada a glicosilaciones post-traduccionales de proteínas [54]. Que CS26 confiera adherencia a DH10B, pero no CS27, podría deberse a dos razones: que estos CFs poseen afinidades diferentes a la superficie del epitelio intestinal, dada, por ejemplo, por modificaciones post-traduccionales de cada una, y/o que los niveles de expresión de ambos CFs, en ausencia de factores reguladores adicionales como los ya descritos, y que no se encuentran en DH10B, y en el mismo contexto recombinante, sean significativamente diferentes. Como las comparaciones entre distintos CFs no fueron parte del estudio, se requieren observaciones adicionales para establecer la importancia de esta información.

5. 3 Anticuerpos anti-CsnA no bloquean la adherencia de ETEC a células

Caco-2

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos de bloqueo, los anticuerpos anti-CsnA no producen cambios significativos en los niveles de adherencia de ETEC. Las cepas que fueron incubadas con los anticuerpos anti-CsnA no presentan diferencias significativas en sus niveles de adherencia en comparación a las que fueron cultivadas con el suero preinmune o con anti-MrKA, ni tampoco con las cepas inoculadas sin elementos adicionales. El

elemento más importante que se puede observar en los gráficos es la gran variabilidad de los resultados, representada por las barras de la desviación estándar (**Figura 10**). Esta variabilidad, que se observó en menor medida en los ensayos anteriores (ver barras de error en **Figura 9**), fue especialmente marcada en el caso de ETEC 603388 (**Figura 10A**) y en los ensayos con el control de isotipo y en el control negativo (sin anticuerpos) de ETEC 702947 (**Figura 10B**, segunda y tercera barra). Una posible explicación a esta amplia variabilidad, particular de este experimento, es que hubo diferencias importantes en los recuentos bacterianos de los inóculos iniciales de cada ensayo, con valores que diferían incluso en órdenes de magnitud, yendo desde 7×10^4 hasta $3,03 \times 10^6$ UFC entre distintas repeticiones. Esto afectó a la proporción entre bacterias y anticuerpos o suero preinmune, que no se ajustó en todos los casos a lo establecido como la condición del experimento. Además, al ser cultivos vivos, algunos parámetros como la velocidad de crecimiento y la distribución de nutrientes en el medio de cultivo durante el ensayo, también pudieron verse afectados. De acuerdo a resultados que se han obtenido posteriormente en otros trabajos en curso en nuestro laboratorio, los anticuerpos anti-CsnA sí serían capaces de disminuir la adherencia de cepas ETEC que expresan CS27 o CS30.

5. 4 Importancia de la funcionalidad de CS27 como determinante de adherencia de ETEC

La funcionalidad de CS27 a partir de los resultados previos es el hallazgo más importante de este trabajo. Aunque la secuencia del locus *cmaHBCDEFG*

se conocía desde 2017 [18], su capacidad para conferir adherencia a cepas de ETEC no había sido confirmada hasta ahora. CS27 es uno de los pili CU descritos más recientes, por lo que su detección en muestras clínicas ha sido limitada. Aun así, la importancia de las ETEC CS27+ ya ha sido reportada. En 2017, se destacó el descubrimiento de una cepa ETEC CS27+ en una muestra clínica obtenida en Bangladesh, notable por ser el único patógeno hallado en dicha muestra, a diferencia de la mezcla con otros patógenos, como *Vibrio cholerae* u otros patotipos de *E. coli*, en la que se encuentra normalmente ETEC. Entonces, se destacó la posibilidad de que este nuevo fenotipo fuera capaz de causar diarrea por sí solo. Ese mismo año, otro estudio mostró que, dentro de un total de 35 genomas de cepas ETEC sin adhesinas conocidas, 7 fueron positivos para el locus de CS27, siendo el más frecuente de todos los encontrados en ese estudio [18]. Por otro lado, una búsqueda de la secuencia de nucleótidos de *cmaH* en genomas de referencia de *Escherichia coli* resulta en un total de 20 genomas distintos de *E. coli*, lo que confirma el aumento de registros positivos en la base de datos desde entonces. Esto reafirma la importancia de considerar de aquí en adelante a CS27 en el marco de la epidemiología de ETEC. Se espera que el estudio de CS27 continúe en el futuro, y es prudente tener en cuenta nuevas consideraciones en base a la metodología de este estudio, como un número mayor de repeticiones controlando los inóculos iniciales, estudiar otras cepas ETEC CS27+ y también la realización de ensayos de colonización y protección *in vivo*.

6. CONCLUSIONES

- Los CFs de ETEC, CS27 y CS30, son reconocidos por anticuerpos anti-CsnA.
- CS27 de ETEC es funcional como pilus determinante de adherencia a células Caco-2.
- Los anticuerpos anti-CsnA no interfieren con la adherencia de ETEC conferida por CS27 o CS30 en las condiciones probadas en el estudio.

7. REFERENCIAS

- [1] Nataro, J. P. y Kaper, J. B. 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 11(1):142-201.
- [2] Gomes, T. A. y cols. 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. Brazilian Journal of Microbiology. 47, 3-30.
- [3] Kaper, J. B., Nataro, J. P., y Mobley, H. L. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. Nature Reviews Microbiology. 2(2):123-140.
- [4] Vila, J. y cols. 2016. *Escherichia coli*: an old friend with new tidings. FEMS Microbiology Reviews. 40(4):437-463.
- [5] Sannes, M. R. y cols. 2004. Virulence factor profiles and phylogenetic background of *Escherichia coli* isolates from veterans with bacteremia and uninfected control subjects. The Journal of infectious diseases. 190(12):2121-2128.
- [6] Croxen, M. A. y cols. 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. Clinical Microbiology Reviews. 26(4):822-880.
- [7] Institute for Health Metrics and Evaluation (IHME). 2018. Findings from the global burden of disease study 2017. [en línea] <<http://www.healthdata.org/policy-report/findings-global-burden-disease-study-2017>> [consulta: 29 junio 2020]

- [8] Zhang, W. y Sack, D. A. 2015. Current progress in developing subunit vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhea. Clinical and Vaccine Immunology. 22(9):983-991.
- [9] Troeger, C. y cols. 2018. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of diarrhoea in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet Infectious Diseases. 18(11):1211-1228.
- [10] World Health Organization. 2017. Diarrhoeal Disease [en línea] <www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/diarrhoeal-disease> [consulta: 29 junio 2020]
- [11] World Health Organization. 2019. World health statistics 2019: monitoring health for the SDGs, sustainable development goals. [en línea] <https://www.who.int/gho/publications/world_health_statistics/2019/en/> [consulta: 29 junio 2020]
- [12] Naghavi, M. y cols. 2017. Global, regional, and national age-sex specific mortality for 264 causes of death, 1980–2016: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2016. The Lancet. 390(10100):1151-1210.
- [13] Mirhoseini, A. y cols. 2018. Review on pathogenicity mechanism of enterotoxigenic *Escherichia coli* and vaccines against it. Microbial pathogenesis. 117:162-169.

- [14] Turner, S. M. y cols. 2006. Weapons of mass destruction: virulence factors of the global killer enterotoxigenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters. 263(1):10 –20.
- [15] Madhavan, T. V. y Sakellaris, H. 2015. Colonization factors of enterotoxigenic *Escherichia coli*. In Advances in applied microbiology. 90:155-197.
- [16] Nuccio, S. P. y Bäumlér, A. J. 2007. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. Microbiology and Molecular Biology Reviews. 71(4):551-575.
- [17] Werneburg, G. T. y Thanassi, D. G. 2018. Pili assembled by the chaperone/usher pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. EcoSal Plus. 8(1).
- [18] Del Canto, F. y cols. 2017. Chaperone-usher pili loci of colonization factor-negative human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Frontiers in cellular and infection microbiology. 6:200.
- [19] Cádiz, L. y cols. 2018. Coli surface antigen 26 acts as an adherence determinant of enterotoxigenic *Escherichia coli* and is cross-recognized by anti-CS20 antibodies. Frontiers in Microbiology. 9:2463.
- [20] Nada, R. y cols. 2011. Discovery and phylogenetic analysis of novel members of class b enterotoxigenic *Escherichia coli* adhesive fimbriae. Journal of clinical microbiology. 49(4):1403-1410.

- [21] von Mentzer, A. y cols. 2017. Identification and characterization of the novel colonization factor CS30 based on whole genome sequencing in enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC). Scientific reports. 7(1):1-11.
- [22] Bourgeois, A. L. y cols. 2016. Status of vaccine research and development for enterotoxigenic *Escherichia coli*. Vaccine. 34(26):2880-2886.
- [23] Vidal, R. M. y cols. 2019. Colonization factors among enterotoxigenic *Escherichia coli* isolates from children with moderate-to-severe diarrhea and from matched controls in the Global Enteric Multicenter Study (GEMS). PLoS neglected tropical diseases. 13(1):e0007037.
- [24] Isidean, S. D. y cols. 2011. A systematic review of ETEC epidemiology focusing on colonization factor and toxin expression. Vaccine. 29(37):6167–6178.
- [25] Sahl, J. W y cols. 2017. Insights into enterotoxigenic *Escherichia coli* diversity in Bangladesh utilizing genomic epidemiology. Scientific reports. 7(1):1-12.
- [26] Harro, C y cols. 2019. Live attenuated enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) vaccine with dmLT adjuvant protects human volunteers against virulent experimental ETEC challenge. Vaccine. 37(14):1978-1986.
- [27] O’Ryan, M. y cols. 2015. Vaccines for viral and bacterial pathogens causing acute gastroenteritis: Part II: Vaccines for *Shigella*, *Salmonella*, enterotoxigenic *E. coli* (ETEC) enterohemorrhagic *E. coli* (EHEC) and *Campylobacter jejuni*. Human Vaccines & Immunotherapeutics. 11(3):601-619.

- [28] Begum, Y.A. y cols. 2018. *In Situ* analyses directly in diarrheal stool reveal large variations in bacterial load and active toxin expression of enterotoxigenic *Escherichia coli* and *Vibrio cholerae*. mSphere. 3(1):e00517-17.
- [29] Duan, Q. y cols. 2017. MEFA (multi-epitope fusion antigen)-novel technology for structural vaccinology, proof from computational and empirical immunogenicity characterization of an enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) adhesin MEFA. Journal of vaccines & vaccination. 8(4):367.
- [30] Zhang, W. y Sack, D. A. 2015. Current progress in developing subunit vaccines against enterotoxigenic *Escherichia coli*-associated diarrhea. Clinical and Vaccine Immunology. 22(9):983-991.
- [31] Del Canto F y cols. 2012. Identification of Coli Surface Antigen 23, a Novel Adhesin of Enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infection and Immunity. 80(8):2791-2801.
- [32] Savarino, S. J. y cols. 2017. Prophylactic Efficacy of Hyperimmune Bovine Colostral Antiadhesin Antibodies Against Enterotoxigenic *Escherichia coli* Diarrhea: A Randomized, Double-Blind, Placebo-Controlled, Phase 1 Trial. The Journal of Infectious Diseases. 216(1):7–13.
- [33] Tobias, J. y Svennerholm, A. M. 2012. Strategies to overexpress enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) colonization factors for the construction of oral whole-cell inactivated ETEC vaccine candidates. Applied Microbiology and Biotechnology. 93(6):2291–2300.

- [34] McConnell, M. M. y cols. 1989. Antigenic homology within human enterotoxigenic *Escherichia coli* fimbrial colonization factor antigens: CFA/I, coli-surface-associated antigens (CS) 1, CS2, CS4 and CS17. FEMS microbiology letters. 61(1-2):105-108.
- [35] Singh, B. y cols. 2015. Antibody-mediated disruption of the mechanics of CS20 fimbriae of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Scientific Reports. 5:13678.
- [36] Sievers, F. y cols. 2011. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. Molecular systems biology. 7(1).
- [37] Lucigen. 2018. CopyRight® v2.0 BAC Cloning Kits. [en línea] <<https://www.lucigen.com/docs/manuals/MA028-CopyRight-v2.0-BAC-Cloning-Kits.pdf>> [consulta: 29 junio 2020]
- [38] Datsenko, K. A. y Wanner, B. L. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. Proceedings of the National Academy of Sciences. 97(12):6640-6645.
- [39] Datta, S. y cols. 2006. A set of recombineering plasmids for gram-negative bacteria. Gene. 379:109-115.
- [40] Honarvar, S. y cols. 2003. Phase variation of the 987P-like CS18 fimbriae of human enterotoxigenic *Escherichia coli* is regulated by site-specific recombinases. Molecular microbiology. 48(1):157-171.

- [41] New England Biolabs. Phusion® High-Fidelity DNA Polymerase. [en línea] <<https://international.neb.com/>> [consulta: 29 junio 2020]
- [42] Evans, D. G. y cols. 1977. Hemagglutination of human group A erythrocytes by enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from adults with diarrhea: correlation with colonization factor. Infection and immunity. 18(2):330-337.
- [43] Wu, D. Y. y Wallace, R. B. 1989. Specificity of the nick-closing activity of bacteriophage T4 DNA ligase. Gene. 76(2):245-254.
- [44] Thermo Fisher Scientific. 2019. DH10B Competent Cells. Carlsbad, EEUU.
- [45] Kruger, N. J. 2009. The Bradford method for protein quantitation. In The protein protocols handbook. 17-24p. Humana Press, Totowa, NJ.
- [46] Congdon, R. W. y cols. 1993. The binding interaction of Coomassie blue with proteins. Analytical biochemistry. 213(2):407-413.
- [47] Romero-Calvo, I. y cols. 2010. Reversible Ponceau staining as a loading control alternative to actin in Western blots. Analytical biochemistry. 401(2):318-320.
- [48] Sambuy, Y. y cols. 2005. The Caco-2 cell line as a model of the intestinal barrier: influence of cell and culture-related factors on Caco-2 cell functional characteristics. Cell biology and toxicology. 21(1):1-26.

- [49] Valvatne, H. *y cols.* 1996. Identification and characterization of CS20, a new putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infection and immunity. 64(7):2635-2642.
- [50] Tacket, C. O. *y cols.* 1987. Purification, morphology, and genetics of a new fimbrial putative colonization factor of enterotoxigenic *Escherichia coli* O159:H4. Infection and immunity 55(5):1063-1069.
- [51] Viboud, G. I. *y cols.* 1993. A new fimbrial putative colonization factor, PCFO20, in human enterotoxigenic *Escherichia coli*. Infection and immunity. 61(12):5190-5197.
- [52] Haines, S. *y cols.* 2015. IscR regulates synthesis of colonization factor antigen I fimbriae in response to iron starvation in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Journal of bacteriology. 197(18):2896-2907.
- [53] Crofts, A. A. *y cols.* 2018. Enterotoxigenic *E. coli* virulence gene regulation in human infections. Proceedings of the National Academy of Sciences. 115(38):e8968-e8976.
- [54] Maigaard Hermansen, G. M. *y cols.* 2018. HldE is important for virulence phenotypes in enterotoxigenic *Escherichia coli*. Frontiers in cellular and infection microbiology. 8:253.

- [55] Vidal, M. y cols. 2005. Single multiplex PCR assay to identify simultaneously the six categories of diarrheagenic *Escherichia coli* associated with enteric infections. Journal of Clinical Microbiology. 43:5362–5365
- [56] Vidal, R. y cols. 2004. Multiplex PCR for diagnosis of enteric infections associated with diarrheagenic *Escherichia coli*. Journal of Clinical Microbiology. 42(4):1787–9
- [57] Rudin, A., Olbe, L., y Svennerholm, A. M. 1996. Monoclonal antibodies against fimbrial subunits of colonization factor antigen I (CFA/I) inhibit binding to human enterocytes and protect against enterotoxigenic *Escherichia coli* expressing heterologous colonization factors. Microbial pathogenesis. 21(1):35-45.
- [58] Qadri, F. y cols. 2006. Homologous and cross-reactive immune responses to enterotoxigenic *Escherichia coli* colonization factors in Bangladeshi children. Infection and immunity. 74(8):4512-4518.