

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**



**TESIS PROFESIONAL**

*Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico.*

**“ANÁLISIS MORFOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE COLIBACTINA (CoPEC) SOBRE CÉLULAS HeLa”**

**LUCIANA ANGÉLICA DARISI PADILLA**

**DIRECTORES DE TESIS:**

Una firma manuscrita en tinta azul, con trazos fluidos y entrecruzados.

**DR. JORGE TOLEDO**  
Red de Equipamiento Científico Avanzado  
(REDECA)  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

Una firma manuscrita en tinta gris, con trazos sencillos y circulares.

**DR. FELIPE DEL CANTO**  
Programa de Microbiología y Micología  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**08 DE JULIO DE 2022**

**UNIVERSIDAD DE CHILE**  
**FACULTAD DE MEDICINA**  
**ESCUELA DE TECNOLOGÍA MÉDICA**



**TESIS PROFESIONAL**

*Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico.*

**“ANÁLISIS MORFOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE COLIBACTINA (CoPEC) SOBRE CÉLULAS HeLa”**

**LUCIANA ANGÉLICA DARISI PADILLA**

**DIRECTORES DE TESIS:**

Una firma manuscrita en tinta azul, con trazos fluidos y entrecruzados.

**DR. JORGE TOLEDO**  
Red de Equipamiento Científico Avanzado  
(REDECA)  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

Una firma manuscrita en tinta negra, con trazos sencillos y circulares.

**DR. FELIPE DEL CANTO**  
Programa de Microbiología y Micología  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

**08 DE JULIO DE 2022**

## **Dedicatoria**

Esta tesis está dedicada a mi madre, Angélica Padilla, y a la memoria de mi padre, Giancarlo Darisi, quienes han sido una fuente constante de apoyo a través de los desafíos de la vida escolar y universitaria, y quienes me han enseñado la importancia de perseverar por lo que aspiro lograr. Por ello, y por el amor que me han entregado, estoy profundamente agradecida.

## **Agradecimientos**

La realización de esta tesis no habría sido posible sin los conocimientos y experiencia de mis tutores, el Dr. Felipe Del Canto y Dr. Jorge Toledo. Quisiera agradecer a ambos por la oportunidad de realizar investigación dentro de sus instalaciones y por ser guías a lo largo de todo el proceso de investigación y escritura. Además, quisiera agradecer particularmente al Dr. Felipe Del Canto por su visión, apoyo y asesoramiento oportuno durante la realización de las metodologías de estudio, y al Dr. Jorge Toledo por su dinamismo, enfoque científico y por facilitarme el equipamiento microscópico y tecnológico.

Por último, me gustaría agradecer a las personas que trabajan en el Programa de Microbiología y Micología y en la Red de Equipamiento Científico Avanzado (REDECA) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, por hacer del proceso un ambiente grato y por sus comentarios y sugerencias.

## Índice

<b>Resumen</b>	3
<b>Introducción</b>	5
Clasificación de cepas de Escherichia coli	5
Cepas comensales y patogénicas	6
Escherichia coli productora de colibactina (CoPEC)	8
Megalocitosis	11
Efecto citopático de aislados clínicos de CoPEC en células HeLa	11
High Content Screening (HCS)	13
Métodos informáticos de análisis de imágenes	14
<b>Hipótesis</b>	17
<b>Objetivo general</b>	17
<b>Objetivos específicos</b>	17
<b>Materiales y métodos</b>	18
Selección de cepas y grupos experimentales	18
Cultivo celular	19
Cultivo bacteriano	20
Infección de células HeLa	20
Ensayos de viabilidad celular	20
Bioseguridad	23
Digitalización de imágenes	23
Deconvolución de imágenes digitalizadas mediante Huygens Professional	26
Análisis morfométrico	26
Análisis estadístico	28
<b>Resultados</b>	29
Evaluación y selección del equipamiento de HCS	29
Megalocitosis in vitro de aislados clínicos de CoPEC	31
Viabilidad celular in vitro de aislados clínicos de CoPEC	44
Análisis morfométrico para la determinación de megalocitosis	46
<b>Discusión</b>	52
<b>Conclusión</b>	59
<b>Bibliografía</b>	61
<b>Anexos</b>	67

## Resumen

*Escherichia coli* es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, que forma parte de la microbiota intestinal humana y que, por otro lado, es agente causal de infecciones del tracto gastrointestinal y urinario. Dentro de la especie *E. coli* existe una amplia variedad de cepas, las que, de acuerdo a las metodologías más actualizadas, pueden ser clasificadas en filogrupos y secuenciotipos. Dentro del filogrupo B2, el cual incluye principalmente cepas patogénicas extraintestinales de *E.coli*, es donde encontramos a las *E. coli* productoras de colibactina (CoPEC), cuya prevalencia ha ido en aumento en la población mundial. Las cepas CoPEC poseen la isla de patogenicidad *pks* (*polyketide synthase*) en su genoma, que codifica la maquinaria de síntesis de la toxina colibactina, un compuesto híbrido entre policétido y péptido de síntesis no ribosomal. Mediante análisis de microscopía, se ha visto que infecciones transientes con CoPEC inducen megalocitosis en células eucariotas, caracterizada por el aumento progresivo del tamaño celular y del núcleo. La inducción de megalocitosis ha sido mayoritariamente observada utilizando cepas prototipo y no ha sido sistemáticamente determinada en células infectadas con grupos de aislados clínicos que representen una mayor diversidad genética. Además, no se han realizado análisis cuantitativos de las imágenes capturadas por microscopía, que permitan determinar la magnitud de los efectos citopáticos ocasionados por distintas cepas CoPEC. Por lo tanto, este trabajo tiene como objetivo evaluar la capacidad de distintos aislados clínicos de CoPEC de ocasionar megalocitosis sobre células HeLa en tinciones de May-Grünwald Giemsa (MGG) y mediante el uso de *High Content Screening* (HCS). Además, se cuantificaron y establecieron diferencias en la magnitud del efecto citopático entre diferentes aislados, mediante el software Fiji. Se observó que todos los aislados clínicos de cepas CoPEC presentaron la capacidad de inducir megalocitosis, con diferencias significativas en su magnitud e independiente del secuenciotipo. De este modo, la implementación de estas metodologías contribuirá a la caracterización de las capacidades patogénicas que las cepas CoPEC exhiben in vitro, estableciendo una base para futuras evaluaciones del rol de otros determinantes de patogenicidad, además de la colibactina, y la eficacia de potenciales inhibidores. **Palabras clave:** *E. coli*, colibactina, isla *pks*, megalocitosis, secuenciotipo.

## Abstract

*Escherichia coli* is a bacterium of the *Enterobacteriaceae* family, which is part of the human intestinal microbiota and that, on the other hand, is the causative agent of gastrointestinal tract and urinary tract infections. *E. coli* comprises a wide variety of different strains, which according to the most updated methodologies, can be classified into phylogroups and sequence types. Within the B2 phylogroup, which includes mainly extraintestinal pathogenic strains, is the Colibactin-Producing *E.coli* (CoPEC) pathotype, whose prevalence has been increasing in the worldwide human population. CoPEC strains harbor the *pks* genomic island that encodes the machinery required for synthesis of the toxin colibactin, a nonribosomal peptide-polyketide hybrid. By performing microscopy analyses, it has been reported that transient infections with CoPEC induce megalocytosis in eukaryotic cells, characterized by a progressive enlargement of the cell body and nucleus. To date, these effects have mostly been analyzed using prototype strains and have not been systematically determined in groups of clinical isolates representing a greater genetic diversity. In addition, quantitative analyses of microscopy images have not been performed to determine the magnitude of the cytopathic effects caused by different CoPEC strains. Therefore, the aim of this project is to evaluate the ability of different CoPEC clinical isolates on causing megalocytosis on HeLa cells with May-Grünwald Giemsa (MGG) stain and by using High Content Screening (HCS). Moreover, the magnitude of the cytopathic effect was quantified using the Fiji software, in order to establish potential differences among different CoPEC isolates. It was observed that all CoPEC clinical isolates strains showed the capacity to induce megalocytosis, with significant differences in the magnitude and regardless of the sequence type. Thus, the implementation of these methodologies will contribute to the characterization of the pathogenic capacities that CoPEC strains can demonstrate *in vitro*, establishing a basis for future evaluation of the role of other pathogenicity determinants, besides colibactin, and the efficacy of potential inhibitors. **Keywords:** *E. coli*, colibactin, *pks* island, megalocytosis, sequence type.

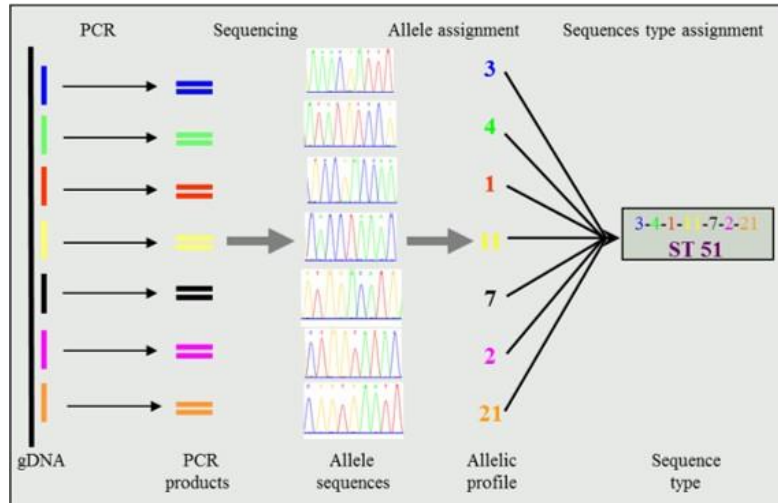
## Introducción

### Clasificación de cepas de *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es una bacteria de la familia *Enterobacteriaceae*, que forma parte de la microbiota intestinal humana desde solo horas después del parto, expandiéndose en la adultez y disminuyendo progresivamente en la vejez (21). Es el bacilo Gram negativo más común como agente infeccioso en el humano (18) y se asocia principalmente a infecciones del tracto gastrointestinal y urinario (ITUs) (8). Particularmente en esta última enfermedad, ocasiona hasta un 75 a 80% de los casos (3, 6).

Existe una amplia diversidad de cepas dentro de la especie *E. coli*, las que han sido clasificadas de diversas formas, por ejemplo, de acuerdo a la enfermedad que ocasionan o a las variantes de antígenos de superficie que producen. Sin embargo, en la actualidad destacan esquemas de clasificación que emplean determinaciones del filogrupo o del secuenciotipo. La determinación del filogrupo es una clasificación basada en la detección de cuatro genes (*arpA*, *chuA*, *yjaA* y *TspE4.C2*), mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa Múltiple (*PCR multiplex*), y posterior análisis de los productos mediante electroforesis, donde la ausencia o presencia de los productos génicos para cada caso, va a permitir la clasificación de las cepas en siete filogrupos: A, B1, B2, C, D, E y F (4).

Por otro lado, el secuenciotipo es una clasificación mucho más resolutive que el filogrupo (se conocen hasta ahora más de 13.000 secuenciotipos de *E. coli* (30)) y se establece mediante MLST (*Multilocus sequence typing*), técnica en la que se amplifican los segmentos internos específicos de siete genes *housekeeping* (*adhk*, *fumC*, *gyrB*, *icd*, *mdh*, *purA* y *recA*) mediante PCR convencional, se secuencian y luego se obtiene una secuencia única para cada uno de los genes de cada cepa de *E. coli*, a la que se le asigna un número que representa un alelo (Figura 1).



**Figura 1: Multilocus Sequence Typing (MLST).** Secuenciotipo basado en el perfil alélico asignado a secuencias únicas de 7 genes housekeeping (4).

Posteriormente, dependiendo de la combinatoria de alelos, se le otorga un tipo de secuencia o secuenciotipo, denominado ST, seguido de un número que representa una combinatoria alélica única (20). En la actualidad, tanto el filogrupa como el secuenciotipo pueden ser determinados a partir de las secuencias genómicas de cepas de *E. coli*.

### Cepas comensales y patogénicas

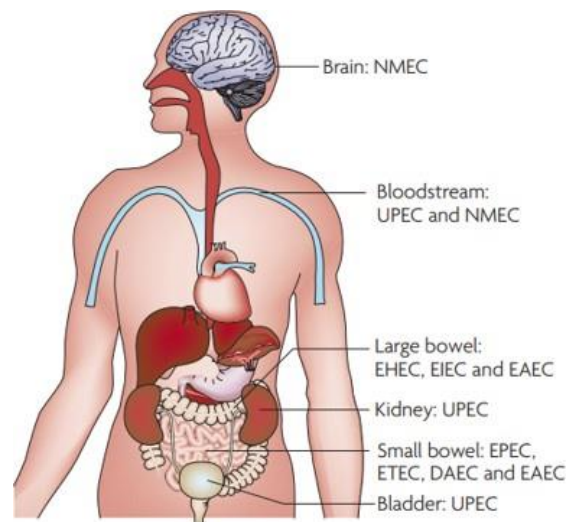
Dentro de la especie *E. coli* encontramos cepas comensales y cepas patogénicas. Las comensales residen en el tracto gastrointestinal e interactúan con el hospedero obteniendo beneficios de este sin ocasionar daño, mientras que las patogénicas sí ocasionan perjuicios, afectando a un gran número de personas anualmente en todo el mundo (21). Es ampliamente aceptado como teoría de evolución, que los distintos linajes de *E. coli* patogénicas hoy existentes provienen de una *E. coli* comensal, y que su emergencia se debe a múltiples eventos de transferencia horizontal de genes, en los que fueron adquiriendo diversos factores de virulencia mediante la transferencia horizontal de elementos genéticos móviles (21) que, en la actualidad, son esenciales para su mecanismo de patogenicidad (6). Existen al menos cuatro maneras en las que una bacteria puede captar ADN, en forma de elementos genéticos



móviles, mediante transferencia horizontal. Una primera es la (i) transducción, que ocurre a través de virus o fagos (36, 38); (ii) conjugación, mediante la cual una bacteria dadora le transfiere un plásmido a una bacteria receptora (36, 40); (iii) transformación, donde la bacteria capta ADN libre en el ambiente (36, 39); y (iv) transferencia de ADN mediante vesículas de membrana externa, las cuales al ser liberadas al exterior por una célula dadora, son capaces de fusionarse con la membrana externa de una célula receptora (37). Dentro de los elementos genéticos móviles que han sido determinantes en la emergencia de cepas patogénicas, en general, se encuentran las islas de patogenicidad (PAIs), las cuales se integran a una molécula receptora, ya sea un cromosoma, un plásmido o el genoma de un fago. Es posible diferenciarlas del resto del genoma ya que presentan una composición nucleotídica distinta y suelen insertarse junto a genes de ARN de transferencia (10, 24).

Debido a la ganancia o pérdida de elementos genéticos móviles, es que los genomas de las *E. coli* patogénicas poseen una gran diversidad y plasticidad genómica, y sus genomas presentan un tamaño cerca de 1 Mb más grande que los genomas de las cepas de *E. coli* comensales (6). Dentro de las *E. coli* patogénicas, se han estudiado ocho categorías definidas como patovares o patotipos, los cuales están definidos por la expresión de factores de virulencia específicos y/o por la presentación clínica de la enfermedad (21). Si bien cada uno de los ocho patovares puede poseer su mecanismo propio de colonización, adhesión e invasión de las células del hospedero, tienen similitudes mayoritariamente en la maquinaria o proceso celular que atacan (3). En general, las *E. coli* patogénicas se clasifican en patotipos diarreogénicos o extraintestinales (14), los que, como su nombre lo sugiere, provocan infecciones a distintos niveles en el hospedero (Figura 2). Dentro de las *E. coli* diarreogénicas, encontramos seis patovares correspondientes a: *E. coli* enteropatógena (EPEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC) y *E. coli* enteroagregativa (EAEC). EPEC, ETEC y DAEC colonizan el intestino delgado y ocasionan diarrea, mientras que EHEC y EIEC generan enfermedad a nivel del intestino grueso. EAEC es capaz de colonizar ambas zonas (6). Por otra parte, dentro de las *E. coli*

extraintestinales de importancia epidemiológica, encontramos dos patovares. El primero y más relevante en términos epidemiológicos corresponde a *E. coli* uropatogénica (UPEC), la cual posee la capacidad de colonizar el tracto urinario alcanzando la vejiga, donde puede ocasionar cistitis e incluso pielonefritis al ascender hasta los riñones (6). El segundo corresponde a la *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC), que tiene la capacidad de atravesar la barrera hematoencefálica. Sumado a esto, ambos tipos de *E. coli* extraintestinales pueden alcanzar la circulación y provocar septicemia (6).

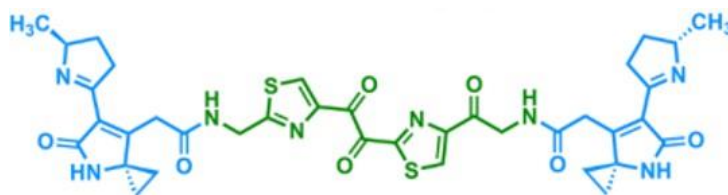


**Figura 2: Sitios anatómicos colonizados por *Escherichia coli* patogénica.** *E. coli* patogénicas que provocan infecciones en varios sitios anatómicos del cuerpo, tales como cerebro, sangre, intestino grueso, riñones, intestino delgado y vejiga, ocasionando enfermedades asociadas (6).

### ***Escherichia coli* productora de colibactina (CoPEC)**

Dentro de las *E. coli* extraintestinales, recientemente se han descrito las *E. coli* productoras de colibactina (CoPEC), las cuales se han asociado a cuadros de infección urinaria, septicemia y meningitis neonatal, donde se ha considerado a la colibactina como un factor de virulencia (16). Por lo tanto, varias cepas UPEC y NMEC son consideradas como CoPEC (21).

La colibactina es una genotoxina correspondiente a un compuesto híbrido entre policétido y péptido de síntesis no ribosomal (9), cuya estructura molecular (Figura 3) fue elucidada por M. Xue et al (26) mediante la captura de la molécula usando como sonda ADN para su aislamiento desde cultivos bacterianos, donde se vio como un aducto entrecruzado con dos adeninas en el ADN, y un método combinado de espectrofotometría de masas en tándem (MS/MS), marcado isotópico y síntesis química. Recientemente, las cepas CoPEC se han visto asociadas a la carcinogénesis del cáncer colorrectal (CRC) (22). Existen estudios en que líneas celulares (CHO AA8, CHO xrs-6, IEC-6 y HCT-116) expuestas a colibactina, que no sufrieron muerte celular, presentaban aberraciones cromosómicas, inestabilidad genómica, incremento en la frecuencia de mutación génica (7) y aumento del tamaño *in vitro* (24), todas lesiones vistas frecuentemente en este tipo de cáncer. Además, se ha evidenciado que favorece el crecimiento tumoral en modelos murinos con xenotrasplantes y con CRC (5).



**Figura 3: Estructura molecular de la colibactina.** La estructura de la colibactina está compuesta por dos grupos electrófilos de spirociclopropildihidro-2-pirrolonas (azul) que alquilan el ADN induciendo rotura de doble hebra en células eucariotes, separados por un grupo dicarbonilo fácil de hidrolizar (verde). (26)

Las CoPEC pertenecen mayoritariamente al filogrupo B2 (24), y se ha visto que la prevalencia, tanto de este grupo como de las CoPEC, ha ido en aumento en la población, llegando a colonizar cerca del 25% de la población mundial (13). Además de su asociación con CRC, se ha reportado que cepas CoPEC son responsables de una serie de cuadros clínicos que varían desde infecciones del tracto urinario hasta sepsis, neumonía y meningitis neonatal (17). Dentro de los siete filogrupos de *E.coli*, es conocido que el filogrupo A corresponde en su mayoría a cepas no patogénicas y que en el grupo

filogenético B2 se encuentran la mayoría de las cepas patogénicas, como las *E. coli* extraintestinales (21), incluyendo a las CoPEC. Estas últimas poseen en su genoma un gran número de genes que codifican factores de virulencia, promoviendo la invasión, colonización y supervivencia en la sangre y otros tejidos, además de la evasión de la respuesta inmune (17). Asimismo, se ha visto que cerca del 30% de las *E. coli* del grupo filogenético B2 poseen en su genoma la isla de patogenicidad *pks*, que codifica la maquinaria de síntesis de la colibactina (18). Se postula que la isla *pks* fue adquirida mediante los mecanismos de transferencia horizontal de genes y está relacionada a la persistencia a largo plazo de CoPEC en el tracto gastrointestinal, representando un subgrupo altamente virulento dentro del filogrupo B2 (23, 24). La isla *pks* posee un tamaño de 54 kb, contiene 19 genes (*clbA* - *clbS*) con funcionalidades distintas, codificando tres megasintasas que sintetizan péptidos no ribosomales (NRPS; *clbH*, *clbJ* y *clbN*), tres megasintasas que sintetizan policétidos (PKS; *clbC*, *clbL* y *clbO*), dos megasintasas híbridas NRPS/PKS (*clbB* y *clbK*) y nueve enzimas accesorias (11) que completan todos los elementos necesarios para la formación de un complejo multimodular para la síntesis en el citosol de una colibactina inactiva o precolibactina. Este precursor es traslocado al periplasma por el transportador de membrana MATE (codificado por el gen *clbM*) y, al ser hidrolizado por una peptidasa FmtA (codificada por el gen *clbP*), genera un producto de escisión correspondiente a un aminoácido de asparagina (C14 - asparagina) y la forma activa y madura de la colibactina, la cual es un compuesto híbrido entre péptido de síntesis no-ribosomal y policétido, que es traslocado por un transportador aún desconocido hacia el medio (9, 21).

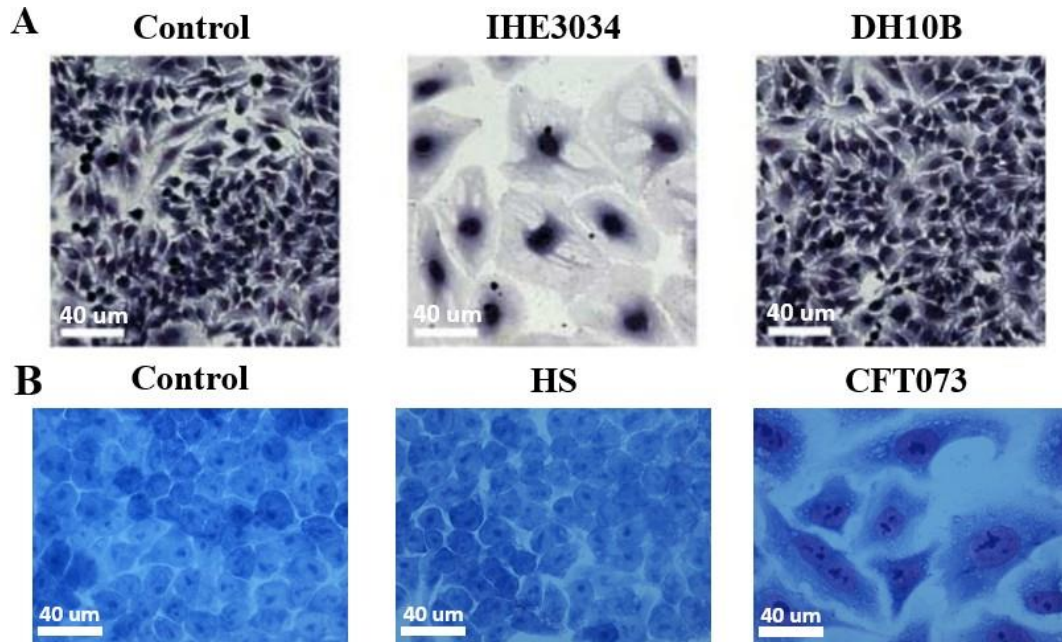
Debido a que hasta ahora no se han desarrollado métodos directos para aislar la colibactina desde cultivos bacterianos, sino que solo formas indirectas, tales como métodos de síntesis química y captura de productos naturales mediante sondas (26), una cepa CoPEC es definida en la actualidad como una cepa de *E. coli* que porta la isla *pks* (18).

## **Megalocitosis**

La megalocitosis es uno de los efectos citopáticos ocasionados por la infección de células eucariotas con cepas de CoPEC, la cual se caracteriza por el agrandamiento progresivo del tamaño celular y del núcleo, en ausencia de mitosis (12, 18, 25). Otros autores han demostrado en estudios previos, el fenotipo de megalocitosis en células eucariotas infectadas por cepas CoPEC aisladas de meningitis neonatal, mediante tinciones de May-Grunwald Giemsa (12, 18), inmunohistoquímica (18) y azul de metileno (25). Además, la megalocitosis generada por cepas de CoPEC aisladas de meningitis neonatal, tal como SP15, ha sido cuantificada mediante la relación entre el número de células HeLa infectadas y células HeLa no infectadas, teñidas con azul de metileno, en estudios en los que se determinó el rol de la polifosfato kinasa (*PPK*) en la producción de colibactina y la generación de megalocitosis (25).

## **Efecto citopático de aislados clínicos de CoPEC en células HeLa**

La colibactina es una genotoxina que, si bien algunas de sus funciones y estructura han sido dilucidadas, es un foco de investigación que se encuentra en progreso (9). Sin embargo, existen estudios donde ya se ha visto el efecto citopático ocasionado por la colibactina en células HeLa, como el realizado por Nougayrède et al (18), en el cual se demuestra que infecciones transitorias de células eucariotas por CoPEC IHE3034 inducen ruptura masiva de la doble hebra del ADN de estas células, bloqueando la mitosis e induciendo megalocitosis, con un aumento progresivo del tamaño celular junto con su núcleo, y la ausencia de mitosis (Figura 4), lo que coincide con un arresto en el ciclo celular en fase G2 (18).



**Figura 4: Megalocitosis inducida por infecciones transientes de células HeLa con *E. coli* en tinciones de May-Grünwald Giemsa (MGG).** (A) De izquierda a derecha, se observa un control de infección con células HeLa no infectadas, células HeLa infectadas con *E. coli* IHE3034 (causante de meningitis neonatal) *pks*<sup>+</sup> y células HeLa infectadas con *E. coli* de laboratorio DH10B en tinciones de MGG, la cual posee un cromosoma artificial bacteriano (BAC) sin la isla *pks*. Se observa megalocitosis inducida por infección con *E. coli* IHE3034, caracterizada por el agrandamiento del tamaño celular y del núcleo (18). Barras de escala, 40 um. (B) De izquierda a derecha, se observa un control de infección con células HeLa no infectadas, células HeLa infectadas con *E. coli* HS (comensal) isla *pks*<sup>-</sup> y células HeLa infectadas con *E. coli* CFT073 (utropatógena) isla *pks*<sup>+</sup> en tinciones de MGG. Se observa presencia de megalocitosis en infección por *E. coli* CFT073 (Datos de nuestro laboratorio). Barras de escala, 40 um.

Además, se ha visto que la dosis de colibactina sintetizada tiene un rol en el efecto citopático que se genera. A altas dosis de colibactina es posible observar apoptosis en linfocitos, mientras que, a dosis medias y dosis bajas, se genera senescencia junto con megalocitosis o aberraciones cromosómicas, respectivamente (21). Esto último se genera debido a la activación de la respuesta al daño del ADN

(‘*DNA Damage Response*’, DDR) cuando existen bajas dosis de colibactina, donde las células que sobreviven pueden reparar su ADN gracias a esta maquinaria y reanudar el ciclo celular (7). Sin embargo, la reparación del ADN puede ser incompleta y desencadenar una serie de fenómenos, tales como anomalías cromosómicas, inestabilidad genómica y aumento de la frecuencia de mutación (7).

### ***High Content Screening (HCS)***

En gran parte de los estudios en los que se ha realizado análisis de megalocitosis en células HeLa, inducida por CoPEC, se han obtenido imágenes digitalizadas con distintos aumentos mediante microscopía óptica de campo claro (12, 18, 27) o de fluorescencia (18). Si bien la microscopía tradicional permite capturar efectos citopáticos, esto normalmente se realiza en un número pequeño de campos visuales, por lo que solo permite el análisis de imágenes representativas. Es por esto que, el panorama se complica frente a la necesidad de adquirir imágenes de cientos o miles de células a una alta resolución, para lo cual, resulta necesario avanzar hacia una visualización y cuantificación masiva de múltiples imágenes y análisis de múltiples parámetros de la actividad celular. En la actualidad, existe una gran variedad de equipamientos para la adquisición de imágenes en análisis de microscopía, destacando el HCS de células, también conocido como celómica, el cual involucra microscopía digital con todos sus ejes automatizados y la posibilidad de aplicar algoritmos de análisis automatizados para la descripción morfométrica de las imágenes (29). Lo anterior, permite la visualización de sistemas biológicos complejos en diferentes campos, planos focales, magnificaciones y espectros de forma simultánea, lo cual disminuye significativamente el tiempo empleado en la obtención de miles e incluso millones de imágenes y proporciona un análisis paralelo de los datos (29), teniendo como objetivo principal detectar y cuantificar características relevantes de una imagen en el menor tiempo posible, entregando reproducibilidad y estadística.

## **Métodos informáticos de análisis de imágenes**

Los métodos de análisis de imágenes son herramientas cuantitativas para el análisis de datos de microscopía de campo claro y fluorescencia (2). Diversos softwares de análisis de imágenes han sido desarrollados para mejorar los procesos manuales, ya sea de código abierto o comerciales. Estos se basan en algoritmos de análisis de imágenes que se pueden utilizar para la segmentación automatizada de núcleos y/o células individuales, caracterización de tipos celulares, medición de descriptores morfológicos como área, perímetro y/o longitud, entre otras (31). Estos softwares pueden diferir entre ellos según el área de aplicación, costo, complejidad en el uso, entre otros aspectos. Algunos de ellos incluyen herramientas de detección y cuantificación automatizada basada en donde la delimitación e identificación precisa de los cuerpos celulares mediante la binarización de las imágenes permite aplicar algoritmos que describen cuantitativamente morfología, contraste y textura de los cuerpos celulares, es (31). La masificación de un algoritmo completamente automatizado como estos tiene como ventaja la reducción del tiempo requerido para el análisis de una gran cantidad de imágenes, y el aumento en la reproducibilidad de los datos obtenidos. Ejemplo de ello, son los softwares Cell Profiler, Qupath y Fiji (2, 29), los cuales son softwares de código abierto compatible con imágenes digitalizadas, entre ellas las provenientes de placas de 96 pocillos, que presenta diversas herramientas de análisis para detectar y cuantificar células, tales como: segmentación automatizada para detectar núcleos y/o células individuales, medición de la morfología celular, clasificación de tipos celulares de acuerdo a sus características, entre otras funciones (2).

Existen otros softwares de análisis de imágenes disponibles comercialmente, que dentro de sus funciones, permiten realizar un pre-procesamiento esencial como lo es la deconvolución de las imágenes microscópicas, donde mediante una operación matemática, es posible restaurar la deformación de la imagen o convolución generada por el sistema óptico del microscopio, en cuanto a ruido y dispersión de los fotones incidentes en un punto determinado en la imagen (32, 33), lo cual se denomina Point Spreading Function (PSF). El pre-procesamiento de las imágenes resulta crucial a la



hora de obtener una representación más fidedigna del objeto real, con mayor resolución y disminución del ruido, facilitando la posterior segmentación y análisis de los objetos. Ejemplo de ello, es el software Huygens (Scientific Volume Imaging, Países Bajos), que ya ha sido utilizado para la deconvolución de imágenes obtenidas en el contexto de análisis morfométrico de organelos del hongo *Saccharomyces cerevisiae* (41), y mostrado que al ser aplicado de manera automatizada se convierte en un paso esencial para cualquier tipo de procesamiento masivo.

En este contexto, considerando la implicancia de CoPEC en diferentes cuadros clínicos y debido a que estudios del efecto citopático de CoPEC en células HeLa infectadas han sido realizados mayoritariamente en cepas prototipo, tales como las cepas IHE3034 (18, 42), SP15 (25, 42), y CFT073 (42) aisladas de casos de meningitis neonatal (IHE3034 y SP15) y de pielonefritis (CFT073), y solo en un bajo número de aislados de otros genotipos, es que este proyecto buscará estudiar la capacidad de distintos aislados clínicos de CoPEC, de ocasionar efectos citopáticos, tales como pérdida de la viabilidad y megalocitosis, ya descrita en infecciones sobre células HeLa. Además, se cuantificarán y establecerán posibles diferencias en la magnitud de los efectos citopáticos entre diferentes aislados mediante el uso de un equipo de HCS (High Content Screening), AxioObserver (Zeiss), y posterior uso de softwares de análisis de imágenes basados en algoritmos automatizados.

De esta forma, considerando que aún no existen estudios previos en nuestro país que investiguen y evalúen el efecto citopático provocado por las cepas CoPEC, es que se espera contribuir a la caracterización de las capacidades patogénicas que exhiben, *in vitro*, distintos aislados de CoPEC obtenidos desde pacientes con cuadros infecciosos extraintestinales en Chile, algunos de ellos representativos de genotipos relevantes en términos epidemiológicos, por ejemplo, de los secuenciotipos ST12, ST14 y ST131 (15, 19), y, dar respuesta a las siguientes preguntas: ¿Presentan las cepas de CoPEC, independiente de su secuenciotipo, la capacidad de ocasionar megalocitosis en células HeLa?, y, ¿Presentan los distintos secuenciotipos de cepas de CoPEC, diferencias en la magnitud de la megalocitosis sobre células HeLa?

El conocimiento de estas capacidades será útil a futuro en la evaluación del rol de otros factores de virulencia de CoPEC, y además, en la evaluación de potenciales inhibidores de la patogenicidad.

## **Hipótesis**

Cepas de CoPEC aisladas desde pacientes chilenos con cuadros infecciosos extraintestinales, y representantes de distintos secuenciotipos, presentan la capacidad de ocasionar megalocitosis sobre células HeLa, observándose diferencias significativas en la magnitud de estos efectos entre las distintas cepas.

## **Objetivo general**

Caracterizar la ocurrencia y magnitud de megalocitosis en células HeLa infectadas con distintos aislados clínicos chilenos de CoPEC, representantes de distintos secuenciotipos.

## **Objetivos específicos**

1. Determinar la ocurrencia de megalocitosis, en células HeLa infectadas con aislados clínicos de distintos secuenciotipos de CoPEC.
2. Comparar la magnitud de la megalocitosis observada en células HeLa infectadas con aislados clínicos de distintos secuenciotipos de CoPEC.

## **Materiales y Métodos**

### **Selección de cepas y grupos experimentales**

Las cepas que se utilizaron en esta tesis representan cinco secuenciotipos distintos. Tres cepas no lograron ser clasificadas por el esquema de MLST, ya que presentan diferencias de secuencia con todos los STs conocidos hasta la fecha, y están rotulados como ST “desconocido”. Todas las cepas fueron recolectadas entre los años 2008 y 2011 en tres hospitales chilenos y poseen diverso origen, desde casos de infecciones de heridas quirúrgicas, aisladas de orina en casos de ITU y de hemocultivos en casos de sepsis y urosepsis (Tabla 1).

**Tabla 1. Aislados clínicos de cepas de *E. coli* productora de colibactina caracterizadas como *pks* positivas.**

<b>N° UChile</b>	<b>Año de aislamiento</b>	<b>Origen</b>	<b>Hospital</b>	<b>Filogrupo</b>	<b>Secuenciotipo</b>
<b>6</b>	<b>2011</b>	<b>Herida quirúrgica</b>	<b>San José</b>	<b>B2</b>	<b>ST - 12</b>
<b>15</b>	<b>2011</b>	<b>Herida quirúrgica</b>	<b>San José</b>	<b>B2</b>	<b>ST - 14</b>
<b>59</b>	<b>2010</b>	<b>Herida quirúrgica</b>	<b>San José</b>	<b>B2</b>	<b>Desconocido</b>
<b>175</b>	<b>2008</b>	<b>Hemocultivos (Urosepsis)</b>	<b>Félix Bulnes</b>	<b>B2</b>	<b>Desconocido</b>
<b>198</b>	<b>Desconocido</b>	<b>Urocultivo</b>	<b>HCUCH</b>	<b>B2</b>	<b>ST - 141</b>
<b>207</b>	<b>Desconocido</b>	<b>Urocultivo</b>	<b>HCUCH</b>	<b>B2</b>	<b>Desconocido</b>
<b>235</b>	<b>Desconocido</b>	<b>Urocultivo</b>	<b>HCUCH</b>	<b>B2</b>	<b>ST - 131</b>
<b>247</b>	<b>Desconocido</b>	<b>Urocultivo</b>	<b>HCUCH</b>	<b>B2</b>	<b>ST - 998</b>

N° UChile: número único de registro otorgado a cada cepa CoPEC; Filogrupo: clasificación dependiente de la ausencia o presencia de los productos génicos de cuatro genes determinados de cada cepa; Secuenciotipo: clasificación dependiente de la combinatoria de alelos de siete genes *housekeeping* de cada cepa; Desconocido

(Año de aislamiento): se desconoce el año en que la cepa fue aislada; Desconocido (Secuenciotipo): cepa con una combinatoria de alelos que no comparte con ningún otro secuenciotipo, y a la cual no se le ha otorgado aún un número de ST; HCUCH: Hospital Clínico de la Universidad de Chile; Hemocultivo (urosepsis): exámen de laboratorio para verificar presencia de microorganismos en sangre, en pacientes que además cursan con urosepsis; Los ensayos se realizaron básicamente mediante la infección de células HeLa con cada aislado de CoPEC. Estas cepas fueron previamente caracterizadas como CoPEC en nuestro laboratorio (datos no publicados), mediante la detección de dos genes de la isla *pks* por PCR convencional, correspondientes a los genes *clbA* y *clbQ*. Posteriormente, se realizó una secuenciación genómica, donde se identificó la presencia de la isla *pks* en cada una de estas cepas bacterianas.

Además, se ocuparon dos cepas adicionales, correspondientes a CoPEC CFT073 y *E. coli* HS. CoPEC CFT073 es una de las cepas prototipo de UPEC, que ya ha sido bien caracterizada y representó el control positivo en la capacidad de inducir megalocitosis (49), mientras que *E. coli* HS es una cepa comensal que no posee la isla *pks* en su genoma, y por este motivo, representó el control negativo. Sumado a lo anterior, se añadió un control negativo extra, correspondiente a células HeLa sin infección.

### **Cultivo celular**

Se utilizaron células HeLa, derivadas de carcinoma uterino humano, las cuales se encontraban almacenadas a -80°C en DMSO 5% en suero fetal bovino. Estas fueron mantenidas y propagadas bajo una campana de flujo laminar, en botellas de cultivo T25 (25 cm<sup>2</sup> de superficie) a una razón de 0.7x10<sup>6</sup> células por pocillo y en botellas T75 (75 cm<sup>2</sup>) a una razón de 2,625x10<sup>6</sup> células por pocillo, en medio de cultivo DMEM (del inglés *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*) suplementado con suero fetal bovino al 10% v/v y antibiótico/antimicótico al 1% v/v (contiene anfotericina B, estreptomicina y penicilina; ThermoFisher Scientific), a una temperatura de 37 °C en un incubador con una atmósfera constituida por 5 % de CO<sub>2</sub> (43).

Para los ensayos de infección, las células HeLa propagadas fueron sembradas en placas de 96 pocillos de fondo óptico (Nunc) pretratados con Nunclon Delta para facilitar su adhesión, en medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino al 10 % v/v y antibiótico/antimicótico al 1 % v/v en dos densidades de siembra diferentes. El volumen de células HeLa a sembrar fue medido mediante el recuento de estas en una cámara de Neubauer o hemocitómetro (Boeco), considerando una densidad de siembra de  $0.04 \times 10^6$  células por pocillo o de una densidad de siembra de  $0.01 \times 10^6$  células por pocillo. Para cada densidad de siembra, se realizaron 3 ensayos independientes.

### **Cultivo bacteriano**

Las cepas bacterianas que se encontraban almacenadas a  $-80^{\circ}\text{C}$  en leche descremada estéril (45), fueron sembradas en placas Petri con Agar MacConkey e incubadas durante 24 hrs a  $37^{\circ}\text{C}$  (43).

Para los ensayos de infección, las cepas bacterianas fueron cultivadas en caldo lisogénico Lennox (LB) durante 16-20 h a  $37^{\circ}\text{C}$  con una agitación de 90 RPM (43). Para estimar el volumen de suspensión de bacterias cultivadas necesario para realizar la infección, se determinó su densidad óptica mediante un espectrofotómetro (Thermo Scientific) luego de las 16-20 hrs de crecimiento bacteriano, a una longitud de onda de 600nm (OD600), considerando que una OD600 = 1 corresponde a  $8 \times 10^8$  bacterias/mL.

### **Infección de células HeLa**

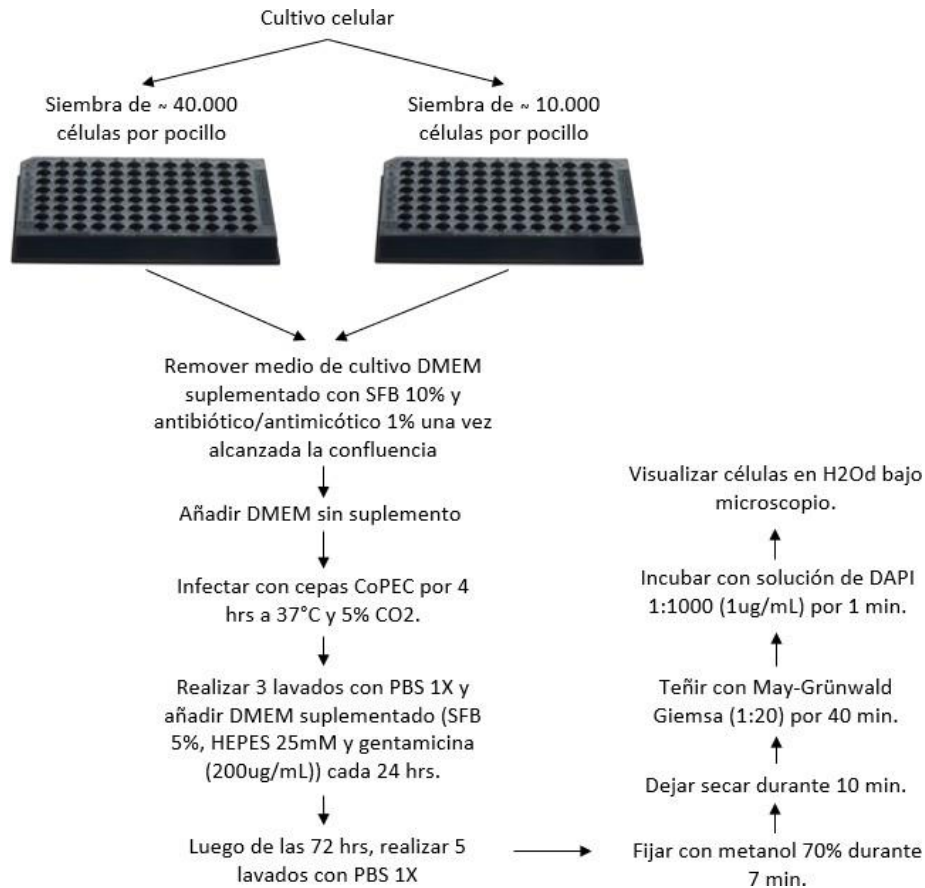
Las células HeLa sembradas, una vez alcanzada una confluencia de 80%, se infectaron en medio de cultivo DMEM sin suplemento (ThermoFisher Scientific) en una cámara de bioseguridad tipo 2, con una multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula (MOI 20) y de 100 bacterias por célula (MOI 100), durante 4 h a  $37^{\circ}\text{C}$  en una atmósfera constituida por 5 % de  $\text{CO}_2$  (Figura 5) (18, 43). Para cada MOI y cepa de *E. coli* empleada en la infección, se realizó un triplicado.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
A	HS MOI 20	HS MOI 20	HS MOI 20	CFT073 MOI 20	CFT073 MOI 20	CFT073 MOI 20	HS MOI 100	HS MOI 100	HS MOI 100	CFT073 MOI 100	CFT073 MOI 100	CFT073 MOI 100
B	6 MOI 20	6 MOI 20	6 MOI 20	15 MOI 20	15 MOI 20	15 MOI 20	6 MOI 100	6 MOI 100	6 MOI 100	15 MOI 100	15 MOI 100	15 MOI 100
C	59 MOI 20	59 MOI 20	59 MOI 20	175 MOI 20	175 MOI 20	175 MOI 20	59 MOI 100	59 MOI 100	59 MOI 100	175 MOI 100	175 MOI 100	175 MOI 100
D	198 MOI 20	198 MOI 20	198 MOI 20	207 MOI 20	207 MOI 20	207 MOI 20	198 MOI 100	198 MOI 100	198 MOI 100	207 MOI 100	207 MOI 100	207 MOI 100
E	235 MOI 20	235 MOI 20	235 MOI 20	247 MOI 20	247 MOI 20	247 MOI 20	235 MOI 100	235 MOI 100	235 MOI 100	247 MOI 100	247 MOI 100	247 MOI 100
F	Sin infección	Sin infección	Sin infección									
G												
H												

**Figura 5: Planilla de infección de cepas CoPEC.** 1-12: columnas de la placa de 96 pocillos; A-H: filas de la placa de 96 pocillos; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula; HS: cepa *pks* negativa (control negativo); CFT073 (control positivo), 6, 15, 59, 175, 198, 207, 235 y 247: cepas CoPEC caracterizadas como *pks* positivas; Sin infección: pocillo que posee solo células HeLa (control negativo).

Posterior a la infección, se realizaron tres lavados consecutivos con tampón fosfato salino (PBS 1X) y se incubaron las células infectadas en 100 uL de medio de cultivo DMEM suplementado con suero fetal bovino al 5 % v/v, HEPES (25mM) y gentamicina (200 ug/mL) cada 24 hrs, durante 72 hrs a 37 °C en una atmósfera de 5 % CO<sub>2</sub> (18, 43). A continuación, se hicieron 5 lavados con PBS 1X y se fijaron las células con 100 uL de metanol 70 % durante 7 min a temperatura ambiente. Una vez removido el metanol 70 %, se dejó secar durante 10 min y se tiñó con 100uL de la tinción de May-Grünwald Giemsa (1:20) durante 40 min a temperatura ambiente (18, 43). Finalmente, se lavó con agua destilada (H<sub>2</sub>O<sub>d</sub>) y se incubó con 100 uL de DAPI 1:1000 (1ug/mL) durante 1 min a temperatura ambiente. Una

vez removida la solución de DAPI, se dejaron las células en H<sub>2</sub>O<sub>d</sub> (Figura 6) a 4 °C para posteriormente, durante la semana siguiente, registrar mediante microfotografías la ocurrencia del efecto citopático utilizando los equipos de HCS, AxioObserver Z1 (Zeiss, Alemania) y Cellomics ArrayScan XTI (Thermo Scientific, Estados Unidos).



**Figura 6: Flujo de trabajo para la detección de megalocitosis en células HeLa en placas de 96 pocillos.**



### **Ensayos de viabilidad celular**

Luego de la infección de células HeLa, se evaluó el efecto de la colibactina sobre la viabilidad de estas, en la misma placa de 96 pocillos utilizada para el ensayo anteriormente descrito. Para esto, en un primer ensayo, las células fueron teñidas con una solución de Yoduro de Propidio (IP) 1ug/mL, antes de la fijación con metanol 70%, durante 1 min. En un segundo ensayo, se marcaron las células con una solución de IP 1:1000 1ug/mL antes de la fijación con metanol 70%, durante 10 s. Por último, en un tercer ensayo, se marcaron las células con diluciones seriadas de IP a distintas concentraciones, 1ug/mL, 0.5ug/mL, 0.25ug/mL, 0.2ug/mL, 0.125ug/mL y 0.1ug/mL; antes de la fijación con metanol 70%, durante 10 s. El porcentaje de células vivas y muertas fue analizado mediante los equipos de HCS, AxioObserver Z1 (Zeiss, Alemania) y Cellomics ArrayScan XTI (Thermo Scientific, Estados Unidos).

### **Bioseguridad**

La manipulación de las cepas CoPEC y de las células HeLa se realizó bajo un nivel de bioseguridad 2, lo cual implicó el uso permanente de guantes de nitrilo o látex, mascarilla de doble filtro, delantal y la disposición de residuos infecciosos de acuerdo a los protocolos del Programa de Microbiología y Micología. Además, el gabinete de seguridad biológica clase II (CellGard ES NU-480) de cultivo celular y el de manejo de bacterias, cuentan con barrera protectora de vidrio y se encuentran debidamente certificadas.

### **Digitalización de imágenes**

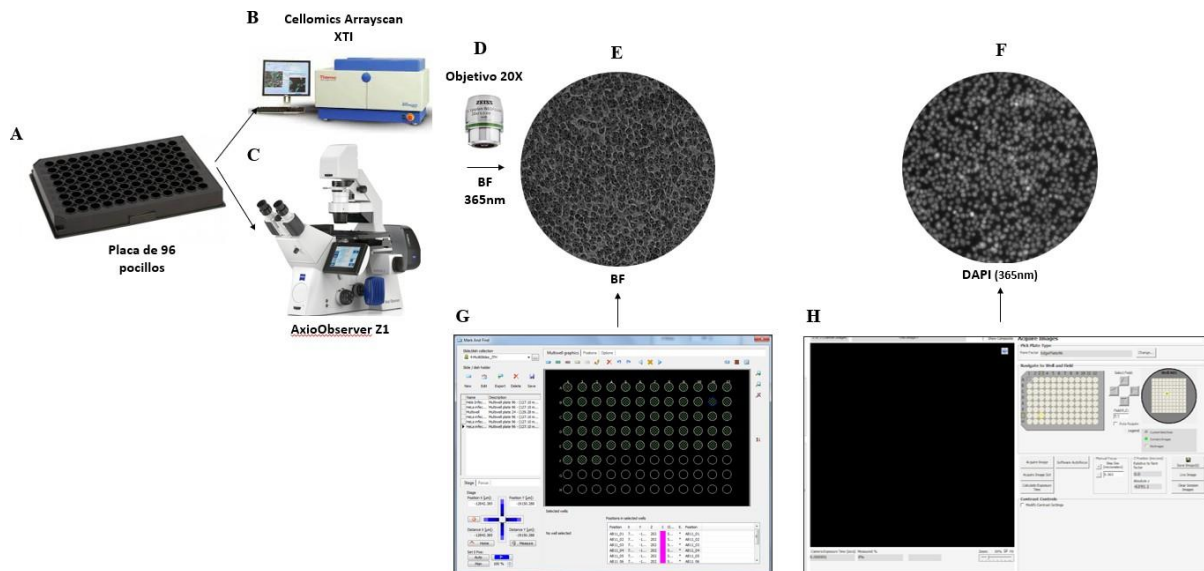
Dentro de los equipos que emplean HCS, encontramos el equipo AxioObserver (Zeiss), el cual es un microscopio de epifluorescencia motorizado, que ya ha sido empleado en el contexto de análisis morfométrico de una línea celular (NCI-H446) derivada de cáncer de pulmón de células pequeñas (34) y de una línea celular (HeLa) derivada de cáncer de cuello cérvico uterino (35). Posee la capacidad de escanear a gran velocidad y simultáneamente, hasta 32 fluoróforos diferentes, imágenes en campo claro, campo oscuro, contraste de interferencia diferencial (DIC, del inglés *Differential Interference*

*Contrast*) y contraste de fases. Cuenta con un sistema de iluminación de estado sólido, que otorga alta estabilidad y un sistema de registro que corresponde a una cámara digital EMCCD Evolve 512 delta. Además, es compatible con diversos formatos, tales como portaobjetos y placas de 6, 12, 24, 48 y 96 pocillos, y cuenta con una cámara de incubación que incluye control de la temperatura, CO<sub>2</sub> y humedad, para la observación y seguimiento de células vivas. Su ventaja respecto a los microscopios convencionales es que, en un tiempo acotado, puede procesar un gran número de muestras y detectar múltiples parámetros a una resolución óptima y con mínimo ruido. Está asociado al software AxioVision Rel. 4.8, el cual ofrece diversos módulos de adquisición de imágenes dependiendo de los requerimientos, dentro de los cuales encontramos la adquisición de imágenes en distintos planos focales equidistantes dentro de un mismo campo (Z-stack) y la adquisición de varios campos dentro de una misma muestra o pocillo gracias a que cuenta con una platina motorizada. Dentro de sus aplicaciones, está el estudio de cambios morfológicos de una célula, de estructuras subcelulares, viabilidad y propagación celular, entre otros (28).

De manera complementaria, se destaca el equipo de HCS, Cellomics ArrayScan XTI High Content Reader (Thermo Scientific, Estados Unidos), el cual es un microscopio de fluorescencia automatizado que ya ha sido utilizado en el contexto de visualización de neuronas de hipocampo de rata (44). Posee la capacidad de escanear simultáneamente hasta cinco fluoróforos diferentes e imágenes en campo claro, y al igual que el equipo anterior, es capaz de procesar un alto número de muestras a gran velocidad, obteniendo miles de imágenes en tan solo cuestión de horas. Además, también es compatible con portaobjetos y placas de distintos formatos, y está asociado al software HSC Studio, el cual posee un total de 20 aplicaciones, dentro de las cuales encontramos citotoxicidad, viabilidad celular, ciclo celular y propagación celular, entre otros (28).

En la presente tesis, obtuvieron microfotografías de 16-bit de los especímenes inmersos en agua, con el microscopio AxioObserver Z1 (Zeiss, Alemania) y Cellomics Arrayscan XTI (Thermo Scientific, Estados Unidos) de la Universidad de Chile, configurados simultáneamente en modo campo claro y

fluorescencia (excitación a 365nm) (Figura 7), con un objetivo LD Plan-Neofluar 20x/0,4 Korr Ph2 M27 (D=0-1,5mm) (dt=8,4mm para D=0mm y dt=7,4mm para D=1,5mm)  $\infty/0-1.5$  sin inmersión y con una cámara digital EMCCD Evolve 512 delta, longitud del pixel en X = 998nm y longitud del pixel en el eje Y = 998nm. Los parámetros de tiempo de exposición, voltaje de luz transmitida e intensidad de la fuente de estado sólido fueron optimizados y configurados para evitar una señal excesiva o débil. Ambos microscopios cuentan con una platina motorizada y permiten la adquisición de imágenes de placas de 96 pocillos a una alta velocidad y resolución, correspondiente a 692 x 520 píxeles para AxioObserver Z1 y 1344 x 1024 píxeles para Cellomics Arrayscan XTI, originando archivos de imágenes con formato zvi y C01, respectivamente.



**Figura 7: Flujo para la adquisición de imágenes.** Sistema de adquisición de imágenes compuesto por; (A) placa de 96 pocillos, (B,C) microscopios de HCS, AxioObserver Z1 (Zeiss, Alemania) y Cellomics ArrayScan XTI (Thermo Scientific, Estados Unidos), (D) Lente objetivo de 20X usado en ambos sistemas, (E, F) imágenes representativas de la adquisición secuencial (BF: Brightfield; 365nm: DAPI). Ambos sistemas de HCS cuentan con softwares de similares características (G) AxioVision Rel 4.8 y (H) Thermo Scientific HCS Studio: Cellomics Scan, en los cuales es posible escanear y registrar múltiples pocillos, y en cada pocillo, registrar múltiples posiciones de forma automatizada.

## **Deconvolución de imágenes digitalizadas mediante Huygens Professional**

Una vez digitalizadas las imágenes, se utilizó el software Huygens versión 22.04 (Scientific Volume Imaging, Países Bajos) para la deconvolución de las imágenes obtenidas con el microscopio AxioObserver Z1 (Zeiss, Alemania).

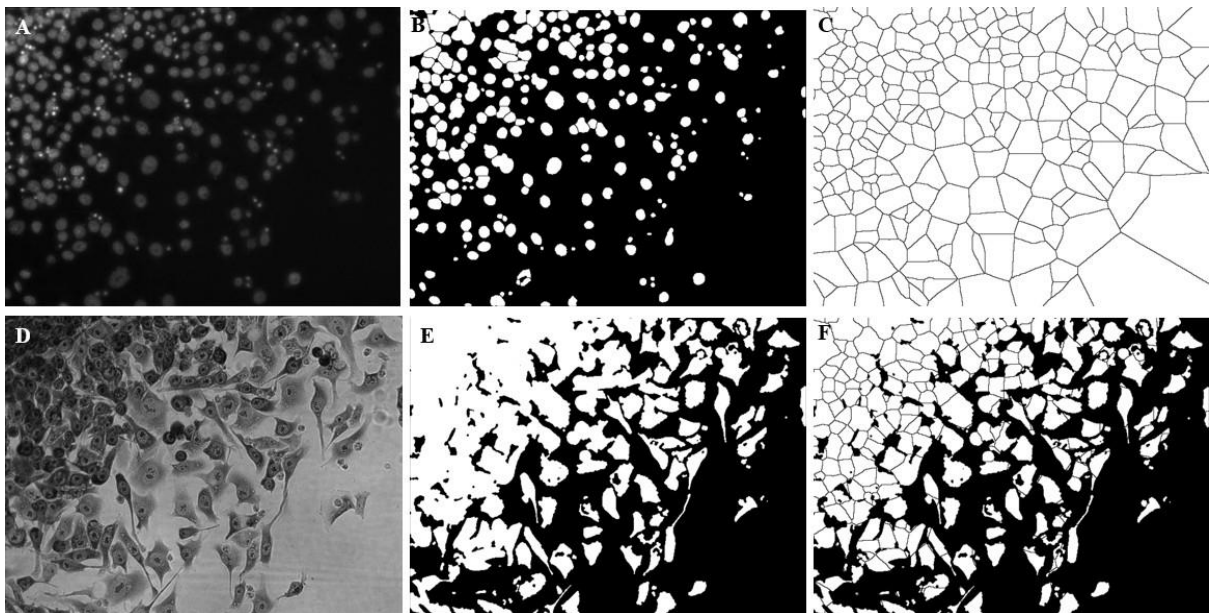
Se realizó el cálculo automático de una PSF teórica basada en el tipo de microscopio (widefield) y en los parámetros microscópicos mencionados en el apartado anterior, tales como apertura numérica, longitud del píxel en X e Y, medio de inmersión del espécimen y del lente, y longitud de onda de excitación y emisión. Además, se configuró el parámetro de relación señal/ruido = 5 y el número de iteraciones = 400. Una vez obtenida la PSF, se utilizaron los algoritmos matemáticos Classic Maximum Likelihood Estimation (CMLE), Quick Maximum Likelihood Estimation (QMLE) y Good's Roughness Maximum Likelihood Estimation (GMLE) de forma independiente entre sí, para resolver la operación matemática de convolución.

## **Análisis morfométrico**

Se utilizó un software de análisis de imágenes, correspondiente al software Fiji (v1.53s), para cuantificar la magnitud del efecto citopático ocasionado por los distintos secuenciotipos de cepas CoPEC (Figura 8).

Se desarrolló una secuencia de comandos en el lenguaje IJ1 Macro para la ejecución de múltiples algoritmos de procesamiento de imágenes. Las imágenes fueron transformadas en imágenes de 8-bit ("8-bit"). Luego, se suavizó la heterogeneidad de la tinción nuclear ("Smooth") y se utilizaron algoritmos que emplean herramientas para la sustracción del ruido de fondo de la imagen ("Subtract Background...", "rolling=200") y para la segmentación automatizada ("Auto Threshold", "method=Otsu white" y "Options...", "iterations=10 count=5 black do=Open") de los núcleos (imágenes con DAPI) y regiones celulares (imágenes con BF) de las células presentes en cada imagen, obteniendo imágenes binarias. Una vez realizada la segmentación, se separaron los núcleos marcados con DAPI cuyos bordes celulares estaban en contacto ("Watershed") y se realizó un diagrama de

Voronoi ("Voronoi") en las imágenes binarias de los núcleos, donde a cada núcleo se le asignó un territorio o región de la imagen. Posteriormente, se superpusieron los diagramas de Voronoi sobre las imágenes binarias de las regiones celulares mediante la herramienta Image Calculator ("AND create", "Voronoi", "Cytoplasm"). A continuación, se cuantificaron los núcleos y citoplasmas presentes en cada imagen mediante la función 'Analyze Particles', generando ROIs para cada objeto identificado y excluyendo los objetos que se encontraban en los bordes de las imágenes. Una vez realizada esta detección, se extrajo información acerca del número de células y núcleos remanentes en los pocillos y de parámetros morfométricos tales como área celular y área nuclear. Posteriormente, estos resultados fueron filtrados de forma manual, excluyendo los objetos identificados correspondientes a conglomerados celulares y nucleares que los comandos no lograron segmentar adecuadamente como células y núcleos individuales, respectivamente.



**Figura 8:** Imágenes representativas de la segmentación mediante macro en Fiji para segmentación nuclear y citoplasmática. (A) Imagen monocromática de DAPI de infección con *E. coli* 207 MOI 20. (B) Segmentación nuclear mediante los algoritmos Otsu y Watershed. (C) Posterior generación del Diagrama de Voronoi a partir de los núcleos para delimitar los territorios citoplasmáticos. (D) Imagen monocromática de campo claro en infección con *E. coli* 207 MOI 20. (E) Segmentación citoplasmática aplicando Otsu y uso de filtros de apertura y cierre. (F) Posterior

superposición del diagrama de Voronoi sobre la imagen binaria delimitando con este los territorios de los citoplasmas .

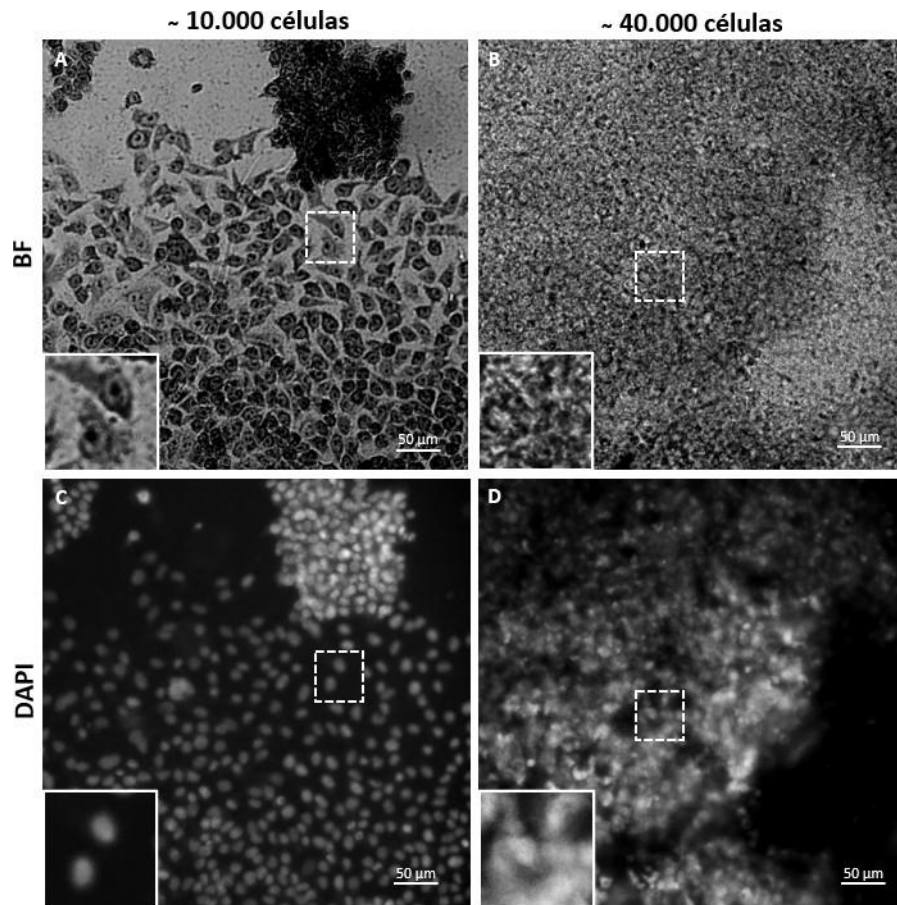
### **Análisis estadístico**

El análisis estadístico fue realizado para comparar los efectos de cada cepa CoPEC sobre las células HeLa, en términos de: número total de células remanentes post-infección, área nuclear promedio, área celular promedio, porcentaje de núcleos remanentes post-infección con un área superior al valor máximo del área nuclear en el control sin infección y porcentaje de células remanentes post-infección con un área superior al valor máximo del área celular en el control sin infección . Debido a que los datos no presentaron una distribución normal luego de aplicar la prueba de normalidad de D'Agostino-Pearson y a que su varianza presentaba diferencias significativas mediante la prueba de Bartlett, es que se utilizó la prueba de comparación múltiple de ANOVA Brown-Forsythe y Welch, seguida de las pruebas posteriores de Dunnett o de Games Howell, cuando la cantidad de datos era menor a 50 o mayor a 50, respectivamente. Se utilizó el software GraphPad Prism (versión 9), donde los datos fueron presentados como la media  $\pm$  desviación estándar, y se consideraron las diferencias como significativas cuando  $p < 0.05$  luego de realizar al menos tres ensayos independientes ( $n= 3$ ), con tres réplicas intra-ensayo.

## **Resultados**

### **Evaluación y selección del equipamiento de HCS**

Se adquirieron imágenes de las células HeLa con los equipos de HCS AxioObserver Z1 y Cellomics ArrayScan XTI en modalidad de campo claro (BF: *Brightfield*) y de fluorescencia. Al comparar las imágenes se observó que no se obtenían buenos resultados en cuanto a resolución y nitidez en las imágenes obtenidas con el microscopio Cellomics ArrayScan XTI, particularmente en pocillos con una alta confluencia celular. Debido al carácter completamente automatizado de este equipo, no permitía optimizar los ajustes de foco automático requeridos para una correcta microfotografía. Distinto fue cuando se adquirieron imágenes de pocillos con una menor confluencia celular, siendo posible distinguir con mayor claridad los contornos nucleares y celulares (Figura 9). Por las dificultades de automatizar este sistema para las diferentes confluencias celulares, se decidió utilizar las imágenes obtenidas con el microscopio AxioObserver Z1, el cual también posee un componente automatizado en la lectura de los diferentes pocillos, pero permite la búsqueda del foco manual, lo cual es más lento, pero asegura la factibilidad de esta tesis en el periodo establecido. Por lo tanto, de aquí en adelante todos los resultados mostrados serán aquellos obtenidos con el equipo AxioObserver Z1, tanto para la visualización de los efectos citopáticos como para el análisis morfométrico posterior.



**Figura 9:** Adquisición de imágenes con el equipo Cellomics ArrayScan XTI. Infección con *E. coli* HS MOI 20 sobre ~10.000 células HeLa sembradas (A, C) y sobre ~40.000 células HeLa sembradas (B, D). Se observa mayor nitidez y definición de los contornos nucleares (DAPI) y celulares (BF) en las imágenes con una siembra de ~10.000 células. Barras de escala, 50  $\mu$ m.

Además de la problemática del foco automatizado, el microscopio Cellomics ArrayScan XTI y su software asociado, presentaron una serie de dificultades técnicas durante el transcurso de la tesis que le impedían leer sobre 900 muestras. Abordamos esta dificultad evaluando sistemáticamente cada una de las características del ensayo que explicaran esta limitación, concluyendo que la limitada capacidad del software no era suficiente para el procesamiento de un gran volumen de muestras. Por lo tanto, se realizó una optimización del hardware, siendo posible actualmente evaluar hasta 3000 imágenes en 5D. Por último, debido a la muy reciente estandarización en el uso del equipo AxioObserver Z1, no existía ningún instructivo ni manual de operaciones, por lo que durante este proyecto desarrollé un protocolo



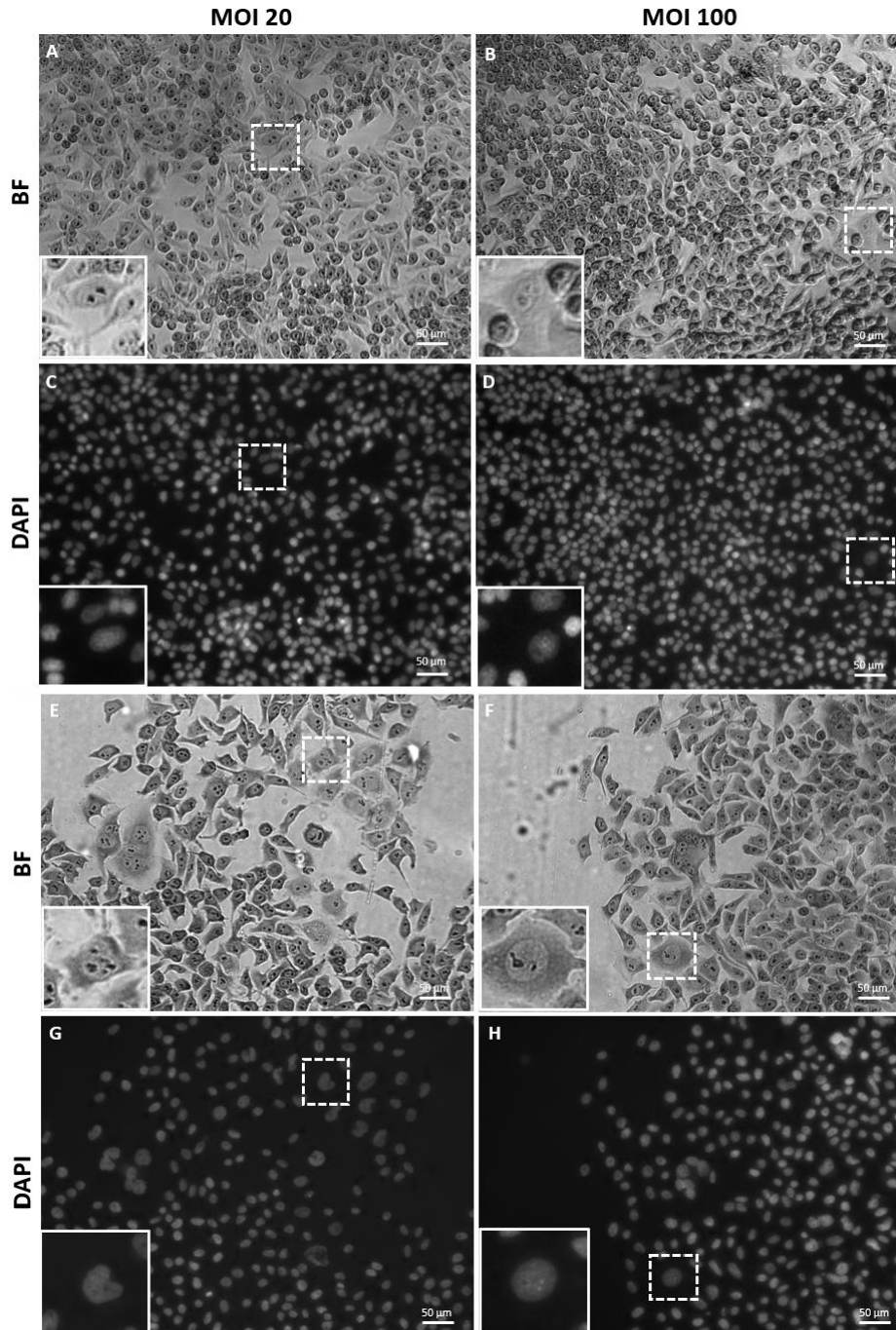
de operaciones paso a paso disponible en la página web de REDECA (28), que permite actualmente el uso masivo del equipo.

### **Megalocitosis *in vitro* de aislados clínicos de CoPEC**

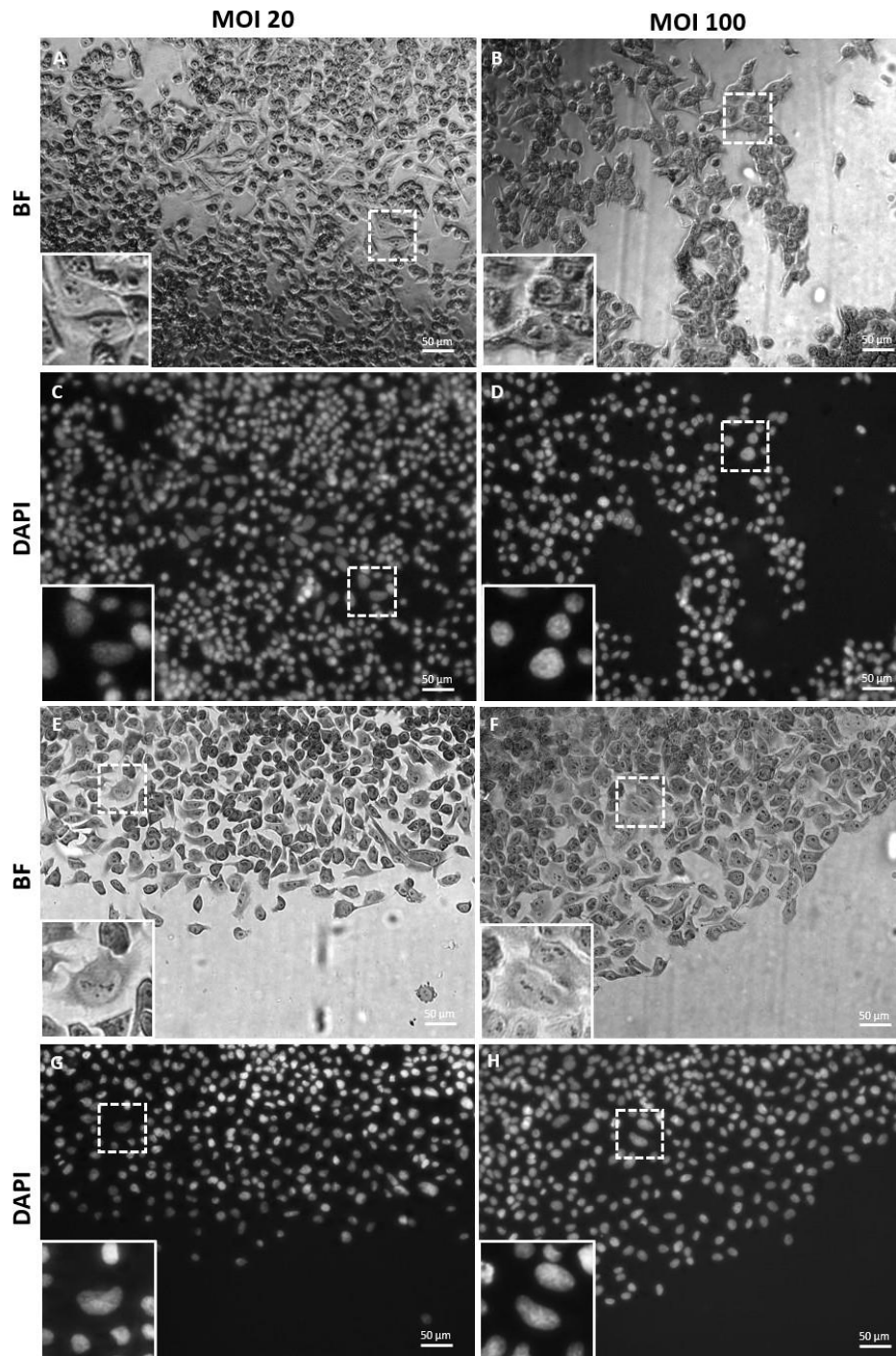
En las infecciones con cepas CoPEC donde se sembraron  $\sim 40.000$  células HeLa, se observó la ocurrencia de megalocitosis en aquellas células infectadas con las cepas de *E. coli* CFT073 (Figura 9), correspondiente al control positivo, *E. coli* 15 (Figura 10), *E. coli* 175 (Figura 11), *E. coli* 198 (Figura 12), *E. coli* 207 (Figura 13), *E. coli* 235 (Figura 14) y *E. coli* 247 (Figura 15), siendo evidente un aumento en el tamaño celular junto con el agrandamiento del núcleo.

Por otro lado, se observó una mayor cantidad de células con megalocitosis en las infecciones con las cepas CoPEC CFT073 (Figura 9), 175 (Figura 11) y 198 (Figura 12), donde hubo una siembra de  $\sim 10.000$  células HeLa, tanto a MOI 20 como a MOI 100, evidenciándose además, un mayor aumento del tamaño celular y nuclear de algunas células.

En la infección con *E. coli* 15 (Figura 10) y *E. coli* 247 (Figura 15) a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, un análisis cualitativo luego de observar todas las muestras concluye que no se observaron diferencias notorias en la cantidad de células que presentaron megalocitosis respecto a los pocillos con una mayor densidad de siembra.

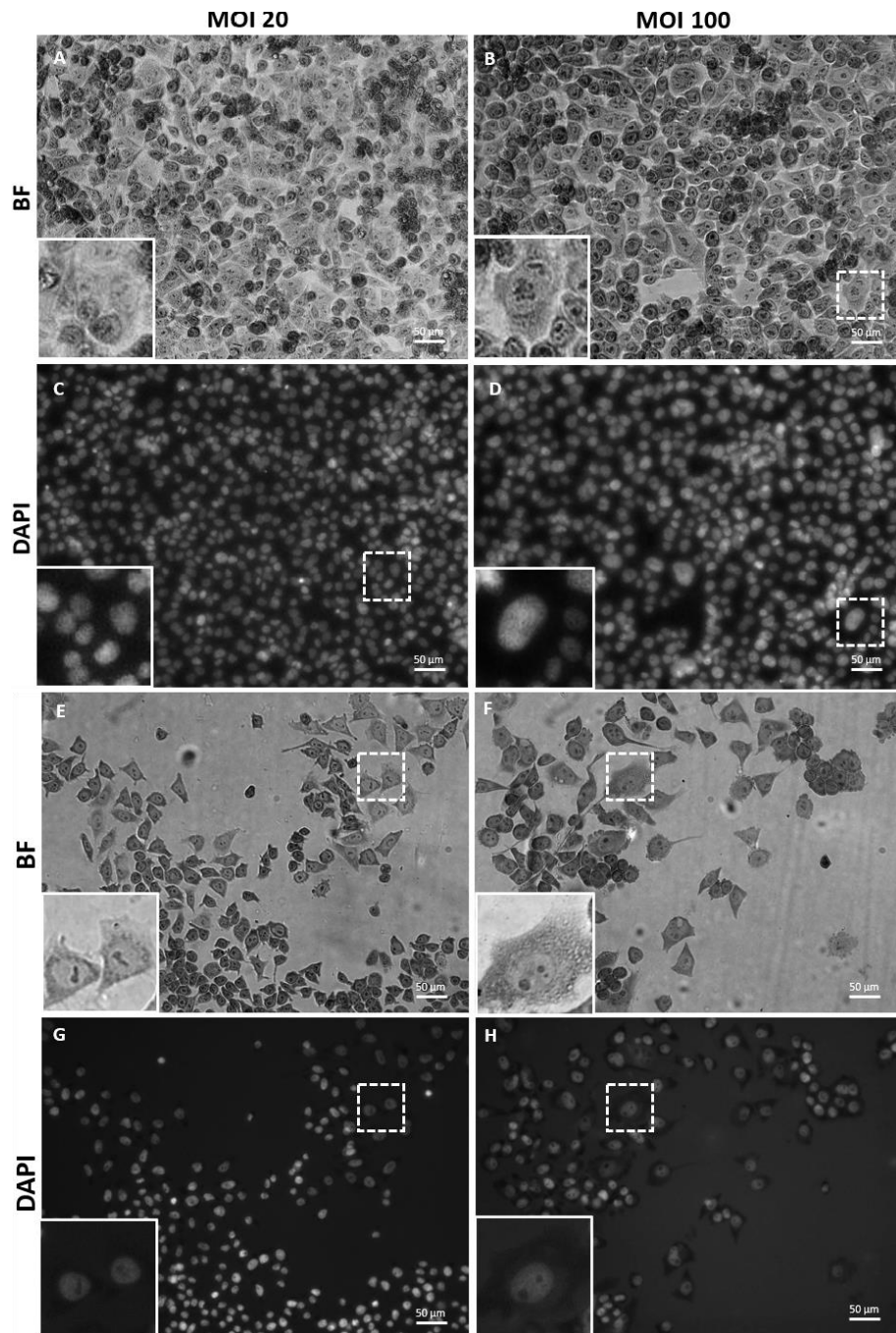


**Figura 10: *E. coli* CFT073 (control positivo).** Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* CFT073 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, infectadas con *E. coli* CFT073 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .



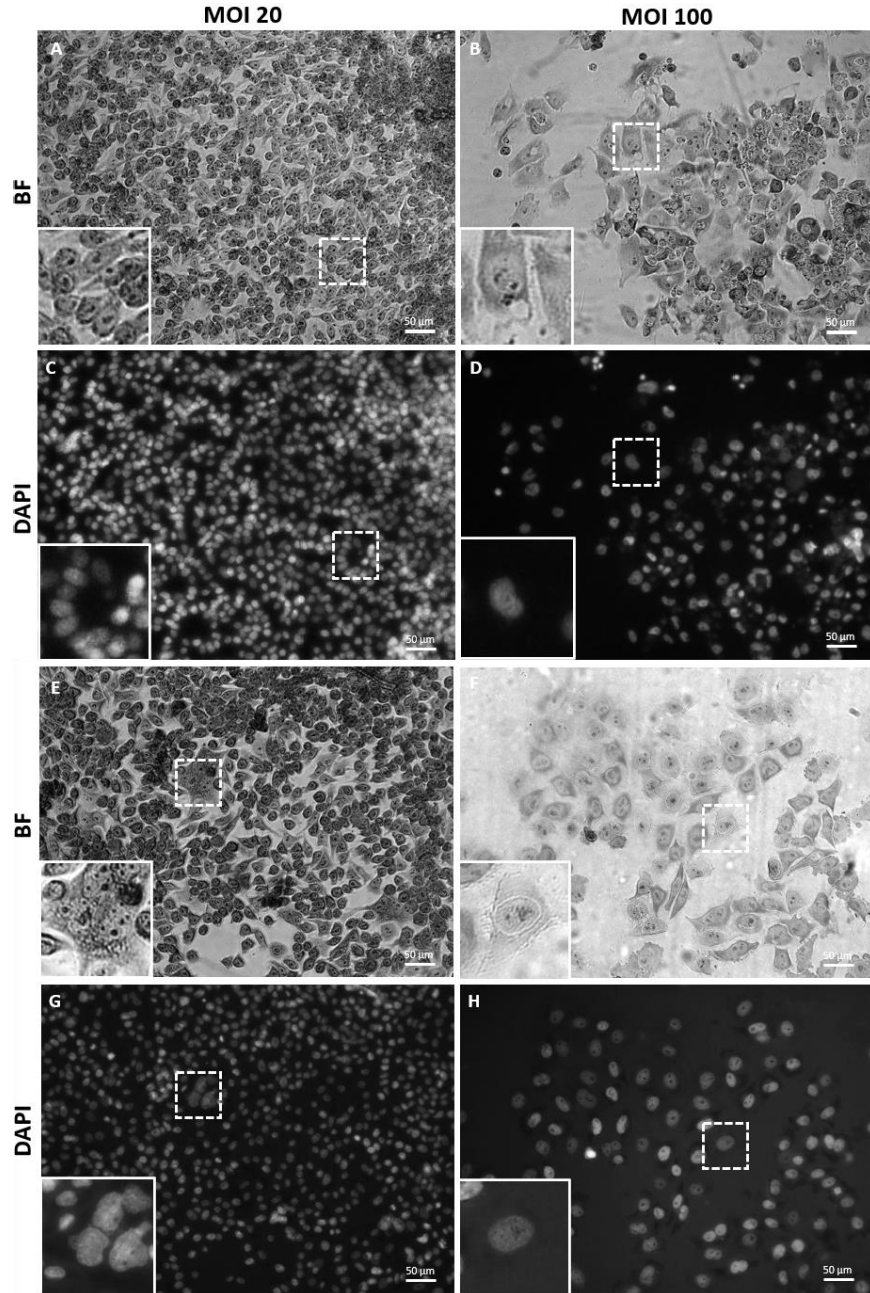
**Figura 11:** *E. coli* 15. Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* 15 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, infectadas con *E. coli* 15 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI:

4,6-diamidino-2-phenylindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .



**Figura 12:** *E. coli* 175. Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* 175 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, infectadas con *E. coli* 175 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI:

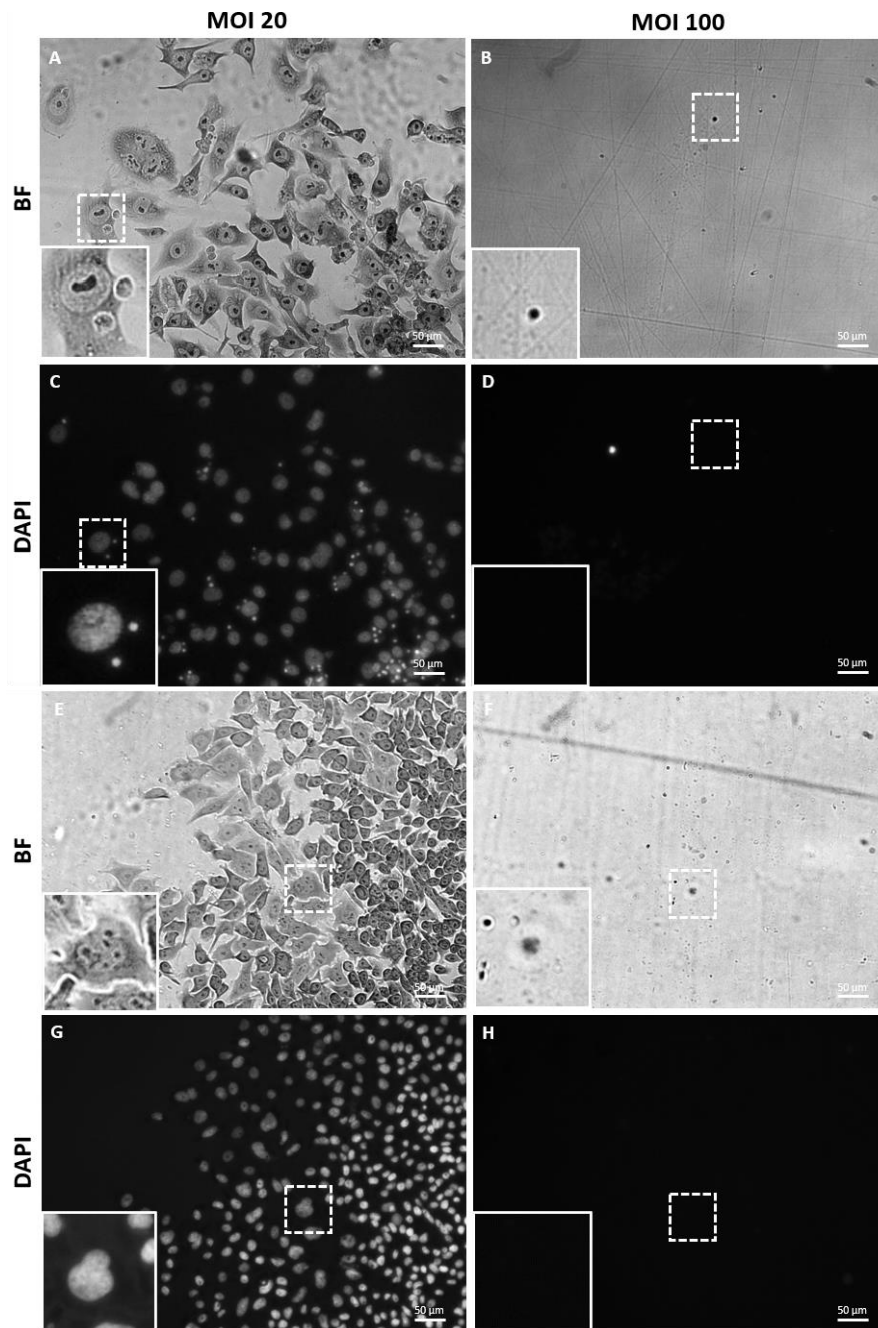
4,6-diamidino-2-phenylindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu$ m.



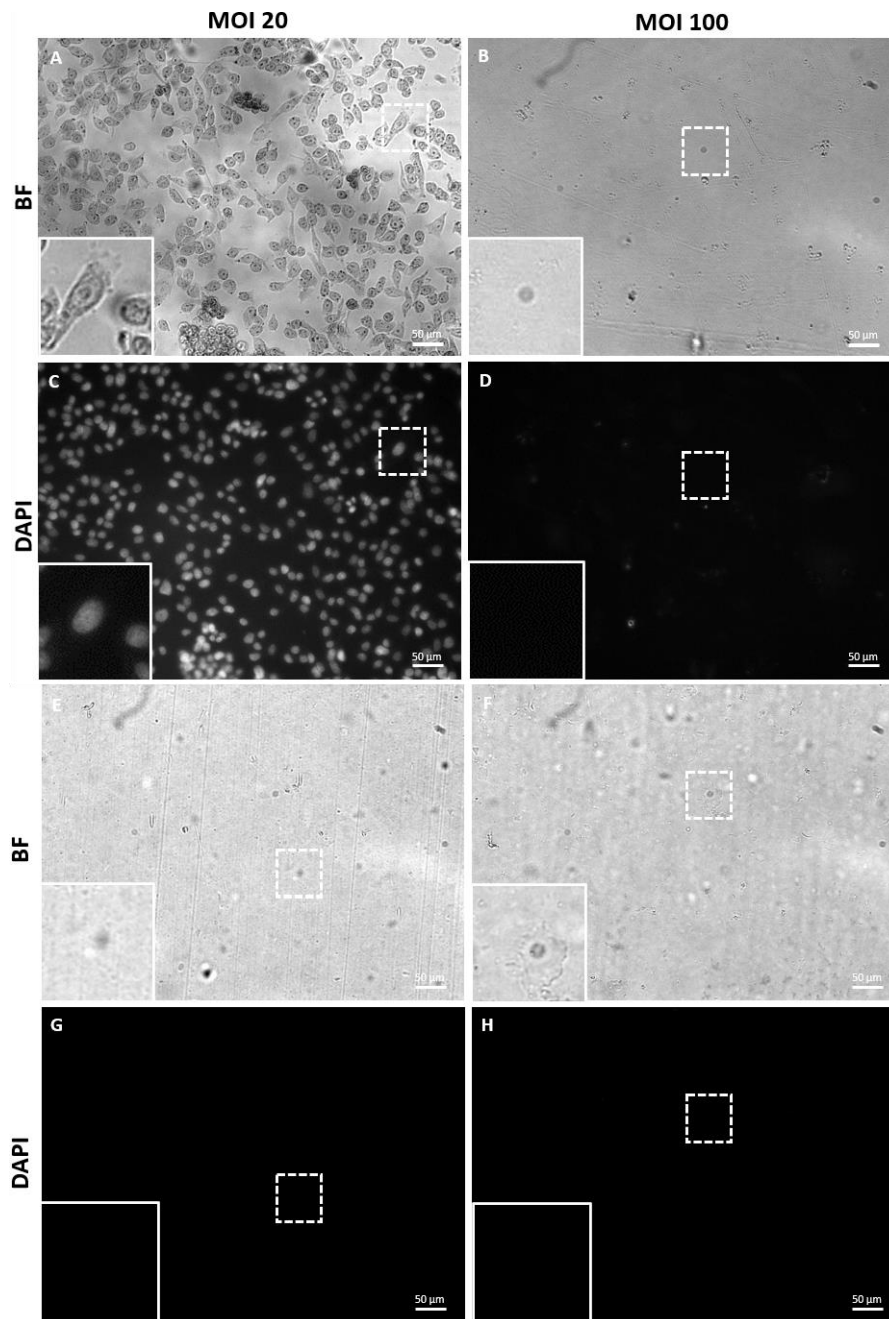
**Figura 13:** *E. coli* 198. Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim$ 40.000 células, infectadas con *E. coli* 198 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim$ 10.000 células, infectadas con *E. coli* 198 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI:

4,6-diamidino-2-phenylindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

Si bien la cepa CoPEC 207 (Figura 13) presentó células con megalocitosis a una MOI 20, hubo una pérdida total de las células presentes en el pocillo a una MOI 100, lo cual se repitió tanto en los pocillos con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  y  $\sim 10.000$  células. Asimismo, a una MOI 20, la cepa CoPEC 235 (Figura 14) mostró megalocitosis en pocillos con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células HeLa, mientras que a una MOI 100, no quedaron células restantes en el pocillo. Sin embargo, al disminuir la densidad de siembra, los pocillos infectados con la cepa CoPEC 235 quedaron sin células visibles en su interior.

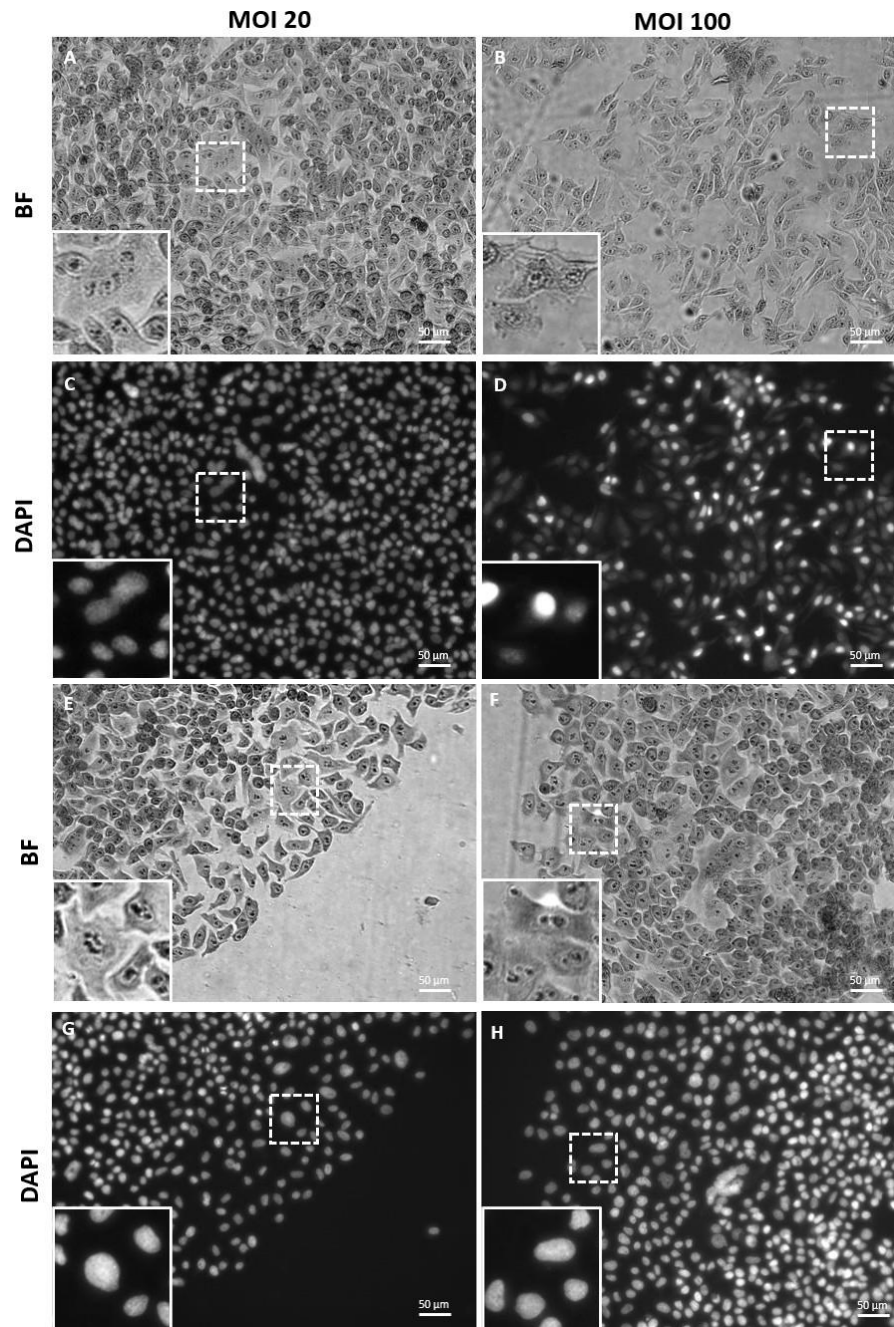


**Figura 14:** *E. coli* 207. Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* 207 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, infectadas con *E. coli* 207 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .



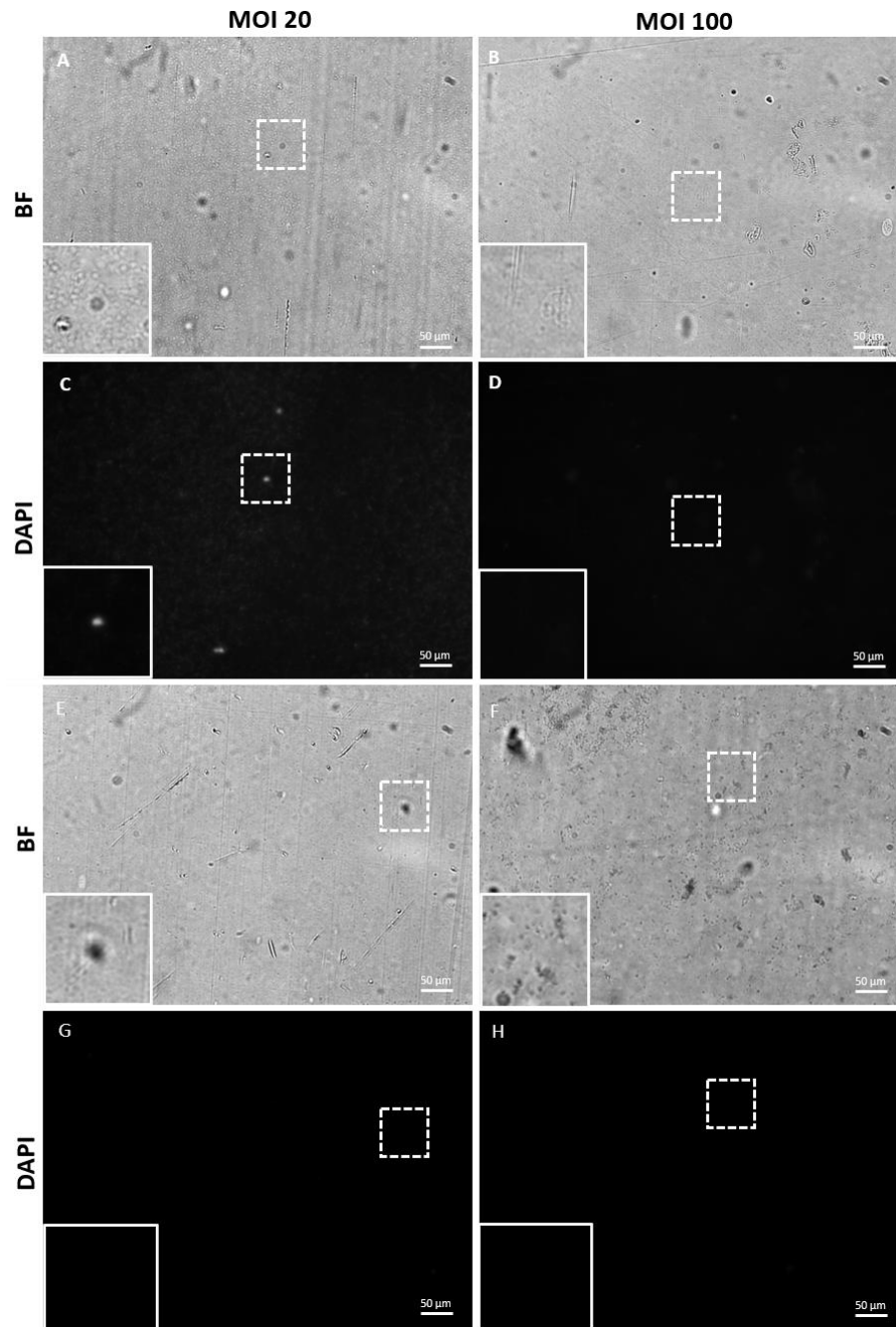
**Figura 15:** *E. coli* 235. Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* 235 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, infectadas con *E. coli* 235 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .





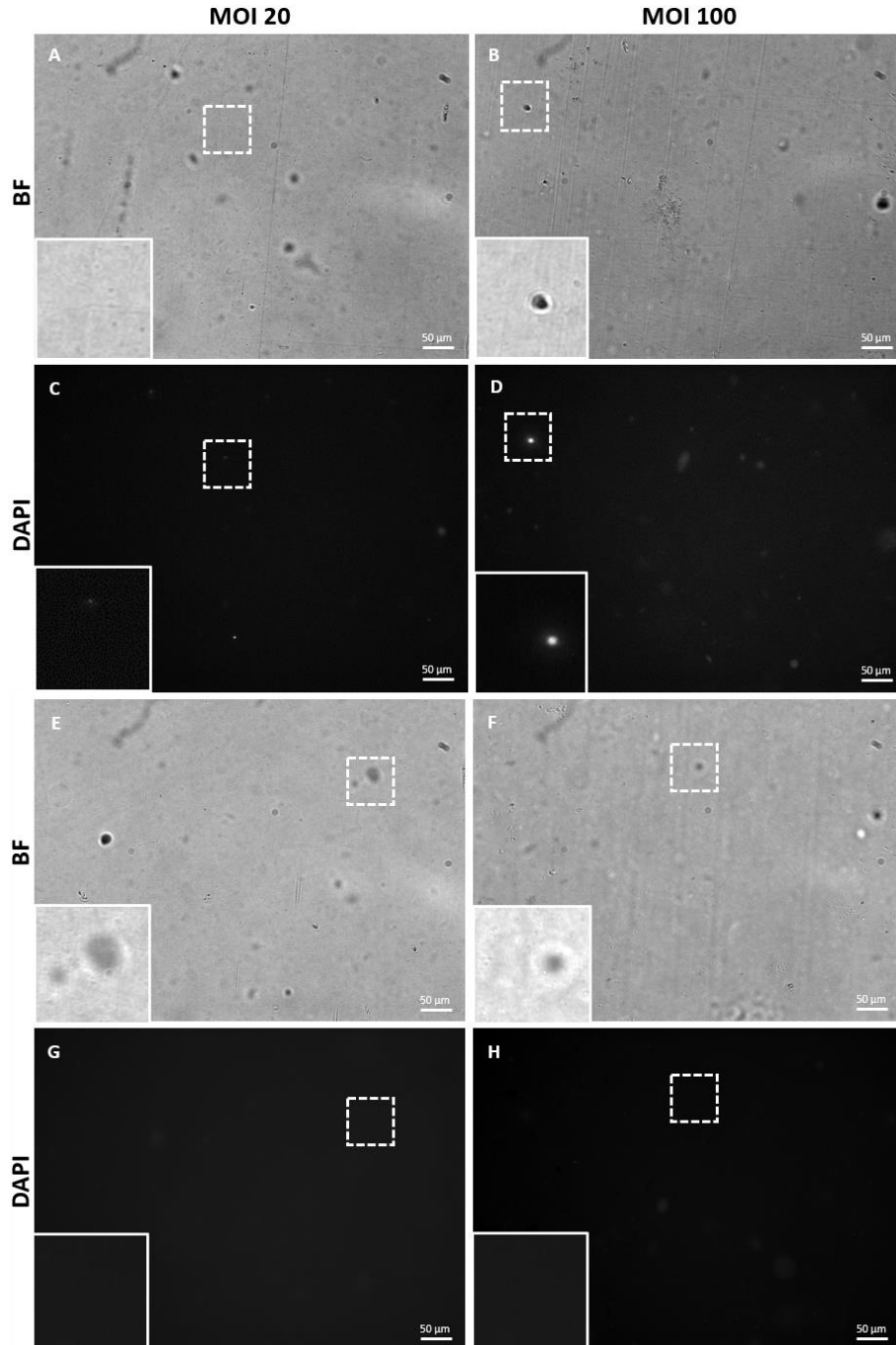
**Figura 16:** *E. coli* 247. Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* 247 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, infectadas con *E. coli* 247 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

Por otra parte, en la infección con cepas CoPEC 6 (Figura 16) y 59 (Figura 17) en ambas densidades de siembra, los campos visuales de los pocillos quedaron completamente vacíos, pudiendo observarse solo detritus celulares tanto a MOI 20 como MOI 100 e imposibilitando la visualización de la ocurrencia o no de megalocitosis.



**Figura 17:** *E. coli* 6. Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* 6 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células,

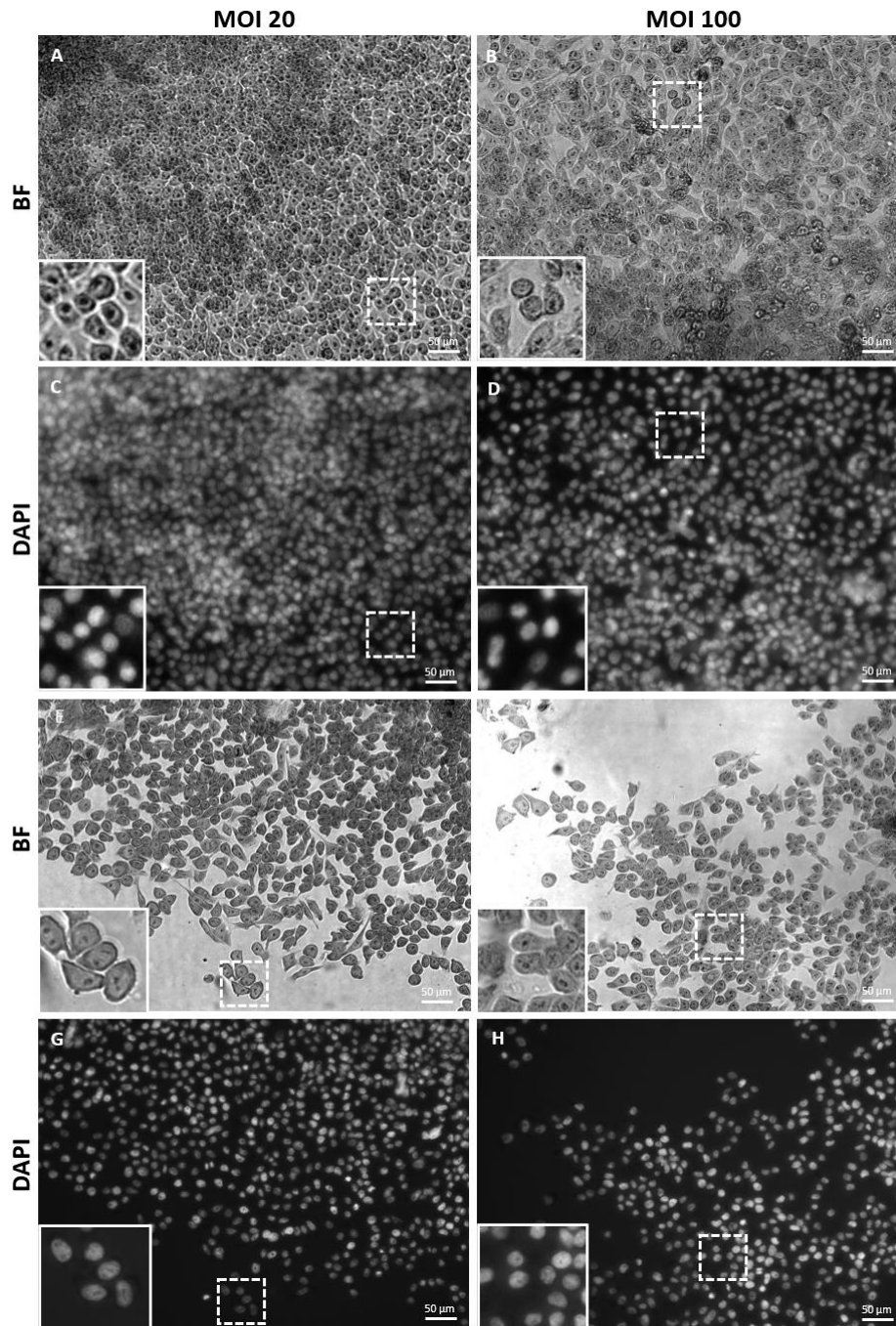
infectadas con *E. coli* 6 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu$ m.



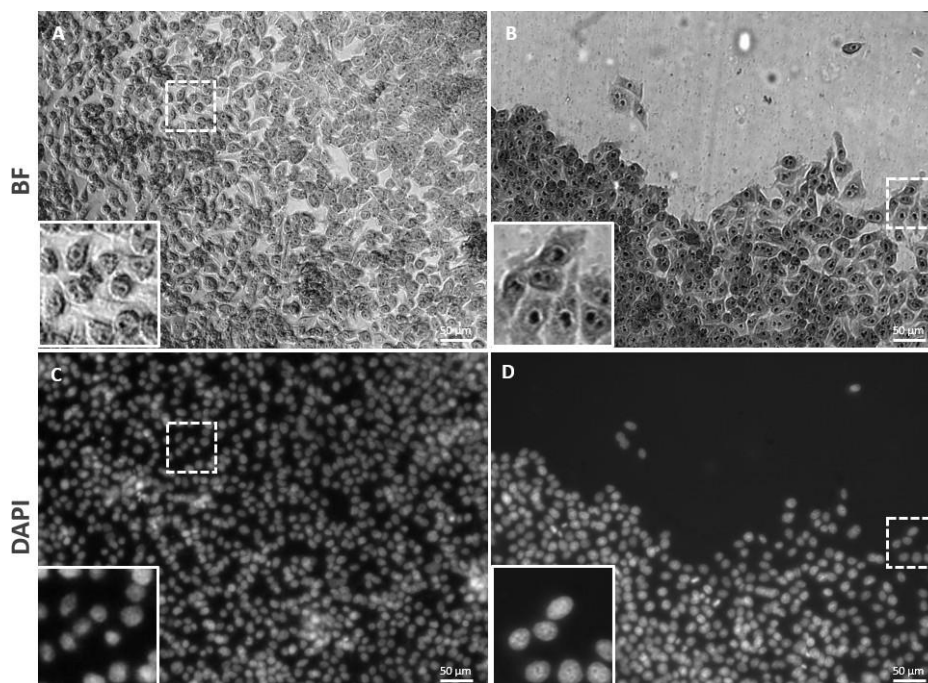
**Figura 18:** *E. coli* 59. Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* 59 MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células,

infectadas con *E. coli* 59 MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H). BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-phenylindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

En los pocillos correspondientes a los controles negativos, la infección con *E. coli* HS (Figura 18) y el control sin infección (Figura 19), no se observó la ocurrencia de megalocitosis, tanto para una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células como para una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células.



**Figura 19: *E. coli* HS (control negativo).** Células HeLa con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, infectadas con *E. coli* HS MOI 20 (A, C) y MOI 100 (B, D), y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, infectadas con *E. coli* HS MOI 20 (E, G) y MOI 100 (F, H), donde no se observa la ocurrencia de megalocitosis. BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

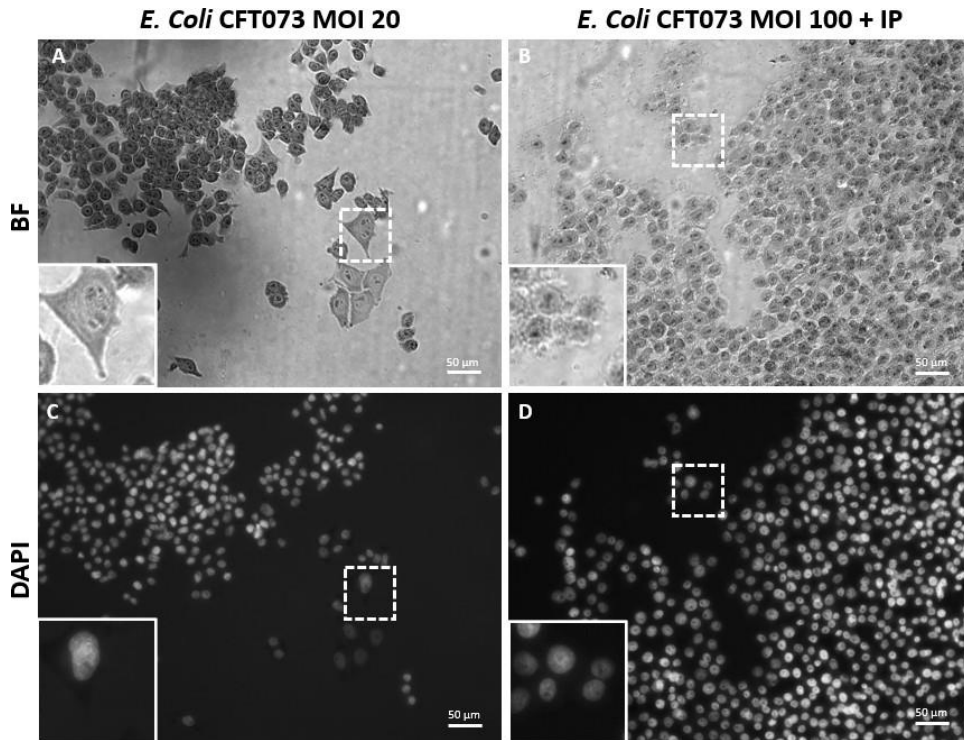


**Figura 20: Control sin infección.** Células HeLa sin infección con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células (A, C) y con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células (B, D), donde no se observa la ocurrencia de megalocitosis. BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindole; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50  $\mu\text{m}$ .

Cabe mencionar, que cada imagen empleada en la realización de las Figuras 9 - 19 es representativa de un total de 27 imágenes y de 3 ensayos realizados de manera independiente.

### **Viabilidad celular *in vitro* de aislados clínicos de CoPEC**

Se realizaron ensayos donde se marcaron las células HeLa infectadas con Yoduro de Propidio (IP) (1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) durante 1 minuto para ver muerte celular. Sin embargo, al añadir este marcador fluorescente, las células sufrieron una disminución de su tamaño nuclear, adquiriendo una morfología pequeña y circular (Figura 20), incluyendo las células que presentaban megalocitosis. Debido a esto, no fue posible evaluar la pérdida de viabilidad celular en las células HeLa infectadas con distintos aislados clínicos de CoPEC mediante este método.

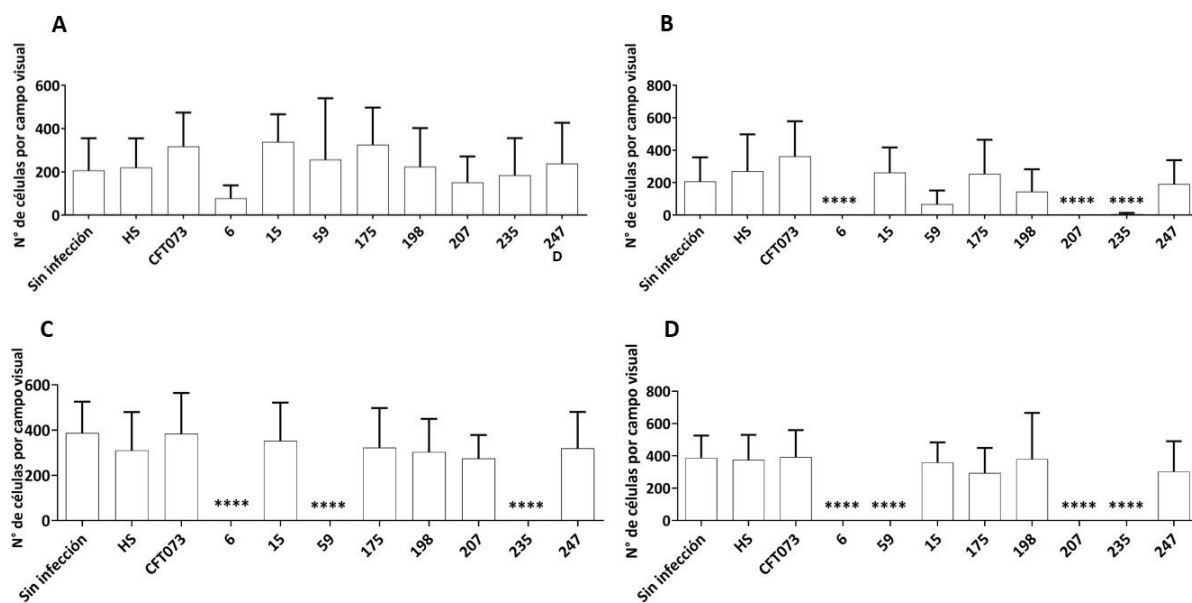


**Figura 21: Marcación con Yoduro de Propidio (IP) para evaluar viabilidad celular.** Comparativa entre infección de células HeLa con *E. coli* CFT073 MOI 20, sin marcación con IP (1µg/mL) (A, C) y con marcación con IP (1µg/mL) (B, D). Los núcleos de las células tratadas con IP presentan una morfología pequeña y circular respecto a las células sin tratamiento con IP. BF: brightfield; DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindole; IP: Yoduro de propidio; MOI 20: multiplicidad de infección de 20 bacterias por célula; MOI 100: multiplicidad de infección de 100 bacterias por célula. Barras de escala, 50 µm.

Además, en los ensayos donde se dejó el IP a la misma concentración, pero por un tiempo de 10 segundos, también se visualizó disminución del tamaño nuclear y la adquisición de una morfología pequeña y circular. Asimismo, se realizó un ensayo donde se generaron diluciones seriadas de IP a distintas concentraciones (1µg/mL, 0.5mg/mL, 0.25mg/mL, 0.2mg/mL, 0.125mg/mL y 0.1mg/mL). Sin embargo, las mismas características celulares mencionadas anteriormente estuvieron presentes. Tomando en consideración los plazos de ejecución de esta tesis, no se continuó con la ejecución de estos experimentos, privilegiando el análisis de megalocitosis.

## Análisis morfométrico para la determinación de megalocitosis

Al someter los datos del análisis morfométrico a pruebas estadísticas, se observó que el número total de células remanentes post-infección con cepas CoPEC no tuvo diferencias significativas entre estas a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células y MOI 20. No así, a una MOI 100, donde se evidenció diferencias significativas en el número total de células en las cepas CoPEC 6, 207 y 235, respecto al control sin infección (Figura 22). A una MOI 100, no se contabilizaron células remanentes en las infecciones con cepas CoPEC 6 y 207. Asimismo, para una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, se obtuvo diferencias significativas en el número de células remanentes para los casos de las cepas CoPEC 6, 59 y 235 respecto al control sin infección a una MOI 20, y en las cepas CoPEC 6, 59, 207 y 235 a una MOI 100 (Figura 22). No se contabilizaron células remanentes en las infecciones con cepas CoPEC 6, 59 y 235 a una MOI 20 y en cepas CoPEC 6, 59, 207 y 235 a una MOI 100.

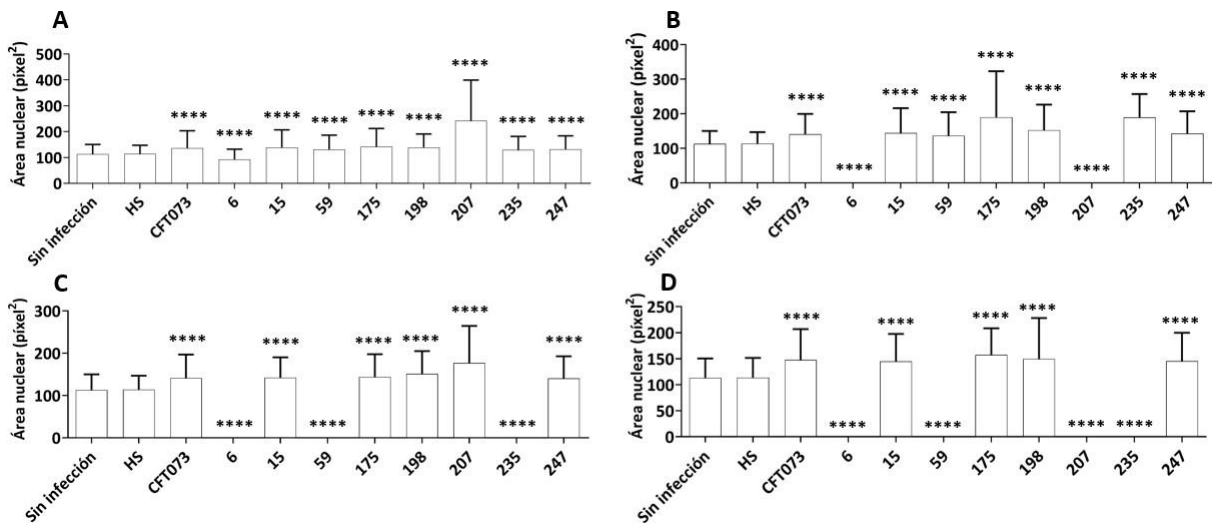


**Figura 22: Cuantificación de células HeLa infectadas por cepas CoPEC.** Número de células remanentes por campo visual luego de la infección con cepas CoPEC a MOI 20 (A) y MOI 100 (B) a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, y a MOI 20 (C) y MOI 100 a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células (D). Cada gráfico es representativo de 3 ensayos independientes y de triplicados.



Se consideraron como significativos valores de  $p \leq 0.05$ . \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

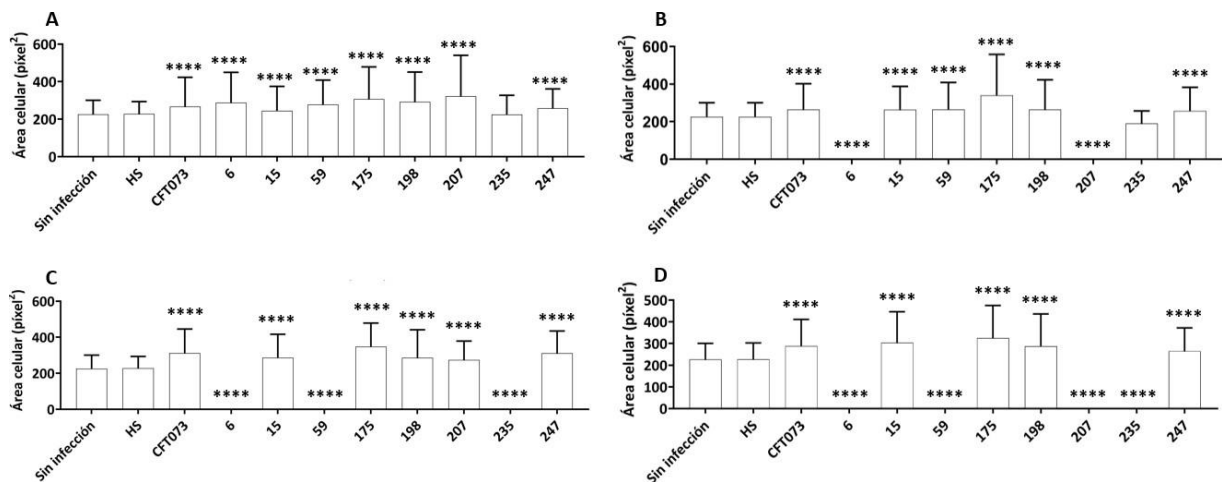
Por otra parte, se determinó que el área nuclear promedio de las células HeLa infectadas por cada una de las cepas CoPEC, fue significativamente mayor respecto al área nuclear promedio del control sin infección (Figura 23). Esto fue evidente al utilizar una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células y de  $\sim 10.000$  células, tanto para infecciones con MOI 20 como para infecciones con MOI 100. El valor del área nuclear promedio se reportó como 0  $\text{pixel}^2$  para los casos en los que no se detectó células remanentes. Estos corresponden a las infecciones con las cepas CoPEC 6 y 207 (en la condición de densidad de  $\sim 10.000$  células y MOI 100), con las cepas CoPEC 6, 59 y 235 ( $\sim 10.000$  células, MOI 20), y con las cepas CoPEC 6, 59, 207 y 235 ( $\sim 10.000$  células, MOI 100).



**Figura 23: Área nuclear promedio de células HeLa infectadas por cepas CoPEC.** Área promedio de los núcleos remanentes por campo visual luego de la infección con cepas CoPEC a MOI 20 (A) y MOI 100 (B) a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, y a MOI 20 (C) y MOI 100 a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células (D). Cada gráfico es representativo de 3 ensayos independientes y de triplicados. Se consideraron como significativos valores de  $p \leq 0.05$ . \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

En el tercer análisis, se vio que el área celular promedio de las células HeLa infectadas por cepas CoPEC presentó un aumento significativo a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, tanto en MOI 20 como MOI 100, en las cepas CoPEC CFT073, 6, 15, 59, 175, 198, 207 y 247 respecto al control sin infección (Figura 24). De forma similar, a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, hubo un incremento significativo respecto al área celular promedio del control sin infección en todas las cepas CoPEC a una MOI 20 y MOI 100 (Figura 24).

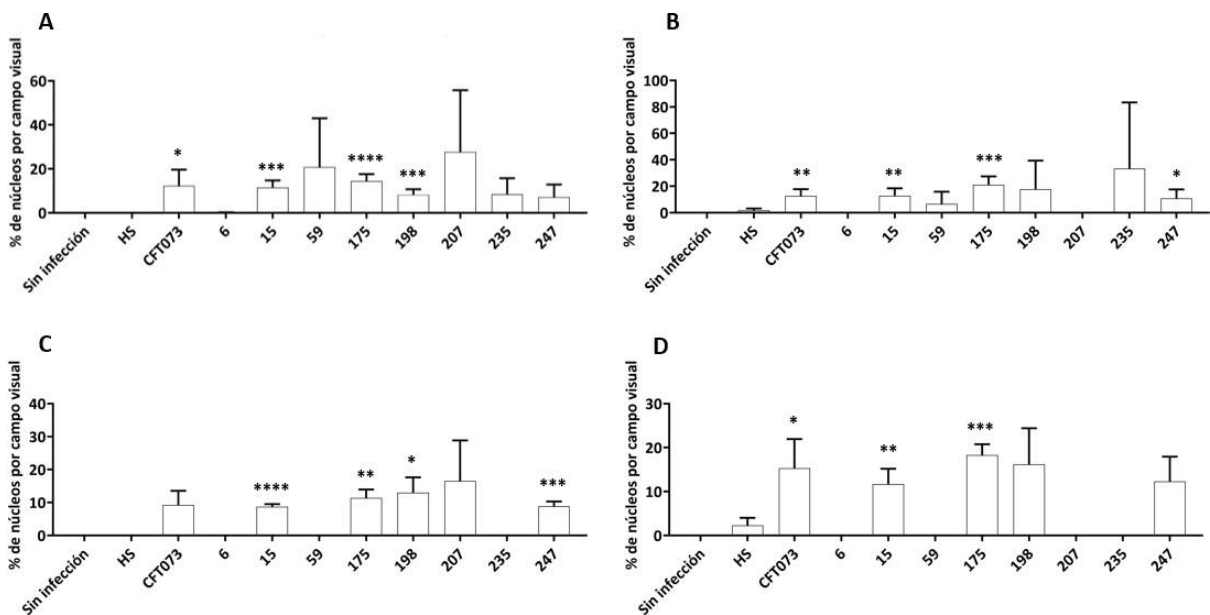
Al igual que en el análisis anterior, se reportaron valores de área celular promedio de  $0 \text{ pixel}^2$  en aquellos casos en los que no se identificaron células remanentes. Estos correspondieron a las infecciones con las cepas CoPEC 6 y 207 (en la condición de densidad de  $\sim 40.000$  células y MOI 100), CoPEC 6, 59 y 235 ( $\sim 10.000$  células, MOI 20) y con las cepas 6, 59, 207 y 235 ( $\sim 10.000$  células, MOI 100).



**Figura 24: Área celular promedio de células HeLa infectadas por cepas CoPEC.** Área promedio de las células remanentes por campo visual luego de la infección con cepas CoPEC a MOI 20 (A) y MOI 100 (B) a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, y a MOI 20 (C) y MOI 100 a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células (D). Cada gráfico es representativo de 3 ensayos independientes y de triplicados. Se consideraron como significativos valores de  $p \leq 0.05$ . \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

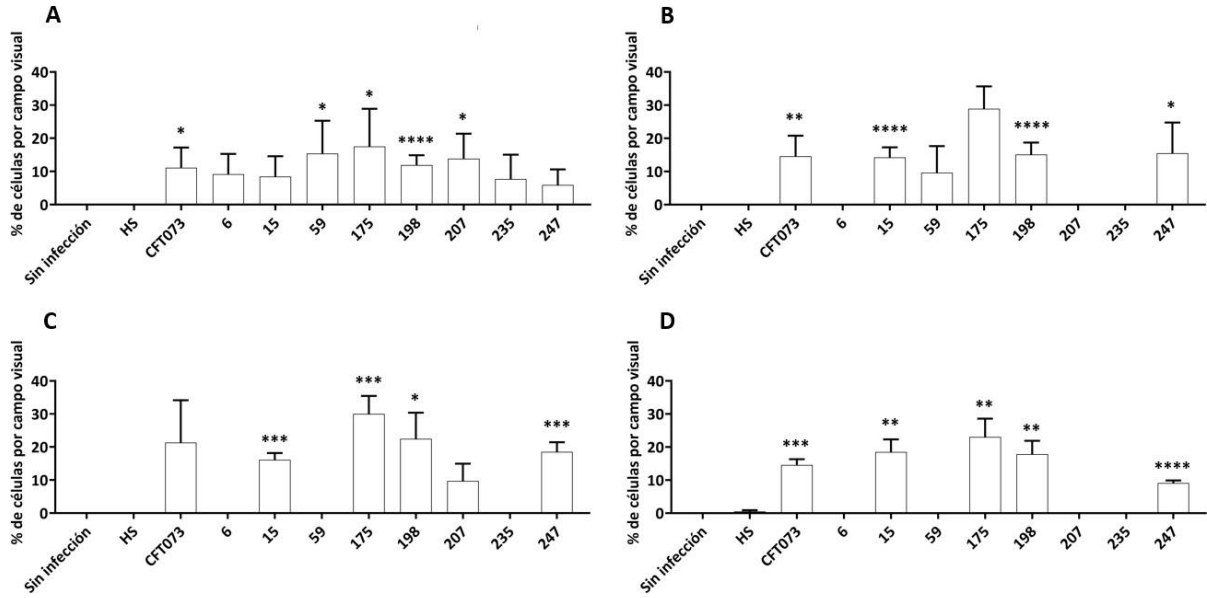
Para los siguientes análisis, con el objetivo de poder evidenciar en números (recuentos) la ocurrencia de megalocitosis, se determinó el porcentaje de núcleos y de células que presentaron un área mayor en los pocillos infectados con cepas de *E. coli* (*E. coli* HS y cepas CoPEC) con respecto al control sin infección. Analizando la distribución de áreas nucleares, se determinó que el valor máximo en el control sin infección tuvo valores de 201.526 pixel<sup>2</sup> (en el 1er ensayo), 199.530 pixel<sup>2</sup> (2do ensayo) y 199.780 pixel<sup>2</sup> (3er ensayo) para la densidad de siembra de ~40.000 células; y valores de 199.780 pixel<sup>2</sup> (1er ensayo), 203.400 pixel<sup>2</sup> (2do ensayo) y 198.680 pixel<sup>2</sup> (3er ensayo) para una densidad de siembra de ~10.000 células.

Respecto a la cuantificación de núcleos remanentes post-infección, con áreas nucleares mayores al área nuclear máxima del control sin infección, se presentaron diferencias significativas respecto al control sin infección en las cepas CoPEC CFT073, 15, 175 y 198 a una densidad de siembra de ~40.000 células y MOI 20, y en las cepas CFT073, 15, 175 y 247 a una MOI 100 (Figura 25). A una menor densidad de siembra (~10.000 células), las diferencias significativas respecto al control sin infección fueron en las cepas CoPEC 15, 175, 198 y 247 a una MOI 20 y CFT073, 15 y 175 a una MOI 100 (Figura 25).



**Figura 25: Cuantificación de núcleos con un área mayor al área nuclear máxima del control sin infección.** Porcentaje de núcleos que poseen un área mayor al área nuclear máxima del control sin infección por campo visual, luego de la infección con cepas CoPEC a MOI 20 (A) y MOI 100 (B) a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, y a MOI 20 (C) y MOI 100 a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células (D). Cada gráfico es representativo de 3 ensayos independientes y de triplicados. Se consideraron como significativos valores de  $p \leq 0.05$ . \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

Por último, para la cuantificación de células remanentes post-infección, con áreas celulares mayores al área celular máxima del control sin infección, se buscaron los valores de área celular máxima en los pocillos del control sin infección. Estas correspondieron a  $403.052 \text{ pixel}^2$  (en el 1er ensayo),  $399.060 \text{ pixel}^2$  (2do ensayo) y  $399.560 \text{ pixel}^2$  (3er ensayo) para la densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células; y a  $399.56 \text{ pixel}^2$  (1er ensayo),  $406.800 \text{ pixel}^2$  (2do ensayo) y  $399.45 \text{ pixel}^2$  (3er ensayo) para una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células. Se observaron diferencias significativas respecto al control sin infección en las cepas CoPEC CFT073, 59, 175, 198 y 207 a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células y MOI 20, y en las cepas CFT073, 6, 15, 59, 175, 198 y 247 a una MOI 100 (Figura 26). A una menor densidad de siembra ( $\sim 10.000$  células), las diferencias significativas respecto al control sin infección fueron en las cepas CoPEC 15, 175, 198 y 247 a una MOI 100 y CFT073, 15, 175, 198 y 247 a una MOI 100 (Figura 26).



**Figura 26: Cuantificación de células con un área mayor al área celular máxima del control sin infección.** Porcentaje de células que poseen un área mayor al área celular máxima del control sin infección por campo visual, luego de la infección con cepas CoPEC a MOI 20 (**A**) y MOI 100 (**B**) a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, y a MOI 20 (**C**) y MOI 100 a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células (**D**). Cada gráfico es representativo de 3 ensayos independientes y de triplicados. Se consideraron como significativos valores de  $p \leq 0.05$ . \*:  $p \leq 0.05$ ; \*\*:  $p \leq 0.01$ , \*\*\*:  $p \leq 0.001$ , \*\*\*\*:  $p \leq 0.0001$ .

## Discusión

En este trabajo de investigación se evaluó la ocurrencia de megalocitosis en infecciones de células HeLa con aislados clínicos de cepas CoPEC. Al analizar las imágenes obtenidas de estas infecciones, se observó que todas las cepas CoPEC, independiente de su secuenciotipo, presentaban la capacidad de inducir megalocitosis y que, además, las células infectadas exhibían diferencias en su tamaño nuclear y celular, utilizando dos multiplicidades de infección distintas (MOI 20 y MOI 100) y dos densidades de siembra distintas ( $\sim 10.000$  células y  $\sim 40.000$  células). En las infecciones con una densidad de siembra de  $\sim 10.000$  células, se evidenció una mayor cantidad de células con megalocitosis respecto a las infecciones con una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, sugiriendo que células más expuestas podrían ser más susceptibles a la acción de la colibactina. Esto se puede extrapolar a lo que ocurre, por ejemplo, en el epitelio intestinal normal, donde, al generarse una primera vulneración de la microbiota cohabitante en el intestino, las cepas CoPEC comienzan a comportarse de forma patogénica mediante la acción de factores de virulencia y liberación de toxinas, que generan un daño estructural sobre la mucosa intestinal, exponiendo a las células epiteliales (46). De igual manera, se ha estudiado en CRC humano y de rata, que debido a alteraciones genéticas, aumenta la permeabilidad de sus uniones estrechas, estando más expuesto el epitelio a la acción de carcinógenos y unión de factores de crecimiento (50). Algo similar se logra observar en nuestros resultados, en donde a una densidad de siembra menor, con menos uniones celulares presentes, el efecto genotóxico de la colibactina se evidenció con mayor frecuencia, mientras que a una mayor confluencia celular, es posible que esté presente una mayor cantidad de uniones intercelulares. Esto puede atribuirse a que al haber un mayor espacio entre las células en pocillos menos confluentes, existe una mayor facilidad para la colibactina de permear a través de ellas y una mayor duración del contacto directo bacteria-célula, el cual es necesario para la ocurrencia de efectos citopáticos (18). Asimismo, se observa que las cepas CoPEC que ocasionan un menor grado de megalocitosis, son aquellas que más células remanentes poseen al interior de los pocillos, mientras que, por el contrario, aquellas cepas CoPEC que generan un mayor grado de megalocitosis, tienen una menor cantidad de células remanentes. Esto podría deberse a que

estas últimas cepas CoPEC producen mayor cantidad de colibactina o que las células sufren muerte celular por la acción de la síntesis paralela de otros factores de virulencia. A pesar de esto, la presencia de megalocitosis en todos los casos de infecciones con cepas CoPEC en los que se observó células remanentes, sugiere que la maquinaria codificada por la isla *pks* se encuentra funcional, por lo que habría producción de colibactina, la cual podría ocasionar directamente o contribuir, junto con otros factores de virulencia, a la ocurrencia del efecto genotóxico evidenciado. Será pertinente evaluar, en estudios futuros, el rol de la colibactina en la ocurrencia de megalocitosis a diferentes periodos de tiempo y/o MOIs para aquellos casos en los que no se detectó células remanentes al final del ensayo.

El análisis del número de células remanentes por campo visual luego de la infección de células HeLa con cepas CoPEC mostró diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) entre el control sin infección y las cepas CoPEC 6, 207 y 235 a una MOI 20 y siembra de  $\sim 10.000$  células, y en cepas CoPEC 6, 59 y 235 a una MOI 20 y 6, 59, 207 y 235 a una MOI 100 para una confluencia celular mayor. Además, en este análisis fue posible observar que no se identificaron células en los pocillos infectados con las cepas CoPEC 6 y 207 a una MOI 100 y densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, y en las infecciones con cepas CoPEC 59 y 235 a una MOI 20 y 6, 59, 207 y 235 a una MOI 100, a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$ . Esto se correlaciona con las imágenes representativas mostradas en las figuras 14, 15, 17 y 18 de 'Megalocitosis *in vitro* de aislados clínicos de CoPEC', donde se observan los campos visuales de estas condiciones, sin células remanentes en su interior. Por otra parte, y debido a que no fue posible evaluar la viabilidad celular como fue previsto en un inicio, se infiere del recuento de células que la colibactina u otros factores de virulencia de las cepas CoPEC, podrían tener un efecto sobre la viabilidad de las células infectadas con cepas CoPEC, representado principalmente por la disminución e incluso nula presencia de células remanentes en algunos campos visuales. Sin embargo, no es la manera óptima de evaluar viabilidad celular, puesto que podrían haber células que permanezcan adheridas aún durante el proceso de muerte celular.

Luego, se cuantificó el área nuclear promedio de las células HeLa infectadas por cepas CoPEC. Se observó un aumento significativo ( $p < 0.05$ ) en el caso de las infecciones con las cepas CoPEC

CFT073, 6, 15, 59, 198, 207, 235 y 247, tanto para MOI 20 como MOI 100, a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  y  $\sim 10.000$  células, con respecto al control sin infección. Por otra parte, la cepa 175 solo presentó diferencias significativas respecto al control sin infección a esta última densidad de siembra, con una MOI 100. Al igual que en el análisis anterior, se observó que no fue posible identificar células dentro de los pocillos infectados con las cepas CoPEC 6 y 207 a una MOI 100 y densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, y en las infecciones con cepas CoPEC 6, 59 y 235 a una MOI 20 y 6, 59, 207 y 235 a una MOI 100, a una densidad de siembra de  $\sim 10.000$ , lo cual también se correlaciona con las imágenes presentes en las figuras 14, 15, 17 y 18 de 'Megalocitosis *in vitro* de aislados clínicos de CoPEC'.

De manera similar, en el tercer análisis se observó que el área celular promedio de las células HeLa infectadas por cepas CoPEC presentó diferencias significativas ( $p < 0.05$ ) respecto al control sin infección en todas las cepas CoPEC a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$  células, tanto en MOI 20 como MOI 100, excepto por CoPEC 235 (Figura 24). De forma similar, a una densidad de siembra menor, hubo un aumento significativo respecto al área celular promedio del control sin infección en todas las cepas CoPEC, para una MOI 20 y MOI 100 (Figura 24). Asimismo, al igual que en el análisis anterior, en las densidades de siembra y MOIs que no fue posible cuantificar células restantes post-infección, se otorgó un valor de 0  $\text{pixel}^2$  para el área celular promedio.

Ambos ensayos de cuantificación de áreas promedio tienen relación al primer análisis, referente a la cuantificación de células remanentes post-infección, donde se muestra que las mismas cepas con las que se infectaron las células cuyas áreas nucleares y celulares poseen un valor 0  $\text{pixel}^2$ , son aquellas que no dejaron células remanentes en los pocillos post-infección, lo que podría indicar que existen cepas CoPEC con una mayor capacidad de ocasionar muerte y/o desprendimiento celular.

La manifestación del resultado como un promedio de las áreas nucleares y celulares podría implicar la existencia de un sesgo, ya que pueden haber células infectadas con cepas CoPEC que posean un área nuclear y celular de gran tamaño, pero que, en pocillos con alta confluencia celular, exista una gran cantidad de células que podrían tener un área nuclear y celular normal. Por lo tanto, el promedio



enmascara la posible distribución desigual que podría haber de, por un lado, núcleos y células con tamaños normales, y por otro lado, una subpoblación de núcleos y células con megalocitosis. Sin embargo, debido a que se evidencian diferencias significativas entre los promedios de áreas nucleares y citoplasmáticas con respecto al control sin infección, y en las comparaciones entre cepas CoPEC, creemos que los resultados son lo suficientemente representativos y comprueban la hipótesis planteada. Un cuarto análisis, mostró el porcentaje de núcleos con un área mayor al área nuclear máxima del control sin infección por campo visual, luego de las infecciones con cepas CoPEC. Las diferencias significativas obtenidas a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$ , fueron entre el control sin infección y las cepas CoPEC CFT073, 15, 175 y 198 a una MOI 20 y CFT073, 15, 175 y 247 a una MOI 100, mientras que a una densidad de siembra menor, se observaron diferencias significativas entre el control sin infección y las cepas CoPEC 15, 175, 198 y 247 para una MOI 20 y CFT073, 15 y 175 para una MOI 100. Por otro lado, en el análisis estadístico que evaluó los porcentajes de células con un área celular mayor al área celular máxima del control sin infección por campo visual, luego de las infecciones con cepas CoPEC, se observó que a una densidad de siembra de  $\sim 40.000$ , son las cepas CoPEC CFT073, 15, 175 y 198 las que presentan diferencias significativas con el control sin infección a una MOI 20 y las cepas CoPEC CFT073, 15, 175 y 247 a una MOI 100. Por otra parte, a una menor densidad de siembra, son las cepas CoPEC 15, 175, 198 y 247 las que presentan diferencias significativas con el control sin infección a ambas MOIs, y la cepa CFT073 a una MOI 100. Para efectos de los últimos dos análisis estadísticos mencionados, se estableció como células con megalocitosis aquellas que tengan un área nuclear y celular por sobre el área nuclear y celular máxima del control sin infección, respectivamente. Lo anterior, se debe a la ausencia de definiciones en la actualidad que indiquen una medida cuantitativa universal para establecer megalocitosis. Si bien, mediante esta definición es posible que no se pueda descartar completamente que haya total ausencia de megalocitosis en pocillos sin infección, en los ensayos realizados sí se lograron observar diferencias significativas entre el control sin infección y las infecciones con el resto de las cepas de *E. coli*.

De estos análisis, se infiere que los distintos secuenciotipos de *E. coli* poseen diferencias en la magnitud de megalocitosis que ocasionan, tal como lo reportado por Auvray et al (1) donde se evaluaron cepas CoPEC humanas y de bovino, y que existen secuenciotipos que inducen megalocitosis en una mayor magnitud que otros, lo cual se podría atribuir a la mayor producción de colibactina por estas cepas, o a que, en conjunto, se encuentran participando otros factores de virulencia en la generación del fenotipo observado. Estas diferencias de magnitud se pueden atribuir a divergencias en el *background* genético que poseen los distintos secuenciotipos, tal como diversos repertorios de factores de virulencia, los cuales varían entre *E. coli* extraintestinales y entre cepas CoPEC. Además, se observó que las cepas CoPEC CFT073, 15, 175, 198, 207 y 247 son aquellas con la mayor capacidad de inducir megalocitosis en células HeLa, y corresponden a los secuenciotipos ST-14, desconocido, ST-141, desconocido y ST - 998, respectivamente. En todos los casos, los resultados obtenidos con *E. coli* HS son coherentes con su naturaleza de cepa comensal, al no exhibir efectos citopáticos de forma significativa con respecto al control sin infección.

En la realización del presente estudio, se utilizó una manera de evidenciar que las cepas CoPEC sintetizan y liberan colibactina, usando como indicador a las células HeLa, y pudiendo a la vez, observar la ocurrencia de megalocitosis. En la actualidad solo existen métodos indirectos de síntesis química y captura de productos naturales mediante sondas, como estrategias de acercamiento al aislamiento de colibactina (26). Si bien la elección de la línea celular HeLa para este estudio se debe a la simplicidad de su uso y a que este ha sido validada por diversos estudios en donde se busca observar megalocitosis (18, 25, 42), en el contexto *in vivo*, las cepas CoPEC no se encuentran en contacto directo con este tipo celular, por lo que, sería de interés evaluar el efecto que tienen aislados clínicos de CoPEC sobre líneas celulares intestinales, tal como lo reportado por Reuter C. et al (51) en el estudio de cómo una capa gruesa de mucus sobre la línea celular HT29-MTX-E12 (epitelio intestinal, derivada de células de Goblet) actúa como barrera físico-química, atenuando el efecto genotóxico de la colibactina al reducir las rupturas de doble hebra de ADN, y el efecto de cepas CoPEC en el epitelio del tracto urinario tal como lo reportado por Chauvray et al. (3). Además, sería útil determinar el efecto

citopático de las cepas CoPEC estudiadas sobre líneas celulares de CRC, ya que sabemos que poseen la capacidad de ocasionar cuadros clínicos infecciosos, sin embargo, está por determinarse si todas las cepas CoPEC son partícipes en la formación de tumores a nivel colorrectal, como se ha estudiado por Cougnoux et al.(5), Iyadorai T. et al. (12) y Dziubańska-Kusibab P.J. et al (46). Por lo tanto, debido a que en casos de CRC ocasionados por inflamación crónica, tal como la Enfermedad de Crohn o la Colitis Ulcerosa, las cepas CoPEC se encuentran en gran cantidad (47), y dado que la acumulación de las lesiones ocasionadas por CoPEC generan estrés en la replicación y favorecen la ruptura de doble hebra de ADN, promoviendo el envejecimiento de los tejidos y la inestabilidad genómica (52), es que es de suma relevancia caracterizar aquellas CoPEC que poseen una mayor capacidad de inducir megalocitosis, lo que podría ayudar a la eventual prevención de CRC mediante el tratamiento temprano de la infección por CoPEC.

Por otra parte, realizar un análisis masivo de imágenes y datos mediante HCS y HCA, nos permite evaluar un mismo efecto bajo múltiples condiciones, como fue hecho en este estudio, donde se evaluó megalocitosis en dos condiciones de densidad de siembra y dos MOIs. Por lo tanto, implementar el uso de HCS en las metodologías de trabajo de estudios del efecto de cepas CoPEC, podría contribuir significativamente a la resolución de problemáticas relativas al rol de la colibactina que aún no han sido dilucidadas, mediante la evaluación de múltiples condiciones de forma simultánea en un periodo de tiempo optimizado, y en una mayor diversidad de líneas celulares.

El análisis de bioimágenes es un proceso de identificación y comprensión de patrones en una imagen, cuyo objetivo principal es la medición de estructuras biológicas de manera imparcial, para lograr la comprensión de sistemas biológicos de forma cuantitativa. En este estudio, el uso de HCS y HCA en el análisis masivo de bioimágenes e información nos permitió evaluar mediante metodologías automatizadas, un mismo efecto bajo múltiples condiciones, donde se evaluó megalocitosis en condiciones distintas de siembra y de MOIs. Además, el análisis automatizado mediante softwares facilita las rutinas de análisis, logrando obtener resultados reproducibles y que pueden ser comparados globalmente, estableciendo protocolos de análisis fácilmente reproducibles en un mismo laboratorio, lo

que reduce dramáticamente el tiempo que investigadores suelen dedicar en entrenamiento y aplicación, logrando incluso obtener características que el análisis manual no es capaz detectar. Es ahí donde radica la importancia de que los científicos incorporen conocimientos informáticos en softwares especializados o en programación. Sin embargo, aún es un área en desarrollo, puesto que los investigadores de áreas biomédicas no suelen estar lo suficientemente capacitados en programación, lo que representa una gran barrera para la incorporación masiva de este tipo de metodologías automatizadas.

La arista central en la importancia de este estudio radica en que, en el contexto actual de una ausencia de estudios previos en Chile que investiguen y evalúen el efecto que tienen cepas CoPEC sobre diversas líneas celulares, se contribuye a la caracterización de las capacidades patogénicas que exhiben, *in vitro*, aislados clínicos de CoPEC provenientes de pacientes con cuadros infecciosos extraintestinales en el contexto del ámbito hospitalario en nuestro país, donde UPEC es el agente causal de la mayoría de las ITUs (52), incluyendo cistitis, pielonefritis y complicaciones infecciosas, por lo que se sugiere igualmente que UPEC *pks+* debe ser estudiada como un posible factor de riesgo, particularmente en casos de infecciones crónicas y recurrentes. Además, mediante la innovación en la realización de un *screening* masivo por HCS, nunca antes publicado previamente para determinar megalocitosis, fue posible observar la ocurrencia de megalocitosis en diferentes grados de severidad entre las distintas CoPEC, obteniendo gran cantidad de información en términos cualitativos y cuantitativos, entregando estadísticas sólidas y robustas. Por lo tanto, continuar caracterizando la patogenicidad de estas cepas y seguir evaluando el rol de la colibactina sobre la megalocitosis, contribuirá en un futuro a la evaluación de la posible participación funcional de otros factores de virulencia en forma paralela a la acción de colibactina, así como en la búsqueda de potenciales inhibidores de patogenicidad y terapias dirigidas en el contexto del CRC y otros cuadros clínicos inflamatorios e infecciosos. Además, en estudios posteriores será de interés asociar los efectos citopáticos ocasionados por cepas CoPEC con la diferencia entre los genes y proteínas que codifica el locus de la isla *pks* en cada una de ellas.

## Conclusión

En un poco más de una década, las cepas CoPEC han adquirido relevancia en el contexto de la salud humana, dada su asociación con diversas patologías, incluyendo CRC y cuadros infecciosos. Esto radica en gran medida en la inducción de ruptura de doble hebra de ADN y a los efectos que posee la sobre la fisiología y estructura celular, evidenciable en la ocurrencia de megalocitosis.

El presente trabajo evidenció que todos los aislados clínicos de cepas CoPEC en estudio, definidas como cepas de *E. coli* que portan la isla *pks* en su genoma, poseen la capacidad de ocasionar megalocitosis *in vitro* sobre células HeLa, independiente de su secuenciotipo y en diferentes magnitudes. Además, nuestro estudio muestra que entre cepas de *E. coli* aisladas desde cuadros infecciosos extraintestinales en ambientes hospitalarios chilenos, se distribuye una isla *pks* funcional, sugiriendo que esta genotoxina está involucrada en las vías de infección en pacientes que se encuentran hospitalizados.

Por otro lado, gran parte de nuestro conocimiento sobre el efecto citopático ocasionado por cepas CoPEC en sepsis, meningitis e infecciones intestinales y del tracto urinario, deriva de numerosos estudios y observaciones *in vitro*, lo cual no necesariamente refleja los patrones que ocurren *in vivo*. Es por esto, que debemos ser metódicos en continuar dilucidando las capacidades patogénicas que posee la colibactina, así como las diversas variaciones genéticas de la isla *pks* que se encuentran distribuidas dentro del árbol filogenético de *E. coli*, aspirando al eventual desarrollo de potenciales inhibidores y nuevas estrategias terapéuticas dirigidas a la supresión de sus efectos genotóxicos. Asimismo, puesto que existen estudios que han demostrado la capacidad antibiótica, analgésica o antiinflamatoria de productos producidos por la isla *pks*, destinar esfuerzos a la purificación de estos metabolitos podría ser utilizado potencialmente en salud.

En este contexto, debido a que el HCS es una herramienta novedosa en el manejo de una gran cantidades de imágenes y datos, asegurando reproducibilidad, estudios científicos rigurosos y permitiendo visualizar e interpretar fenotipos celulares presentes en fenómenos biológicos de interés, es que su implementación en estudios futuros contribuirá a continuar caracterizando la capacidad de

otras cepas CoPEC, con secuenciotipos similares o distintos, de inducir megalocitosis en líneas celulares provenientes de enfermedades relevantes a nivel país, tal como lo es el CRC, siendo el 3er cáncer más prevalente y con mayor mortalidad en Chile al año 2020 (48), o incluso, el estudio de efectos citopáticos *in vivo*, estableciendo una base para la evaluación futura del rol de otros determinantes de patogenicidad, además de la colibactina.

## Bibliografía

1. Auvray F., Perrat A., Arimizu Y., Chagneau C.V., Bossuet-Greif N., Massip C., Brugère H., Nougayrède J.P., Hayashi T., Branchu P., Ogura Y., Oswald E. Insights into the acquisition of the *pks* island and production of colibactin in the *Escherichia coli* population. *Microbial Genomics*. 2021. 7(5):000579.
2. Schindelin J., Arganda-Carreras I., Frise E., Kaynig V., Longair M., Pietzsch T., Preibisch S., Rueden C., Saalfeld S., Schmid B., Tinevez J.Y., White D.J., Hartenstein V., Eliceiri K., Tomancak P., Cardona A. Fiji: una plataforma de código abierto para el análisis de imágenes biológicas. *Nature Methods*. 2012. 9 (7): 676-82.
3. Chagneau C.V., Massip C., Bossuet-Greif N., Fremez C., Motta J-P., Shima A. Uropathogenic *E. coli* induces DNA damage in the bladder. *PLOS Pathogens*. 2021. 17(2).
4. Clermont O., Christenson J.K., Denamur E., Gordon D.M. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. *Environmental Microbiology Reports*. 2013. 5(1):58-65.
5. Cougnoux A., Dalmasso G., Martínez R., Buc E., Delmas J., Gibold L., Sauvanet P., Darcha C., Dechelotte P., Bonnet M., Pezet D., Wodrich H., Darfeuille-Michaud A., Bonnet R. Bacterial genotoxin colibactin promotes colon tumour growth by inducing a senescence-associated secretory phenotype. *Gut*. 2014. 63: 1932–1942.
6. Croxen, M., Finlay, B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 2010. 8, 26–38.
7. Cuevas-Ramos G., Petit C.R., Marcq I., Boury M., Oswald E., Nougayrede J.P. *Escherichia coli* induces DNA damage in vivo and triggers genomic instability in mammalian cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2010. 107: 11537–11542.
8. Denamur E., Clermont O., Bonacorsi S. The population genetics of pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2021. 19: 37–54.

9. Faïs T., Delmas J., Barnich N., Bonnet R., Dalmasso G. Colibactin: more than a new bacterial toxin. *Toxins*. 2018. 10(4):151.
10. Hacker J., Kaper J.B. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Annual Review of Microbiology*. 2000. 54:641–679.
11. Hutchinson C. R. Polyketide and non-ribosomal peptide synthases: falling together by coming apart. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 2003. 100(6): 3010–3012.
12. Iyadorai T., Mariappan V., Vellasamy K. M., Wanyiri J. W., Roslani A. C., Lee G. K., Sears C., & Vadivelu J. Prevalence and association of *pks+* *Escherichia coli* with colorectal cancer in patients at the University Malaya Medical Centre, Malaysia. *Plos One*. 2020. 15(1)e0228217.
13. Johnson J.R., Johnston B., Kuskowski M.A., Nougayrede J.P., Oswald E. Molecular epidemiology and phylogenetic distribution of the *Escherichia coli pks* genomic island. *Journal of Clinical Microbiology*. 2008. 46: 3906–3911.
14. Kaper J. B., Nataro J. P. & Mobley H. L. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology*. 2004. 2: 123–140.
15. Manges A. R., Geum H. M., Guo A., Edens T. J., Fibke C. D., Pitout J. D. D. Global Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli* (ExPEC) Lineages. *Clinical Microbiology Reviews*. 2019. 32(3).
16. Marcq I., Martin P., Payros D., Cuevas-Ramos G., Boury M., Watrin C., Nougayrede J.P., Olier M., Oswald E. The genotoxin colibactin exacerbates lymphopenia and decreases survival rate in mice infected with septicemic *Escherichia coli*. *The Journal of Infectious Diseases*. 2014. 210: 285–294.
17. McCarthy A. J., Martin P., Cloup E., Stabler R. A., Oswald E., Taylor P. W. The genotoxin colibactin is a determinant of virulence in *Escherichia coli* K1 experimental neonatal systemic infection. *Infection and Immunity*. 2015. 83:3704–3711.



18. Nougayrède J. P., Homburg S., Taieb F., Boury M., Brzuszkiewicz E., Gottschalk G., Buchrieser C., Hacker J., Dobrindt U., Oswald E. *Escherichia coli* induces DNA double-strand breaks in eukaryotic cells. *Science*. 2006. 313(5788):848-51.
19. Ren Y., Palusiak A., Wang W., Wang Y., Li X., Wei H., Kong Q., Rozalski A., Yao Z., Wang Q. A high-resolution typing assay for uropathogenic *Escherichia coli* based on fimbrial diversity. *Frontiers in Microbiology*. 2016. 7.
20. Ruppitsch, W. Molecular typing of bacteria for epidemiological surveillance and outbreak investigation. *Journal of Land Management, Food and Environment*. 2016. 67(4): 199–224.
21. Secher T., Brehin C., Oswald E. Early settlers: which *E. coli* strains do you not want at birth? *American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2016. 311:1: G123-G129.
22. Secher T., Gaillot O., Ryffel B., Chamaillard M. Remote control of intestinal tumorigenesis by innate immunity. *Cancer Research*. 2010. 70: 1749–1752.
23. Secher T., Samba-Louaka A., Oswald E., Nougayrède J.P. *Escherichia coli* producing colibactin triggers premature and transmissible senescence in mammalian cells. *Plos One*. 2013. 8:e77157.
24. Suresh A., Shaik S., Baddam R., Ranjan A., Qumar S., Jadhav S., Semmler T., Ghazi I.A., Wieler L.H., Ahmed N. Evolutionary dynamics based on comparative genomics of pathogenic *Escherichia coli* lineages harboring polyketide synthase (*pks*) island. *mBio*. 2021. 12.
25. Tang-Fichaux M., Chagneau C.V., Bossuet-Greif N., Nougayrède J.P., Oswald É., Branchu P. The Polyphosphate Kinase of *Escherichia coli* Is Required for Full Production of the Genotoxin Colibactin. *mSphere*. 2020. 5 (6).
26. Xue M., Kim C.S., Healy A.R., Wernke K.M., Wang Z., Frischling M.C., Shine E.E, Wang W., Herzon S.B., Crawford J.M. Structure elucidation of colibactin and its DNA cross-links. *Science*. 2019. 365(6457).

27. Fabian, N. J., Mannion, A. J., Feng, Y., Madden, C. M., & Fox, J. G. Intestinal Colonization of Genotoxic *Escherichia coli* Strains Encoding Colibactin and Cytotoxic Necrotizing Factor in Small Mammal Pets. *Veterinary Microbiology*. 2019. 108506.
28. Toledo J. Red de Equipamiento Científico Avanzado (REDECA). Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. 2020. [Consultado el 29 de Junio de 2022]. Disponible en: <https://redeca.med.uchile.cl>
29. Buchser W., Collins M., Garyantes T. Assay Development Guidelines for Image-Based High Content Screening, High Content Analysis and High Content Imaging. *Assay Guidance Manual*. 2012.
30. Jolley K.A., Bray J.E., Maiden M.C.J. Open-access bacterial population genomics: BIGSdb software, the PubMLST.org website and their applications. *Wellcome Open Research*. 2018. 24;3:124.
31. Abdolhoseini M., Kluge M.G., Walker F.R. Segmentation of Heavily Clustered Nuclei from Histopathological Images. *Scientific Reports*. 2019. 9, 4551.
32. Goodwin, P.C. Quantitative deconvolution microscopy. *Quantitative Imaging in Cell Biology*. 2014. 177–192.
33. Mbiki S., McClendon J., Alexander-Bryant A. Gilmore J. Classifying changes in LN-18 glial cell morphology: a supervised machine learning approach to analyzing cell microscopy data via FIJI and WEKA. *Medical & Biological Engineering & Computing*. 2020.
34. Zhang Z., Zhou Y., Qian H. Stemness and inducing differentiation of small cell lung cancer NCI-H446 cells. *Cell Death and Disease*. 2013. 4, e633.
35. Tang H., Yuen K., Tang H. Reversibility of apoptosis in cancer cells. *British Journal of Cancer*. 2009. 100, 118–122.
36. Soucy S. M., Huang J., & Gogarten J. P. Horizontal gene transfer: building the web of life. *Nature Reviews Genetics*. 2015. 16(8), 472–482.

37. Dell'Annunziata F., Folliero V., Giugliano R., De Filippis A., Santarcangelo C., Izzo V., Daglia M., Galdiero M., Arciola C.R., Franci, G. Gene Transfer Potential of Outer Membrane Vesicles of Gram-Negative Bacteria. *International Journal of Molecular Sciences*. 2021. 22(11), 5985.
38. Chiang Y. N., Penadés J.R., Chen J. Genetic transduction by phages and chromosomal islands: The new and noncanonical. *PLOS Pathogens*. 2019. 15(8):e1007878.
39. Johnston C., Martin B., Fichant G., Polard P., Claverys J.P. Bacterial transformation: distribution, shared mechanisms and divergent control. *Nature Reviews Microbiology*. 2014. 12(3), 181–196.
40. Cabezón E., Ripoll-Rozada J., Peña A., De la Cruz F., Arechaga I. Towards an integrated model of bacterial conjugation. *FEMS Microbiology Reviews*. 2015. 39 (1), 81–95.
41. Deolal P, Mishra K. An adaptable live-cell imaging protocol to analyze organelle morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *STAR Protocols*. 2022. 14;3(1):101124.
42. Auvray F., Perrat A., Arimizu Y., Chagneau C.V., Bossuet-Greif N., Massip C., Brugère H., Nougayrède J.P, Hayashi T., Branchu P., Ogura Y., Oswald E. Insights into the acquisition of the *pks* island and production of colibactin in the *Escherichia coli* population. *Microbial Genomics*. 2021. 7(5).
43. Bossuet-Greif N., Belloy M., Boury M., Oswald E., Nougayrède J.P. Protocol for HeLa Cells Infection with *Escherichia coli* Strains Producing Colibactin and Quantification of the Induced DNA-damage. *Bio-protocol*. 2017. 20;7(16):e2520.
44. Di Nardo A., Vasquez S., Sahin M. A Cell-Based Assay Optimized for High-Content Cilia Imaging with Primary Rat Hippocampal Neurons. *STAR Protocols*. 2020. 3;1(3):100189.
45. Cody W.L, Wilson J.W., Hendrixson D.R., McIver K.S., Hagman K.E., Ott C.M., Nickerson C.A., Schurr M.J. Skim milk enhances the preservation of thawed -80 degrees C bacterial stocks. *Journal of Microbiological Methods*. 2008. 75(1):135-8.
46. Dziubańska-Kusibab P.J., Berger H., Battistini F. Colibactin DNA-damage signature indicates mutational impact in colorectal cancer. *Nature Medicine*. 2020. 26 1063–1069.

47. Iftekhar A., Berger H., Bouznad N. Genomic aberrations after short-term exposure to colibactin-producing *E. coli* transform primary colon epithelial cells. *Nature Communications*. 2021. 12, 1003.
48. Global Cancer Observatory (GLOBOCAN). Estimated age-standardized incidence, prevalence and mortality rates (World) in 2020, colorectal cancer, both sexes , all ages, South America. World Health Organization (WHO). 2020.
49. Li Z.R., Li J., Cai W. Macrocyclic colibactin induces DNA double-strand breaks via copper-mediated oxidative cleavage. *Nature Chemistry*. 2019. 11, 880–889.
50. Peralta Soler A., Miller R.D., Laughlin K.V., Carp N.Z., Klurfeld D.M., Mullin J.M. Increased tight junctional permeability is associated with the development of colon cancer. *Carcinogenesis*. 1999. 20(8); p1425–1432.
51. Reuter C., Alzheimer M., Walles H., Oelschlaeger T.A. An adherent mucus layer attenuates the genotoxic effect of colibactin. *Cellular Microbiology*. 2017. 20(2).
52. Unidad de IAAS del Ministerio de Salud. Informe de Vigilancia de Infecciones Asociadas a la Atención en Salud. Ministerio de Salud, Departamento de Calidad y Seguridad de la Atención, Programa de Control de IAAS. 2019.

## Anexos

### Carta de autorización de tesis

Santiago de Chile, 08 de Julio de 2022

A quien corresponda,

Por medio de la presente carta, mis tutores, el Dr. Felipe Del Canto, RUT 12.050.672-2 y el Dr. Jorge Toledo, RUT 15.917.719-K, AUTORIZAN a Luciana Angélica Darisi Padilla, RUT 20.245.399-6, estudiante de la carrera de Tecnología Médica de la Universidad de Chile, a entregar el escrito final de la tesis profesional para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico. El trabajo se titula 'ANÁLISIS MORFOMÉTRICO PARA LA DETERMINACIÓN DEL EFECTO CITOPÁTICO DE AISLADOS CLÍNICOS DE *Escherichia coli* PRODUCTORA DE COLIBACTINA (CoPEC) SOBRE CÉLULAS HeLa'. Esta tesis fue desarrollada en las instalaciones del Programa de Microbiología y Micología y en la Red de Equipamiento Científico Avanzado (REDECA), ambos del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. financiado por el proyecto N°1200979 del Fondo Nacional de Desarrollo Científico y Tecnológico (FONDECYT).

La presente tesis presenta modificaciones en los objetivos específicos 1 y 2, respecto a la versión entregada el semestre pasado, debido a que durante la realización de los experimentos para evaluar los efectos citopáticos ocasionados sobre células HeLa por las distintas cepas CoPEC, no fue posible evaluar la viabilidad celular prevista en un comienzo, puesto que la adición del reactivo Yoduro de Propidio, dificultó la adecuada visualización de las células, tal como se muestra en los resultados. Por lo tanto, no fue posible correlacionar la ocurrencia de megalocitosis con la pérdida o no de viabilidad celular. A pesar de una serie de intentos, mencionados en este escrito, no se logró superar esta dificultad técnica y se optó únicamente por determinar la ocurrencia de megalocitosis y comparar

posibles diferencias en su magnitud entre los distintos aislados clínicos de CoPEC, con una aproximación a la viabilidad mediante el reporte del número de células remanentes al final de cada experimento. Se espera que la evaluación de megalocitosis en las cuatro condiciones ensayadas (infecciones con multiplicidad de infección de 20 y 100 bacterias por célula, en conjunción con dos densidades de siembra distintas, 10.000 y 40.000 células), compense esta modificación en términos de la suficiencia y magnitud del trabajo.

Sin otro particular, se despiden atentamente



**DR. JORGE TOLEDO**

Red de Equipamiento Científico Avanzado (REDECA)  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile



**DR. FELIPE DEL CANTO**

Programa de Microbiología y Micología  
Instituto de Ciencias Biomédicas  
Facultad de Medicina  
Universidad de Chile

## ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN


La **Srta. Luciana Angélica Darisi Padilla**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Morfofisiopatología y Citodiagnóstico, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“Análisis morfométrico para la determinación del efecto citopático de aislados clínicos de Escherichia coli productora de colibactina sobre células HeLa”**, dirigida por el **Prof. Jorge Toledo y Prof. Felipe Del Canto**, ambos académicos del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: **Prof. Matías Castro**, académico de la **Facultad de Ciencias Físicas y Matemáticas** y la **Prof. María Teresa Ulloa**, académica del programa de Microbiología del Instituto de Ciencias Biomédicas (ICBM) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

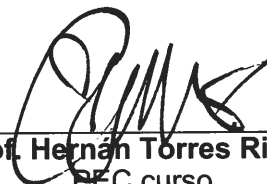
La calificación obtenida se detalla a continuación:

<b>Corrector 1 Matías Castro</b>	7.00	25%
<b>Corrector 2 María teresa Ulloa</b>	6.16	25%
<b>Tutor(es) Guía:</b>		
<b>Evaluación intermedia</b>	6.10	25%
<b>Nota final tutor</b>	7.00	25%
<b>Nota final tesis profesional</b>	<b>6.57</b>	

En consecuencia el estudiante **Luciana Angélica Darisi Padilla** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



**Prof. Maroly Müller Sobarzo**  
Coordinador(a) curso  
Trabajo de Investigación



**Prof. Hernán Torres Rivera**  
PEC curso  
Trabajo de Investigación