



**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
POSTGRADO EN BIOLOGÍA CELULAR**

Efecto de la metilación del ADN sobre la formación de biopelículas bacterianas

Tesis Doctoral presentado ante la ilustre Universidad Central de Venezuela por la Licenciada Victoria H. Navas G. para optar al título de Doctor en Ciencias, mención Biología Celular.

Tutora: Dra. Guillermina Alonso

**Caracas – Venezuela
2019**



Comisión de Estudios de Postgrado

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE CIENCIAS
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO**



ACTA DE DEFENSA DE TESIS DOCTORAL

Quienes suscriben, miembros del jurado designado por el Consejo de la Facultad de Ciencias y el Consejo de Estudios de Postgrado de la Universidad Central de Venezuela, para examinar la **Tesis Doctoral** presentada por: **Victoria Helena Navas Gil, Cédula de identidad N° V 18.714.440**, bajo el título **"Efecto de la metilación del ADN sobre la formación de biopelículas bacterianas"**, a fin de cumplir con el requisito legal para optar al grado académico de **DOCTOR EN CIENCIAS, MENCIÓN BIOLOGÍA CELULAR**, dejan constancia de lo siguiente:

1.- Leído como fue dicho trabajo por cada uno de los miembros del jurado, se fijó el día 22 de Julio de 2020 a las 10:00 AM., para que la autora lo defendiera en forma pública. Dos semanas previas a esta fecha, la autora le envió a cada uno de los jurados un video con la presentación del marco teórico, resultados y discusión de los mismos, dicho video se hizo público para las personas interesadas el día 21 de julio de 2020 a las 10:00 am. La defensa se realizó en un Aula Virtual de la Plataforma Zoom, con una asistencia de público que fluctuó entre 39 a 42 participantes, mediante un resumen oral de su contenido, luego de lo cual respondió satisfactoriamente a las preguntas que le fueron formuladas por el jurado, todo ello conforme con lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado.

2.- Finalizada la defensa del trabajo, el jurado decidió **aprobarlo**, por considerar, sin hacerse solidario con la ideas expuestas por la autora, que se ajusta a lo dispuesto y exigido en el Reglamento de Estudios de Postgrado

Para dar este veredicto, el jurado estimó que el trabajo examinado representa un aporte sobre el papel de la metilación del ADN bacteriano en la formación de biopelículas como un mecanismo epigenético asociado al proceso adaptativo y dinámico en el desarrollo de la heterogeneidad fenotípica. En el estudio se determinó como las variaciones del entorno microbiano pueden afectar la formación de estas estructuras de biopelículas que aumentan la sobrevivencia bacteriana. El presente trabajo también alcanzó el cumplimiento de objetivos adicionales a los planteados inicialmente en el proyecto.





3.- El jurado por unanimidad decidió otorgar la calificación de **EXCELENTE** al presente trabajo, por considerarlo de excepcional calidad al determinar que los resultados permitieron postular un modelo, según el cual la metilación del ADN debe ejercer un rol regulatorio importante en la expresión génica involucrada en el desarrollo de biopelículas, pudiendo formar parte del establecimiento de la plasticidad fenotípica de las bacterias residentes en biopelículas. Además el jurado consideró que los resultados representan un aporte científico meritorios de publicación.

En fe de lo cual se levanta la presente ACTA, a los 22 días del mes de Julio del año 2020, conforme a lo dispuesto en el Reglamento de Estudios de Postgrado, actuó como Coordinadora del jurado la Dra. Guillermina Alonso.

El presente trabajo fue realizado bajo la dirección de la Dra. Guillermina Alonso.

Dr. Manuel Guzmán
C.I.V-3.177.264
Centro Médico de Caracas
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad

Dr. Iván Galindo
C.I.V-6.374.711
Instituto de Estudios Avanzados (IDEA)
Jurado designado por el Consejo
de la Facultad

Dr. José Bubis
C.I.V-4.136.606
Universidad Simón Bolívar
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado

Dra. Andreina Fernandes
C.I.V-16.903.358
Facultad de Odontología, UCV
Jurado designado por el Consejo
de Estudios de Postgrado

Dra. Guillermina Alonso
C.I.V.6.201.870
Facultad de Ciencias, UCV
Tutora



GA/22 Julio de 2020

RESUMEN

Las biopelículas representan uno de los mecanismos bacterianos que dificulta el tratamiento de enfermedades infecciosas. Se requiere conocer los procesos moleculares y condiciones del entorno que regulan el desarrollo de las biopelículas, con la finalidad de plantear estrategias que permitan prevenirlas o erradicarlas. Una de las funciones asignadas a la metilación del ADN consiste en la regulación de la expresión génica. Esta etiqueta epigenética parece ejercer un control relevante sobre la formación de biopelículas, pudiendo considerarse como un blanco terapéutico complementario en el tratamiento de infecciones bacterianas.

En este trabajo se estudiaron los efectos de los cambios del entorno sobre los perfiles de metilación del ADN y sobre el desarrollo de biopelículas bacterianas. Se evaluaron los efectos de distintas condiciones del entorno sobre la formación de biopelículas de los aislados clínicos de *Acinetobacter* spp., *A. baumannii* y *S. marcescens*; así como de la cepa de referencia *E. coli* MG1655 y su cepa isogénica, Δdam . Se evaluaron los cambios en biomasa, producción y clasificación de biopelículas formadas sobre superficies de las microplacas de poliestireno, mediante la detección con cristal violeta. Las concentraciones de etanol y de los surfactantes ensayados presentaron efectos inhibitorios generalizados sobre el desarrollo de biopelículas. Se detectaron cambios especie-específicos sobre la formación de biopelículas en función de cambios en las concentraciones de nutrientes y metionina. La ausencia de la enzima ADN metiltransferasa solitaria (Dam) en *E. coli* MG1655, causó la reversión fenotípica en cuanto al desarrollo de biopelículas.

Para vincular la metilación del ADN con los fenotipos de biopelículas obtenidos, se emplearon ensayos de restricción enzimática que detectaron los cambios de metilación de las secuencias de ADN sustrato de la enzima Dam, la secuencia GATC, sobre los genomas aislados de las biopelículas de *A. baumannii* y *S. marcescens*. Se detectaron niveles de metilación global del ADN, sin embargo, se observaron variaciones puntuales sobre estos patrones de metilación, comparando los genomas de biopelículas ante las distintas condiciones del entorno en la que fueron formadas. En la cepa mutante *E. coli*

MG1655 Δdam se observó la ausencia de metilación global del ADN, detectándose aun así variaciones en el patrón de metilación, al comparar los genomas de biopelículas entre la cepa silvestre y mutante, ante las distintas condiciones del entorno ensayadas. Según los resultados se concluye que existen variaciones específicas sobre los patrones de metilación del ADN que son afectados sobre el desarrollo de biopelículas bacterianas. En este trabajo se propone un modelo que justifica la posible relación de la metilación del ADN y las condiciones del entorno, sobre la formación de las biopelículas bacterianas.

Este trabajo establece las bases para una investigación científica más amplia y compleja, que vincule el estudio de la epigenética en bacterias, como mecanismo adaptativo y dinámico sobre el desarrollo de la heterogeneidad fenotípica, propiedad característica de las biopelículas.

Palabra claves: Biopelículas bacterianas, epigenética, metilación del ADN

DEDICATORIA

*A mis abuelos Laura, Asisclo, Doris y Pedro, de quienes epi-heredé los
patrones de expresión génica.*

*A ellos gracias por su amor incondicional y por concebir a toda mi familia, por
su ejemplo de lucha, de ayudar a los demás sin importar las circunstancias.*

***Dedicado especialmente a Helena del Carmen,
porque en tu corta y hermosa estadia, cambiaste mi vida.***

Los amo y extraño mucho.

AGRADECIMIENTOS

A mi tutora, Dra. Guillermina Alonso. Siempre atenta al bienestar de los estudiantes, asumió, inicialmente adoptarme de forma temporal como profesor guía del postgrado en momento de necesidad y, hasta el sol de hoy, sigue orientándome profesional y académicamente, por eso le estoy muy agradecida.

Al Dr. Manuel Guzmán, por su contribución y entusiasmo en el desarrollo de este proyecto de investigación. Gracias por su colaboración para la donación de las punciones bacterianas. Gracias a usted y a las licenciadas bioanalistas Adele Rizzi y Altagracia Merentes, por enseñarme desde una perspectiva clínica el trabajo realizado en los Laboratorios de Microbiología.

Al Dr. Iván Galindo, por sus correcciones y sugerencias como jurado evaluador, las cuales se llevaron a cabo, incluso, desde antes de proponer un tema de tesis, durante mi seminario de Genética Avanzada.

A la Dra. Mercedes Panizo que me ayudó en establecer los contactos para la adquisición de las enzimas de restricción. A la Dra. Annamil Trotta que, desde la distancia, se dispuso para ayudar ante cualquier necesidad que presentáramos en el laboratorio. Muchas gracias por facilitarnos la dotación de los cebadores que se utilizaron en los ensayos de la PCR.

Mi profundo agradecimiento a la Dra. María Alexandra García, por todo su apoyo, colaboración y orientaciones. Gracias por su confianza y permitirme trabajar en su laboratorio. Sin usted, no hubiese logrado las metas que me propuse en este año.

A todos los integrantes del equipo del Laboratorio de Biología de Plásmidos del Instituto de Biología Experimental, que me cedieron un espacio para crecer y aprender a ser un biólogo profesional. Gracias especialmente a la Dra. Guillermina Alonso y a mis compañeros Andreina Fernández, Joselyn Puma, Esther Baptista, Mónica Quijada, Indira Pérez y Yusibeska Ramos, por su apoyo, aportes y orientaciones para este trabajo; de igual manera, le agradezco profundamente a Zuleima Sanabria, Giovanny Angiolillo y Beatriz Álvez por sus consejos y orientaciones.

A los profesores Elizabeth Valdivieso y Francisco Arévalo, y a Felipe por su colaboración con el uso de los equipos de lector de ELISA en momentos de necesidad. Al Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos, por sus orientaciones y donación de las cepas controles empleadas en este trabajo. Gracias al profesor Victor Hugo por sus orientaciones durante el análisis estadístico.

A todos los miembros de la Universidad de las Naciones Unidas – Biotecnología para Latinoamérica y el Caribe, que aceptaron hacerme acreedora de la beca Pasantía de Adiestramiento y de Investigación. Especialmente gracias al Dr. Iván Galindo y a la Srta. Susana González, que me atendieron y me tuvieron paciencia a lo largo del proceso administrativo de la beca. Incluyo en este agradecimiento a la Academia de Ciencias, Físicas, Matemáticas y Naturales, especialmente al Dr. Antonio Machado-Allison, por su contribución económica en apoyo a la referida beca.

A la Dra. María del Rosario Aya por no dudar en decirme que sí para yo poder realizar esta pasantía de investigación y adiestramiento en el Instituto de Investigaciones en Microbiología y Parasitología Médica, de la Universidad de Buenos Aires, República de Argentina, así como sus orientaciones en la redacción del proyecto. Al Dr. Sebastián Sarnacki, por asumirme como pasante esos tres meses vividos en Argentina, aprendí mucho de vos, gracias totales. A la Dra. Cristina Cerquetti por todas sus atenciones. A todos mis compañeros de laboratorio Anahí, Cecilia, Ailin, Giselle, Lucia, Angie, Fernando, Mauricio, Cristián, Andrea, Sabrina, Mariana, Patricia, gracias a ustedes por ser tan especiales y atentos conmigo. No puedo dejar de mencionar y agradecer a Olga, Kique, Margaret, Keeyna, Marisa, Lucia, Juan, Hugo y Susana por darme la bienvenida y hacerme enamorar de mi querida, bulliciosa, bohemia, inmensa y hermosa ciudad de Buenos Aires.

A todos los investigadores del Centro de Biofísica y Bioquímica del IVIC que me apoyaron en el desarrollo de este trabajo: Dra. María Alexandra García, Dra. Mónica Contreras, Carolina Aristimuño, Silvia Fraile y Jesús Aranguren; especialmente gracias a Carla Rudolf, por toda su ayuda, que incluyen una buena taza de té y conversaciones interesantes. Gracias al Centro de

Fotografía Científica del IVIC, por las hermosas imágenes que pude adquirir en los ensayos de restricción.

A mis queridos tutores de pregrado, al Dr José Bubis y al Dr. Juan Carlos Martínez, siempre han sido un faro de luz en mi camino. Por su entereza, su fortaleza y consejos, que siempre me animan y guían para seguir adelante, gracias.

A mis amigas hermanas María y Rossana, por siempre estar conmigo, espero que podamos celebrar pronto en *Siga la vaca*. A mi amigo hermano Ángel, gracias por todas las fotos de ánimo que me enviaste mientras visitabas las tiendas de *Harry Potter*. A mis amigos Juan, Luis, Mariana, Alcibeth y Oscar, por todos los momentos gratos que compartimos.

A todos y cada uno de los miembros de mi gran familia. Gracias inmensas a mi cuñado José Manuel, a mi hermana Grauben y a mi papá Alberto Navas, por todo su apoyo, consejos (con regaños incluidos) y su inmensa paciencia; por su ayuda incondicional, sin ustedes no hubiese sido posible. Especialmente gracias por ayudarme con la adquisición de los reactivos. A mi tía Trina Navas, gracias por tus consejos, orientaciones y ayuda durante el desarrollo de este trabajo. A mi tío Jesús Navas, gracias por tu solidaridad, tu apoyo y por velar por nuestro bienestar. A mi esposo, Luis Faria, por fortalecerme, darme fuerzas y esperanzas en todo momento, para poder lograr esta meta. Por creer en mí más de lo que yo misma lo hacía, gracias por *“bailar conmigo en la oscuridad... y tener fe en mí”*. Mi tami, *eres perfecto* hoy y siempre, te amo. Gracias también por todo el apoyo y orientaciones en la realización de la estadística y los gráficos. A mis queridos sobrinos Lucas y Tiago que, con sus tremenduras, siempre me brindan motivos de sobra para sonreír y darle mucho color a la vida. A mi mamá, Doris de Navas, porque fueron tus palabras, tus abrazos, tu cariño, tu dedicación y ayuda, por las que estoy aquí dedicándote estas palabras de inmenso amor y agradecimiento. Gracias, mamá.

i. ÍNDICE

	Página
i. ÍNDICE	6
ii. ÍNDICE DE FIGURAS	9
iii. ÍNDICE DE TABLAS	12
iv. ABREVIACIONES	14
 I. INTRODUCCIÓN	 18
 II. MARCO TEÓRICO	 20
II.1 Biopelículas bacterianas	20
II.1.1 Adherencia bacteriana	20
II.1.2 Matriz extracelular	22
II.1.3 Heterogeneidad fenotípica	24
II.1.4 Fases de desarrollo	26
II.2 Infecciones humanas asociadas a la formación de biopelículas	28
II.2.1 Infecciones causadas por <i>Acinetobacter baumannii</i> y <i>Serratia marcescens</i> ...	35
II.2.1.a <i>Acinetobacter baumannii</i>	36
II.2.1.b <i>Serratia marcescens</i>	39
II.3 Procesos de metilación del ADN	41
II.3.1 Metilación del ADN en organismos eucariotas superiores	42
II.3.2 Metilación del ADN en bacterias	43
 III. ANTECEDENTES	 49
 IV. JUSTIFICATIVO	 53
 V. OBJETIVOS	 55
 VI. MATERIALES Y MÉTODOS	 56
VI.1 Cepas bacterianas	56
VI.1.1 Aislados clínicos	56
VI.1.1.a Caracterización microbiológica	57
VI.1.1.b Caracterización molecular	58
VI.1.2 Construcción de cepas bacterianas mutantes Δdam	62
VI.1.2.a Selección de cepas bacterianas	65
VI.1.2.b Transformación bacteriana del plásmido pKD46	65
VI.1.2.c Construcción de casete funcional para la mutagénesis	66
VI.1.2.d Mutagénesis sitio dirigida, de inactivación en un paso	67
VI.1.2.e Caracterización genotípica y fenotípica de las cepas mutantes	

construidas	68
VI.1.2.e.i PCR de colonias	68
VI.1.2.e.ii Sensibilidad al análogo de bases 2-Aminopurina	69
VI.1.2.e.iii Alteraciones en los patrones de restricción del ADN	69
VI.2 Ensayos de formación de biopelículas	69
VI.2.1 Método de Agar Rojo Congo	69
VI.2.2 Método de detección por cristal violeta	70
VI.2.3 Efecto de estímulos del entorno sobre la formación de biopelículas	74
VI.3 Análisis de la metilación del genoma de bacterias en biopelículas, mediante ensayos de restricción enzimática	75
 VII. RESULTADOS	 79
VII.1 Cepas bacterianas	79
VII.1.1 Caracterización de los aislados bacterianos clínicos	79
VII.1.1.a Identificación molecular	82
VII.1.1.a.i Identificación molecular de los aislados de <i>S. marcescens</i>	83
VII.1.1.a.ii Identificación molecular de los aislados de <i>A. baumannii</i>	84
VII.1.2 Construcción de cepas bacterianas mutantes Δdam	85
VII.2. Ensayos de formación de biopelículas	92
VII.2.1 Método de agar Rojo Congo	92
VII.2.2 Método de detección por cristal violeta	96
VII.2.2.a Cepas clínicas de <i>A. baumannii</i> y <i>S. marcescens</i>	97
VII.2.2.b Cepa de referencia <i>E. coli</i> MG1655 y su mutante isogénica	101
VII.3 Efecto de estímulos del entorno sobre la formación de biopelículas	103
VII.3.1 Condiciones nutritivas	104
VII.3.2 Metionina	107
VII.3.3 Etanol	111
VII.3.4 EDTA	115
VII.3.5 Surfactantes	118
VII.4 Análisis de la metilación del genoma de bacterias en biopelículas, mediante ensayos de restricción enzimática	125
VII.4.1 Niveles de metilación global del ADN en biopelículas de <i>A. baumannii</i> 3910 formadas con exceso de glucosa	126
VII.4.2 Niveles de metilación global del ADN en biopelículas de <i>S. marcescens</i> 4474 formadas en presencia de etanol 1 %	129
VII.4.3 Niveles de metilación global del ADN en biopelículas de <i>E. coli</i> MG1655 y <i>E. coli</i> MG1655 Δdam formadas en presencia de metionina	131

VIII. DISCUSIÓN	136
VIII.1 Condiciones del entorno sobre la formación de biopelículas de las cepas clínicas <i>A. baumannii</i> y <i>S. marcescens</i>	138
VIII.1.1 Efecto de las condiciones nutritivas	139
VIII.1.2 Efecto de la metionina	143
VIII.1.3 Efecto del etanol	146
VIII.1.4 Efecto del EDTA	148
VIII.1.5 Efecto de surfactantes	150
VIII.2 Variaciones en los patrones de metilación del genoma de bacterias en biopelículas en diferentes condiciones del entorno	152
VIII.2.1 Análisis de los patrones de metilación del ADN en la formación de biopelículas de las cepas clínicas	152
VIII.2.1.a Efecto del exceso de glucosa sobre la metilación del ADN de las biopelículas de <i>A. baumannii</i> 3910	154
VIII.2.1.b Efecto del etanol sobre la metilación del ADN de las biopelículas de <i>S. marcescens</i> 4474	157
VIII.2.2.a Efecto de las condiciones del entorno sobre las biopelículas de <i>E. coli</i> MG1655 y su cepa isogénica <i>E. coli</i> MG1655 Δdam	159
VIII.2.2.a.i Efecto de las condiciones nutritivas sobre las biopelículas de <i>E. coli</i> MG1655 Δdam	163
VIII.2.2.a.ii Efecto del etanol sobre las biopelículas de <i>E. coli</i> MG1655 Δdam	164
VIII.2.2.a.iii Efecto del EDTA y de los surfactantes sobre las biopelículas de <i>E. coli</i> MG1655 Δdam	166
VIII.2.2.a.iii Efecto de la metionina sobre las biopelículas de <i>E. coli</i> MG1655 Δdam	167
VIII.2.2. a.iv Efecto de la metionina sobre el patrón de metilación del ADN de biopelículas de <i>E. coli</i> MG1655 y su cepa isogénica <i>E. coli</i> MG1655 Δdam	169
VIII.3 Efecto global de las condiciones del entorno sobre la formación de biopelículas bacterianas	172
VIII.4 Biopelículas bacterianas, metilación del ADN e implicaciones clínicas	174
IX. CONCLUSIONES	181
X. BIBLIOGRAFÍA	183

ii. ÍNDICE DE FIGURAS

Figura	Página
Figura 1: Registro fotográfico de la distribución espacial y temporal de tres tipos celulares de <i>B. subtilis</i> durante el desarrollo de biopelículas	25
Figura 2: Representación esquemática de la serie de estados discretos que constituyen la formación de biopelículas	28
Figura 3: Infecciones comúnmente asociadas al desarrollo de biopelículas bacterianas	34
Figura 4: Clasificación taxonómica de las especies <i>A. baumannii</i> y <i>S. marcescens</i> .	36
Figura 5: Estructura de las bases nitrogenadas modificadas por metilación	41
Figura 6: Fases estables de la expresión dependiente de metilación del operón <i>pap</i>	47
Figura 7: Características genéticas del plásmido pKD46	63
Figura 8: Construcción del casete para la mutagénesis funcional	64
Figura 9: Resultados del ensayo secreción de prodigiosina en <i>S. marcescens</i>	80
Figura 10: Registro fotográfico de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores universales 8F y 1525R	82
Figura 11: Registro fotográfico de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores específicos del gen <i>luxS</i>	83
Figura 12: Registro fotográfico de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores específicos del gen <i>ssrA</i>	84
Figura 13: Registro fotográfico de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores específicos del gen <i>bla</i> _{OXA51}	84
Figura 14: Registro fotográfico del ADN genómico y ARN de las posibles colonias transformadas de <i>S. marcescens</i> con el plásmido pKD46	87
Figura 15: Análisis fenotípico y molecular de las posibles colonias de <i>E. coli</i> transformantes con el plásmido pKD46	88
Figura 16: Registro fotográfico de los casetes de mutagénesis funcionales contruidos para <i>E. coli</i>	89
Figura 17: Registro fotográfico de la PCR de colonia para la verificación de la cepa mutante construida	90
Figura 18: Registro fotográfico de los resultados de una digestión del ADN cromosomal de <i>E. coli</i> MG1655 y su cepa isogénica Δdam , con las enzimas de restricción Sau3AI, DpnI y MboI	91
Figura 19: Influencia de los medios de cultivo y la temperatura sobre las biopelículas de <i>Acinetobacter</i> spp	98
Figura 20: Influencia de los medios de cultivo y la temperatura sobre las biopelículas de <i>S. marcescens</i>	99
Figura 21: Influencia de los medios de cultivo y la temperatura sobre la biomasa de biopelículas de <i>E. coli</i>	102

Figura 22: Influencia de distintas condiciones nutritivas sobre la biomasa de biopelículas de <i>Acinetobacter</i> spp.	105
Figura 23: Influencia de distintas condiciones nutritivas sobre la biomasa de biopelículas de <i>S. marcescens</i>	105
Figura 24: Influencia de distintas condiciones nutritivas sobre la biomasa de biopelículas de <i>E. coli</i>	106
Figura 25: Influencia de distintas concentraciones de metionina sobre la biomasa de biopelículas de <i>Acinetobacter</i> spp.	108
Figura 26: Influencia de distintas concentraciones de metionina sobre la biomasa de biopelículas de <i>S. marcescens</i>	109
Figura 27: Influencia de distintas concentraciones de metionina sobre la biomasa de biopelículas de <i>E. coli</i>	110
Figura 28: Influencia del etanol sobre la biomasa de biopelículas de <i>Acinetobacter</i> spp.	112
Figura 29: Influencia del etanol sobre la biomasa de biopelículas de <i>S. marcescens</i>	113
Figura 30: Influencia del etanol sobre la biomasa de biopelículas de <i>E. coli</i>	114
Figura 31: Influencia del EDTA sobre la biomasa de biopelículas de <i>Acinetobacter</i> spp.	116
Figura 32: Influencia del EDTA sobre la biomasa de biopelículas de <i>S. marcescens</i>	116
Figura 33: Influencia del EDTA sobre la biomasa de biopelículas de <i>E. coli</i>	117
Figura 34: Influencia de los surfactantes CTAB y SDS sobre la biomasa de biopelículas de <i>Acinetobacter</i> spp.	119
Figura 35: Influencia de los surfactantes CTAB y SDS sobre la biomasa de biopelículas de <i>S. marcescens</i>	120
Figura 36: Influencia de los surfactantes CTAB y SDS sobre la biomasa de biopelículas de <i>E. coli</i>	120
Figura 37: Registro fotográfico de la metilación global del ADN de biopelículas de <i>A. baumannii</i> 3910, formadas en distintas condiciones de glucosa	127
Figura 38: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas <i>A. baumannii</i> , formadas en distintas condiciones de glucosa	128
Figura 39: Registro fotográfico de la metilación global del ADN en biopelículas de <i>S. marcescens</i> 4474, formadas en distintas condiciones del entorno	129
Figura 40: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas <i>S. marcescens</i>	130
Figura 41: Registro fotográfico de la metilación global del ADN en biopelículas de <i>E. coli</i> MG1655 y su cepa isogénica Δdam , formadas en distintas condiciones del entorno	131
Figura 42: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas <i>E. coli</i> , formadas en ausencia y presencia de metionina	132

Figura 43: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas <i>E. coli</i> MG1655, formadas en presencia de metionina	133
Figura 44: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas <i>E. coli</i> MG1655 Δdam , formadas en ausencia y presencia de metionina	134
Figura 45: Esquema del modelo que propone la posible relación de la metilación del ADN y las biopelículas bacterianas	176

iii. ÍNDICE DE TABLAS

Tabla	Página
Tabla 1: Cuadro resumen con datos relevantes de las muestras clínicas en las que fueron aisladas las cepas identificadas como complejo <i>A. baumannii</i> y <i>S. marcescens</i> por el sistema semi-automatizado VITEK 2 del Centro Médico de Caracas.....	57
Tabla 2: Condiciones de la PCR con los cebadores universales 8F y 1525R	59
Tabla 3: Condiciones de la PCR con los cebadores <i>bla</i> _{OXA-51} para detectar <i>A. baumannii</i>	60
Tabla 4: Condiciones de la PCR con los cebadores <i>luxS</i> y <i>ssrA</i> para detectar <i>S. marcescens</i>	61
Tabla 5: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en la construcción de bacterias mutantes	62
Tabla 6: Condiciones de la PCR para la construcción del casete funcional para la mutagénesis	67
Tabla 7: Condiciones de la PCR de colonias para la corroboración del genotipo recombinante	68
Tabla 8: Cuadro resumen de la composición base de los medios de cultivo empleados	71
Tabla 9: Criterios de clasificación de las cepas en función a la producción de biopelículas	73
Tabla 10: Tratamientos nutritivos, físicos y químicos evaluados como condiciones para medir el efecto en el desarrollo de biopelículas bacterianas	75
Tabla 11: Condiciones del entorno ensayadas para evaluar los patrones de metilación del ADN en el desarrollo de biopelículas bacterianas	75
Tabla 12: Propiedades de restricción de las enzimas endonucleasas Sau3AI, DpnI y MboI	77
Tabla 13: Componentes presentes en la mezcla de la reacción de restricción enzimática	77
Tabla 14: Manifestaciones fenotípicas obtenidas de los ensayos bioquímicos convencionales para la identificación de los ocho aislados clínicos de <i>Serratia</i> spp.	79
Tabla 15: Cuadro resumen de las características de la muestra clínica de las cepas de <i>S. marcescens</i> , destacando su pigmentación en las condiciones de medio de cultivo ensayadas	81
Tabla 16: Manifestaciones fenotípicas obtenidas de los ensayos bioquímicos convencionales para la identificación de los ocho aislados de <i>Acinetobacter</i> spp.	82

Tabla 17: Cuadro resumen de los fenotipos de sensibilidad a antibióticos obtenidos en la réplica en placa	86
Tabla 18: Resultados de la morfología de las colonias de <i>Acinetobacter</i> spp. en Agar Rojo Congo	93
Tabla 19: Resultados de la morfología de las colonias de <i>S. marcescens</i> crecidas en Agar Rojo Congo	94
Tabla 20: Cuadro resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de secreción de prodigiosina, componentes proteicos y EPS de los aislados clínicos bacterianos de estudio	95
Tabla 21: Resultados de la morfología de las colonias de <i>E. coli</i> MG1655 crecidas en Agar Rojo Congo	96
Tabla 22: Efecto de los medios de cultivo y temperatura sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas de las cepas <i>Acinetobacter</i> spp. y <i>S. marcescens</i>	100
Tabla 23: Efecto de los medios de cultivo y temperatura sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas de las cepas de <i>E. coli</i> MG1655	103
Tabla 24: Características de las cepas formadoras de biopelículas seleccionadas para la evaluación de efectos del estímulo del entorno	104
Tabla 25: Efecto de las diferentes condiciones nutritivas sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas	107
Tabla 26: Efecto de la metionina sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas	111
Tabla 27: Efecto del etanol sobre las unidades de adhesión y la clasificación de la capacidad de formación biopelículas	115
Tabla 28: Efecto del EDTA sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas	118
Tabla 29: Efecto de los surfactantes CTAB y SDS sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas	121
Tabla 30: Cuadro resumen de los efectos de estímulos del entorno sobre la formación de las biopelículas de las cepas clínicas <i>A. baumannii</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>S. marcescens</i> y la cepa de referencia <i>E. coli</i> MG1655	122
Tabla 31: Cantidad de ADN genómico aislado de biopelículas bacterianas, mediante el kit de extracción	126
Tabla 32: Cuadro resumen de los efectos de la relación de la formación de las biopelículas de las cepas clínicas <i>A. baumannii</i> , <i>Acinetobacter</i> spp., <i>S. marcescens</i> y la cepa de referencia <i>E. coli</i> MG1655; con respecto a las variaciones en el patrón de metilación del ADN detectadas	135

iv. ABREVIACIONES

A	Adenina
<i>A. baumannii</i> , Aba o Ab	<i>Acinetobacter baumannii</i>
ADN	Ácido desoxirribonucleico
Asp	<i>Acinetobacter</i> spp.
ATCC	"American Type Culture Collection"
C	Citosina
CMC	Centro Médico de Caracas
CVCM	Centro Venezolano de Colecciones Microbiológicas
Dam o <i>dam</i>	ADN metiltransferasa en adenina
Dnmts	ADN metiltransferasas
DO	Densidad óptica
DO biopelículas	Biomasa de biopelículas formadas
DOa	Densidad óptica antes de teñir con cristal violeta
DOc	Densidad óptica de corte
DOd	Densidad óptica después de teñir con Cristal violeta
<i>E. coli</i> , Eco o Ec	<i>Escherichia coli</i>
EPS	Sustancias poliméricas extracelulares
F	Foward
G	Guanina
IMPaM	Instituto de Microbiología y Parasitología Médica
MMM	Medio mínimo mineral
pb	Pares de base
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa
pdar	Morfología de colonias rosadas, secas y rugosas
R	Reverse
rdar	Morfología de colonias rojas, secas y rugosas
RM	Restricción - Modificación
<i>S. marcescens</i> , Sma o Sm	<i>Serratia marcescens</i>
SAM	S-Adenosil Metionina
saw	Morfología de colonias blancas y lisas
SD	Desviación estándar
SIM	Sulfuro –Indol –Motilidad
T	Timina
TA	Temperatura ambiente
UA	Unidades de adhesión
UFC	Unidades formadoras de colonias
UPEC	<i>E. coli</i> uropatogénica
$\bar{x}$	Promedio

4mC	4-metilcitosina
5mC	5-metilcitosina
6mA	6-metiladenina

I. INTRODUCCIÓN

Las biopelículas son la forma predominante de vida de las bacterias en la naturaleza. Los microorganismos que constituyen las biopelículas se encuentran adheridos a una superficie y embebidos dentro de una matriz de sustancias poliméricas extracelulares, integrándose complejas propiedades fisiológicas. Las biopelículas son una ventaja selectiva en la supervivencia bacteriana, ya que representan una barrera física que confiere protección en contra de los múltiples agentes fluctuantes, deletéreos e impredecibles del entorno.

Desde una perspectiva humana, el desarrollo de biopelículas puede ser perjudicial o beneficioso. Desde el ámbito biotecnológico, las biopelículas pueden emplearse en procesos de biorremediación o para el biocontrol de plagas en agricultura. Sin embargo, también pueden implicar la bioacumulación nociva de bacterias sobre materiales industriales causando corrosión, o representando un factor de riesgo en la calidad de alimentos.

En el ámbito médico, las biopelículas se consideran como uno de los focos de transmisión y agente causal de enfermedades infecciosas. Debido a su fisiología e incrementada tolerancia/resistencia en contra de los antibióticos, se limita el tratamiento convencional de estas enfermedades y, por ende, la erradicación de las biopelículas. Es por ello que surge la motivación para la búsqueda de mecanismos alternativos y novedosos para la erradicación de las biopelículas.

Existen evidencias relevantes respecto a las alteraciones significativas de expresión génica que involucran la formación de biopelículas, así como sus implicaciones clínicas. Sin embargo, aún se desconocen los mecanismos moleculares fundamentales que regulan su formación, y tampoco han sido elucidados por completo los estímulos del entorno que pueden ser determinantes en el desarrollo de biopelículas. Son pocos los estudios relacionados a cómo interviene la epigenética en este proceso biológico. La metilación del ADN representa una marca epigenética que coordina la expresión génica en bacterias. En este estudio se plantea evaluar el efecto de la metilación del ADN en la capacidad de formación de biopelículas. Se

propone que la metilación del ADN debe ejercer un rol regulatorio importante en la expresión génica involucrada en el desarrollo de biopelículas, pudiendo formar parte del establecimiento de plasticidad fenotípica de las bacterias residentes en biopelículas. Los resultados podrían aportar conocimientos aplicables para mejorar los controles antimicrobianos en diferentes ámbitos.

II. MARCO TEÓRICO

II.1 Biopelículas bacterianas

Las biopelículas son sistemas complejos de desarrollo de una comunidad bacteriana. En este consorcio las bacterias se encuentran adheridas a superficies y agregadas entre sí, delimitadas dentro de una matriz hidratada de sustancias poliméricas extracelulares. Las bacterias sésiles de las biopelículas, manifiestan características fisiológicas que difieren de su crecimiento planctónico. Las biopelículas representan el estilo de vida común de las bacterias en la naturaleza; el formato de crecimiento planctónico, en cambio, es considerado como un mecanismo transitorio de colonización sobre nuevas superficies (Watnick y Kolter, 2000; Donlan, 2002; Stanley y Lazazzera, 2004; Boudarel, 2018).

La capacidad de adhesión a superficies, síntesis de la matriz extracelular y heterogeneidad fenotípica son atributos biológicos inherentes al desarrollo de las biopelículas, de los cuales derivan sus propiedades emergentes específicas (Flemming y col., 2016; Koo y col., 2017).

II.1.1 Adherencia bacteriana

La adhesión es una propiedad física de biopelículas que abarca las interacciones estables de bacterias planctónicas sobre una superficie. El proceso de adhesión inicia con la acumulación de bacterias sobre una superficie; seguida de la asociación reversible hasta la adhesión irreversible entre bacterias-superficie, inducidas por la composición de la envoltura celular. Este proceso se concreta con la colonización bacteriana (Garrett y col., 2008).

El sustrato de adhesión contiene la superficie sólida en la que se desarrollan las biopelículas. La composición y propiedades fisicoquímicas del sustrato influyen sobre las interacciones bacterias-superficie, tales como: la carga, tensión, rugosidad e hidrofobicidad de la superficie, entre otros. Se ha descrito mayor capacidad de adhesión bacteriana sobre superficies rugosas e hidrofóbicas (Donlan, 2002; Garrett y col., 2008).

La adhesión transitoria y no específica, se atribuye a fuerzas físicas de atracción entre bacterias-superficie (interacciones de Van der Waals, estéricas y electrostáticas), generadas por la composición de polisacáridos y proteínas extracelulares; y las adhesinas hidrofóbicas preformadas, como el flagelo, fimbria o pilus, los cuales superan las fuerzas de repulsión entre bacterias-superficie. La interacción permanente se consolida mediante la síntesis de adhesinas específicas que, en conjunto con la hidrofobicidad de la envoltura celular, establecen reacciones químicas (oxidación o hidratación) entre bacterias y superficie. Esta fase del proceso de adhesión se encuentra regulado a nivel genético y modulado por las condiciones del entorno (Dunne, 2002; Stanley y Lazazzera, 2004; Garrett y col., 2008; Karatan y Watnick, 2009).

Las características del entorno contribuyen con la expresión de las estructuras y adhesinas bacterianas. Además, la superficie puede recubrirse con polímeros del medio acuoso del entorno, los cuales condicionan su composición química y afectan las propiedades de adhesión bacteriana (Dunne, 2002; Donlan, 2002; Garrett y col., 2008).

La adherencia bacteriana es un proceso complejo en la formación de biopelículas, que se encuentra modulada por numerosas variables presentes entre bacterias-superficie-entorno. Por lo tanto, las biopelículas pueden establecerse sobre infinitas condiciones de superficie y entorno. Además del desarrollo natural de biopelículas en el ambiente, la adherencia bacteriana representa una estrategia importante de estudio en las industrias de ambiente, alimentos, agua, biotecnológica y cuidados de la salud (Garrett y col., 2008).

II.1.2 Matriz extracelular

Las biopelículas representan un hábitat natural, construido por bacterias capaces de sintetizar y secretar sustancias poliméricas extracelulares (EPS), las cuales forman una masa gelatinosa conocida como matriz extracelular.

La matriz extracelular es un componente esencial de biopelículas, la cual delimita e inmoviliza las bacterias, rellendo los espacios entre ellas. Su estructura y composición, confieren la apariencia macroscópica de las biopelículas. Además, como propiedades emergentes, la síntesis de la matriz extracelular determina el espacio fisicoquímico y las actividades fisiológicas bacterianas dentro de las biopelículas.

La matriz extracelular constituye cerca del 90% de masa de biopelículas. La matriz está compuesta principalmente de agua, proporcionando un entorno altamente hidratado, en el que se encuentran solubles polisacáridos, proteínas y ADN; seguida de componentes insolubles al agua como: lípidos (lipopolisacáridos, biosurfactantes), proteínas (fibras amiloides) y polisacáridos neutros o hidrofóbicos (celulosa) y componentes de la envoltura celular (fimbrias, pili y flagelo). La síntesis de la matriz extracelular es un proceso dinámico, por lo que la composición de EPS y estructura precisa de la matriz extracelular, están moduladas por las condiciones del entorno (Flemming y col., 2016; Koo y col., 2017).

Los polisacáridos están en mayor proporción entre los componentes de la matriz extracelular, los cuales contribuyen con la adherencia bacteriana, el arreglo espacial y arquitectura de las biopelículas. Las bacterias pueden sintetizar exopolisacáridos de diversa composición química. Estos pueden presentar estructuras lineales o ramificadas; ser de tipo homo- o heteropolisacáridos, con sustituciones químicas orgánicas o inorgánicas (Flemming y Wingender, 2010; Koo y col., 2013).

En cuanto a las proteínas retenidas en la matriz extracelular, se han descrito enzimas con actividades catalíticas dirigidas a degradar biopolímeros, como proteínas, polisacáridos y lípidos. Estas enzimas pueden estar involucradas en la obtención de sustratos orgánicos, como fuente de materia y

energía; así como en la degradación de la matriz extracelular en la liberación de bacterias y dispersión de las biopelículas. Adicionalmente, en la matriz extracelular se encuentran retenidas proteínas estructurales, las cuales están asociadas a superficies bacterianas, y son responsables de mantener estable la red de exopolisacáridos. En cuanto al ADN, representa una parte integral de la matriz extracelular, con funciones asociadas al mantenimiento de la arquitectura de las biopelículas (Flemming y Wingender, 2010).

Las EPS ejercen funciones biológicas con ventajas selectivas en la sobrevivencia bacteriana. Las EPS intervienen en la organización espacial de la comunidad bacteriana dentro de las biopelículas, estableciendo las interacciones bacterias-superficie y entre bacterias. Las EPS producen cohesión y estabilidad mecánica de la matriz extracelular de biopelículas, promoviendo la inmovilización de agregados celulares y la comunicación celular (Flemming y Wingender, 2010; Boudarel y col., 2018).

En cuanto a las propiedades químicas de la matriz extracelular, se manifiestan funciones vinculadas a la composición de EPS. La composición altamente hidratada y viscoelástica de la matriz, promueven la retención de agua y la disipación de energía ante condiciones de tolerancia a la desecación y al estrés mecánico, respectivamente. Las EPS pueden resultar fuentes de almacenamiento energético. Por otra parte, la barrera física de la matriz extracelular interviene en la difusión pasiva de compuestos orgánicos e inorgánicos, incluyendo la adsorción de nutrientes o exportación de componentes celulares (Flemming y col., 2016).

La matriz extracelular confiere propiedades físicas y químicas únicas, que garantizan el hábitat natural en biopelículas, tales como: hidratación, capacidad de degradación de las reservas energéticas almacenadas en las EPS y de los sustratos capturados del ambiente; comunicación celular, que vincula interacciones físicas y sociales, promoviendo incluso el intercambio de información genética; confiere protección en contra de los agentes deletéreos del entorno (Flemming y col., 2016).

II.1.3 Heterogeneidad fenotípica

La comunidad bacteriana de biopelículas ocurre la coexistencia estable de sub-poblaciones celulares que manifiestan distintos fenotipos. Esta heterogeneidad fenotípica responde a la organización espacio-temporal de las actividades fisiológicas bacterianas dentro de las biopelículas. La estructura y composición de la matriz extracelular, determinan la estratificación espacial y gradientes químicos (de nutrientes, compuestos celulares, oxígeno, entre otros) dentro de las biopelículas. Esto origina que la ubicación de fenotipos bacterianos sea heterogénea, en respuesta a los compartimentos de microentornos establecidos (Flemming y col., 2016).

La distribución heterogénea espacial y temporal de bacterias, está coordinada por el comportamiento grupal, ante mecanismos de señalización intercelular y sus respuestas efectoras, en entornos locales de las biopelículas. La elevada densidad bacteriana y la acumulación de sustancias poliméricas extracelulares de la matriz, influye en la retención y difusión de solutos químicos y nutrientes entre las biopelículas y su entorno, estableciendo estratificación de heterogeneidad espacial. Por ejemplo, los nutrientes tienen una mayor acumulación sobre las capas más superficiales de las biopelículas. El consumo de sustratos y secreción de productos en esta capa originan limitaciones de difusión de estos compuestos, por lo que se producen gradientes químicos transversales y complejos en el interior de las biopelículas, que determinan la distribución de células por exclusión competitiva de recursos, en base a la capacidad metabólica y la tasa de crecimiento. Adicionalmente, los patrones de distribución de oxígeno en gradiente, dentro de las biopelículas, también generan entornos locales aerobios en las capas más superficiales y entornos anaerobios en capas más profundas, los cuales manifiestan la separación de especies aeróbicas y anaeróbicas. La cooperación fisiológica, como respuesta celular a condiciones locales del entorno, incrementa la productividad y eficiencia metabólica de la biopelícula (Nadell y col., 2008; Kostakioti y col., 2013).

La figura 1 demuestra la distribución de tres sub-poblaciones fenotípicas de *Bacillus subtilis* durante el desarrollo de biopelículas. Las imágenes

adquiridas por microscopia de fluorescencia, presentan las diferencias espaciales y temporales de fenotipos entre células móviles, productoras de la matriz extracelular y formadoras de esporas de *B. subtilis*. Vlamakis y colaboradores (2008) describen que en la fase inicial de desarrollo, las biopelículas de *B. subtilis* están constituidas por células móviles con localización definida; seguida de la transición de la expresión y distribución azarosa de células productoras de la matriz extracelular, la cual culmina con la esporulación, que ocurre en microentornos aerobios.

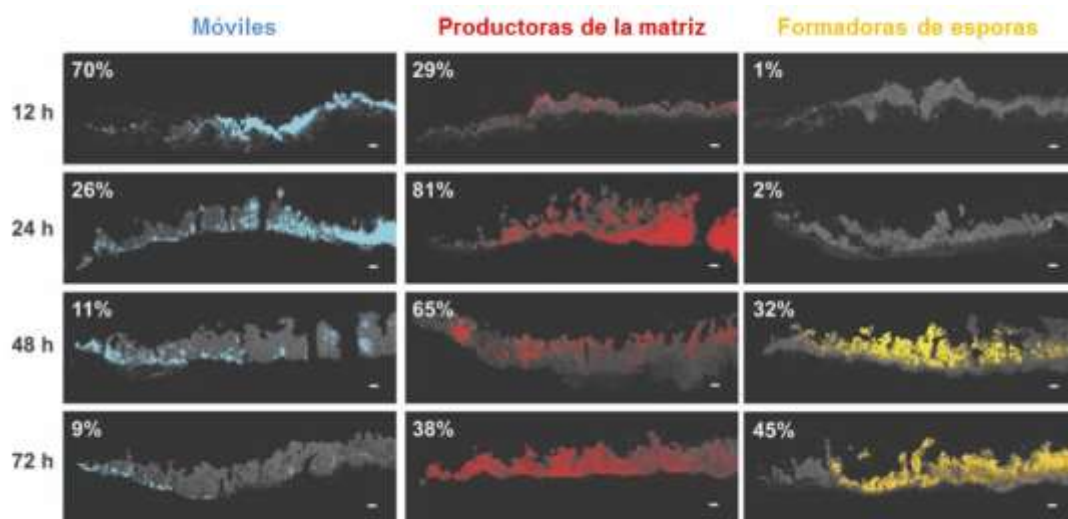


Figura 1: Registro fotográfico de la distribución espacial y temporal de tres tipos celulares de *B. subtilis* durante el desarrollo de biopelículas. Se presentan imágenes tomadas en el transcurso de 72 h de tres experimentos, en los cuales se indujo el desarrollo de biopelículas de *B. subtilis* cuyos genes específicos a movilidad, producción de matriz y formadoras de esporas se encuentran fusionados con fluoróforos reporteros de colores azul, rojo y amarillo, respectivamente. Los términos de porcentaje indican la fluorescencia obtenida por citometría de flujo. Barras: 50 μ m Tomado de: Vlamakis y col., 2008.

Por lo tanto, en biopelículas se manifiesta heterogeneidad química de los entornos locales; y heterogeneidad biológica, constituida por la diversidad genética y fisiológica. Además, la distribución de distintos fenotipos celulares en regiones específicas de biopelículas, promueve un conjunto de interacciones físicas, químicas y sociales entre bacterias, pudiéndose

desencadenar transferencia horizontal de material genético y comunicación célula-célula (Stewart y Franklin, 2008; Flemming y col., 2016).

En respuesta a las condiciones locales del entorno, el sistema de interacciones metabólicas determina la división de labores y cooperación fisiológica bacteriana, las cuales promueven adaptación al entorno químico local, incrementando así la productividad y eficiencia metabólica en biopelículas (Aparna y Yadav, 2008; Nadell y col., 2008; Kostakioti y col., 2013).

La heterogeneidad fisiológica y fenotípica se manifiesta tanto en el desarrollo de biopelículas mono-especie como multi-especies (Stewart y Franklin, 2008). Las biopelículas mixtas implican la coexistencia estable de diversas especies bacterianas, lo cual incrementa la complejidad de interacciones intercelulares y la distribución espacio-temporal de especies dentro de las biopelículas. Las adaptaciones fisiológicas de las especies al entorno químico local en biopelículas, promueven la cooperación y competencia intercelular (Flemming y col., 2016). En biopelículas mixtas pueden desarrollarse mayor biomasa que con respecto a biopelículas mono-especie. En cuanto a su distribución, las diferentes especies bacterianas pueden estar dispersas en biopelículas, adaptándose con distintos estados fisiológicos a un rango de condiciones del entorno (Stewart y Franklin, 2008). Por lo tanto, durante la formación de biopelículas mixtas se manifiestan efectos sinérgicos entre las especies debido a la biodiversidad genética (Flemming y col., 2010; Eze y col., 2018).

II.1.4 Fases de desarrollo

El desarrollo de biopelículas pueden representarse en un ciclo de fases de formación gradual en el tiempo (figura 2), las cuales comparten eventos comunes, independientemente del fenotipo del microorganismo que forma parte de la biopelícula (Aparna y Yadav, 2008).

Primera fase: consiste en la adherencia de las bacterias a una superficie. Las fuerzas hidrodinámicas de atracción y repulsión, son inducidas por señales del entorno (nutrientes y su concentración, pH, temperatura, concentración de

oxígeno, presión osmótica, entre otros) y la composición de la membrana plasmática bacteriana, exhibiendo adhesinas preformadas que incrementan la adherencia transitoria. Seguidamente, en esta fase se establece el enlazamiento irreversible célula-superficie, determinado por fuerzas de mayor magnitud a las repulsivas generadas entre las bacterias y la superficie. Estas interacciones se favorecen por la síntesis y secreción de estructuras adhesivas específicas y estables en la membrana celular (Stanley y Lazazzera, 2004; Aparna y Yadav, 2008; Karatan y Watnick, 2009; Kostakioti y col., 2013).

Segunda fase: corresponde a la maduración de las biopelículas, proceso en el cual se establecen el resto de las propiedades que caracterizan a las biopelículas. Se activa la división celular y el crecimiento bacteriano. La expresión génica altera el perfil de transcripción, permitiendo el desarrollo de la estructura integral de biopelículas. Los cambios fenotípicos más relevantes reportados consisten en la síntesis de la matriz extracelular (Stanley y Lazazzera, 2004; Kostakioti y col., 2013).

La maduración de las biopelículas consiste en el desarrollo de la integridad de su arquitectura tridimensional, conferida por la composición de la matriz extracelular. La matriz extracelular es una estructura compleja, dinámica e interactiva, cuya arquitectura está influenciada por factores biológicos (composición del medio, presencia de surfactantes, varios tipos de motilidad y efectos del quorum sensing), los cuales están determinados por las bacterias y condiciones físicas del entorno.

Tercera fase: la dispersión de las biopelículas, las bacterias pueden abandonar la biopelícula y desarrollar nuevamente un estilo de vida planctónico. Durante el crecimiento de las biopelículas, se manifiestan elementos que influyen sobre la susceptibilidad de las bacterias residentes. Debido a la acumulación de desechos tóxicos y la disminución de acceso a los nutrientes, el interior de las biopelículas se convierte en un ambiente desfavorable para la sobrevivencia de las bacterias residentes. Por otra parte, también existe la condición de alteraciones favorables del entorno que circundan a las biopelículas, propiciando su transición a un estilo de vida planctónico. La dispersión es un proceso regulado por un conjunto de sistemas

moleculares sensores, los cuales perciben las condiciones del entorno circundante, haciendo posible el desarrollo de este estilo de vida. Los mecanismos de dispersión son: las condiciones físicas del entorno, la degradación enzimática de la matriz extracelular, la inducción de la motilidad, la producción de surfactantes, la muerte o lisis celular (Karatan y Watnick, 2009; Kostakioti y col., 2013).

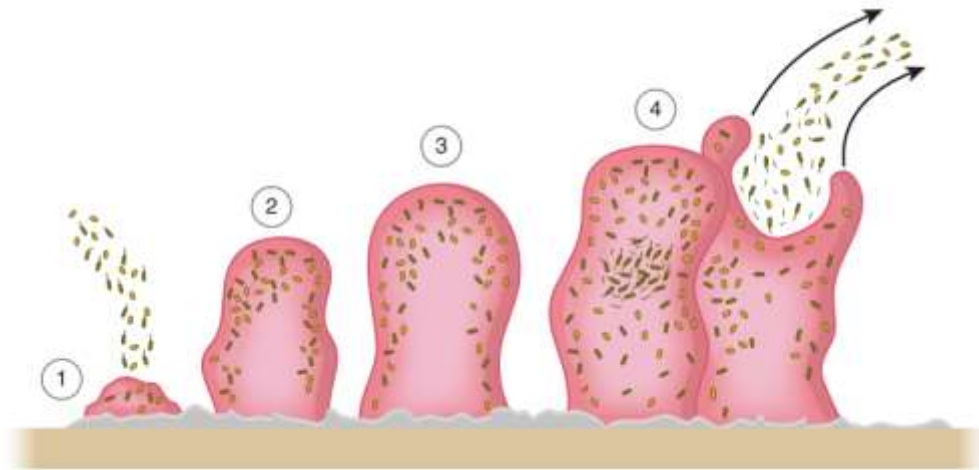


Figura 2: Representación esquemática de los estados discretos que constituyen la formación de biopelículas. Las señales del entorno inducen la adhesión de las bacterias de vida libre a una superficie. El enlazamiento inicial es reversible (1), seguido de adhesión irreversible y estable (2). Estas interacciones desencadenan señales químicas que activan la maduración de las biopelículas, acumulándose los componentes de la matriz extracelular (3). En base a las condiciones desfavorables del interior de la biopelícula o condiciones favorables del entorno circundante, se activan redes regulatorias de percepción del entorno, que pueden activar mecanismos de dispersión de biopelículas, si resulta conveniente retornar la transición a un estilo de vida planctónico (4). Tomado de: Torretta y col., 2018.

II.2 Infecciones humanas asociadas a la formación de biopelículas

Existen numerosas interacciones biológicas entre un hospedador y los microbios que alberga. Estas asociaciones establecen un entorno beneficioso entre hospedador y microorganismo. Por ejemplo, las bacterias entéricas que forman parte de la microbiota intestinal, ejercen un conjunto de beneficios funcionales, que abarcan la degradación de compuestos dietéticos que no son digeribles por el sistema digestivo del organismo (Bjarnsholt, 2013). Por lo tanto, la microbiota humana está compuesta de microorganismos ubicuos sobre

zonas del cuerpo humano no estériles, que son de fácil acceso ante la colonización bacteriana.

Además, existen otras áreas del cuerpo humano, con ocupación de microbios temporal, ya que residen una cantidad escasa o su presencia es transitoria. Estas zonas son: la laringe, tráquea, bronquios, senos nasales accesorios, esófago, estómago, porciones superiores del intestino delgado, tracto urinario superior, áreas distales de los genitales masculinos y femeninos (Murray col., 1995). Estas áreas del cuerpo humano, son las que delimitan entre el estado de salud o enfermedad de un hospedador en relación con las enfermedades infecciosas. Entre los factores de riesgo que influyen sobre las probabilidades que un número pequeño de bacterias, invadan estas superficies del cuerpo e induzcan procesos de enfermedades infecciosas están: geográficos, ambientales, condiciones inmunológicas y comportamiento humano (Fauci y col., 2000).

Una infección bacteriana describe la adherencia, multiplicación y crecimiento de un microorganismo sobre una superficie del cuerpo humano. Como consecuencia, en una infección se establecen interacciones complicadas entre el microorganismo y el individuo infectado, pudiendo producir cambios en la fisiología de ambas partes. Un proceso infeccioso resulta en una enfermedad cuando se producen alteraciones en la fisiología normal del individuo infectado, debido a la habilidad de un microorganismo de invadir tejidos del cuerpo humano (Atlas, 1997; Fauci y col., 2000).

Una infección bacteriana que resulta en enfermedad infecciosa desencadena, en conjunto, la ruptura de la integridad homeostática de barreras mucosas o superficies de la piel, así como el despliegue de mecanismos defensivos inmunitarios. Si la infección es erradicada espontáneamente por medio de la respuesta inmune innata o adaptativa, se clasifica como infección aguda; si, por el contrario, la infección y la sintomatología persisten en el tiempo, a pesar del desarrollo de la respuesta inmune y la asistencia de la terapia de antibióticos, se clasifica como una infección crónica (Bjarnsholt, 2013).

De acuerdo a la reacción bioquímica e inmune compleja desarrollada en el individuo infectado, pueden establecerse innumerables y diversas manifestaciones clínicas. En efecto, las enfermedades infecciosas son consideradas todavía una causa importante de debilidad, muerte y responsables del empeoramiento de condiciones de vida (Fauci y col., 2000).

Los microorganismos patógenos han desarrollado diversas estrategias que les permite evadir los mecanismos defensivos y la respuesta inmune del hospedador, así como incrementar la virulencia. Dentro de estos mecanismos, cabe destacar: la alternancia de expresión de componentes de membrana y cambios en su permeabilidad, secreción de toxinas, control de crecimiento microbiano; la expresión de mecanismos de resistencia a antibióticos y otros agentes antimicrobianos, de manera intrínseca, adaptativa y/o adquirida por intercambio génico.

Se designan a las biopelículas como agentes causales de enfermedades infecciosas, debido a los siguientes criterios: 1) capacidad de adherencia bacteriana sobre sustratos, 2) bacterias encapsuladas dentro de la matriz extracelular, 3) se encuentran confinadas a una locación específica, 4) la infección es difícilmente erradicada con terapia convencional de antibióticos (Parsek y Singh, 2003).

Las biopelículas son una estrategia importante de patogenicidad, así como de cronicidad de infecciones bacterianas. El desarrollo y la estructura de las biopelículas, confieren una protección de agentes externos, que son imposibles de manifestarse en células con estilo de vida libre. Se ha propuesto que una serie de propiedades fenotípicas de las biopelículas, proporcionan importantes mecanismos patogénicos (Aparna y Yadav, 2008), causando problemas de salud. Estos son:

- Capacidad de adherencia a superficies bióticas y abióticas: las biopelículas pueden formarse sobre superficies bióticas, como tejido sano, huesos, capas mucosas, quemaduras, heridas o tejido necrótico; así como pueden adherirse sobre superficies inertes, resultando una fuente de contaminación de dispositivos médicos que inciden sobre las rutas de transmisión del

agente patógeno, tales como: catéteres, unidades dentales, ventiladores, implantes médicos, entre otros.

- División de labores: la red protectora de la matriz extracelular, la ubicación de bacterias metabólicamente activas y resistentes en capas superiores de las biopelículas, reducen la entrada y la capacidad de efecto de agentes deletéreos al interior de las mismas.
- Evasión de la defensa inmune: la formación de biopelículas activan mecanismos de respuesta inmune del hospedador, sin embargo, la matriz extracelular como barrera protectora, dificulta la penetración de los componentes de la respuesta inmune al interior de las biopelículas. En este caso, la respuesta inmune ejerce daños sobre los tejidos que bordean a las biopelículas.
- Protección contra agentes antimicrobianos: las biopelículas disminuyen la susceptibilidad de las bacterias residentes en contra de estos agentes antimicrobianos, ya que la matriz extracelular dificulta su penetración. Sumado a las propiedades que confiere la heterogeneidad fenotípica, por ejemplo, las bacterias que producen y secretan proteínas que degradan los antibióticos, protegen a las bacterias sensibles.
- Alto potencial de intercambio de material genético, por transferencia horizontal: en el interior de las biopelículas, se da un entorno propicio de interacciones intercelulares y, por ende, el intercambio génico. Una ventaja fundamental puede resultar en la transmisión de genes de virulencia entre cepas bacterianas.
- Alta densidad de microorganismos: la transmisión del agente patógeno a otras regiones blanco de infección en el cuerpo humano, durante la fase de dispersión de las biopelículas, es favorecida por el contenido de microorganismos que conforman las biopelículas. Durante la dispersión de las biopelículas, también son liberados factores de virulencia que incrementan la habilidad de invadir otros tejidos del cuerpo humano.

La formación de biopelículas contribuye con la sobrevivencia y adaptación bacteriana por los sitios que coloniza del cuerpo humano (Nucleo y col., 2009). Se considera que más del 50% de las infecciones bacterianas están asociadas a biopelículas (Hancock y col., 2006).

Las infecciones del tracto respiratorio están vinculadas con el desarrollo de biopelículas. La adherencia bacteriana ocurre sobre los tejidos de las vías respiratorias inferiores, como bronquios y pulmones; así como de las vías superiores, tales como oídos, nariz y garganta. Las infecciones respiratorias asociadas a biopelículas son: neumonía asociada a ventilación; enfermedades pulmonares obstructivas crónicas, fibrosis quística, bronquitis, otitis, tonsilitis, adenoiditis y rinosinusitis (Blasi y col., 2016; Torretta y col., 2018). Las especies bacterianas *Pseudomonas aeruginosa*, *Haemophilus influenzae* y *Streptococcus pneumoniae* representan los agentes infecciosos comunes asociadas a infecciones del tracto respiratorio. Las cepas patógenas oportunistas de *Acinetobacter baumannii* están catalogadas como agentes comunes causales de neumonía asociada a ventilación mecánica; así como las cepas oportunistas de *Serratia marcescens* también se han descrito como responsables de infecciones del tracto respiratorio (Mahlen y col., 2011; Bjarnsholt, 2013; Blasi y col., 2016).

Las infecciones del tracto urinario consisten en la adherencia y colonización bacteriana del urotelio, las cuales permiten resistir su remoción por el flujo de orina. Estos microorganismos provienen de reservorios que están fuera del tracto urinario, como la microbiota intestinal. Puede iniciar como una infección de vejiga, con capacidad potencial de diseminarse a riñones o por vía hematógena. Estas infecciones bacterianas representan un grave problema de salud, siendo un fenómeno recurrente en la mujer. El desarrollo de biopelículas en el tracto urinario se considera una estrategia de persistencia bacteriana, pudiendo ser la causa de cronicidad de estas infecciones (Hancock y col., 2006; Soto y col., 2006). Las bacterias uropatogénicas que comúnmente desarrollan las biopelículas asociadas a estas infecciones son: *E. coli*, *Proteus mirabilis*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* (Valdevenito, 2008). Las cepas patógenas oportunistas *A. baumannii* y *S. marcescens* también se han descrito como agentes causales de infecciones del tracto urinario (Nucleo y col., 2009; Mahlen y col., 2011).

Un conjunto de enfermedades infecciosas de la piel también se han vinculado con biopelículas bacterianas, las cuales se extienden a lesiones, como quemaduras. Los microorganismos asociados a piel son: *S. aureus*,

Staphylococcus epidermidis, *Propionibacterium acnés*, entre otros (Brandwein y col., 2016). De igual manera, las cepas *A. baumannii* y *S. marcescens* se han reportado como responsables de infecciones de lesiones de piel, heridas y quemaduras (Nucleo y col., 2009; Mahlen y col., 2011).

Las cepas patógenas pueden ser agentes causales de infecciones adquiridas en la comunidad o dentro de los centros de salud. Las infecciones adquiridas en la comunidad predominan en individuos con condiciones subyacentes de riesgo en salud, como diabetes mellitus, fumadores o alcohólicos; también están mediadas por las condiciones climáticas (Morris y col., 2019). Las infecciones hospitalarias o nosocomiales se definen como aquellas contraídas durante o como consecuencia de una hospitalización. En este caso, el paciente estuvo ingresado por un periodo mínimo de 48 horas al centro de salud, sin embargo, su motivo inicial de hospitalización no involucra el periodo de incubación, manifestación ni tratamiento de la infección nosocomial. Las infecciones nosocomiales representan un problema adicional de incidencia sobre la morbilidad, mortalidad, costos hospitalarios y situación económica del paciente (Murray y col., 1995; Fauci y col., 2000). Del género *Acinetobacter* spp. han surgido cepas patógenas con prevalencia importante en infecciones nosocomiales (Subhadra y col., 2018; Morris y col., 2019).

Los factores de riesgo que atribuyen la frecuencia y severidad de adquisición de infecciones nosocomiales son diversos. Un factor importante influyente reside en la severidad de la condición del paciente infectado, como: su estado inmunológico (competente o comprometido), edad, estado de nutrición, enfermedades anteriores o simultáneas, estado emocional, post-operaciones, entre otros.

Otro factor de riesgo reside en la introducción de aparatos físicos, como dispositivos intravenosos, válvulas, catéteres, sondas, tubos traqueales, instrumentos ortopédicos, entre otros. La superficie abiótica que exponen estos cuerpos extraños, en conjunto con la incisión de la barrera cutánea o de las mucosas que ocasiona la instalación del dispositivo, incrementan la probabilidad de colonización e invasión bacteriana al paciente. Si el tratamiento previo y durante las primeras 48 horas de hospitalización, contempla el uso de

terapia empírica de antibióticos de amplio espectro, se predisponen estados alterados de la microbiota normal de las mucosas del paciente, lo que también facilita la colonización de los agentes patógenos sobre estas áreas del cuerpo humano, por la falta de competencia de los recursos del medio circundante (Fauci y col., 2000; Aparna y Yadav, 2008). En la figura 3 se esquematizan las infecciones bacterianas por biopelículas.

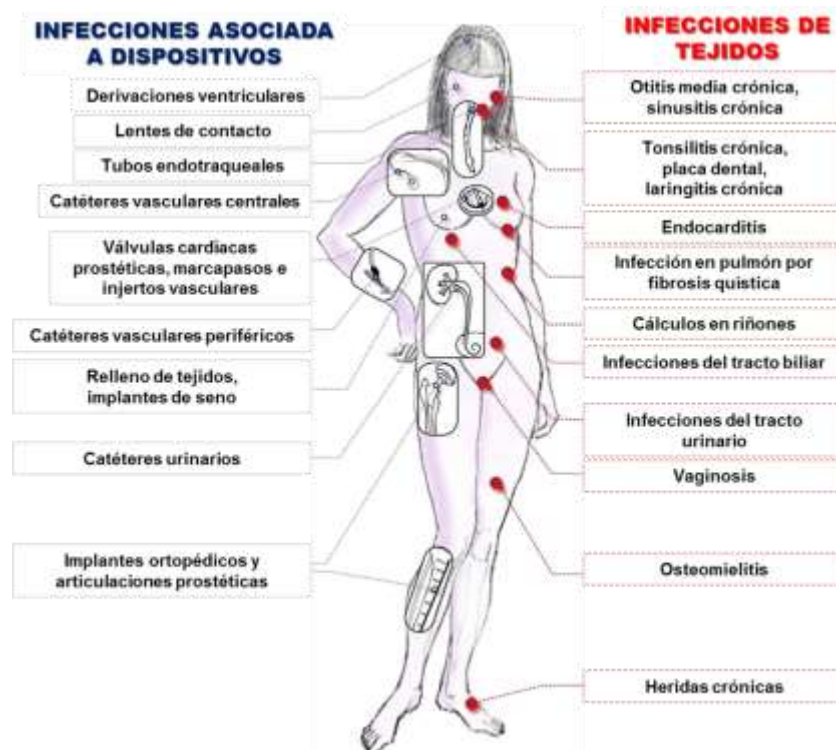


Figura 3: Infecciones comúnmente asociadas al desarrollo de biopelículas bacterianas. Las bacterias tienen la capacidad de adherirse sobre superficies bióticas o dispositivos médicos, desencadenando así la formación de biopelículas como mecanismo de virulencia. Tomado y modificado de: Høiby y col., 2015.

Las biopelículas bacterianas conllevan a un grave problema de salud a nivel mundial, concerniente al control terapéutico de estas enfermedades. Las infecciones por biopelículas son de difícil tratamiento y erradicación, ya que las bacterias residentes dentro de este consorcio, tienen menor susceptibilidad en contra de los antibióticos y la respuesta inmune del hospedador, que con respecto al estilo de vida planctónico (Bryers y col., 2008; Stewart y Franklin, 2008).

En biopelículas se establecen complejos mecanismos de tolerancia y resistencia en contra de agentes antimicrobianos. Este fenómeno describe a las biopelículas como recalcitrantes, la cual define la capacidad de las bacterias en biopelículas de sobrevivir al tratamiento de antibióticos, siendo un fenotipo reversible y no heredado (Lebeaux y col., 2014). El fenotipo recalcitrante se atribuye a propiedades genéticas innatas de biopelículas, tales como: la heterogeneidad fisiológica, la difusión limitada de nutrientes, generación de células persistentes, expresión génica específicas en biopelículas; así como se atribuyen propiedades inducidas por el agente antimicrobiano (Anderson y O'Toole, 2008; Antypas y col., 2018).

II.2.1 Infecciones causadas por *Acinetobacter baumannii* y *Serratia marcescens*

Las especies *A. baumannii* y *S. marcescens* han resurgido mundialmente como patógenos oportunistas, causantes de un amplio rango de infecciones severas adquiridas en el hospital y la comunidad. Estas especies virulentas comparten numerosas características biológicas que les confieren adaptación y sobrevivencia. En conjunto: su distribución ubicua, capacidad de adherencia sobre diversas superficies, resistencia múltiple a la exposición de diversos agentes deletéreos, capacidad de adquisición de determinantes genéticos y formación de biopelículas (Blossom y Srinivasan, 2008; Peleg y col., 2008; McConnell y col., 2012).

Dominio	Bacteria
Phylum	Proteobacteria
Clase	Gammaproteobacteria
Orden	Enterobacteriales
Familia	Enterobacteriaceae
Género	Serratia
Especie	<i>Serratia marcescens</i>
Orden	Pseudomonadales
Familia	Moraxellaceae
Género	Acinetobacter
Especie	Complejo <i>Acinetobacter baumannii/calcoaceticus</i>

Figura 4: Clasificación taxonómica de las especies *A. baumannii* y *S. marcescens*. Ambas especies pertenecen a la clase γ-proteobacteria, grupo taxonómico con una amplia colección de microorganismos patógenos para humanos y otros animales. Se cataloga a *A. baumannii* como un complejo bacteriano con la especie *A. calcoaceticus* (Tomado de: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)

II.2.1.a *Acinetobacter baumannii*

Las especies pertenecientes al género *Acinetobacter* sp., son microorganismos ubicuos, las cuales presentan como hábitat natural las superficies de agua, suelos y vegetales. Adicionalmente, estos microorganismos también forman parte de la microbiota de piel y membranas mucosas de animales y de individuos humanos sanos, como el tracto respiratorio, tracto genitourinario, piel y huesos. Se ha descrito a: *A. lwoffii*, *A. johnsonii*, *A. junii* y *A. radioresistens*, como las especies comunes de colonización en áreas del cuerpo humano (Peleg y col., 2008). En las muestras clínicas, estas especies pueden estar presentes ocasionalmente, estando involucradas en infecciones (Murray y col., 1995).

Para la especie *A. baumannii*, se presentan discrepancias en cuanto a su hábitat natural. Ciertos autores afirman que su distribución es ubicua en la naturaleza y destacan que forman parte de la microbiota habitual de la piel humana; mientras que otros autores lo descartan, indicando que *A. baumannii* no parece ser un microorganismo típico del entorno y proponen la existencia

por contaminación de cepas de *A. baumannii* sobre dispositivos médicos impuestos en pacientes hospitalizados (Peleg y col., 2008; McConnell y col., 2012).

A nivel microbiológico, se identifica a la especie *A. baumannii* como bacilos Gram negativos, a menudo difíciles de decolorar; de 1,5 a 2,5 μm de longitud, dispuestos en pares y en cadenas de longitud variable. Son microorganismos aerobios estrictos, no fermentadores de glucosa, nitrato negativos, Catalasa positivos y Oxidasa negativos, con capacidad de crecimiento a temperaturas de 37 y 41 °C (MacFaddin, 2004). La identificación de *A. baumannii*, por lo general, es catalogada como un grupo, debido a la capacidad de formación de complejos bacterianos con otras especies como *A. calcoaceticus*, presentando características epidemiológicas y clínicas relevantes. Su clasificación taxonómica se muestra en la figura 4.

A. baumannii es un agente patógeno poco común, pero severo de infecciones del tipo adquiridas en la comunidad, destacando la neumonía. Sin embargo, si es responsable de causar un amplio rango de infecciones nosocomiales. En estas últimas, la más frecuente es el contagio del tracto respiratorio, tracto urinario, meningitis, endocarditis e infecciones de diseminación sanguínea. Adicionalmente, el patógeno *A. baumannii* causa infecciones severas en situaciones inusuales o de emergencia, por ejemplo: en situaciones bélicas incrementan los tipos de infecciones adquiridas en la comunidad, que incluyen contagios de piel, tejido blando, sobre quemaduras y heridas (Bhargava y col., 2010). Los pacientes críticos que padecen significativamente de estas infecciones son los inmunocomprometidos y aquellos hospitalizados en las unidades de cuidados intensivos y neonatología (Blossom y Srinivasan, 2008).

Los sectores de cuidados intensivos están ocupados por pacientes que requieren procedimientos invasivos, por períodos prolongados de tiempo, como la incorporación de dispositivos de ventilación en el tracto respiratorio y de catéteres intravasculares. Adicionalmente, los pacientes infectados deben recibir un tratamiento frecuente antimicrobiano, durante su hospitalización (Lee y col., 2008). En consecuencia, las condiciones del entorno de las unidades de

cuidados intensivos y de neonatología, ejercen fuertes presiones selectivas sobre los microorganismos presentes, que causan la selección de mecanismos rápidos y eficientes de patogenicidad. Estos atributos, los cuales son elementales en su epidemiología, consisten en la habilidad de sobrevivir por períodos de tiempo prolongados sobre superficies inanimadas, la colonización de piel humana y la capacidad de resistencia a múltiples drogas (Bhargava y col., 2010).

La especie *A. baumannii* presenta una destreza extraordinaria de adquisición de ADN foráneo, por transmisión horizontal de plásmidos, transposones e integrones. Entre estos mecanismos se presenta la capacidad de adquisición de islas de patogenicidad, lo que confiere una ventaja selectiva en la estrategia de persistencia de *A. baumannii*, con respecto a microorganismos de genomas más estáticos (Smith y col., 2007; Cerqueira y Peleg, 2011).

Las islas genómicas son regiones del genoma bacteriano, los cuales representan puntos de integración sucesiva de genes, con funciones putativas de virulencia y resistencia. La especie *A. baumannii* contiene numerosas islas genómicas, entre ellas destacan las islas de patogenicidad, como la AbaR1, región de 16,3 kb. Esta isla contiene 25 genes de resistencia a antibióticos, 20 genes de resistencia a antisépticos y metales pesados. El material genético foráneo contenido en AbaR1, proviene de diversos microorganismos, como *E. coli*, *Salmonella* sp. y *Pseudomonas* sp. (Fournier y col., 2006; Smith y col., 2007). Dada a estas características, la Organización Mundial de la Salud ha clasificado a la especie *A. baumannii* como uno de los patógenos ESKAPE (acrónimo de *Enterococcus faecium*, *S. aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *A. baumannii*, *P. aeruginosa* y especies de Enterobacterias), de los cuales se requieren atención prioritaria para el desarrollo de nuevos tratamientos terapéuticos (Morris y col., 2019).

La capacidad de formación de biopelículas de *A. baumannii*, particularmente sobre dispositivos médicos, contribuye con la prevalencia de infecciones nosocomiales. Se han caracterizado distintos determinantes de virulencia en biopelículas de *A. baumannii*. La proteína de superficie de

membrana Bap modula la formación y desarrollo de biopelículas de *A. baumannii* mediante la adhesión entre células y funciones estructurales. El sistema de la bomba de eflujo AdeABC y la porina OmpA están vinculados con mecanismos de resistencia, adhesión y formación de biopelículas. El sistema enzimático PgaABCD y AlgC, catalizan la síntesis del exopolisacáridos de biopelículas, como: poli-(1-6)-N-acetilglucosamina, alginato y lipopolisacáridos. La biogénesis de los pili Csu, requeridos en la adherencia bacteriana sobre superficies abióticas, el cual se encuentra su expresión modulada por el sistema de dos componentes BfmRS. Los sistemas “quorum sensing” AbaIR y Lux, median la agregación celular y formación de biopelículas (Eze y col., 2018).

II.2.1.b *Serratia marcescens*

La especie *S. marcescens* son bacterias saprófitas ubicuas, distribuidas naturalmente en diversos nichos ecológicos como superficies de agua y suelos; asociado, además, sobre tejidos de insectos, animales y plantas; también se puede presentar como contaminante de alimentos ricos en almidón (Hejazi y Falkiner, 1997). Las cepas de *S. marcescens* aisladas del ambiente, producen prodigiosina, un pigmento que confiere a sus colonias apariencia de color rojo característico. Las especies mutantes de *Serratia* sp no productoras del pigmento son menos sensibles a antibióticos y las que comúnmente se aíslan de muestras clínicas (Hejazi y Falkiner, 1997; Atlas y col., 1997). Es común encontrar colonización de cepas pigmentadas en el tracto respiratorio y huesos.

A nivel microbiológico, se identifica a la especie *S. marcescens* como bacilos Gram negativos, de tamaños que oscilan entre 5 a 30 µm de longitud; presenta motilidad, mediada por flagelos. Son microorganismos anaerobios facultativos, fermentadores de glucosa con producción variable de gas y no fermentadores de lactosa, nitrato positivos, catalasa positivos y oxidasa negativos (MacFaddin, 2004). Se distingue de otras especies de *Serratia* sp patógenas en humanos, por no poder fermentar a L-arabinosa (Murray y col., 1995). En la figura 4 se muestra la taxonomía de esta especie.

La especie *Serratia* sp forma parte de las enterobacterias patógenas oportunistas, que causan enfermedades infecciosas en animales (insectos, reptiles, roedores, aves, peces, caballos, entre otros), plantas y humanos. Concretamente, la especie *S. marcescens* se encuentra estrechamente vinculada con algunos tipos de infecciones humanas. *S. marcescens* es el agente causal de un amplio espectro de infecciones nosocomiales y extraintestinales importantes en el hombre, como: infecciones del tracto urinario, tracto respiratorio, sistema nervioso central (meningitis), infecciones de diseminación sanguínea, como septicemia y endocarditis; distintos tipos de infecciones de heridas, como la herida quirúrgica e infecciones asociadas a la implementación de dispositivos, como catéteres o equipos de ventilación (Atlas y col., 1997; Mahlen, 2011).

Existen análisis de secuencias genómicas entre cepas de *S. marcescens* que revelan su elevada plasticidad genómica, la cual se refleja a su vez en la diversidad de hábitats que puede colonizar. Este agente patógeno contiene potenciales factores de virulencia, tal como su habilidad de secretar diversas exoenzimas (toxinas, hemolisinas, proteasas), por medio de sistemas de secreción; así como expresa variabilidad en sus proteínas de superficie.

Son escasos los mecanismos moleculares descritos en biopelículas de *S. marcescens*. Por lo general, el componente de adherencia de *S. marcescens* a diversos sustratos, está pautada por el sistema pili de fimbrias de tipo 1 (Kalivoda y col., 2008). Los sistemas de “*quorum sensing*” se consideran como reguladores globales determinantes del desarrollo de biopelículas de *S. marcescens* (Rice y col., 2005; Bakkiyaraj y col., 2012); de igual manera la proteína regulatoria global receptora de AMPc (Crp), las enzimas fosfodiesterasas (Kalivoda y col., 2008; Kalivoda y col., 2013) y la proteína regulatoria OxyR, que modula la expresión de genes de adherencia bacteriana y formación de biopelículas, bajo condiciones de estrés oxidativas (Shanks y col., 2007).

II.3 Procesos de metilación del ADN

La estructura de la molécula del ácido desoxirribonucleico (ADN) permite almacenar la información genética en una serie de instrucciones codificadas que determinan la constitución de toda célula viva. Las funciones genéticas adscritas al ADN se encuentran establecidas por el orden específico de cuatro bases nitrogenadas: Adenina (A), Citosina (C), Guanina (G) y Timina (T).

Sin embargo, se ha evidenciado que las moléculas A, C, G y T no son las únicas bases nitrogenadas que constituyen las letras del alfabeto genético. Se han descubierto modificaciones dinámicas de las mismas, las cuales hacen una extensión especial del código genético. Dichas estructuras químicas novedosas presentan la incorporación de un grupo metilo, sobre una posición específica de las bases nitrogenadas de A y C (figura 5), estas son: 5-metilcitosina (5mC), N^6 -metiladenina (6mA) y N^4 -metilcitosina (4mC) (Jeltsch, 2002; Heyn y Esteller, 2015; Wion y Casadesús, 2006).

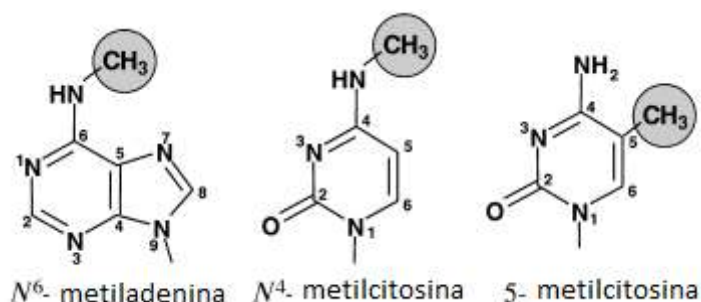


Figura 5: Estructuras de las bases nitrogenadas A y C, modificadas por metilación. El grupo metilo puede estar enlazado a un átomo de nitrógeno (N^6 -metiladenina o N^4 -metilcitosina) o uno de carbono (5-metilcitosina). Tomado y modificado de: Jeltsch, 2002.

Las moléculas de A y C metiladas reducen la estabilidad de las propiedades de apareamiento típicas $A=T$ y $C\equiv G$, lo que promueve la apertura de las hebras y el enlazamiento entre proteínas-ADN. Por lo tanto, la metilación del ADN incorpora información adicional al material genético, la cual no se encuentra codificada directamente en su secuencia. Las enzimas ADN metiltransferasas (Dnmts) catalizan la metilación del ADN sobre secuencias específicas, a partir de una molécula donadora del grupo metilo, como el

sustrato S-Adenosil Metionina (SAM) (Jeltsch, 2002; Wion y Casadesús, 2006; Heyn y Esteller, 2015).

Las bases 4mC, 5mC y 6mA, están presentes en secuencias específicas de ADN de los genomas procariotas y eucariotas (Cedar y Bergman, 2012). La base 5mC ejerce un rol biológico predominante en células eucarióticas de plantas y animales mamíferos; mientras que 6mA y 4mC, son modificaciones dominantes en bacterias (Heyn y Esteller, 2015).

II.3.1 Metilación del ADN en organismos eucariotas superiores

Los patrones de metilación en células eucariotas de mamíferos están determinados por 5mC. Esta base nitrogenada está organizada de manera exclusiva dentro de una secuencia específica de ADN que corresponde al dinucleótido C+G (CpG). Entre un 70%~80% de estas secuencias en el genoma pertenecen a los dinucleótidos CpG puntuales, generalmente metilados. La proporción restante de CpG (30%~20%), está distribuida específicamente dentro de regiones promotoras de ADN, conocidas como islas CpG. Estas secuencias tienen un tamaño de 200 a 1000 pares de base (pb), contienen una elevada composición simétrica de C+G, la cual excede del contenido GC global del genoma. Alrededor de un 70% de las islas CpG carecen de metilación (Law y Jacobsen, 2010; Cedar y Bergman, 2012).

Con respecto a los patrones de metilación en el genoma de plantas, se ha descrito la presencia de las islas CpNpG, las cuales presentan un contenido simétrico de C+N+G, donde N indica la presencia de cualquiera de las cuatro bases nitrogenadas A, C, G o T. Las islas CpNpG se encuentran hemimetiladas (sólo una de las dos hebras de ADN está metilada) y están distribuidas sobre transposones y elementos repetitivos de ADN (Law y Jacobsen, 2010; Cedar y Bergman, 2012).

Los patrones de metilación se mantienen estables en la replicación del ADN, mediante las Dnmts. Estas enzimas permiten que se conserven los marcadores de metilación en cada división celular, ya que transfieren grupos metilos sobre regiones de ADN hemimetiladas, formadas durante la replicación

del ADN y restauran un estado de metilación en ambas hebras (Law y Jacobsen, 2010).

La función biológica asociada a la base 5mC dentro del genoma eucariota consiste, en la mayoría de los casos, en el silenciamiento de la expresión genética mediante dos mecanismos moleculares: 1) la inhibición directa de interacciones entre proteínas regulatorias con secuencias específicas del ADN y 2) las alteraciones de la estructura y empaquetamiento de la cromatina, que proporcionan accesibilidad de las referidas proteínas regulatorias a sus respectivos sitios de unión al ADN (Cedar y Bergman, 2012). Adicionalmente, los patrones de metilación del genoma eucariota coordinan la replicación del cromosoma y el ciclo celular, ejerciendo control sobre mecanismos como la diferenciación celular y la inactivación de cromosomas o “*imprinting*” genómico.

Un proceso de desarrollo normal en organismos eucariotas, requiere una ejecución apropiada de un programa de metilación del genoma. Sin embargo, las alteraciones en los patrones de modificación del ADN, pueden representar elementos básicos de desórdenes de metabolismo y desarrollo. Por lo tanto, los patrones de metilación del ADN también se correlacionan a manifestaciones patológicas, siendo muy estudiado el rol de los patrones anormales de metilación del ADN sobre el desarrollo del cáncer, desórdenes neurológicos, entre otros (Cedar y Bergman, 2012).

II.3.2 Metilación del ADN en bacterias

Una visión clásica de la metilación del ADN en bacterias consiste en la distinción molecular de ADN propio y no propio. Este reconocimiento forma parte de los sistemas de Restricción-Modificación (RM), los cuales confieren protección contra la invasión de ADN foráneo (Jeltsch, 2002).

Los sistemas de RM están compuestos por genes que codifican enzimas de restricción y de modificación, las cuales generan un mecanismo de defensa en contra de la infección de bacterias por bacteriófagos. Tanto las enzimas de restricción (nucleasas dependientes de ADN) como las enzimas de

modificación o Dnmts (metilasas dependientes de ADN), catalizan sus reacciones bioquímicas sobre secuencias específicas de ADN (Cheng y Roberts, 2001; Jeltsch, 2002).

La protección es conferida por las enzimas de restricción, las cuales hidrolizan específicamente el ADN foráneo de la célula, en sitios de reconocimiento definidos. Por otra parte, el ADN celular está protegido, debido a que dichos sitios de reconocimiento se encuentran metilados por las enzimas Dnmts (Cheng y Roberts, 2001; Jeltsch, 2002).

Los sistemas de RM se clasifican en tres tipos: I, II y III; los cuales se clasifican en base a su composición de subunidades enzimáticas, posición de la hidrólisis, especificidad de la secuencia y requerimientos de cofactores. El sistema de restricción tipo I, consiste de una holoenzima de tres subunidades, que contienen las actividades de reconocimiento, modificación y restricción del ADN. El sitio de reconocimiento de ADN es asimétrico y la enzima hidroliza el ADN distante de la secuencia de reconocimiento. El sistema de restricción tipo II, las enzimas de modificación y restricción se encuentran separadas, funcionando de manera independiente. Ambas enzimas ejercen actividad catalítica en una misma secuencia de reconocimiento, la cual se caracteriza por ser una secuencia específica y palindrómica, de tamaño entre 4-40 pb. La restricción ocurre cerca o en el sitio de reconocimiento. El sistema de restricción tipo III, está constituido por una enzima de dos subunidades, las cuales contienen las actividades de reconocimiento, modificación y restricción del ADN. El sitio de reconocimiento es asimétrico y específico, de 5-6 pb. La endonucleasa de restricción, requiere dos sitios de reconocimiento inversamente orientados y no metilados, la hidrólisis del ADN ocurre a 25-27 pb río abajo de la secuencia de reconocimiento. La enzima de modificación sólo metila a una de las hebras de ADN (Srikhanta y col., 2010).

En células procariotas existe una amplia diversidad de sistemas de RM. Se han descrito más de 3000 sistemas de RM en todo el espectro de especies bacterianas conocidas, incluyendo a los dominios eubacterias y archaea. Por lo tanto, la mayoría de las Dnmts descritas, provienen de los sistemas de RM (Cheng y Roberts, 2001; Jeltsch, 2002).

La metilación del ADN presenta otros efectos sobre la fisiología bacteriana. Existen patrones de metilación del genoma bacteriano que se establecen por enzimas de modificación que no forman parte de ningún sistema de RM, designadas como Dnmts solitarias o huérfanas, que catalizan la transferencia de grupos metilo sobre hebras replicadas de ADN hemimetiladas. Estas enzimas se encuentran involucradas en mecanismos regulatorios de la replicación cromosomal, transferencia de plásmidos por conjugación, el sistema de reparación del ADN y la expresión génica.

El gen constitutivo *dam* codifica a una Dnmt solitaria de elevada procesividad y catálisis, conocida como ADN metiltransferasa en adenina o Dam, comúnmente descrita en la clase de Gamma-proteobacterias. La enzima Dam cataliza la incorporación de grupos metilos en A, formando la base modificada 6mA sobre la secuencia específica GATC hemimetilados o no metilados, formados durante la replicación cromosomal. El intervalo de transición entre estos estados de metilación de los motivos GATC, desarrollan el control de diversos efectos regulatorios globales, mediados por las alteraciones de la afinidad de proteínas regulatorias que interactúan con el ADN (Low y Casadesús, 2008; Collier, 2009; Casadesús y Low, 2013).

La enzima Dam contribuye con la regulación de la transcripción de genes. Las proteínas regulatorias de unión al ADN compiten con Dam por el enlazamiento a regiones promotoras. Los motivos GATC se encuentran protegidos de metilación por Dam, cuando las proteínas regulatorias se enlazan a su sitio de unión en el ADN. Por el contrario, cuando los motivos GATC están expuestos a metilación por Dam, ocurren alteraciones de la afinidad de proteínas regulatorias por el enlazamiento al ADN (Løbner-Olesen y col., 2005; Collier, 2009). El operón *pap* y el operón *agn43*, son representaciones clásicas de mecanismos epigenéticos de regulación de la expresión génica, mediada por la metilación del ADN. Debido a ellos, se considera que la presencia de regiones GATC no metiladas, podrían estar catalogadas dentro de un sistema de modificación epigenética del genoma bacteriano (Collier, 2009, McKelvie y col., 2012).

El operón *pap* (pili asociado a pielonefritis) codifica genes estructurales de un complejo proteico de superficie celular, que permite la adhesión e invasión de cepas patógenas sobre células uroepiteliales. El gen *papB* codifica una proteína co-regulatoria y el gen *papA*, los monómeros del pili. El gen divergente *papI* codifica a la proteína regulatoria PapI, que modula de manera positiva la expresión del operón *pap*. La unión de PapI con la proteína regulatoria global Lrp (proteína reguladora que responde a leucina), incrementa su afinidad a los sitios respectivos de enlazamiento.

La región regulatoria del operón *pap* está determinada por seis regiones de enlazamiento a Lrp, organizados en dos conjuntos (figura 6): 1) los sitios 1-3 de enlazamiento a Lrp, los cuales están próximos al sitio de inicio de la transcripción del operón *papBA* y, a su vez, coincide con la región de enlazamiento de la ARN polimerasa; 2) los sitios 4-6 de enlazamiento a Lrp, que están distantes al sitio de inicio de la transcripción del operón *papBA*. Adicionalmente, los sitios de enlazamiento 2 y 5 presentan solapamiento con el motivo GATC, descritos como motivos proximal y distal, respectivamente (Casadesús y Low, 2006).

La expresión del operón *pap* está regulada por la metilación de los motivos GATC, que se encuentran controlados por un mecanismo de exclusión: si estos motivos no están metilados por Dam, ocurre el enlazamiento de la proteína Lrp, mientras que si están metilados, no ocurre el enlazamiento de Lrp. La fase en la que está activa la expresión del operón *Pap* o fase “ON” (figura 6), el complejo proteico Lrp-PapI está enlazada en la región GATC^{distal}, lo que impide que Dam catalice la metilación de este motivo, sin embargo, la región GATC^{proximal} si es metilada por la enzima Dam. En cambio, en la fase “OFF” (figura 6), está inactiva la expresión del operón *pap*, la proteína Lrp está enlazada con la región proximal GATC, por lo que no ocurre la metilación por Dam, mientras que la región distal GATC si está metilada (Casadesús y Low, 2013).

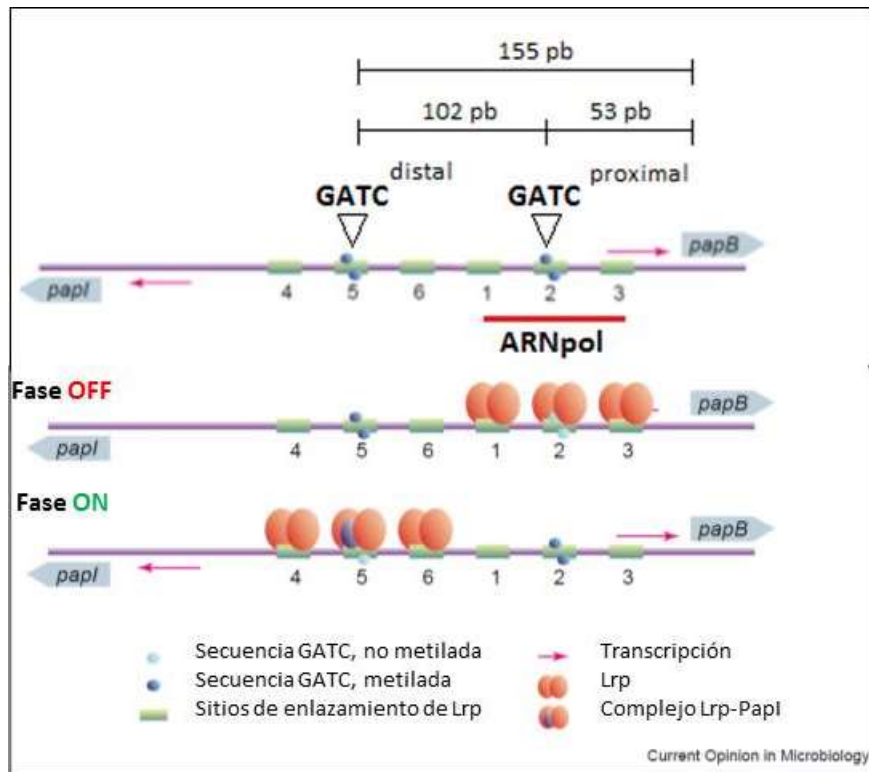


Figura 6: Fases estables de la expresión dependiente de metilación del operón *pap*. Panel superior: características generales del operón *pap*, se presentan los operones divergentes *papBA* y *papI*; en su región promotora están presentes seis sitios de enlazamiento de Lrp, los cuales el sitio 2 y 3 coinciden con los motivos GATC. Los sitios de enlazamiento de Lrp 1-3, coinciden con el sitio de enlazamiento de la ARN polimerasa. En la fase “OFF”, el motivo GATC^{proximal} no metilado, se enlazan la proteína Lrp, mientras que el motivo GATC^{distal}, está metilado por Dam. En la fase “ON”, el motivo GATC^{distal} no metilado, se enlaza el complejo Lrp-PapI, mientras que el motivo GATC^{proximal}, se encuentra metilado por Dam. Tomado y modificado de: Løbner-Olesen y col., 2005.

La epigenética abarca el estudio de aquellas modificaciones adaptativas de estructuras locales de los cromosomas, las cuales no cambian ni alteran la secuencia nucleotídica, sino que proporcionan información adicional al ADN, interfiriendo con aspectos de las funciones genéticas del ADN, tales como cambios dinámicos de los patrones de expresión génica. La metilación del ADN y las modificaciones covalentes de las proteínas estructurales de tipo histonas, son los mecanismos responsables de ejercer efectos globales sobre la topología de los cromosomas (Bird y Mcleod, 2004; Casadesús y Low, 2006; Gómez-Díaz y col., 2012).

En eucariotas se asume que el genoma de un organismo multicelular es idéntico en todos los tipos celulares, con menores excepciones. En cambio, el epigenoma es potencialmente dinámico y específico a cada tipo de célula (Doerfler, 2005). Las etiquetas epigenéticas causan complejos programas de expresión génica, que se establecen como mecanismos adaptativos ante las condiciones del entorno y, además, puede perpetuarse entre generaciones, garantizando una memoria de dicha actividad genética (Bird y Macleod, 2004).

Esta estrategia adaptativa también ejerce efectos en la sobrevivencia bacteriana. La heterogeneidad fenotípica representa una de las propiedades características de biopelículas bacterianas, las cuales surgen de la habilidad de cambios de la expresión génica, como respuesta adaptativa ante las condiciones fluctuantes del entorno (Casadesús y Low, 2013). Por lo tanto, en una organización grupal y coordinada como las biopelículas, deben existir estrategias moleculares que rebasen las rutas clásicas de regulación de la expresión genética, tales como los mecanismos epigenéticos.

III. ANTECEDENTES

Existe una densa recopilación de trabajos que buscan construir y caracterizar las rutas genéticas y las redes de señalización celular involucradas en la formación de biopelículas. Se han reportado propiedades fenotípicas comunes durante el desarrollo de biopelículas de cualquier especie, como los fenómenos de motilidad, la producción de componentes de la superficie celular y matriz extracelular; y la alteración del metabolismo, involucrado en la adaptación a condiciones adversas del entorno. Sin embargo, existe variabilidad entre géneros en las rutas de señalización celular en biopelículas, manifestándose estímulos del entorno especie-específicos en el desarrollo de biopelículas (An y Parsek, 2007; Kalivoda y col., 2013).

Las condiciones del entorno son determinantes en el mecanismo regulatorio del desarrollo de biopelículas. Moryl y colaboradores (2014) demostraron las diferencias en fenotipo que se expresan en las biopelículas formadas por el patógeno oportunista *Proteus mirabilis*, bajo distintas condiciones nutritivas de crecimiento, mediante la cuantificación de proteínas y de polisacáridos presentes en las biopelículas. Las biopelículas de *P. mirabilis* formadas en un medio de cultivo con dosis adicional de fuente de carbono, como la glucosa, albúmina, N-acetilglucosamina o N-acetilgalactosamina; hubo una sobreproducción cuatro veces mayor de cantidad de polisacáridos. Al disminuir los nutrientes del medio, se desencadenó un incremento de los niveles de polisacáridos en la mayoría de las biopelículas formadas, siendo 1,25 veces mayor, con respecto al control. La disminución de pH, también ocasionó el incremento en la cantidad de polisacáridos, esta fue dos veces mayor, comparada con el control. Por último, una dosis subinhibitoria de cefotaxim desencadena en la formación de biopelículas con el incremento entre 1,5-2,7 de polisacáridos (Moryl y col., 2014).

Rice y colaboradores (2005) demostraron que las condiciones del entorno afectan la morfología de las biopelículas de *S. marcescens*. Estas biopelículas presentan un morfotipo filamentoso, bajo condiciones nutritivas favorables. Sin embargo, cuando se reducen las cantidades de estos nutrientes

en el medio, se desarrollan biopelículas con una morfología de tipo microcolonias.

Las condiciones del entorno también son determinantes para el mecanismo regulatorio de desarrollo de biopelículas de *A. baumannii*. Lee y colaboradores (2008) describieron que el tratamiento con EDTA causó una disminución del 55 – 65 % en la formación de biopelículas de *A. baumannii*. Nwugo y colaboradores (2012) evidenciaron que la exposición de *A. baumannii* a dosis bajas de etanol, causa la sobre-producción de biopelículas. Mussi y colaboradores (2010) demostraron que la formación de biopelículas de *A. baumannii* es modulada en respuesta a la luz y la temperatura. La incubación de *A. baumannii* con luz azul a 24 °C, causa la ausencia o producción de biopelículas débiles. En oscuridad, reportaron la formación de biopelículas fuertes. Durante la incubación a 37 °C, se afecta la producción diferencial de biopelículas.

Son diversos los trabajos que demuestran que la interrupción o el incremento de la expresión de Dam en las γ -proteobacterias, causan respuestas fisiológicas pleiotrópicas. La metilación mediada por Dam es esencial en ciertas cepas bacterianas, así como es dispensable en otras. En general, este control epigenético está involucrado en modular la expresión de genes que confieren los fenotipos de virulencia en bacterias patogénicas.

En cepas de *E. coli* uropatogénica se ha descrito que los genes *pap* y *agn43*, los cuales codifican proteínas de membrana, están regulados por un mecanismo de variación de fase, dependiente de Dam (Wallecha y col., 2002). La sobreproducción de *dam* en *Y. enterocolitica*, conduce al incremento de transcritos de *flhDC* y de genes asociados a la síntesis de lipopolisacáridos, modificando las propiedades de motilidad y composición antigénica de este agente patógeno (Fälker y col., 2007). Robinson y colaboradores (2005) estimaron que una dosis de 1 UFC de *Y. pestis* inoculadas a ratones BALB/c es letal; en cambio, al emplear una cepa isogénica mutante de *Y. pestis* que carece del gen *dam*, se requiere una cantidad considerablemente mayor, de 2300 UFC de inoculación, para observar letalidad en ratones. Además, evidenciaron que 129 genes de *Y. pestis* C46 presentan alteraciones de

expresión génica: 76 genes incrementaron su expresión y 53 genes se encuentra disminuida su expresión.

Se están desarrollando tecnologías de secuenciación del ADN con sistemas de detección de la metilación global en genomas bacterianos, (metiloma). De esta manera se genera información completa sobre el epigenoma bacteriano, pudiendo evaluar así sus efectos sobre la regulación de la expresión génica (Beaulaurier y col., 2018).

Sin embargo, son escasos los estudios para elucidar directamente los efectos de los mecanismos epigenéticos sobre la formación de biopelículas. Los múltiples genes *mod* de *Neisseria gonorrhoeae* expresan Dnmts responsables de regular la expresión de genes asociados a su virulencia, mediante la metilación diferencial del genoma. En este trabajo sugieren que la metilación del ADN mediada por la enzima Mod, incrementa la tasa de crecimiento y disminuye la capacidad de adherencia bacteriana, lo que compromete el estilo de vida de biopelículas por una planctónica (Srikhanta y col., 2009; Kwiatek y col., 2015).

Yadav y colaboradores estudiaron la importancia de los patrones de metilación durante la formación de biopelículas. Estos autores determinaron el efecto de la 5-azacytidina y sinefungina sobre la formación de biopelículas del agente patógeno *Streptococcus pneumoniae*. La droga 5-azacytidina causa hipometilación del ADN e inhibe a las Dnmts, el metabolismo del ARN y la síntesis de proteínas. La sinefungina es un nucleósido natural, análogo a SAM, metabolito necesario en las reacciones de transmetilación, asistido por las enzimas Dnmts. Esta droga interfiere con la transferencia del grupo metilo de SAM a otros sustratos, como ADN, ARN, proteínas y otras moléculas, por medio de la inhibición competitiva. Para ambas drogas, en sus resultados demuestran que hubo una disminución de la biomasa de biopelículas por efectos dosis dependiente, a partir de concentraciones que no afectaron el crecimiento planctónico. Estas drogas no alteraron la cantidad de biomasa sobre biopelículas ya establecidas del pneumococo (Yadav y col., 2012; Yadav y col., 2014).

Aya y colaboradores (2015) demostraron el rol de la enzima Dam en la formación de las biopelículas de *Salmonella enterica*. A partir de un aislado clínico de *S. enterica*, formador de biopelículas, los autores construyeron la cepa mutante *S. enterica* ArJEG Δdam . La ausencia de metilación por Dam, afectó la expresión de genes *csgD* y *csgA*, que codifican reguladores maestros requeridos en la producción de biopelículas en *S. enterica* ArJEG; disminuyendo así la capacidad de formación de biopelículas. En sus resultados se vincula el rol regulatorio de la metilación del ADN en la formación de biopelículas bacterianas. También se ha descrito la influencia de la enzima Dam sobre la adherencia de *E. coli* uropatogénicas y enterohemorrágicas sobre superficies (Campellone y col. 2007; Stephenson y Brown, 2016).

IV. JUSTIFICATIVO

Las especies bacterianas *A. baumannii* y *S. marcescens* han surgido como cepas patógenas oportunistas, causales de enfermedades infecciosas severas, incluyendo las de tipo nosocomial. En estas especies bacterianas se han descrito numerosos mecanismos de virulencia, los cuales han sido extensamente caracterizados en *A. baumannii*, destacando la plasticidad genómica adquirida.

Las infecciones causadas por bacterias con capacidad de formar biopelículas son difícilmente erradicadas bajo terapia convencional de antibióticos, recibiendo un interés significativo en las áreas científicas y médicas. Las biopelículas pueden establecerse sobre los dispositivos médicos o superficies bióticas, interviniendo como fuentes de transmisión de enfermedades infecciosas dentro de los centros de salud. Por lo tanto, se hace necesario establecer las bases moleculares responsables de la formación de biopelículas, siendo un apoyo importante comprender los mecanismos de regulación de expresión génica involucrados. Sin embargo, éstas apenas están siendo elucidadas en el desarrollo de biopelículas de *A. baumannii* y *S. marcescens*. Se han publicado dos revisiones recientes que describen los factores de virulencia hasta ahora descritos en *A. baumannii*, incluyendo el desarrollo de biopelículas (Eze y col., 2018; Morris y col., 2019).

La metilación del ADN como etiqueta epigenética representa actualmente un “boom” en la búsqueda de conocimiento científico. La metilación del ADN es una modificación química esencial en procesos de desarrollo biológico en mamíferos y plantas, así como también es responsable de la etiología de manifestaciones fisiopatológicas. El estudio de la regulación de estas alteraciones como causa de enfermedades en humanos, ha permitido el desarrollo de drogas empleadas como terapias. Sin embargo, comparativamente, este mecanismo epigenético ha recibido poca atención en el estudio de su asociación con el desarrollo de biopelículas bacterianas.

El tratamiento de enfermedades infecciosas está amenazado por el inicio de la era post-antibiótica, un problema mundial en la cual el empleo indiscriminado de antibióticos y agentes antimicrobianos existentes ha

seleccionado resistencia bacteriana a múltiples drogas. Este fenómeno produce graves efectos secundarios: dispara los costes sanitarios e inutiliza el uso de terapia de antibióticos convencionales. En este caso, la epigenética pudiese proporcionar estrategias novedosas para el tratamiento de estas enfermedades infecciosas.

Son escasos los estudios que buscan asociar directamente los patrones de metilación del ADN con la formación de biopelículas bacterianas. No existen reportes previos nacionales o internacionales que busquen determinar la relación de la metilación del ADN sobre la formación de biopelículas de cepas patógenas de *A. baumannii* ni de *S. marcescens*.

Igualmente, se hace necesario el estudio de aquellos estímulos ambientales que favorecen o evitan la formación de biopelículas. Las condiciones del entorno pueden ser determinantes para el mecanismo regulatorio de desarrollo de biopelículas, lo que puede tener aplicaciones importantes con respecto a la disminución de capacidad de formación de biopelículas en el ambiente hospitalario.

La caracterización de los mecanismos genéticos, y posiblemente epigenéticos, que regulan la formación de biopelículas permiten comprender cómo los agentes patógenos colonizan una amplia variedad de nichos y persisten en el entorno, además de enriquecer los estudios sobre la fisiología bacteriana en este formato de crecimiento. Al adquirir conocimientos de este fenómeno biológico, cada vez se hacen más prometedora las aplicaciones biotecnológicas que pueden llevarse a cabo, como determinar el efecto de tratamientos alternativos que erradiquen la formación de biopelículas causales de infecciones en humanos y de biopelículas persistentes en ambientes hospitalarios.

V. OBJETIVOS

Objetivo general

Determinar la relación de la metilación del ADN y la formación de biopelículas en aislados bacterianos

Objetivos específicos

A nivel fenotípico

1. Determinar la capacidad de crecimiento planctónico en aislados bacterianos, en presencia de diferentes estímulos del entorno
2. Determinar la capacidad de formación de biopelículas en aislados bacterianos que crecen en presencia de diferentes estímulos del entorno

A nivel genotípico

1. Detectar las variaciones en los patrones de metilación del genoma bacteriano creciendo en formato de biopelículas, en las diferentes condiciones de su formación

VI. MATERIALES Y MÉTODOS

VI.1 Cepas bacterianas

VI.1.1 Aislados clínicos

Fueron suministrados dieciséis aislados bacterianos de muestras clínicas de pacientes provenientes del Laboratorio de Microbiología Clínica del Centro Médico de Caracas. Las muestras fueron analizadas bacteriológicamente por el personal del Laboratorio, mediante técnicas de diagnóstico e identificación convencionales y semi-automatizados (sistema VITEK[®]2). Ocho aislados fueron identificados como complejo *A. baumannii* y los otro ocho, como *S. marcescens*.

Las muestras suministradas fueron trabajadas manteniendo el nombre en el anonimato para garantizar la privacidad de los pacientes. Todos los procedimientos se realizaron de acuerdo con las normas establecidas por la Organización Mundial de la Salud para trabajos de investigación en seres humanos, la declaración de Helsinki, ratificada por la 52^a Asamblea General, Edimburgo, Escocia (Rothman, 2000) y el Código de Bioseguridad y Bioética de la República Bolivariana de Venezuela (MPPCTII, 2009).

Las muestras fueron tomadas de cuatro pacientes hospitalizados, cinco de consulta ambulatoria, tres provenientes de sala de emergencias y dos de pacientes supervisados en la unidad de terapia de adultos. Las muestras bacterianas provienen de ocho pacientes adultos mayores (a partir de 65 años), tres pacientes en adultez media (30 a 65 años), dos pacientes en adultez temprana (18 a 30 años) y un paciente infante, de dos años de edad. La mayoría de las muestras se aislaron de secreciones del aparato respiratorio, seguida de fluidos corporales de lesiones de la piel, mucosas e ingie. Se cuenta sólo con una muestra de orina. En la tabla 1 se encuentra organizada la información suministrada por cada cepa aislada e identificada.

Cabe destacar que dos de los aislados identificados como complejo *A. baumannii* y dos de *S. marcescens* provienen de la toma de muestra de un mismo paciente, en distintos tiempos. Se aisló la cepa *A. baumannii* 3910 y 20 días después, a una cepa asignada como *A. baumannii* 4840. Para *S.*

marcescens, la cepa 7172 fue aislada seis días después de haber sido detectada e identificada la cepa 6991.

Tabla 1: Cuadro resumen con datos relevantes de las muestras clínicas en las que fueron aisladas las cepas identificadas como complejo *A. baumannii* y *S. marcescens* por el sistema semi-automatizado VITEK 2 del Centro Médico de Caracas

	Número de registro	Datos del paciente		Características de la muestra clínica	
		Edad	Sexo	Sala/Unidad	Fuente de la muestra
Complejo <i>A. baumannii</i>	6596	47	M	Ambulatorio	Secreción inguinal
	3988	54	M	Ambulatorio	Secreción de herida
	7528	73	M	Hospitalización	Lavado bronquial
	2317	2	M	Emergencia	Esputo
	4848	71	M	Hospitalización	Flictena
	5796	-	M	Ambulatorio	Úlcera
	3910	27	F	Terapia de adultos	Secreción bronquial
	4840	27	F	Terapia de adultos	Secreción bronquial
<i>S. marcescens</i>	1315	80	M	Emergencia	Esputo
	3710	88	M	Hospitalización	Esputo
	7172	92	M	Terapia de adultos	Secreción bronquial
	2344	78	F	Ambulatorio	Secreción de pie
	4474	66	M	Ambulatorio	Orina
	3018	62	F	Hospitalización	Secreción bronquial
	6991	92	M	Emergencia	Esputo
	4680	-	M	Ambulatorio	Secreción de talón

Se presentan las características de edad (en años) y sexo (M: masculino; F: femenino) de los pacientes a partir de los cuales se aislaron las bacterias. Se indica la procedencia del paciente durante la toma de la muestra y el tipo de material biológico recolectado; -: dato no disponible.

VI.1.1.a Caracterización microbiológica

Los ensayos realizados como pruebas convencionales de caracterización microbiológica en el Laboratorio de Biología de Plásmidos Bacterianos fueron: la Tinción Gram y el crecimiento bacteriano en Agar MacConkey. Se emplearon como ensayos bioquímicos las pruebas de: la Catalasa, Oxidasa, MacConkey (Merck), Kligler (HIMEDIA), SIM (OXOID) y Citrato (OXOID). Para las cepas identificadas previamente como *A. baumannii*,

se evaluó su crecimiento en agar nutritivo (Merck) a 37 y a 42 °C. Por otra parte, las cepas identificadas como *S. marcescens*, se les realizó la prueba de DNAsas (Diagnostics Pasteur). Estos ensayos microbiológicos y bioquímicos fueron seleccionados como esquema de identificación, en función de lo propuesto por MacFaddin (2004).

Adicionalmente, se determinó la secreción del pigmento prodigiosina en los aislados clínicos de *S. marcescens*. Se procedió a inocular una colonia de *S. marcescens* en caldo nutritivo y en medio mínimo mineral M9. Éstos fueron incubados a temperatura ambiente, sin agitación durante siete días. Se detectó la biosíntesis y secreción de prodigiosina, mediante cambios en la coloración del medio a una tonalidad rosada o rojiza (Carbonell y col., 2000, con modificaciones).

VI.1.1.b Caracterización molecular

Para la identificación molecular de los aislados bacterianos de estudio, se realizaron ensayos de PCR con cebadores especie específicos.

Previamente, se extrajo el ADN total de los aislados bacterianos, de acuerdo al protocolo de Barghouthi (2011). Para ello, se tomaron colonias puras (de 24 h de crecimiento) de los aislados de interés y se resuspendieron en 100 µL de una solución amortiguadora (100 mM Tris HCl, 100 mM EDTA, 150 mM NaCl; pH 8) con lisozima (5 mg/mL). Se incubó a 35 °C durante 30 min. Posteriormente, se centrifugó (16000 x g, 3 min. Eppendorf 5415 C) para recuperar el sedimento, al cual se le agregó 40 µL de una solución de lisis (0,5 N de NaOH y 1% de SDS). Se calentó la muestra en baño de maría a 100 °C durante 10 min. Las muestras de ADN fueron resuspendidas con agua estéril hasta un volumen de 200 µL y luego diluidas en 1/10 y 1/100 con agua estéril.

En los ensayos de PCR se empleó el producto comercial *Taq* Master Mix ScieTrade (Cat N°E2110), el cual contiene la mezcla de reacción completa (2,5 U *Taq* ADN polimerasa, 3 mM MgCl₂, 20 mM KCl, 16 mM (NH₄)₂SO₄, 0,1% Tritón X-100, 1,6 mM mezcla de dNTPs, 20 mM Tris HCl; pH 9). Tan sólo se requiere la adición de agua, el ADN molde y los cebadores de estudio. Se

utilizó el termociclador “Gene Amp PCR System 9700” de “Applied Biosystems”.

Con la finalidad de determinar la presencia de ADN bacteriano y la ausencia de inhibidores, se emplearon los cebadores universales 8F y 1525R, que amplifican una región del gen de la subunidad 16S del ARN ribosomal 16S de eubacterias, obteniendo un fragmento de 1517 pb (Lu y col., 2000; Beumer y Robinson, 2005; Contreras y col., 2007). La secuencia del par de cebadores es:

8F: 5´AGAGTTTGATCCTGGCTCAG 3´;
1525R: 5´AAGGAGGTGATCCAGCC 3´

En la tabla 2 se muestran las condiciones de la PCR ensayadas con los cebadores universales 8F y 1525R.

Tabla 2: Condiciones de la PCR con los cebadores universales 8F y 1525R

Pasos	Ciclos*	Temperatura y tiempo
Desnaturalización inicial	1X	94 °C, 6 min
Desnaturalización		94 °C, 45 s
Hibridación	30X	55 °C, 45 s
Elongación		72 °C, 60 s
Elongación final	1X	72 °C, 10 min

*Se indica el número de repeticiones de los ciclos. min: minutos; s: segundos.

Para la identificación del ADN de *A. baumannii* se detectó un gen intrínseco de tipo *bla*_{OXA-51}, que codifica el fenotipo de resistencia a carbapenemasas. El producto de la PCR tiene un tamaño esperado de 353 pb (Turton y col., 2006). Las secuencias de los cebadores específicos son:

*bla*_{OXA-51}F: 5´ TAATGCTTTGATCGGCCTTG 3´;
*bla*_{OXA-51}R: 5´ TGGATTGCACTTCATCTTGG 3´

En la tabla 3 se muestran las condiciones de PCR estandarizadas con los cebadores *bla*_{tipoOXA-51}.

Tabla 3: Condiciones de la PCR con los cebadores *bla*_{OXA-51} para detectar *A. baumannii*

Pasos	Ciclos*	Temperatura y tiempo
Desnaturalización inicial	1X	94 °C, 3 min
Desnaturalización	35X	94 °C, 45 s
Hibridación		57 °C, 45 s
Elongación		72 °C, 60 s
Elongación final	1X	72 °C, 5 min

*Se indica el número de repeticiones de los ciclos. min: minutos; s: segundos.

Para la identificación del ADN de *S. marcescens* se detectó la presencia del gen *luxS*, que codifica la proteína S-ribosyl homocisteina liasa, requerida en la síntesis del autoinductor AI-2 del sistema de “*quorum sensing*”. El producto de la PCR tiene un tamaño esperado de 175 pb (Joyner y col., 2014). Las secuencias de los cebadores específicos son:

luxSF: 5′ TGCCTGGAAAGCGGCGATGG 3′;

luxSR: 5′ CGCCAGCTCGTCGTTGTGGT 3′

Además, se detectó la presencia del gen *ssrA*, que codifica a ARN mensajero-transferencia o “tmRNA”. El producto de la PCR tiene un tamaño esperado de 198 pb (Minogue y col., 2015). Las secuencias de los cebadores específicos son:

ssrAF: 5′ GCACTACATGCTTAGTCCAAT 3′;

ssrAR: 5′ CAGCTTAATACCCTGCTTAGAG 3′

En la tabla 4 se muestran las condiciones de los ensayos de PCR estandarizados con los cebadores *luxS* y *ssrA*.

Tabla 4: Condiciones de la PCR con los cebadores *luxS* y *ssrA* para detectar *S. marcescens*

Pasos	Ciclos*	Temperatura y tiempo (<i>luxS</i>)	Temperatura y tiempo (<i>ssrA</i>)
Desnaturalización inicial	1X	95 °C, 5 min	95 °C, 4 min
Desnaturalización	45X	94 °C, 45 s	95 °C, 30 s
Hibridación		64 °C, 40 s	50 °C, 30 s
Elongación		72 °C, 60 s	72 °C, 30 s
Elongación final	1X	72 °C, 5 min	72 °C, 7 min

*Se indica el número de repeticiones de los ciclos. min: minutos; s: segundos.

Para todas las reacciones de PCR se utilizó como control negativo de reacción, la mezcla de reacción de la PCR sin la adición de ADN molde. Se emplearon las cepas *A. baumannii* ATCC BAA 747 (CVCM: 2117) y *S. marcescens* ATCC 13880 (CVCM: 631) como controles positivos, donados por el Centro Venezolano de Colecciones de Microorganismos. Adicionalmente, para la identificación de *A. baumannii*, se empleó como control negativo *Serratia* spp. 1315; mientras que para la identificación de *Serratia* spp., se usó como control negativo *Acinetobacter* spp. 6596.

La visualización y chequeo de obtención de los productos de la PCR esperados, se realizaron mediante electroforesis en geles de agarosa teñido en bromuro de etidio. Se prepararon geles de agarosa al 2% (m/v) en solución amortiguadora TBE 0,5X (TBE 5X: 54 g/L Tris, 27,5 g/L ácido bórico y 0,004 M EDTA; pH 8), en cada bolsillo de los geles se colocaron 15 µL de los productos de PCR junto con 3 µL de solución de carga (2,5 mg/mL azul de bromofenol; 0,3 mg/mL glicerol, disuelto en solución amortiguadora TBE 1X) y bromuro de etidio. Se corrieron los productos de PCR durante 30 min a 100 V, en solución de corrida TBE 1X. Posteriormente, los geles fueron observados bajo el transiluminador de UV y se realizó el registro fotográfico.

VI.1.2 Construcción de cepas bacterianas mutantes Δdam

Para evaluar el rol de la enzima Dam en el proceso de formación de biopelículas, se propuso construir cepas mutantes con delección del gen *dam*. Se trabajaron con cepas clínicas de *S. marcescens*; así como en aislados clínicos, ambientales y de referencia de *E. coli* (tabla 5). Se empleó la técnica de mutagénesis sitio-dirigida de Datsenko y Wanner (2000).

Tabla 5: Cepas bacterianas y plásmidos utilizados en la construcción de bacterias mutantes

Característica relevante		Procedencia/Referencia
Cepas bacterianas		
<i>S. marcescens</i>		
7172	Cepa silvestre	CMC ^a , aislado clínico
2344	Cepa silvestre	CMC ^a , aislado clínico
3710	Cepa silvestre	CMC ^a , aislado clínico
3018	Cepa silvestre	CMC ^a , aislado clínico
70	Cepa silvestre	IMPam
<i>E. coli</i>		
MG1655	Cepa de referencia, λ^- F ⁻ protótrofa	IMPam/Brombacher y col., 2003
CQ3	Cepa silvestre	IMPam, aislado clínico
CQ6	Cepa silvestre	IMPam, aislado clínico
CQ8	Cepa silvestre	IMPam, aislado clínico
CQ4	Cepa silvestre	IMPam, aislado clínico
CQ10	Cepa silvestre	IMPam, aislado clínico
CQ22	Cepa silvestre	IMPam, aislado clínico
CQ24	Cepa silvestre	IMPam, aislado clínico
Ig4Sn1	Cepa silvestre	IMPam, aislado ambiental
Plásmidos		
pKD46	γ, β y <i>exo</i> del fago λ , <i>araC</i> -P _{<i>araB</i>} , <i>amp</i> ^R	IMPam/Datsenko y Wanner, 2000
pKD3	Plásmido molde para mutagénesis: <i>amp</i> ^R , <i>cat</i> ^R	IMPam/Datsenko y Wanner, 2000
pKD4	Plásmido molde para mutagénesis: <i>amp</i> ^R , <i>kan</i> ^R	IMPam/Datsenko y Wanner, 2000

^a Cepas descritas previamente en la tabla 1. CMC: Centro Médico de Caracas; IMPam; Instituto de Microbiología y Parasitología Médica (Buenos Aires-Argentina); *amp*: ampicilina; P: promotor; *ara*: arabinosa; *cat*: cloranfenicol; *kan*: kanamicina; ^R: resistencia

La mutagénesis sitio dirigida de un paso consiste en la inducción de una reacción de recombinación homóloga *in vivo*, mediada por elementos genéticos del fago λ . Esta reacción permite el intercambio de una secuencia de ADN específica del cromosoma por un gen selectivo de resistencia a antibióticos, que proviene de un segmento lineal de ADN. Para el cumplimiento de esta metodología, se utilizan dos elementos genéticos: el plásmido pKD46 y el casete funcional para la mutagénesis (Datsenko y Wanner, 2000; Gene Bridges, 2014; Murphy, 2015).

El plásmido pKD46 contiene los genes γ , β y *exo* del sistema de recombinación del fago λ (figura 7). Las proteínas expresadas de estos genes, forman parte de un sistema de recombinación λ Red. El gen γ codifica la proteína Gam, la cual inhibe la actividad exonucleasa RecBCD, permitiendo así la transformación de ADN lineal foráneo (en este caso, el casete funcional para la mutagénesis). Los genes β y *exo*, codifican las proteínas Beta y Exo, respectivamente, las cuales catalizan la reacción de recombinación homóloga de interés. La expresión de estos tres genes se encuentra mediada por el promotor inducible P_{araB} . El plásmido pKD46 se caracteriza además por contener un gen que le confiere resistencia a la ampicilina; así como una replicación de bajo número de copias, sensible a 42 °C (Gene Bridges, 2014; Murphy, 2015).

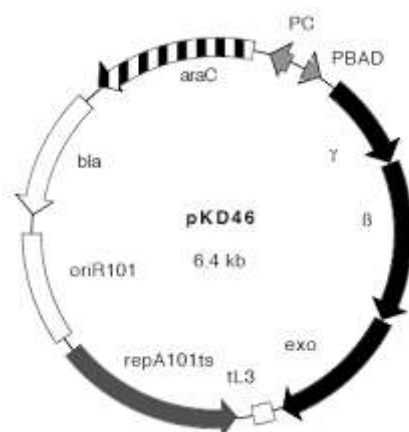


Figura 7: Características genéticas del plásmido pKD46. oriR101: origen de replicación; Gen *repA101ts*: codifica la proteína de inicio de replicación RepA101Ts, inactiva a 42 °C; Genes λ Red (*exo*, β , γ); PBAD: promotor inducible por arabinosa; gen *araC*: regulador transcripcional del promotor PBAD; gen *bla*: gen de resistencia a Ampicilina; tL3: sitio de terminación de la replicación (Tomado de: <http://www.biofeng.com>).

El casete funcional de la mutagénesis es un segmento lineal de ADN que contiene un gen de resistencia, flanqueado en sus extremos por segmentos que son homólogos a la región específica del genoma a ser reemplazado. El casete se construye mediante PCR (figura 8). El ADN molde es el plásmido pKD3 o pKD4, los cuales contienen los genes de resistencia a kanamicina y cloranfenicol, respectivamente, como marcadores de selección. El par de cebadores empleados se caracterizan por contener en su región 5' (tamaño molecular de 36 a 50 nt) la secuencia homóloga de ADN a ser reemplazado del genoma; en la región 3' (tamaño molecular de 18 a 24 nt) la secuencia complementaria al ADN molde pKD3 o pKD4, requerida para la amplificación de los genes de resistencia (Datsenko y Wanner, 2000; Gene Bridges, 2014).

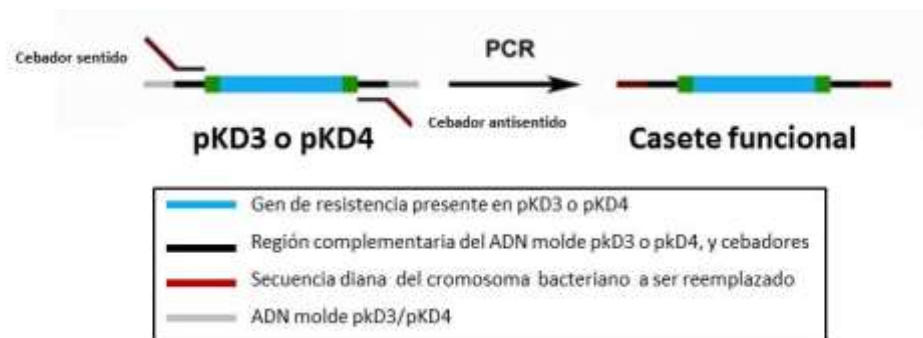


Figura 8: Construcción del casete para la mutagénesis funcional. Tomado y modificado de: Gene Bridges, 2014.

Previo a la inducción de la mutagénesis sitio dirigida se requiere que la cepa bacteriana a ser mutada sea incapaz de crecer en presencia de los antibióticos ampicilina (se selecciona la estabilidad de pKD46 en la bacteria), cloranfenicol y kanamicina (estabilidad del casete funcional para la mutagénesis durante la reacción de recombinación); y que contenga como material extracromosómico al plásmido pKD46.

VI.1.2.a Selección de cepas bacterianas

Un requisito para la construcción de mutantes con la metodología descrita por Datsenko y Wanner (2000), consiste en que las cepas a ser mutadas sean incapaces de crecer en presencia de los antibióticos ampicilina, cloranfenicol y kanamicina.

Se determinó el fenotipo de sensibilidad de las cepas bacterianas de estudio en presencia de estos antibióticos, a partir de ensayos de réplica en placa (Lederberg y Lederberg, 1952). Se evaluó el fenotipo de sensibilidad de las cepas bacterianas *E. coli* y *S. marcescens* de estudio, en presencia de 100, 200, 500 y 1000 µg/mL de ampicilina; 25 µg/mL de cloranfenicol y 50 µg/mL de kanamicina.

VI.1.2.b Transformación bacteriana del plásmido pKD46

La cepa bacteriana a ser mutada debe contener como material extra-cromosómico al plásmido pKD46. Se aisló el plásmido pKD46 de la bacteria *E. coli* BW25113/pKD46, por el método de extracción de plásmidos con un bajo número de copias. Este protocolo es similar a la lisis alcalina con SDS de Sambrook y Fritsch (1989), con tres modificaciones: 1) la solución I de lisis contiene lisozima (1 mg/mL); 2) la solución III de lisis está compuesta de Acetato de Amonio 7,4 M; 3) se empleó isopropanol para la precipitación del ADN plasmídico. Se realizó una electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (m/v), para la corroboración molecular del ADN plasmídico aislado. El tamaño molecular del plásmido pKD46 es de 6,4 kb.

Se probaron dos técnicas para la transformación de las cepas bacterianas a ser mutadas por el plásmido pKD46: choque térmico (42 °C por 45 s) de células quimiocompetentes con CaCl₂ y el método físico de electroporación. Este último consistió en la incorporación activa del ADN foráneo en bacterias electrocompetentes (sacarosa 300 mM y en frío). El choque eléctrico consistió en exponer a la muestra incubada de la bacteria a ser mutada y el plásmido pKD46, a un impulso eléctrico de 2 V durante 2 ó 3 s (200 OHMs de Resistencia y 25 µF de capacitancia), a través de un

electroporador (Cell-Porator, BIO-RAD). Se obtuvo una constante de tiempo idónea de 3,5 a 4,5. Se incubaron las células transformadas durante 90 min en medio SOC a 30 °C, en agitación. Posteriormente, se sembraron en placas de agar suplementadas con Ampicilina y se incubaron a 30 °C, para recuperar las células transformadas. Como ensayo control, no se adicionó a la experiencia el plásmido pKD46.

Para corroborar la transformación a nivel molecular, se aisló el ADN de células transformadas, utilizando el método de lisis alcalina con SDS. Las muestras fueron procesadas por electroforesis en geles de agarosa al 0,8 % (m/v).

VI.1.2.c Construcción de casete funcional para la mutagénesis

El casete funcional para la mutagénesis se construyó mediante PCR. En esta reacción el ADN molde consistió del plásmido pKD3 o pKD4. Los cebadores contenían en su segmento 5' la secuencia de ADN homóloga de los extremos del gen *dam*, y su segmento 3', la secuencia de los plásmidos pKD3 o pKD4. Los oligonucleótidos diseñados para *S. marcescens* fueron:

F:5'-TCCGCCGCTCTGAATTGTATAAGTAGCTAACTGACGGCATGTGTGTAGGCTGGAGCTGCTT-3';
R:5'-GGTAGTCATTATACGCCGGGCGCCTGCTGCTTTCCGGCTTACATATGAATATCCTCCTTAG-3'.

Los oligonucleótidos diseñados para *E. coli* fueron:

F:5'-TTCTCCACAGCCGAGAAGGTGTAATTAGTTAGTCAGCATGTGTGTAGGCTGGAGC-3'
R:5'-GGCAATCAAATACTGTTTCATCCGCTTCTCCTTGAGAATTACATATGAATATCCTCCTTAG-3'

Las condiciones estandarizadas de la PCR se muestran en la tabla 6. Los productos de la PCR fueron visualizados en geles de agarosa al 0,6 % (m/v).

El tamaño molecular de los casetes funcionales de pKD3 y pKD4 es de 1,1 y 1,6 kb, respectivamente. Se procedió a purificar el casete de las bandas del gel a partir del kit Purificación de Fragmentos de ADN en Geles de Agarosa (Roche).

Tabla 6: Condiciones de la PCR para la construcción del casete funcional para la mutagénesis

Pasos	Ciclos*	Tiempo y temperatura	
		<i>S. marcescens</i>	<i>E. coli</i>
Desnaturalización inicial	1X	5 min a 95 °C	5 min a 95 °C
Desnaturalización		1 min a 95 °C	1 min a 95 °C
Hibridación	28X	1 min a 52 °C, pKD3 o 1 min a 57 °C, pKD4	1 min a 57 °C
Elongación		2 min a 72 °C	2 min a 72 °C
Elongación final	1X	10 min a 72 °C	10 min a 72 °C

*Se indica el número de repeticiones de los ciclos. min: minutos.

VI.1.2.d Mutagénesis sitio dirigida, de inactivación en un paso

En un pre-cultivo bacteriano (LB+Ampicilina 1000 µg/mL), se indujo la expresión del plásmido pKD46, suplementando al medio arabinosa al 0,5 ó 1% (m/v), incubándose a 30 °C durante 2 a 3 h, hasta alcanzar una $DO_{\lambda=600nm} = 0,6$ de crecimiento bacteriano.

A partir de este cultivo bacteriano, se formaron bacterias electrocompetentes con glicerol frío al 10% (v/v). La mezcla del casete funcional respectivo y las bacterias electrocompetentes ($\approx 1:10$), se sometió a un choque eléctrico, de pulso de 2,5 V durante 2 a 3 s (200 OHMs de Resistencia y 25 µF de capacitancia). Se obtuvo una constante de tiempo de 3,5 a 4,5. Posteriormente, las células transformadas fueron recuperadas en medio SOC, incubadas durante 3 h a 37 °C sin agitación. Luego se incubó a 30 °C durante 12 h, permitiendo así que se lleve a cabo la reacción de recombinación homóloga. Para la selección de las bacterias recombinantes, se sembraron las bacterias recuperadas en placas de agar suplementadas con

cloranfenicol o kanamicina, según el casete empleado. Como control del ensayo, no se adicionó a la experiencia el casete funcional.

VI.1.2.e Caracterización genotípica y fenotípica de las cepas mutantes construidas

VI.1.2.e.i PCR de colonias

Para corroborar el genotipo recombinante de las cepas mutantes construidas, se empleó un ensayo de PCR, tomando como fuente de ADN molde a una colonia bacteriana transformada, crecida durante 18 h.

Los oligonucleótidos empleados en esta reacción fueron:

F: 5'-TACGACAACCTGAACGGTTG-3';

R: 5'-GCAGCGTGCGGTCAACATG-3'

El tamaño molecular del amplicón esperado a partir de la PCR de colonias de cepas silvestres (*dam*⁺) es de 1486 pb. Para las cepas mutantes *Δdam*, se espera un tamaño molecular del producto de PCR de 1600 pb. En la tabla 7, se presentan las condiciones empleadas en la PCR de colonias.

Tabla 7: Condiciones de la PCR de colonias para la corroboración del genotipo recombinante

Pasos	Ciclos*	Tiempo y temperatura
Desnaturalización inicial	1X	10 min a 95 °C
Desnaturalización	30X	1 min a 95 °C
Hibridación		1 min a 58 °C
Elongación		1 min a 72 °C
Elongación final	1X	3 min a 72 °C

*Se indica el número de repeticiones de los pasos en los ciclos de la PCR. min: minutos

VI.1.2.e.ii Sensibilidad al análogo de bases 2-Aminopurina

Se evaluó la sensibilidad del crecimiento bacteriano en presencia del análogo de bases 2-Aminopurina (Aya y col., 2015). Para ello, se realizó una réplica en placa, en el que un mismo inóculo de la cepa mutante construida, se agotó sobre un medio de agar nutritivo suplementado con 100 mg/mL de 2-Aminopurina, seguido de su agotamiento en medio agar nutritivo.

VI.1.2.e.iii Alteraciones en los patrones de restricción del ADN

A nivel molecular, se evaluaron las alteraciones del patrón de metilación del ADN, causada por la ausencia del gen *dam*. El ADN genómico de las bacterias mutantes construidas (aislado con el kit QIAGEN: DNA isolation), fueron digeridas por las enzimas de restricción DpnI, MboI y Sau3A1 (ThermoScientific). Estas enzimas reconocen y catalizan la hidrólisis de la secuencia 5'-GATC-3', en función de su estado de metilación. Para ello, el ADN genómico aislado se incubó con la enzima de restricción en cuestión, con su respectiva solución amortiguadora, durante 1h y 30 minutos, a 37 °C. El producto de la digestión del ADN genómico fue analizado por electroforesis en geles de agarosa. Como control, se emplearon las mismas condiciones de reacción, sin la adición de las enzimas de restricción (Sarnacki y col., 2009; Aya y col., 2015).

VI.2 Ensayos de formación de biopelículas

VI.2.1 Método de Agar Rojo Congo

El método Agar Rojo Congo (Zhou y col., 2013) se empleó para identificar la capacidad de producción y secreción de componentes proteicos y exopolisacáridos de las cepas de estudio. Para ello, las cepas fueron incubadas en medios de agar YESCA (10 g/L de caseína hidrolizada con ácido; 1 g/L de extracto de levadura; 20 g/L agar) suplementado con 50 µg/mL de Rojo Congo y 1 µg/mL de Azul Comassie. Las soluciones “stock” de los

colorantes se solubilizaron en agua, a una concentración de 0,01 g/mL; se esterilizaron por filtración y fueron almacenados a 4 °C.

Los medios de cultivos inoculados con las respectivas cepas, fueron incubados a temperatura ambiente y a 37 °C, durante 48 h. La morfología de las colonias se evaluaron en función de los tres morfotipos descritos en la literatura: “*rdar*” que son colonias rojas, secas y rugosas, indicativas de secreción de fibras de tipo curli y celulosa; “*pdar*”, colonias rosadas, secas y rugosas, indicativas de secreción de celulosa mas no de fibras de tipo curli y “*saw*”, colonias lisas y blancas, no secretoras de celulosa ni de fibras de tipo curli. Se utilizó como control de ensayo a una cepa de *S. enterica Typhimurium* (CVCM 323), por presentar el morfotipo característico de “*rdar*” en Agar Rojo Congo (Römling, 2005; Aya y col., 2015). El morfotipo “*pdar*” se observó en la cepa de referencia *E. coli* HB101, ya que contiene una mutación en el gen *crl* que impide la síntesis de las fibras proteicas de tipo curli (Arnqvist y col., 1992; Brombacher y col., 2006).

VI.2.2 Método de detección por cristal violeta

Se identificó la capacidad de formación de biopelículas de las cepas de estudio y se semi-cuantificó su biomasa, mediante ensayos *in vitro* con microplacas de poliestireno estériles (“*Tissue Culture Testplate*”, SPL Life Science), de 96 pozos (Merritt y col., 2005; Stepanović y col., 2007; O’Toole, 2011; Ramos, 2014; Aya y col., 2015).

Se diluyó 1/100 a un cultivo bacteriano crecido en caldo nutritivo durante 24 horas, a 37 °C. La composición del medio de cultivo empleado en la dilución fue de caldo nutritivo o medio mínimo mineral M9 (tabla 8). El cultivo bacteriano diluido se sembró por triplicado en la microplaca, agregando 200 µL a cada pozo. Luego, las microplacas fueron incubadas, sin agitación y en oscuridad, durante 72 horas, a temperatura ambiente o 37 °C.

Tabla 8: Cuadro resumen de la composición base de los medios de cultivo empleados

Caldo nutritivo	Concentración g/L	MMM M9	Concentración g/L
Extracto de carne “Lab-lemco”	1	Fosfato de Sodio Dibásico (Na_2HPO_4)	6
Extracto de levadura	2	Fosfato de Potasio Monobásico (KH_2PO_4)	3
Peptona	5	Cloruro de amonio (NH_4Cl)	1
Cloruro de Sodio (NaCl)	5	Cloruro de Sodio (NaCl)	0,5
		Glucosa	2
		Sulfato de Magnesio (MgSO_4)	0,4
		Vitamina B1	0,005

g/L: gramos de los componentes por cada Litro de medio de cultivo; MMM: Medio Mínimo Mineral. Entre paréntesis se presenta la fórmula molecular de las sales.

Culminado el período de incubación, se midió la densidad óptica antes de la tinción con cristal violeta en un lector de microplacas (SPECTRA Fluor - TECAN), a una $\lambda=600$ nm, sin agitación. Estos resultados se identificaron como DOa. Posteriormente, se realizaron los lavados a las microplacas, los cuales permitieron la remoción de medio de cultivo y de bacterias planctónicas en los pozos. Se dispusieron de cuatro bandejas en serie, las cuales contenían agua destilada, una de las bandejas se empleó como recolector de los desechos. Los lavados consistieron en sumergir una microplaca en una de las bandejas con agua, seguido de su agitación moderada sobre un papel absorbente. Se realizó este paso de lavado tres veces y se dejó secar.

Para la visualización y cuantificación de las biopelículas, la biomasa formada y adherida a los pozos fue teñida con una solución cristal violeta. Se le agregó a cada pozo 200 μL de una solución de 0,01 % (m/v) de cristal violeta. Se incubó en oscuridad y a temperatura ambiente durante 30 minutos.

Se realizó la remoción del cristal violeta excedente, mediante tres lavados a las microplacas, siendo sumergidas en agua y agitadas vigorosamente sobre un papel absorbente y luego, se dejaron secar.

Para el revelado, se le adicionó 200 µL de etanol absoluto a cada uno de los pozos de las microplacas teñidas, incubándose en oscuridad a temperatura ambiente, durante 30 minutos. Los resultados fueron cuantificados, mediante la medición en un lector de microplacas (SPECTRA Fluor - TECAN) a una $\lambda=600$ nm, del cristal violeta adherido en la superficie de cada pozo y resuspendido en etanol. Previo a cada lectura, en el aparato lector se realizó un paso previo de agitación vigorosa de la microplaca, permitiendo resolubilizar de manera homogénea el colorante enlazado a la biopelícula de los pozos. Estos resultados se designaron como DOd. Por cada condición ensayada, se realizaron tres réplicas.

Se empleó a la cepa *A. baumannii* AB4 como control positivo, productora de biopelículas, descrita previamente como formadora de biopelículas fuertes en caldo LB a 37 °C (Ramos, 2014). Se usó a *E. coli* HB101 descrita como control de cepa no formadora de biopelículas.

Los resultados obtenidos de la biomasa de biopelículas formadas, fueron expresados como:

$$DO \text{ biopelículas} = \bar{x}(DOd - DOc)$$

Siendo DOc:

$$DOc = \bar{x}(DOd_{\text{blanco}}) + 3 \times [SD (DOd_{\text{blanco}})]$$

Donde:

DO biopelículas Biomasa de biopelículas formadas

DOd DO registradas después de la tinción con cristal violeta

DOc Punto de corte. Distingue las bacterias formadoras o no de biopelículas

DOd_{blanco} DO registradas de los pozos incubados con medio de cultivo sin inóculo bacteriano, después de la tinción con cristal violeta

$\bar{x}$ Promedio

SD Desviación estándar

Las bacterias formadoras de biopelículas se les asignan un valor numérico mayor a cero. Las no formadoras son iguales o menores a cero que, por motivos prácticos, éste último se presenta también con valor de cero (Stepanović y col., 2007). La distribución de los valores de DO biopelículas obtenidos, se presentan en formato de caja y bigote, realizado por el programa R (Versión 3.4.0). La caja delimita el rango del percentil 25 y 75, con una línea horizontal que representa la mediana. Los datos individuales que están fuera del diagrama de caja y bigote, son valores atípicos y se presentan como círculos. La evaluación de diferencias estadísticas entre tratamientos fueron realizados por el programa R, empleando la prueba ANOVA multifactorial.

Además, las cepas fueron clasificadas en categorías “0”, “1”, “2” y “3” de formadoras de biopelículas, mediante la comparación de los valores de DOd, con valores predeterminados derivados de la DOc, como se muestra en la tabla 9 (Stepanović y col., 2007).

Tabla 9: Criterios de clasificación de las cepas en función a la producción de biopelículas

Clasificación de biopelículas	Capacidad de producción de biopelículas	Criterio de clasificación
0	No formadoras	$DOd \leq DOc$
1	Débiles	$DOc \leq DOd \leq 2 \times DOc$
2	Moderadas	$2 \times DOc \leq DOd \leq 4 \times DOc$
3	Fuertes	$DOd \geq 4 \times DOc$

DOd: DO después de la tinción con cristal violeta; DOc: Punto de corte

Las unidades de adhesión (UA) es el parámetro que correlaciona la biomasa adherida a la superficie de poliestireno de las microplacas, con respecto a la densidad de crecimiento celular (Gualdi y col., 2008; Nucleo y col., 2009; Aya y col., 2015). Al normalizar los valores de DO biopelículas, se pueden comparar la capacidad de producción entre biopelículas y se evitan las variaciones causadas por el crecimiento bacteriano de las distintas condiciones experimentales ensayadas (Tomaras y col., 2003).

Las UA se expresan como:

$$UA = DO \text{ biopelículas} / DOa$$

Siendo DOa:

$$DOa = \bar{x}(DOa - DO_{\text{blanco}})$$

Donde:

UA	Unidades de Adhesión
DO biopelículas	Biomasa de biopelículas formadas
DOa	DO registradas antes de la tinción con cristal violeta
DO _{blanco}	DO registradas de los pozos incubados con medio de cultivo sin inóculo bacteriano, antes de la tinción con cristal violeta
$\bar{x}$	Promedio

VI.2.3 Efecto de estímulos del entorno sobre la formación de biopelículas

Para determinar la posible relación de los patrones de metilación en el genoma bacteriano con la capacidad de formación de biopelículas, se evaluó el efecto de diversos tratamientos nutritivos, físicos y químicos en el desarrollo de las biopelículas. Se empleó la metodología descrita en la sección VI.2.2, modificando el medio a realizar la dilución 1/100 del cultivo bacteriano, ya que fue suplementado con el tratamiento nutritivo o químico de ensayo. Basados en la bibliografía consultada, se evaluaron las condiciones expuestas en la tabla 10. Se trabajaron con las cepas: *A. baumannii* 6596, 5796, 3910; *Acinetobacter* spp. 4848; *S. marcescens* 7172, 2344 y 4474; debido a su capacidad de formación de biopelículas. La evaluación de diferencias estadísticas entre tratamientos fueron realizados por el programa R, empleando la prueba ANOVA multifactorial.

Tabla 10: Tratamientos nutritivos, físicos y químicos evaluados como condiciones para medir el efecto en el desarrollo de biopelículas bacterianas

	Medio de cultivo	Temperatura	Condición evaluada	Referencia
1	1/10 Caldo Nutritivo	TA	Dilución de nutrientes	
2	Caldo nutritivo + 500 mM de Glucosa	TA	Exceso de fuente de carbono	Moryl y col., 2014
3	MMM M9 + 0,5 µM de metionina	TA		
4	MMM M9 + 2,5 µM de metionina	TA	Suplemento de fuente de	Gnanadhas y col.,
5	MMM M9 + 5 µM de metionina	TA	grupos metilos	2005
6	MMM M9 + 25 µM de metionina	TA		
7	Caldo Nutritivo + 1% de Etanol	37 °C	Estrés químico	Smith y col., 2004
8	Caldo Nutritivo + 30 mg/mL de EDTA	37 °C	Agente quelante	Raad y col., 2006
9	MMM M9 + 0,9 mM de CTAB	TA	Surfactante catiónico	
10	MMM M9 + 7 mM de SDS	TA	Surfactante aniónico	Simões y col., 2005

MMM: Medio mínimo mineral. EDTA: EtilenDiaminoTetraAcético; CTAB: Bromuro de CetilTrimetilAmonio; SDS: DodecilSulfato Sódico; TA: temperatura ambiente.

VI.3 Análisis de la metilación del genoma de bacterias en biopelículas, mediante ensayos de restricción enzimática

Se emplearon enzimas de restricción para generar patrones de fragmentos de ADN digeridos, que permitieron detectar la metilación global del genoma de bacterias creciendo en formato de biopelículas. Las condiciones del entorno empleadas para el desarrollo de biopelículas están expuestas en la tabla 11. Se trabajaron con las cepas: *A. baumannii* 3910, *S. marcescens* 4474, *E. coli* MG1655 y *E. coli* MG1655 Δdam .

Tabla 11: Condiciones del entorno ensayadas para evaluar los patrones de metilación del ADN en el desarrollo de biopelículas bacterianas

Cepas bacterianas	Medios de cultivo	
	Control	Estímulos del entorno
<i>A. baumannii</i> 3910	Caldo nutritivo, TA	Caldo nutritivo + 500 mM de glucosa, TA
<i>S. marcescens</i> 4474	Caldo nutritivo, 37 °C	Caldo nutritivo + 1% de etanol, 37 °C
<i>E. coli</i> MG1655	MMM M9, TA	MMM M9 + 5 µM de metionina, TA
<i>E. coli</i> MG1655 Δdam	MMM M9, TA	MMM M9 + 5 µM de metionina, TA

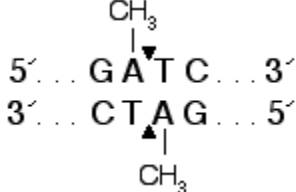
MMM: Medio mínimo mineral; TA: temperatura ambiente.

La biomasa de biopelículas se obtuvo de ensayos *in vitro* con placas de poliestireno estériles (NUNC Brand Products), de seis pozos. Se diluyó 1/100 a un cultivo bacteriano crecido en caldo nutritivo durante 24 horas, a 37 °C. La composición del medio de cultivo empleado en la dilución depende de las condiciones de ensayo, presentadas en la tabla 11. El cultivo bacteriano diluido se sembró en los pozos de tres a cuatro placas, agregando 5 mL a cada pozo. Luego, las placas fueron incubadas, sin agitación y en oscuridad, durante 72 horas, a temperatura ambiente o 37 °C.

Culminado el período de incubación, se removió el líquido residual del medio de cultivo, y se desprendieron las biopelículas adheridas a las superficies de los pozos con raspadores celulares de plástico estériles (COSTAR). Se recolectó la biomasa de biopelículas, hasta obtener un rango de masa del material biológico entre 0,1 a 0,2 g. El ADN genómico de las bacterias crecidas en formato de biopelículas, se aisló con el kit de extracción “*DNeasy PowerBiofilm*” (QIAGEN. Cat N°/ID: 24000-50). La visualización y chequeo de la calidad del ADN genómico aislado de biopelículas, se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa al 1% (m/v). Se cuantificó al ADN genómico aislado con el kit “*Quant-iT ds DNA HS Assay*” de (Invitrogen. Cat N° Q32851).

El análisis de la metilación global se realizó con las secuencias GATC presentes en el genoma de las cepas bacterianas de estudio. Los patrones de digestión del ADN se obtuvieron con las enzimas de restricción *Sau3AI* (R0169S de NEW ENGLAND BioLabs), *DpnI* (R0176S de NEB) y *MboI* (R0147S de NEB). Estas endonucleasas reconocen la secuencia GATC, sin embargo, catalizan su hidrólisis en función de la sensibilidad que presenten por su estado de metilación. En líneas generales, los patrones de digestión de ADN obtenidos con la enzima *Sau3AI*, permiten detectar todas las secuencias GATC presentes en el genoma, independientemente de su estado de metilación. La enzima *DpnI*, que es dependiente de la metilación del ADN, produce patrones de digestión en función de aquellas secuencias GATC que se encuentren metiladas. Por último, la enzima *MboI*, sensible a la metilación del ADN, genera patrones de digestión que detectan las secuencias GATC no metiladas (tabla 12).

Tabla 12: Propiedades de restricción de las enzimas endonucleasas Sau3AI, DpnI y MboI

Enzima de restricción	Tipo	Secuencia de reconocimiento y restricción	Sensibilidad* a metilación por Dam	Solución amortiguadora de NEB	Temperatura óptima de reacción
Sau3AI	II		No sensible	1.1	37 °C
DpnI	II		No sensible**	CutSmart	37 °C
MboI	II		Bloqueada	CutSmart	37 °C

*Definen como sensible aquella digestión que es afectada o bloqueada por sustratos de ADN metilados. **Esta enzima requiere de sustratos metilados para llevar a cabo su catálisis. Tomado de: <https://international.neb.com>.

Para cada uno de los ensayos de restricción, el ADN genómico aislado se incubó con la enzima de restricción en cuestión, con su respectiva solución amortiguadora, durante una hora a 37 °C. En la tabla 13 se resumen el volumen y el orden de los componentes agregados para las reacciones enzimáticas en general.

Tabla 13: Componentes presentes en la mezcla de la reacción de restricción enzimática

	Ensayo control	Ensayo enzimático
Agua estéril	16 µL	15 µL
Solución amortiguadora de NEB (10X)	2 µL	2 µL
ADN	2 µL	2 µL
Enzima de restricción (5 a 20 U/ µL)	-	1 µL
Volumen final	20 µL	20 µL

U: 1 Unidad se define como la cantidad de enzima requerida para digerir 1 µg de ADN, en 1 h a 37 °C, en un volumen total de 50 µL.

El producto de la digestión del ADN genómico fue analizado por electroforesis en geles de agarosa al 1,5 % y teñidos en bromuro de etidio. En cada bolsillo de los geles se colocaron 20 µL de la reacción enzimática junto con 3 µl de solución de carga. Se empleó el sistema de electroforesis Sub-Cell GT (BIO-RAD), cuyas dimensiones del molde del gel son de 15 × 15 *cm*. Con esta corrida electroforética, se garantiza una mejor separación de los fragmentos digeridos de ADN de los ensayos de restricción. Como control, se emplearon las mismas condiciones de reacción, sin la adición de las enzimas de restricción. El registro fotográfico de los geles fue analizado por el programa GelAnalyzer 2010^a (<http://www.gelanalyzer.com/>).

VII. RESULTADOS

VII.1 Cepas bacterianas

VII.1.1 Caracterización de los aislados bacterianos clínicos

De acuerdo con la información suministrada del laboratorio de Microbiología Clínica del Centro Médico de Caracas, ocho de los 16 aislados clínicos proporcionados fueron identificados como complejo *Acinetobacter baumannii*; los otros ocho, como *Serratia marcescens* (tabla 1, materiales y métodos). Los resultados de los ensayos bioquímicos convencionales empleados, concuerdan con las características fenotípicas esperadas en los ocho aislados identificados como *S. marcescens* por la tecnología de VITEK 2 (tabla 14). Se esperaba obtener en *S. marcescens* bacterias Gram Negativas, Catalasa positiva, Oxidasa negativa, fermentadora de glucosa mas no de lactosa, degradadora de citrato, por lo general mótil, no productora de ácido sulfhídrico ni degradadora de indol a triptófano; degradadora de ADN, por la presencia de enzimas Dnasas (Mac Faddin, 2004).

Tabla 14: Manifestaciones fenotípicas obtenidas de los ensayos bioquímicos convencionales para la identificación de los ocho aislados clínicos de *Serratia* spp.

Prueba bioquímica	Control de reactivos	Aislados de <i>Serratia</i> spp.							
	<i>E. coli</i> MG1655	1315	3710	7172	2344	4474	3018	6991	4680
Tinción Gram	GN	GN	GN	GN	GN	GN	GN	GN	GN
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar MacConkey	C. Lac ⁺	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻
Agar Kligler	A/A	Alc/A	Alc/A	Alc/A	Alc/A	Alc/A	Alc/A	Alc/A	Alc/A
Agar Simmons Citrato	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SIM Indol	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
DNasas	-	+	+	+	+	+	+	+	+

Los resultados de las reacciones bioquímicas obtenidos corresponden con el fenotipo esperado para *S. marcescens*. GN: Tinción Gram Negativo; Lac⁺: Fermentador de Lactosa; Lac⁻: No Fermentador de Lactosa; C: Crecimiento; A/A: Ácido/Ácido; Alc/A: Alcalino/ Ácido; +: resultados positivos (90-100%); -: resultados negativos (0-10%)

Se determinó, además, la capacidad de secreción del pigmento prodigiosina en *S. marcescens*. Se observó que cuatro de las ocho cepas de estudio son secretoras de prodigiosina en caldo nutritivo, éstas fueron: *S. marcescens* 3710, 3018, 6991 y 4680; la cepa 2344 presentó una coloración rosado pálido. En medio mínimo mineral M9, no se observó ningún cambio de coloración del medio vinculado a la síntesis de prodigiosina (figura 9).



Figura 9: Resultados del ensayo secreción de prodigiosina en *S. marcescens*. Incubación de cepas de *S. marcescens* en **caldo nutritivo**. Las cepas N° 3710, 2344, 3018, 6991 y 4680, presentan pigmentación rosado-roja. Incubación de cepas de *S. marcescens* en medio **mínimo mineral M9**. Ninguna de las cepas de estudio presentó pigmentación rosado-roja. Blanco: medio de cultivo sin inóculo bacteriano. Sma: *S. marcescens*.

En la tabla 15, se listan las características de las muestras clínicas en función de la pigmentación de las cepas de *S. marcescens*. Las cepas pigmentadas N° 3710, 3018 y 6991, fueron tomadas del tracto respiratorio, mientras que las cepas pigmentadas N° 2344 y 4680, provienen de secreciones del pie.

Tabla 15: Cuadro resumen de las características de la muestra clínica de las cepas de *S. marcescens*, destacando su pigmentación en las condiciones de medio de cultivo ensayadas

	Número de registro	Características de la muestra clínica		Pigmentadas/Prodigiosina	
		Sala/Unidad	Fuente de la muestra	Caldo nutritivo	Caldo MMM M9
<i>S. marcescens</i>	1315	Emergencia	Esputo	-	-
	3710	Hospitalización	Esputo	++	-
	7172*	Terapia de adultos	Secreción bronquial	-	-
	2344	Ambulatorio	Secreción de pie	+	-
	4474	Ambulatorio	Orina	-	-
	3018	Hospitalización	Secreción bronquial	++	-
	6991*	Emergencia	Esputo	++	-
	4680	Ambulatorio	Secreción de talón	++	-

++: cepas pigmentadas, secretoras de prodigiosina; +: cepas pigmentadas, secreción de prodigiosina, presentando tonalidad rosado claro; -: cepas no pigmentadas, no secretoras de prodigiosina. *Aislados bacterianos tomados del mismo paciente, en distintos tiempos. MMM M9: Medio Mínimo Mineral M9

En cuanto a las pruebas bioquímicas convencionales empleadas para la caracterización de los ocho aislados identificados por el sistema VITEK 2 como complejo *Acinetobacter baumannii*, sólo seis concuerdan con las características fenotípicas esperadas (tabla 16), que fueron: *A. baumannii* 6596, 3988, 7528, 2317, 5796 y 3910. Se esperaba obtener en *A. baumannii* bacterias Gram Negativas, Catalasa positiva, Oxidasa negativa, no fermentadora de glucosa ni de lactosa, degradadora de citrato, no mótil, no productora de ácido sulfhídrico ni degradadora de indol a triptófano; así como su capacidad de crecimiento a una temperatura de incubación de 42 °C (Mac Faddin, 2004). Los aislados de *Acinetobacter* spp. 4848 y 4840, no crecieron en la temperatura de incubación ensayada de 42 °C.

Tabla 16: Manifestaciones fenotípicas obtenidas de los ensayos bioquímicos convencionales para la identificación de los ocho aislados de *Acinetobacter* spp.

Prueba bioquímica	Control de reactivos <i>E. coli</i> MG1655	Aislados de <i>Acinetobacter</i> spp.							
		6596	3988	7528	2317	4848	5796	3910	4840
Tinción Gram	GN	GN	GN	GN	GN	GN	GN	GN	GN
Catalasa	+	+	+	+	+	+	+	+	+
Oxidasa	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Agar MacConkey	C. Lac ⁺	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻	C. Lac ⁻
Agar Kligler	A/A	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc	Alc/Alc
Agar Simmons Citrato	-	+	+	+	+	+	+	+	+
Motilidad	+	-	-	-	-	-	-	-	-
SIM Indol	+	-	-	-	-	-	-	-	-
H ₂ S	-	-	-	-	-	-	-	-	-
Crecimiento a 37 °C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
Crecimiento a 42 °C	C	C	C	C	C	NC	C	C	NC

De los resultados de las reacciones bioquímicas obtenidos, sólo seis aislados corresponden con las manifestaciones fenotípicas esperadas para *A. baumannii*. GN: Gram Negativo; Lac: Lactosa; C: Crecimiento; NC: No Crecimiento; A/A: Ácido/Ácido; Alc/Alc: Alcalino/Alcalino; +: resultados positivos (90-100%); -: resultados negativos (0-10%)

VII.1.1.a Identificación molecular

Se confirmó la presencia de ADN bacteriano y la ausencia de inhibidores de PCR, mediante la amplificación por PCR del gen ribosomal 16S bacteriano, a partir de los cebadores universales 8F y 1525R. Como se observa en la figura 10, se obtuvo un producto de PCR de tamaño aproximado entre 1500 y 1600 pb, amplificados del ADN genómico extraído de los 16 aislados bacterianos.



Figura 10: Registro fotográfico de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores universales 8F y 1525R. **M:** Marcador de Tamaño Molecular 1 Kb (Bioneer, Ready-to-load); **1-8:** Aislados bacterianos identificados por el sistema VITEK 2 como complejo *Acinetobacter baumannii*; **9-16:** Aislados bacterianos identificados por el sistema VITEK 2 como *Serratia marcescens*; **17:** Control negativo de reacción, mezcla de la PCR sin ADN molde.

VII.1.1.a.i Identificación molecular de los aislados de *S. marcescens*

Se realizaron las reacciones de PCR con los dos pares de cebadores específicos, en los ocho aislados bacterianos identificados por el sistema VITEK 2 como *S. marcescens* (aislados N°: 1315, 3710, 7172, 2344, 4474, 3018, 6991 y 4680), En las figuras 11 y 12 se muestran productos de PCR menores a 500 pb, coincidiendo con el tamaño de los amplicones obtenidos en las reacciones de controles positivos. En los controles negativos, no se formaron productos de PCR. Por lo tanto, los resultados moleculares obtenidos confirman los resultados del sistema VITEK2 para los ocho aislados identificados como *S. marcescens*.

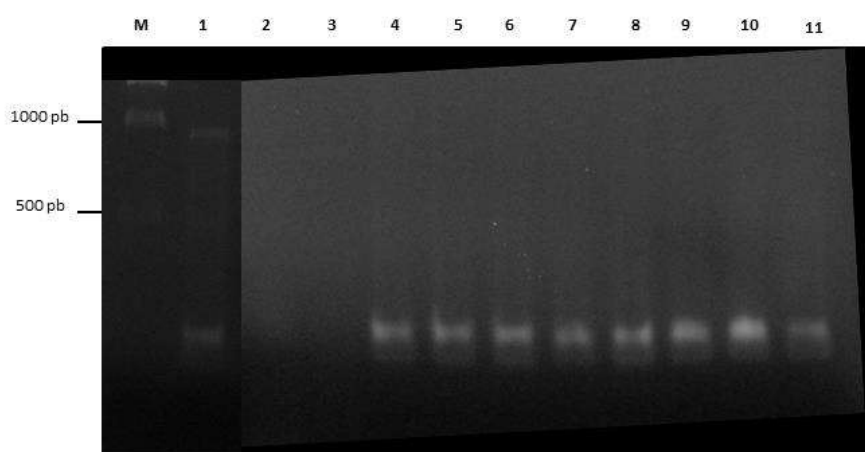


Figura 11: Registro fotográfico de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores específicos del gen *luxS*. M: Marcador de Tamaño Molecular 1 Kb (Bioneer, Ready-to-load); **1:** Control positivo, mezcla de la PCR con ADN molde de *S. marcescens* ATCC 13880; **2:** Control negativo de reacción, mezcla de la PCR sin ADN molde; **3:** Control negativo, mezcla de la PCR con ADN molde de *Acinetobacter* spp. 6596; **4-11:** Aislados de *Serratia* spp. **4:** 1315; **5:** 3710; **6:** 7172; **7:** 2344; **8:** 4474; **9:** 3018; **10:** 6991; **11:** 4680.

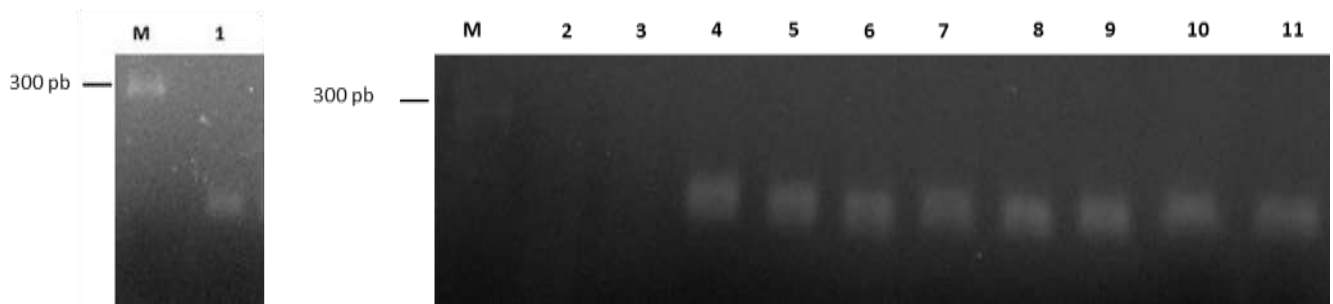


Figura 12: Registro fotográfico de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores específicos del gen *ssrA*. **M:** Marcador de Tamaño Molecular 1 Kb (Bioneer, Ready-to-load); **1:** Control positivo, mezcla de la PCR con ADN molde de *S. marcescens* ATCC 13880; **2:** Control negativo de reacción, mezcla de la PCR sin ADN molde; **3:** Control negativo, mezcla de la PCR con ADN molde de *Acinetobacter* spp. 6596; **4-11:** Aislados de *Serratia* spp. **4:** 1315; **5:** 3710; **6:** 7172; **7:** 2344; **8:** 4474; **9:** 3018; **10:** 6991; **11:** 4680.

VII.1.1.a.ii Identificación molecular de los aislados de *A. baumannii*

Para la identificación molecular de *A. baumannii*, se empleó el par de cebadores específicos para el gen *bla_{OXA51}* (Turton y col., 2006) y los resultados se muestran en la figura 13. Se obtuvo el amplicón esperado en seis de los ocho aislados identificados por el sistema VITEK2 como complejo *Acinetobacter baumannii*. Para las cepas 4848 y 4840, no se detectó amplificación de ADN en presencia de los cebadores *bla_{OXA51}*, coincidiendo con los ensayos fenotípicos convencionales, en los cuales estos dos aislados tampoco crecieron a la temperatura de ensayo de 42 °C.

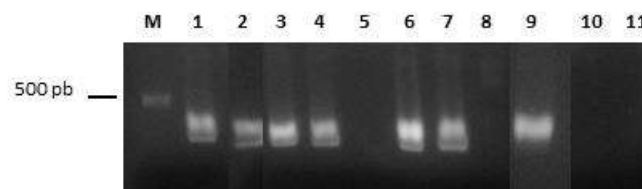


Figura 13: Registro fotográfico de los fragmentos de PCR amplificados con los cebadores específicos del gen *bla_{OXA51}*. **M:** Marcador de Tamaño Molecular 1 Kb (Bioneer, Ready-to-load); **1-8:** Aislados de *Acinetobacter* spp. **1:** 6596; **2:** 3988; **3:** 7528; **4:** 2317; **5:** 4848; **6:** 5796; **7:** 3910; **8:** 4840. **9:** Control positivo, mezcla de la PCR con ADN molde de *A. baumannii* ATCC BAA 747. **10:** Control negativo, mezcla de la PCR con ADN molde de *Serratia* spp. 1315; **11:** Control negativo de reacción, mezcla de la PCR sin ADN molde.

Según estos resultados, los seis aislados identificados como *A. baumannii* son: 6596, 3988, 7528, 2317, 5796 y 3910. Las cepas *Acinetobacter* spp. 4848 y 4840 no contienen el gen *bla_{oxa51}*, ni sus variantes de manera intrínseca o adquirida, por lo que no pertenecen a la especie *A. baumannii*, aun cuando el biopatrón de los ensayos bioquímicos del sistema VITEK2, arrojó una buena identidad para esta especie. Se puede sugerir que estas cepas pertenecen a la especie genómica *A. baumannii*, en la cual distintas especies de *Acinetobacter* están estrechamente relacionadas en características fenotípicas y genotípicas.

En relación a los datos clínicos suministrados, cabe destacar que, con un lapso de 20 días de diferencia, fueron aislados del mismo paciente y tipo de muestra (secreción bronquial) dos especies distintas de *Acinetobacter*: la cepa *A. baumannii* 3910 y, posteriormente, *Acinetobacter* spp. 4840.

VII.1.2 Construcción de cepas bacterianas mutantes *Adam*

Para la metodología de mutagénesis de Datsenko y Wanner (2000), se requiere que las cepas a ser mutadas presenten sensibilidad a ampicilina (100 µg/mL), cloranfenicol (25 µg/mL) y kanamicina (50 µg/mL). Se determinó el fenotipo de sensibilidad por estos antibióticos, mediante ensayos de réplica en placa. La mayoría de las cepas estudiadas crecieron en presencia de 100 µg/mL de Ampicilina, tal como se presenta en la tabla 17.

Tabla 17: Cuadro resumen de los fenotipos de sensibilidad a antibióticos obtenidos en la réplica en placa

Número de registro de la cepa	Antibióticos						
	-	AMP	AMP	AMP	AMP	CHL	KAN
	(0)	(100)	(200)	(500)	(1000)	(25)	(50)
Sma 7172	C	C	C	NC	NC	NC	NC
Sma 2344	C	C	C	C	C	NC	NC
Sma 3710	C	C	C	C	C	NC	NC
Sma 3018	C	C	C	NC	NC	NC	NC
Sma 70	C	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Eco MG1655	C	NC	NC	NC	NC	NC	NC
Eco CQ3	C	C	C	C	ND	NC	NC
Eco CQ6	C	C	C	C	ND	C	NC
Eco CQ8	C	C	C	C	ND	NC	NC
Eco CQ4	C	C	C	C	C	C	C
Eco CQ10	C	NC	NC	NC	NC	C	C
Eco CQ22	C	C	C	C	ND	NC	NC
Eco CQ24	C	C	C	C	ND	NC	C
Eco Ig4Sn1	C	NC	NC	NC	ND	NC	NC
BW25113/pKD46	C	C	C	C	C	ND	ND

AMP: Ampicilina; CHL: Cloranfenicol; KAN: Kanamicina; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli*; C: Crecimiento; NC: No Crecimiento; -: sin antibiótico; ND: No Determinado

Las cepas de *S. marcescens* 7172 y 3018 no crecieron a concentraciones de 500 ni 1000 $\mu\text{g/mL}$ de Ampicilina. Las cepas de *E. coli* MG1655, IgSn1 y *S. marcescens* 70, no crecieron en ninguna concentración de Ampicilina ensayada. La cepa de *E. coli* BW25113/pKD46, portadora del plásmido pKD46, crece en presencia de todas las concentraciones del antibiótico ensayadas.

Por lo que los ensayos de mutagénesis de Datsenko y Wanner (2000) fueron empleados en *E. coli* MG1655, Ig4Sn1; *S. marcescens* 7172, 3018 y 70. Estas cepas se correlacionaron con los requerimientos de ausencia de crecimiento en ampicilina, cloranfenicol y kanamicina.

Una vez aislado el plásmido pKD46 de *E. coli* BW25113/pKD46 y su posterior purificación, se procedió a estandarizar la incorporación de pKD46 en las cepas de estudio. Se ensayaron distintos ajustes y modificaciones en las metodologías de electroporación y de choque térmico para transformar a *S. marcescens* con pKD46. Sin embargo, se observaron resultados

contradictorios: hubo formación de colonias en medios de cultivo suplementados con 500 ó 1000 µg/mL de Ampicilina, sugiriendo una transformación bacteriana aparente. Sin embargo, en la corroboración molecular (figura 14), no se detectó la presencia de pKD46 como material extracromosomal del genoma de las cepas de estudio. Por lo tanto, no hubo transformación bacteriana de *S. marcescens* con el plásmido pKD46.

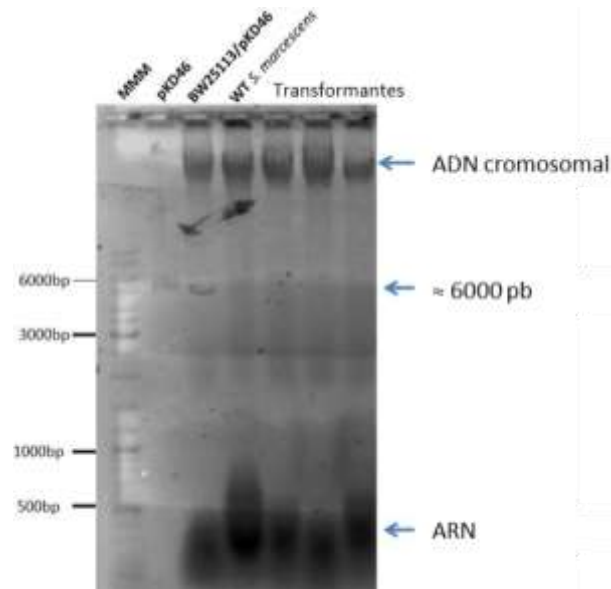


Figura 14: Registro fotográfico del ADN genómico y ARN de las posibles colonias transformadas de *S. marcescens* con el plásmido pKD46. No se detectó la presencia de banda de ADN del plásmido pKD46 (6400 pb) en las potenciales cepas de *S. marcescens* transformadas. MMM: Marcador de Tamaño Molecular, de “O`GeneRuler DNA LadderMix” (ThermoScientific). WT: cepa silvestre de *S. marcescens*.

Las cepas de *S. marcescens* evaluadas no son capaces de integrar ADN foráneo mediante electroporación, bajo las condiciones ensayadas. Con la metodología de mutagénesis sitio dirigida descrita por Datsenko y Wanner (2000), no se obtuvieron los resultados esperados para los aislados clínicos de *S. marcescens*.

Se logró la transformación bacteriana del plásmido pKD46 con la cepa de referencia *E. coli* MG1655. En la figura 15 panel A, se observan colonias transformantes que, a diferencia del ensayo control, crecieron en presencia de 100 µg/mL de ampicilina, a una cantidad proporcional al volumen del inóculo sembrado: 30 y 100 µL, respectivamente. Con las pruebas moleculares se

detectó que las colonias transformadas contienen un fragmento de ADN de aprox. 6400 pb, de tamaño similar al del plásmido pKD46, el cual está ausente en la cepa silvestre (Figura 15 panel B).

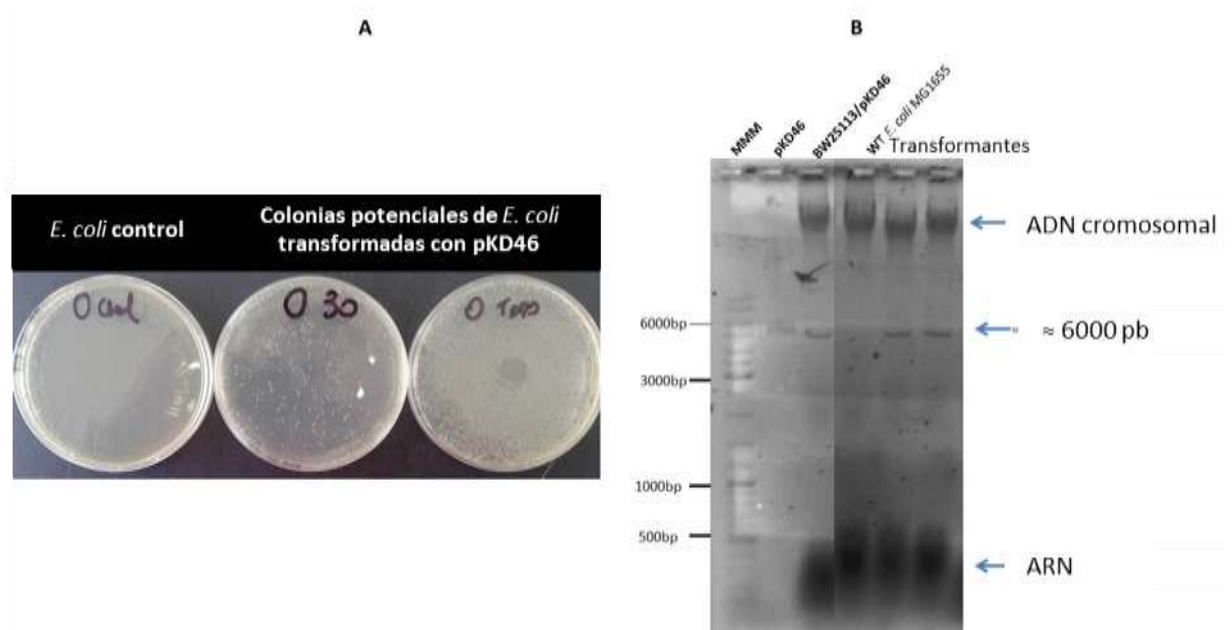


Figura 15: Análisis fenotípico (A) y molecular (B) de las posibles colonias de *E. coli* transformantes con el plásmido pKD46. En el panel A se presenta un registro fotográfico de las colonias de *E. coli* transformadas con pKD46, crecidas en placas de agar suplementadas con 100 µg/mL de Ampicilina. En el panel B, se muestra el registro fotográfico del análisis del ADN genómico de *E. coli* MG1655 (WT) y de las colonias transformadas con el plásmido pKD46. MMM: Marcador de Tamaño Molecular, de “O`GeneRuler DNA LadderMix”(ThermoScientific).

La cepa mutante de *E. coli* MG1655 con delección del gen *dam* (Δdam) se construyó mediante la técnica de mutagénesis descrita por Datsenko y Wanner (2000). Los respectivos casetes de mutagénesis funcionales fueron contruidos por PCR, a partir de los plásmidos pKD3 y pKD4. Estos productos de PCR tuvieron tamaños de ADN similares a los esperados, 1,1 y 1,6 kb, respectivamente (figura 16).

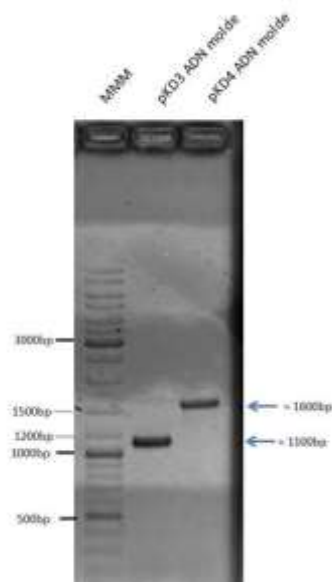


Figura 16: Registro fotográfico de los casetes de mutagénesis funcionales contruidos para *E. coli*. Se observan los productos de PCR de la construcción del casete a partir de ADN molde pKD3 y pKD4, respectivamente. Los tamaños obtenidos de cada banda de ADN coinciden con los tamaños esperados. MMM: Marcador de Tamaño Molecular, de “O`GeneRuler DNA LadderMix”(ThermoScientific)

Luego de haber realizado el proceso de mutagénesis dirigida, las potenciales bacterias mutadas fueron recuperadas y crecidas en medios selectivos. El reemplazo del gen *dam* por un gen de resistencia, confiere un marcador de selección de las bacterias mutadas. La determinación fenotípica consistió en la capacidad de crecimiento bacteriano en los medios selectivos suplementados con los antibióticos cloranfenicol o kanamicina. La cepa silvestre no transformada con el casete fue incapaz de crecer en presencia de los antibióticos. Se obtuvieron colonias potencialmente transformadas de *E. coli* MG1655, que crecieron en presencia de 25 µg/mL de cloranfenicol.

Se evaluó la sensibilidad de la cepa mutante ante el análogo de bases 2 aminopurina. La incorporación de este mutágeno en el ADN durante su replicación, causa sustituciones de tipo transición entre las bases nitrogenadas, incluyendo mutaciones de tipo de cambio de sentido. Las cepas mutantes Δdam presentan efectos pleiotrópicos, como el incremento de sensibilidad a errores incorporados en el ADN en presencia de 2 aminopurina (Ostendorf y col., 1999). En este caso, también se observó alteraciones en el crecimiento de

la cepa de *E. coli* construida en presencia de 100 mg/mL de 2 aminopurina, con respecto a la cepa silvestre.

Para la verificación a nivel molecular de las mutaciones construidas, se realizó una PCR de colonia. El ADN molde se obtuvo del lisado de una colonia bacteriana. Los cebadores flanquean el gen a reemplazar del genoma bacteriano. Como se observa en la figura 17, en la cepa de *E. coli* MG1655 Δdam se detectó diferencias en el tamaño del ADN amplificado, con respecto a la banda obtenida de 1486 pb, producto de la PCR con *E. coli* MG1655 silvestre. Por lo tanto, se confirma el reemplazo del gen *dam*, debido a la amplificación de un fragmento de ADN de mayor tamaño respecto al esperado del gen *dam*. Estos resultados son sugestivos de que se logró construir la cepa mutante de *E. coli* MG1655 Δdam .

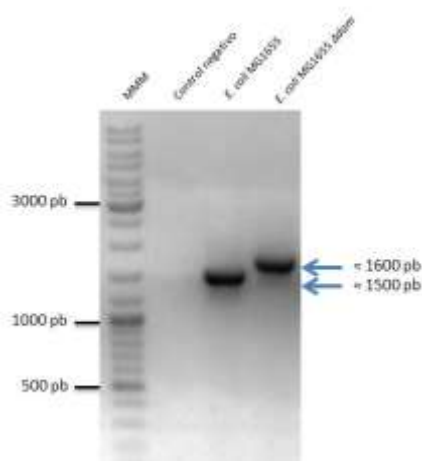


Figura 17: Registro fotográfico de la PCR de colonia para la verificación de la cepa mutante construida. Los productos de PCR obtenidos con los mismos cebadores de amplificación entre la cepa silvestre de *E. coli* MG1655 y la mutante construida, difieren de tamaño. Control negativo: reacción de PCR sin la colonia bacteriana. MMM: Marcador de Tamaño Masa Molecular, de “O`GeneRuler DNA LadderMix”(ThermoScientific).

La caracterización molecular de la cepa mutante *E. coli* MG1655 Δdam consistió en evaluar la digestión cromosomal con las enzimas de restricción Sau3AI (corta en la secuencia 5´GATC3´, independientemente de la metilación o no de la Adenina), DpnI (corta en la secuencias 5´GATC3´ en la cual la Adenina se encuentra metilada) y MboI (corta en la secuencia 5´GATC3´ en la

cual la Adenina no esté metilada), para determinar los cambios en el estado de metilación del ADN. En la figura 18, se observan diferencias en el patrón de digestión del ADN cromosomal de *E. coli* MG1655 y la cepa mutante isogénica Δdam . El ADN genómico de *E. coli* MG1655 y de su cepa isogénica Δdam , fueron degradados con la enzima de restricción Sau3AI; sin embargo, el ADN genómico de *E. coli* MG1655 se degradó con la enzima DpnI y no con MboI; mientras que con el ADN genómico de *E. coli* MG1655 Δdam , fue al contrario: se degradó con la enzima MboI mas no con DpnI. Estos resultados nos permiten sugerir que efectivamente la inactivación y delección del gen *dam* afecta el estado de metilación del ADN cromosomal en *E. coli* MG1655.

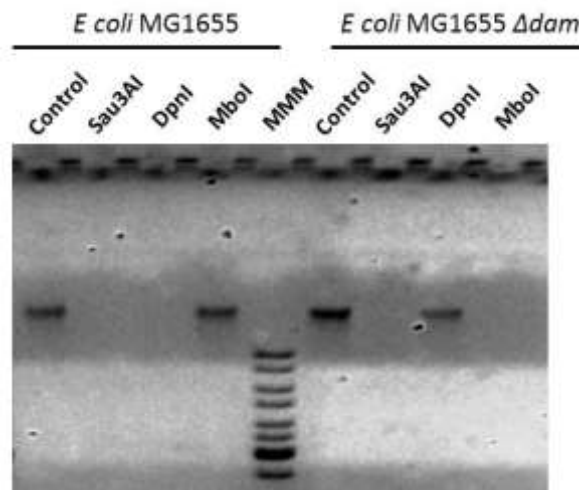


Figura 18: Registro fotográfico de los resultados de una digestión del ADN cromosomal de *E. coli* MG1655 y su cepa isogénica Δdam , con las enzimas de restricción Sau3AI, DpnI y MboI. MMM: Marcador de Tamaño Masa Molecular, de “O`GeneRuler DNA LadderMix” (ThermoScientific).

VII.2. Ensayos de formación de biopelículas

VII.2.1 Método de agar Rojo Congo

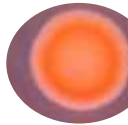
El colorante Rojo Congo tiene afinidad por proteínas de tipo fibrillas y polisacáridos, como la celulosa y el almidón, siendo comúnmente utilizado para la detección de deposición de fibras amiloides en cortes histológicos de tejidos (Frid y col., 2007). Se ha descrito su uso en la detección de agregados proteicos y EPS secretados de colonias bacterianas (Zogaj y col., 2003).

Se empleó este método cualitativo para detectar aquellas cepas capaces de secretar agregados proteicos y polisacáridos, los cuales están asociados a propiedades inherentes de la formación de biopelículas, tales como adhesión a superficies o interacción entre bacterias.

Como se observa en la tabla 18, en las ocho cepas de *Acinetobacter* spp. hubo variabilidad de morfotipos en Agar Rojo Congo. Las cepas N° 3988, 2317, 4848, 3910 y 4840 se tiñeron de rojo congo, bajo distintas tonalidades de rosado; la mayoría de estas colonias presentaron una textura rugosa, asignándolas con el morfotipo “pdar”. En cambio, las cepas N° 6596, 7528 y 5796 no se tiñeron con rojo congo, las colonias presentaron una coloración blanca y textura lisa, es decir, fueron de morfotipo “saw”.

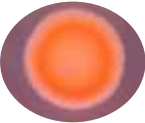
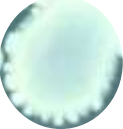
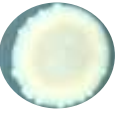
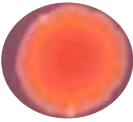
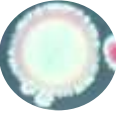
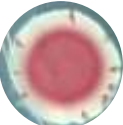
Las ocho cepas de *S. marcescens* presentaron una morfología de colonias de tipo “pdar”: rosadas, secas y rugosas, tal como se observan en la tabla 19. Las cepas N° 3710, 3018, 6991 y 4680 secretaron prodigiosina en agar nutritivo, pudiendo afectar la coloración de las colonias a temperatura ambiente.

Tabla 18: Resultados de la morfología de las colonias de *Acinetobacter* spp. en Agar Rojo Congo

Cepas	Temperatura ambiente	37 °C	Morfotipo
<i>S. enterica</i> Typhimurium			rdar
<i>E. coli</i> HB101			pdar
<i>A. baumannii</i> 6596			saw
<i>A. baumannii</i> 3988			pdar
<i>A. baumannii</i> 7528			saw
<i>A. baumannii</i> 2317			pdar
<i>Acinetobacter</i> spp. 4848			pdar
<i>A. baumannii</i> 5796			saw
<i>A. baumannii</i> 3910			pdar
<i>Acinetobacter</i> spp. 4840			pdar

Morfotipo rdar: colonias rojas, secas y rugosas; pdar: colonias rosadas, secas y rugosas; saw: colonias blancas y lisas.

Tabla 19: Resultados de la morfología de las colonias de *S. marcescens* crecidas en Agar Rojo Congo

Cepas	Temperatura ambiente		37°C	Morfotipo
	AN	ARC	ARC	
<i>S. enterica Typhimurium</i>				rdar
<i>E. coli</i> HB101				pdar
<i>S. marcescens</i> 1315				pdar
<i>S. marcescens</i> 3710*				pdar
<i>S. marcescens</i> 7172				pdar
<i>S. marcescens</i> 2344*				pdar
<i>S. marcescens</i> 4474				pdar
<i>S. marcescens</i> 3018*				pdar
<i>S. marcescens</i> 6991*				pdar
<i>S. marcescens</i> 4680*				pdar

Morfotipo rdar: colonias rojas, secas y rugosas; pdar: colonias rosadas, secas y rugosas. AN: Agar Nutritivo; ARC: Agar Rojo Congo; *: cepas secretoras de prodigiosina a temperatura ambiente, determinadas en ensayos previos (sección VI.3.1 de resultados).

Los resultados obtenidos sugieren que la mayoría de las cepas de *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens* tienen la capacidad de formar biopelículas, demostrado por el método de agar rojo congo, aun con la diversidad de características de la fuente de las muestras o de la capacidad de secreción de prodigiosina en *S. marcescens* (tabla 20).

Tabla 20: Cuadro resumen de los resultados obtenidos en los ensayos de secreción de prodigiosina, componentes proteicos y EPS de los aislados clínicos bacterianos de estudio

Cepa	Características de la muestra clínica		Pigmentadas/Prodigiosina		Morfolito en ARC
	Sala/Unidad	Fuente de la muestra	Caldo nutritivo	Caldo MMM M9	
Aba 6596	Ambulatorio	Secreción inguinal	ND	ND	saw
Aba 3988	Ambulatorio	Secreción de herida	ND	ND	pdar
Aba 7528	Hospitalización	Lavado bronquial	ND	ND	saw
Aba 2317	Emergencia	Espujo	ND	ND	pdar
Asp 4848	Hospitalización	Flictena	ND	ND	pdar
Aba 5796	Ambulatorio	Úlcera	ND	ND	saw
Aba 3910 ^{a*}	Terapia de adultos	Secreción bronquial	ND	ND	pdar
Asp 4840 ^{a*}	Terapia de adultos	Secreción bronquial	ND	ND	pdar
Sma 1315	Emergencia	Espujo	-	-	pdar
Sma 3710	Hospitalización	Espujo	++	-	pdar
Sma 7172 ^{b*}	Terapia de adultos	Secreción bronquial	-	-	pdar
Sma 2344	Ambulatorio	Secreción de pie	+	-	pdar
Sma 4474	Ambulatorio	Orina	-	-	pdar
Sma 3018	Hospitalización	Secreción bronquial	++	-	pdar
Sma 6991 ^{b*}	Emergencia	Espujo	++	-	pdar
Sma 4680	Ambulatorio	Secreción de talón	++	-	pdar

++ ó +: cepas pigmentadas, secretoras de prodigiosina con distintas tonalidades; -: cepas no secretoras de prodigiosina. ND: No determinado. ARC: Agar Rojo Congo; pdar: colonias rosadas, secas y rugosas; saw: colonias blancas y lisas; ^{a*} y ^{b*}: Aislados bacterianos tomados del mismo paciente, en distintos tiempos. MMM M9: Medio Mínimo Mineral M9. Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp; Sma: *S. marcescens*

También se evaluó el morfolito de las colonias de *E. coli* MG1655 y su cepa isogénica Δdam , crecidas en placas de Agar Rojo Congo.

La cepa *E. coli* MG1655 presentó el morfolito “pdar”: rosadas, secas y rugosas (tabla 21), siendo secretora de celulosa, mas no de las fibras amiloides de tipo curli. Sin embargo, en la cepa mutante *E. coli* MG1655 Δdam , se manifestó el morfolito “rdar” a temperatura ambiente.

Tabla 21: Resultados de la morfología de las colonias de *E. coli* MG1655 crecidas en Agar Rojo Congo

	Temperatura ambiente	Morfotipo	37 °C	Morfotipo
<i>S. enterica</i> Typhimurium		rdar		rdar
<i>E. coli</i> HB101		pdar		pdar
<i>E. coli</i> MG1655		pdar		pdar
<i>E. coli</i> MG1655 Δ dam		rdar		pdar

Morfotipo rdar: colonias rojas, secas y rugosas; pdar: colonias rosadas, secas y rugosas.

VII.2.2 Método de detección por cristal violeta

Se emplearon las microplacas de poliestireno de 96 pozos, para evaluar la capacidad de formación de biopelículas *in vitro*. Una vez formada la biopelícula, se cuantificó la biomasa bacteriana adherida en los pozos de las placas, mediante tinción con cristal violeta. Este método es utilizado para evaluar simultáneamente diversas condiciones de crecimiento, en numerosas cepas bacterianas (Merritt y col., 2005; McBain, 2009; Lebeaux y col., 2013).

Como controles de estos ensayos de formación de biopelículas se empleó la cepa *A. baumannii* AB4, en la cual se reiteró su clasificación de formadora de biopelículas fuertes en caldo nutritivo a temperatura ambiente ($\bar{x}D0c = 0,1557$; $\bar{x}D0d = 1,1235$) y a 37 °C ($\bar{x}D0c = 0,1584$; $\bar{x}D0d = 0,7757$). Como control negativo se utilizó la cepa *E. coli* HB101, no formadora de biopelículas, creciendo en caldo nutritivo a temperatura ambiente ($\bar{x}D0c = 0,1557$; $\bar{x}D0d = 0,1377$) y a 37°C ($\bar{x}D0c = 0,1584$; $\bar{x}D0d = 0,1321$).

Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas en caldo nutritivo y MMM M9, a temperatura ambiente y a 37 °C. Las cepas de estudio formaron biopelículas en, al menos, una de las cuatro condiciones evaluadas. Se semi-cuantificó la biomasa adherida sobre la superficie de los pozos de las microplacas, a través de los valores de absorbancia de las biopelículas teñidas en cristal violeta.

VII.2.2.a Cepas clínicas de *A. baumannii* y *S. marcescens*

En las figuras 19 y 20 se encuentran los valores de DO biopelículas obtenidos, para las cepas clínicas de *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens*. Se registraron valores de DO biopelículas menores a 0,2 en todas las cepas crecidas en caldo nutritivo. En cambio, para las biopelículas formadas en el medio mínimo mineral M9, se reportan valores de la DO biopelículas dentro del rango de 0,01 y 1,5 en *Acinetobacter* spp. (figura 19) y *S. marcescens* (figura 20). Por lo tanto, hubo diferencias significativas en la formación de biomasa de biopelículas de *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens*, en función de los cultivos (ANOVA; $F = 386,568$; $df = 1$; $p < 0,001$). Las cepas bacterianas crecidas en el medio mínimo mineral M9 formaron mayor biomasa de biopelículas, en comparación con el desarrollo de biopelículas en caldo nutritivo (figuras 19 y 20). Las temperaturas de ensayo tampoco causaron diferencias en cuanto a biomasa de biopelículas producidas. El efecto de las temperaturas ensayadas sobre las cepas bacterianas no fue relevante en biopelículas de *A. baumannii* formadas en caldo nutritivo (ANOVA; $F = 0,230$; $df = 7$; $p > 0,1$), ni en medio mínimo mineral M9 (ANOVA; $F = 1,911$; $df = 7$; $p > 0,05$); ni en biopelículas de *S. marcescens* formadas en caldo nutritivo (ANOVA; $F = 0,590$; $df = 7$; $p > 0,1$) ni en medio mínimo mineral M9 (ANOVA; $F = 1,495$; $df = 7$; $p > 0,1$).

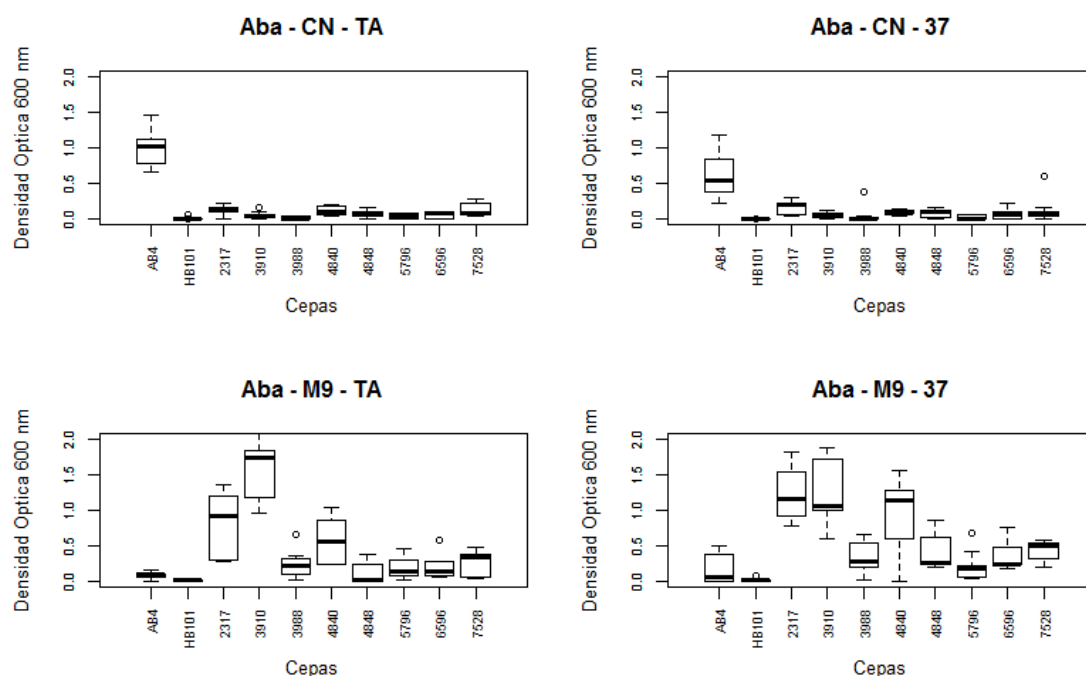


Figura 19: Influencia de los medios de cultivo y la temperatura sobre las biopelículas de *Acinetobacter* spp. Se presentan los valores de DO biopelículas (ejes Y, $DO_{\lambda=600nm}$) de las especies de *Acinetobacter* spp., crecidas en caldo nutritivo a temperatura ambiente (CN-TA) y a 37°C (CN-37), en medio mínimo mineral M9 a temperatura ambiente (M9-TA) y a 37°C (M9-37). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101; Aba: cepas de *A. baumannii* y *Acinetobacter* spp.

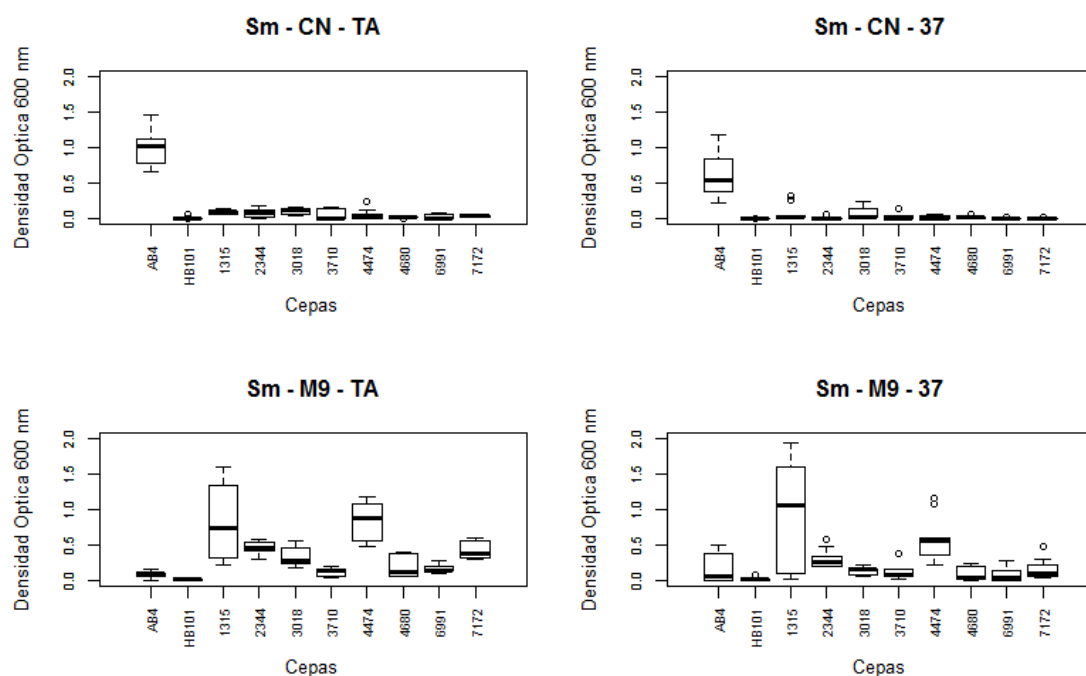


Figura 20: Influencia de los medios de cultivo y la temperatura sobre las biopelículas de *S. marcescens*. Se presentan los valores de DO biopelículas (ejes Y, $DO_{\lambda=600nm}$) de las especies de *S. marcescens*, crecidas en caldo nutritivo a temperatura ambiente (CN-TA) y a 37°C (CN-37), en medio mínimo mineral M9 a temperatura ambiente (M9-TA) y a 37°C (M9-37). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101 Sm: cepas de *S. marcescens*

Para la interpretación de los resultados de DO biopelículas, se catalogaron las cepas bacterianas en: no formadoras, formadoras de biopelículas débiles, moderadas o fuertes. La tabla 22 resume la clasificación de formación de biopelículas de las cepas en las distintas condiciones de ensayo.

Tabla 22: Efecto de los medios de cultivo y temperatura sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas de las cepas *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens*

	CN – TA		CN – 37 °C		MMM M9 – TA		MMM M9 – 37 °C	
	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB
Aba AB4	1,1356	3	1,0689	3	2,2204	1	5,1198	1
Eco HB101	0,1661	1	0,0277	0	0,2316	1	0,4319	1
Aba 6596	0,1007	1	0,1407	1	1,4420	1	2,6785	2
Aba 3988	0,0340	1	0,0970	1	1,1054	2	1,8093	2
Aba 7528	0,2452	1	0,2602	1	1,3819	2	3,0969	2
Aba 2317	0,2460	1	0,3553	2	5,4126	3	9,4042	3
Asp 4848	0,1049	1	0,1732	1	0,3512	1	1,4456	2
Aba 5796	0,0629	1	0,0469	1	0,6967	1	0,9937	2
Aba 3910 ^{a*}	0,1116	1	0,1153	1	10,7178	3	8,9941	3
Asp 4840 ^{a*}	0,1687	1	0,1744	1	1,9357	3	4,0832	2
Sma 1315	0,1248	1	0,1809	1	1,3643	3	1,7141	2
Sma 3710	0,0752	1	0,0509	0	0,1636	1	0,1675	1
Sma 7172 ^{b*}	0,0485	1	0,0123	0	0,7258	2	0,2508	1
Sma 2344	0,1260	1	0,0244	1	0,6995	2	0,4732	2
Sma 4474	0,0942	1	0,0492	1	1,2875	3	1,0102	3
Sma 3018	0,1343	1	0,1188	1	0,5135	2	0,2790	1
Sma 6991 ^{b*}	0,0486	1	0,0041	0	0,2679	1	0,1242	1
Sma 4680	0,0380	1	0,0409	1	0,2878	1	0,1509	1

La clasificación numérica de la capacidad de formación de biopelículas, se basó en la interpretación de resultados propuesto por Stepanović (2007). CN: Caldo nutritivo; TA: temperatura ambiente; Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp.; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli*. UA: unidades de adhesión. CB: clasificación de biopelículas. 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

Las cepas de *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens* crecidas en caldo nutritivo, no formaron biopelículas o fueron clasificadas como biopelículas débiles. En MMM M9, la mayoría de las cepas de *Acinetobacter* y *S. marcescens* evaluadas fueron clasificadas como formadoras de biopelículas moderadas o fuertes. Estos resultados complementan los obtenidos en la cuantificación de biomasa de biopelículas, en los cuales se detectó mayor biomasa de biopelículas en las cepas creciendo en MMM M9, con respecto al caldo nutritivo.

Con el parámetro de UA, se evaluó la capacidad de producción de biopelículas, en función del crecimiento bacteriano. La DO_a mide la densidad

celular bacteriana, previo a la tinción con cristal violeta. La DO biopelículas mide por colorimetría la biomasa de biopelículas, es decir, las células bacterianas y otros componentes de la matriz extracelular adheridos a la superficie de poliestireno de las microplacas, los cuales se tiñen de manera inespecífica con cristal violeta (Merritt y col., 2005).

Las biopelículas formadas por las cepas de estudio se encuentran afectadas por el medio de cultivo. Se obtuvieron valores bajos de UA para las cepas crecidas en caldo nutritivo, siendo menores a 0,35 tanto para *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens*. En cambio, para el medio mínimo mineral M9 hubo mayor producción de biopelículas, obteniéndose UA de 0,3 a 10 para las cepas de *A. baumannii* y *Acinetobacter* spp.; sin embargo, las cepas de *S. marcescens* fue menor el estímulo inducido por el medio, reportándose valores de UA entre 0,1 y 1,7 (tabla 22). Por lo tanto, hubo diferencias significativas en la producción de biopelículas de *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens*, en función de los cultivos ensayados. Las cepas bacterianas tienen mayor producción de biopelículas cuando crecen en el medio mínimo mineral M9, que en caldo nutritivo.

En síntesis, para la mayoría de las cepas bacterianas de estudio se cuantificó una mayor producción de biopelículas formadas en MMM M9, clasificándose como formadoras de biopelículas moderadas o fuertes.

VII.2.2.b Cepa de referencia *E. coli* MG1655 y su mutante isogénica

No se detectó biomasa de biopelículas en ninguna de las condiciones nutritivas ensayadas con la cepa silvestre *E. coli* MG1655. Sin embargo, para *E. coli* MG1655 Δdam se registraron valores significativos de biomasa de biopelículas, formadas en caldo nutritivo (DO biopelículas $\approx 0,5$) y MMM M9 (DO biopelículas $\approx 1,3$) a temperatura ambiente (figura 21). Las temperaturas de ensayo causaron diferencias en cuanto a biomasa de biopelículas producida por *E. coli* MG1655 Δdam en caldo nutritivo (ANOVA; $F = 21,58$; $df = 1$; $p < 0,001$), y en medio mínimo mineral M9 (ANOVA; $F = 130,1$; $df = 1$; $p < 0,001$).

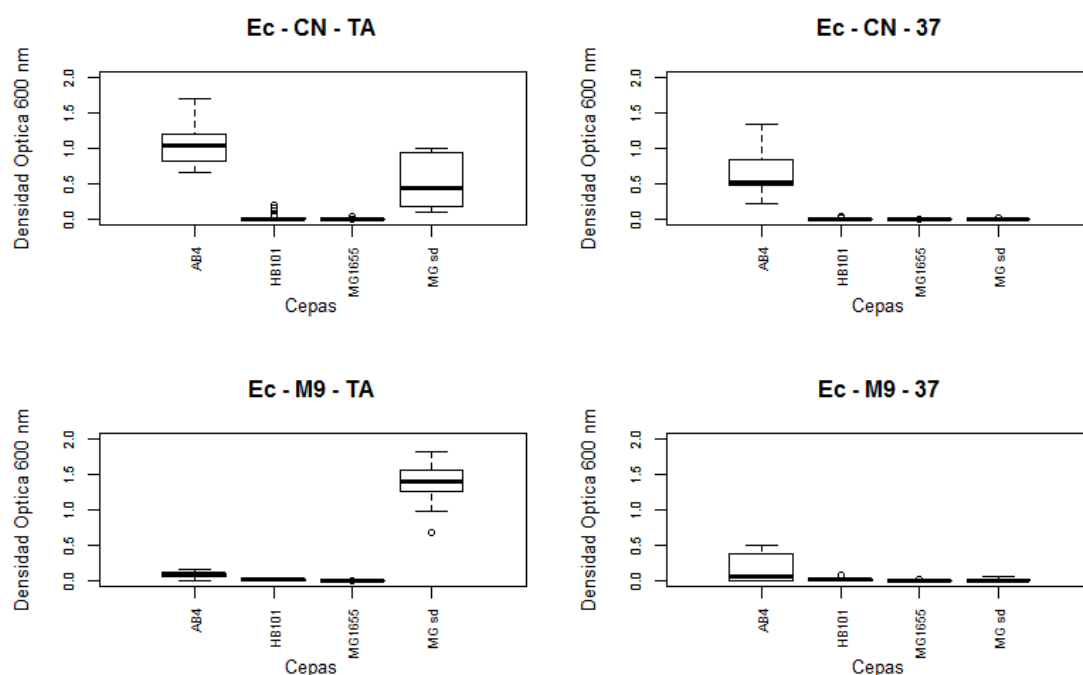


Figura 21: Influencia de los medios de cultivo y la temperatura sobre la biomasa de biopelículas de *E. coli*. Se presentan los valores de $DO_{\text{biopelículas}}$ (ejes Y, $DO_{\lambda=600\text{nm}}$) de *E. coli* MG1655 y su cepa isogénica Δdam , crecidas en caldo nutritivo a temperatura ambiente (CN-TA) y a 37°C (CN-37), en medio mínimo mineral M9 a temperatura ambiente (M9-TA) y a 37°C (M9-37). Ec: *E. coli*. AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101; MG1655: *E. coli* MG1655; MG sd: *E. coli* MG1655 Δdam

Como indica la tabla 23, la cepa silvestre fue catalogada como no formadora de biopelículas en las cuatro condiciones de crecimiento ensayadas. La cepa mutante es formadora de biopelículas fuertes en caldo nutritivo y en MMM M9, ambos a temperatura ambiente.

Tabla 23: Efecto de los medios de cultivo y temperatura sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas de las cepas de *E. coli* MG1655

	CN – TA		CN – 37 °C		MMM M9 – TA		MMM M9 – 37 °C	
	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB
Aba AB4	1,1356	3	1,0689	3	2,2204	1	5,1198	1
Eco HB101	0,1661	1	0,0277	0	0,2316	1	0,4319	1
Eco MG1655	0,0109	0	0,0030	0	0,0019	0	0,0050	0
Eco MG1655 Δdam	1,0851	2	0,0125	0	3,3302	3	0,0424	0

La clasificación numérica de la capacidad de formación de biopelículas, se basó en la interpretación de resultados propuesto por Stepanović (2007). CN: Caldo nutritivo; TA: Temperatura ambiente; Aba: *A. baumannii*; Eco: *E. coli*. UA: Unidades de adhesión. CB: Clasificación de biopelículas. 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

La producción de biopelículas en la cepa silvestre fue nula (UA = 0). En cambio, para *E. coli* MG1655 Δdam fue mayor en medio mínimo mineral M9 (UA = 3,3302) que con respecto a caldo nutritivo (UA = 1,0851), ambos a temperatura ambiente. En el resto de los ensayos, la capacidad de formación de biopelículas para *E. coli* MG1655 Δdam , fue de UA = 0 (tabla 23).

Los resultados obtenidos con la cepa mutante Δdam , sugieren que en esta condición fisiológica bacteriana, en la que está comprometida la metilación del ADN en la secuencia GATC, se promueve la formación de biomasa de biopelículas, en condiciones mínimas de crecimiento, a temperatura ambiente.

VII.3 Efecto de estímulos del entorno sobre la formación de biopelículas

Se seleccionaron 7 de los 16 aislados bacterianos, que se resumen en la tabla 24, para evaluar los efectos de diversos factores nutricionales y químicos sobre la formación de biopelículas de las cepas clínicas de estudio. Se seleccionaron aquellas cepas cuyos valores de biomasa de biopelículas presentaron una menor variabilidad en los ensayos previamente realizados.

Tabla 24: Características de las cepas formadoras de biopelículas seleccionadas para la evaluación de efectos del estímulo del entorno

	Muestra biológica	Agar Rojo Congo	Ensayos de formación de biopelículas							
			CN-TA		CN-37°C		M9-TA		M9-37°C	
			UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB
<i>A. baumannii</i> 3910 ^{a*}	Secreción bronquial	pdar	0,1116	1	0,1153	1	10,7178	3	8,9941	3
<i>Acinetobacter</i> spp 4848	Flictena	pdar	0,1049	1	0,1732	1	0,3512	1	1,4456	2
<i>A. baumannii</i> 5796	Úlcera	saw	0,0629	1	0,0469	1	0,6967	1	0,9937	2
<i>A. baumannii</i> 6596	Secreción inguinal	saw	0,1007	1	0,1407	1	1,4420	1	2,6785	2
<i>S. marcescens</i> 7172 ^{b*}	Secreción bronquial	pdar	0,0485	1	0,0123	0	0,7258	2	0,2508	1
<i>S. marcescens</i> 2344	Secreción de pie	pdar	0,1260	1	0,0244	1	0,6995	2	0,4732	2
<i>S. marcescens</i> 4474	Orina	pdar	0,0942	1	0,0492	1	1,2875	3	1,0102	3

^{a*} y ^{b*}: Aislados bacterianos tomados del mismo paciente, en distintos tiempos; rdar: morfotipo rojo, seco y rugoso; pdar: morfotipo rosado, seco y rugoso; saw: morfotipo blancas y lisas; CN: caldo nutritivo; M9: medio mínimo mineral M9; TA: temperatura ambiente; UA: unidades de adhesión; CB: clasificación de biopelículas; 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

VII.3.1 Condiciones nutritivas

Se evaluó la capacidad de formación de biopelículas en las siguientes condiciones nutritivas: 1) dilución 1/10, del caldo nutritivo con agua destilada y 2) caldo nutritivo suplementado con 500 mM de glucosa, ambos a temperatura ambiente. Las condiciones nutritivas produjeron distintos efectos en la formación de biopelículas las especies de *Acinetobacter* spp. (ANOVA; $F = 140,612$; $df = 2$; $p < 0,001$), *S. marcescens* (ANOVA; $F = 22,96$; $df = 2$; $p < 0,001$) y *E. coli* (ANOVA; $F = 21,20$; $df = 2$; $p < 0,001$).

En la figura 22 se observó que la disponibilidad excedente de glucosa en caldo nutritivo promovió el desarrollo de biopelículas de las especies de *Acinetobacter* evaluadas. En la figura 23 se observa que el exceso de glucosa no resultó ser un inductor en la producción de biopelículas de *S. marcescens* ($UA < 0,5$), obteniéndose un $\bar{x}DO$ biopelículas = $0,2616 \pm 0,2117$. La dilución de nutrientes presentes en caldo nutritivo estimuló el desarrollo de biopelículas moderadas de *S. marcescens*. Con la dilución del medio nutritivo se reportó mayor producción ($UA \approx 1$) y menor variabilidad de la biomasa de biopelículas cuantificada ($\bar{x}DO$ biopelículas = $0,2338 \pm 0,0709$), se catalogaron las tres cepas como formadoras de biopelículas moderadas (tabla 25).

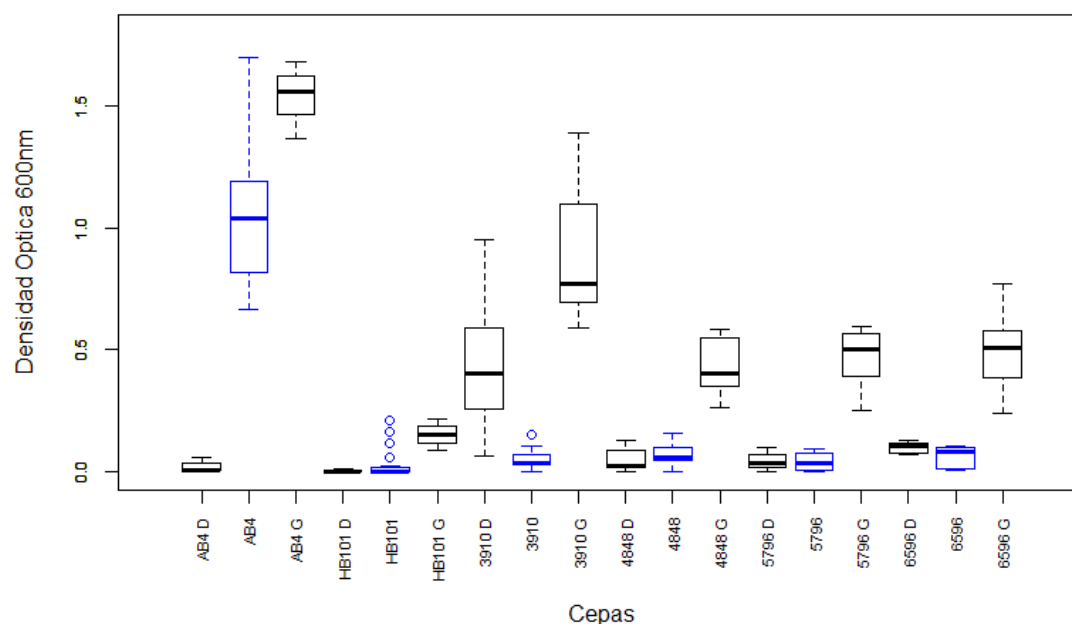


Figura 22: Influencia de distintas condiciones nutritivas sobre la biomasa de biopelículas de *Acinetobacter* spp. En el eje Y se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva ensayada. El orden asignado de las condiciones nutritivas fue: Dilución 1/10 del caldo nutritivo (D); Caldo nutritivo (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y caldo nutritivo suplementado con 500 mM de Glucosa (G). Controles AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas *A. baumannii*: 3910, 5796 y 6596; *Acinetobacter* spp: 4848

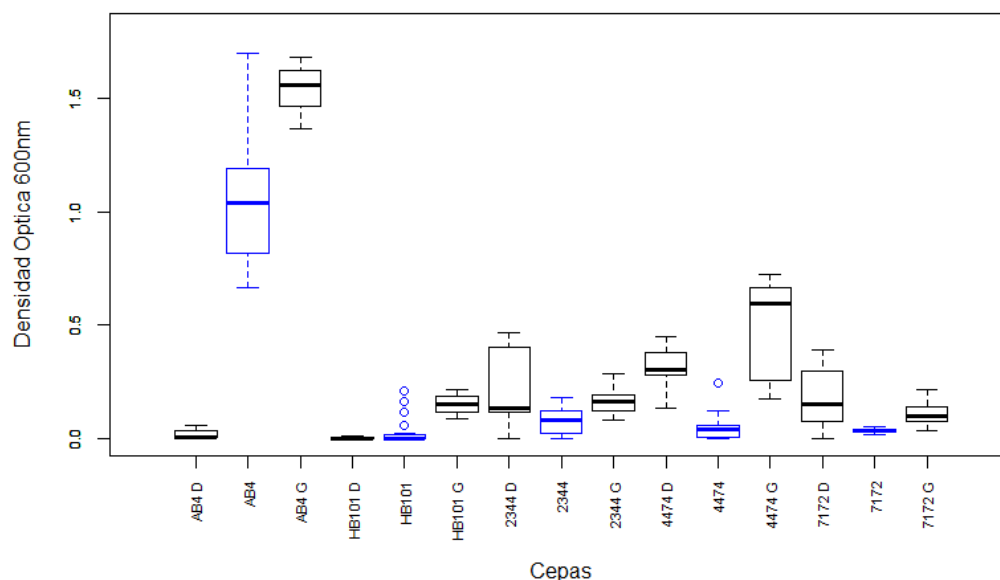


Figura 23: Influencia de distintas condiciones nutritivas sobre la biomasa de biopelículas de *S. marcescens*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas obtenidos. En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva ensayada. El orden asignado de las condiciones nutritivas fue: Dilución 1/10 del caldo nutritivo (D); Caldo nutritivo (diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y caldo nutritivo suplementado con 500 mM de Glucosa (G). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. *S. marcescens*: 7172, 2344 y 4474

La cepa de referencia *E. coli* MG1655 mantuvo la capacidad de formación de biopelículas débiles, sin que las condiciones nutrientes representasen estímulos en su desarrollo. En cambio, la ausencia del gen *dam* en *E. coli* MG1655, se detectó producción de biomasa de biopelículas en caldo nutritivo diluido en 1/10. La capacidad de desarrollo de biopelículas disminuyó a medida que incrementaron las cantidades de nutrientes presentes en el caldo nutritivo (figura 24).

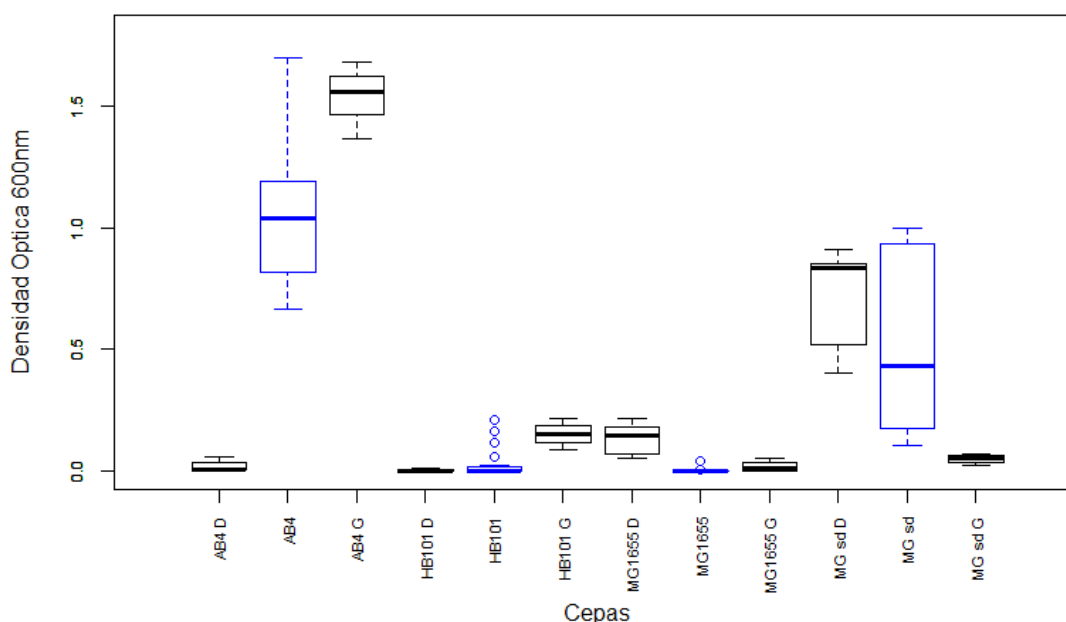


Figura 24: Influencia de distintas condiciones nutritivas sobre la biomasa de biopelículas de *E. coli*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas obtenidos. En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: Dilución 1/10 del caldo nutritivo (D); Caldo nutritivo (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y caldo nutritivo suplementado con 500 mM de Glucosa (G). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. *E. coli* MG1655 (MG1655) y *E. coli* Δdam (MGsD).

En resumen, la mayoría de las cepas de *A. baumannii* y *Acinetobacter* spp. hubo un efecto evidente de incremento de producción de biopelículas (figura 22 y tabla 25), en función de la disposición de glucosa en el medio. La disponibilidad de la fuente de carbono no resultó ser un estímulo en el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens* (figura 23 y tabla 25). En cuanto a *E. coli* MG1655, ninguna de las condiciones indujo la formación de biopelículas;

en cambio, su cepa isogénica, se formaron biopelículas en un medio de cultivo con una baja disponibilidad de fuente de carbono (figura 24 y tabla 25).

Tabla 25: Efecto de las diferentes condiciones nutritivas sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas

	1/10 CN – TA		CN – TA		CN + 500 mM glucosa -TA	
	UA	CB	UA	CB	UA	CB
Aba AB4	0,1701	1	1,1356	3	1,9702	3
Eco HB101	0,0967	1	0,1661	1	0,5605	2
Aba 3910	3,3589	2	0,1116	1	0,9868	3
Asp 4848	0,5882	1	0,1049	1	0,4173	2
Aba 5796	0,3129	1	0,0629	1	0,7036	3
Aba 6596	0,9628	1	0,1007	1	0,7963	2
Sma 7172	1,0041	2	0,0485	1	0,0840	1
Sma 2344	1,0570	2	0,1260	1	0,1289	2
Sma 4474	1,4387	2	0,0942	1	0,4729	3
Eco MG1655	0,7958	1	0,0109	0	0,0508	1
Eco Δdam	7,0692	3	1,0851	2	0,1546	1

La clasificación numérica de la capacidad de formación de biopelículas, se basó en la interpretación de resultados propuesto por Stepanović (2007). CN: Caldo nutritivo; TA: Temperatura ambiente; Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp.; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli*. UA: Unidades de adhesión. CB: Clasificación de biopelículas. 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

VII.3.2 Metionina

Se evaluó el efecto del aminoácido metionina sobre la formación de biopelículas, a concentraciones de 0,5; 2,5; 5 y 25 μ M. Como resultados se detectaron efectos diversos en la formación de biopelículas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp. (ANOVA; $F = 15,46$; $df = 4$; $p < 0,001$) y *S. marcescens* (ANOVA; $F = 4,215$; $df = 4$; $p < 0,001$). En determinadas concentraciones de metionina, hubo tanto disminución como aumento en biomasa de biopelículas.

La presencia de metionina no indujo el desarrollo de biopelículas en la mayoría de las cepas *Acinetobacter* spp. (figura 25). En cuanto a la cepa *A. baumannii* 3910, que presentó el mayor efecto sobre la formación de

biopelículas, las concentraciones 0,5 y 5 μM de metionina produjeron la disminución de biomasa de biopelículas; mientras que a 2,5 μM de metionina, se observó un ligero aumento en biopelículas.

En cambio, la biomasa de biopelículas formada en *S. marcescens* parece ser favorecida por la presencia de metionina (figura 26). Se observa un mayor efecto de aumento de biopelículas en la cepa *S. marcescens* 4474, comparado con el resto de las cepas de *S. marcescens*.

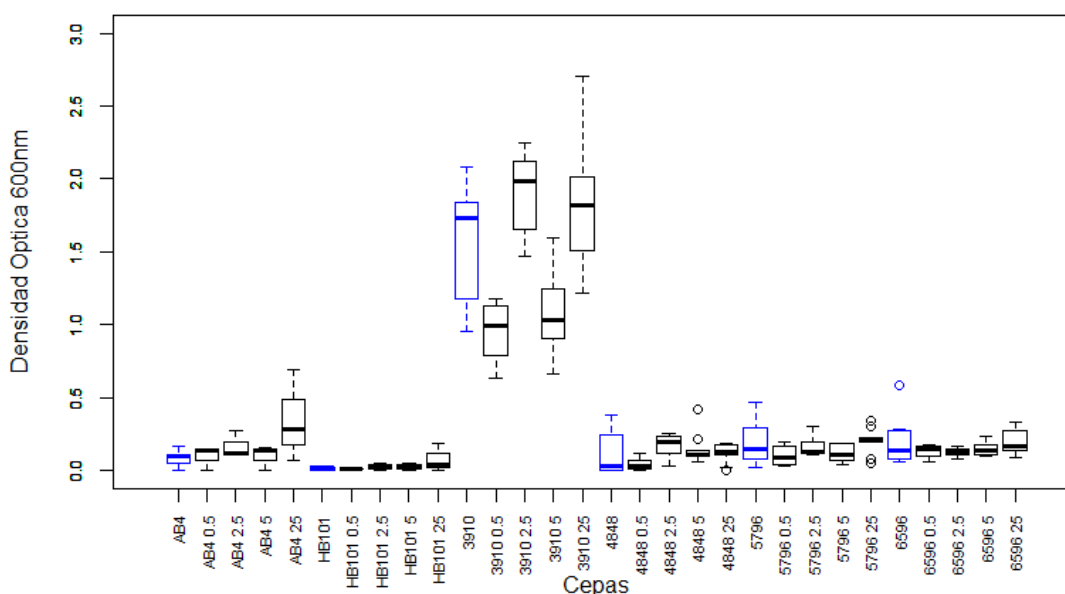


Figura 25: Influencia de distintas concentraciones de metionina sobre la biomasa de biopelículas de *Acinetobacter* spp. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($\text{DO}_{\lambda=600 \text{ nm}}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: 0 (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul); 0,5; 2,5; 5; y 25 μM de metionina. AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas *A. baumannii*: 3910, 5796 y 6596; *Acinetobacter* spp: 4848.

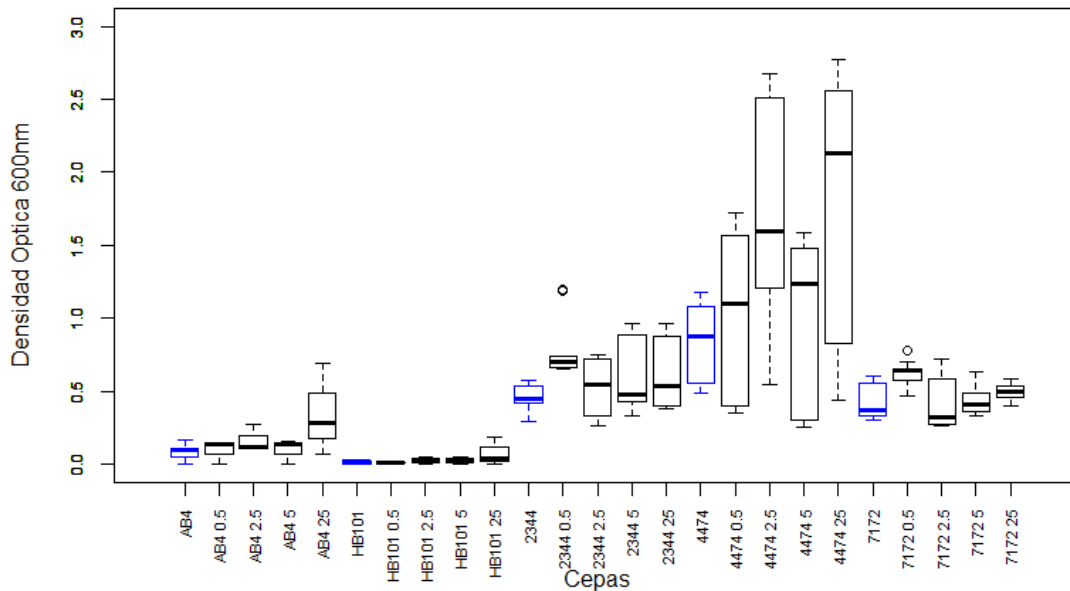


Figura 26: Influencia de distintas concentraciones de metionina sobre la biomasa de biopelículas de *S. marcescens*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600 \text{ nm}}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: 0 (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul); 0,5; 2,5; 5; y 25 μM de metionina. AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas *S. marcescens* 2344, 4474 y 7172.

En cuanto a la cepa de referencia *E. coli* MG1655 y *E. coli* MG1655 Δdam , la metionina no indujo el desarrollo de biopelículas (ANOVA; $F = 1,316$; $df = 4$; $p > 0,1$). Sin embargo, en la cepa mutante hubo un efecto variable de biomasa de biopelículas, en función de las concentraciones de metionina. Por lo general, la presencia de metionina disminuyó la biomasa de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam (figura 27).

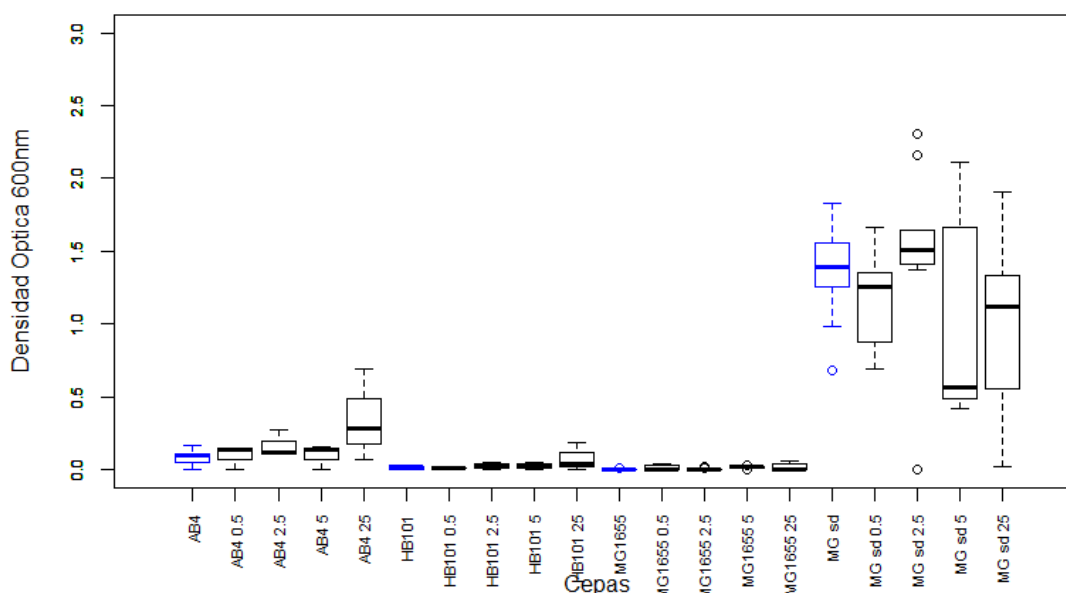


Figura 27: Influencia de distintas concentraciones de metionina sobre la biomasa de biopelículas de *E. coli*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600\text{ nm}}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: 0 (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul); 0,5; 2,5; 5; y 25 μM de metionina. AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. *E. coli* MG1655 (MG1655) y *E. coli* Δdam (MGsD).

En función de la concentración del aminoácido metionina empleada, se disminuye la formación de biopelículas de *A. baumannii*. En cambio, la presencia de metionina estimula el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens*. En cuanto a *E. coli* MG1655 mutante, la presencia de metionina altera el desarrollo de biopelículas. Sin embargo, en cuanto a las UA (tabla 25), por lo general, se mantuvo un valor promedio similar entre tratamientos, conservándose además la clasificación de biopelículas para *Acinetobacter*, *S. marcescens* y *E. coli* MG1655 (tabla 26).

Tabla 26: Efecto de la metionina sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas

	M9-TA		M9+0,5µM met-TA		M9+2,5µM met-TA		M9+5µM met-TA		M9+25µM met-TA	
	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB
Aba AB4	2,2204	1	1,6196	1	1,8623	1	1,9653	2	0,8626	1
Eco HB101	0,2316	1	0,2528	1	0,2988	1	1,1672	1	0,2713	1
Aba 3910	10,7178	3	5,8957	3	10,0784	3	5,2228	3	11,1329	3
Asp 4848	0,3512	1	0,1535	1	0,5000	1	0,3214	1	0,3292	1
Aba 5796	0,6967	1	2,5667	1	1,7236	1	2,1402	1	2,4511	2
Aba 6596	1,4420	1	3,1867	1	2,2984	1	2,1840	1	2,5940	1
Sma 7172	0,7258	2	1,0465	3	0,5970	2	0,7549	2	0,7828	2
Sma 2344	0,6995	2	1,4207	3	0,8080	2	1,0481	3	1,0015	2
Sma 4474	1,2875	3	1,7372	3	2,6520	3	1,7341	3	3,1723	3
Eco MG1655	0,0019	0	0,0283	0	0,0060	0	0,0290	1	0,0323	0
Eco Δdam	3,3302	3	3,4335	3	4,9584	3	2,6047	3	3,3113	3

La clasificación numérica de la capacidad de formación de biopelículas, se basó en la interpretación de resultados propuesto por Stepanović (2007). M9: medio mínimo mineral M9; Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp.; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli*. UA: Unidades de adhesión. met: metionina. TA: temperatura ambiente. CB: Clasificación de biopelículas. 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

VII.3.3 Etanol

Se evaluó el efecto del etanol en la formación de biopelículas, a una concentración de 1% (v/v). Como resultados se detectó que, en las cepas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp. (ANOVA; $F = 234,135$; $df = 1$; $p < 0,001$) y *S. marcescens* de estudio (ANOVA; $F = 92,06$; $df = 1$; $p < 0,001$), hubo un aumento significativo en biomasa de biopelículas (ver figuras 28, 29 y 30) y en la capacidad de adhesión sobre superficies de poliestireno. En la tabla 27 se observa que, en su mayoría, las cepas son clasificadas como formadoras de biopelículas moderadas o fuertes.

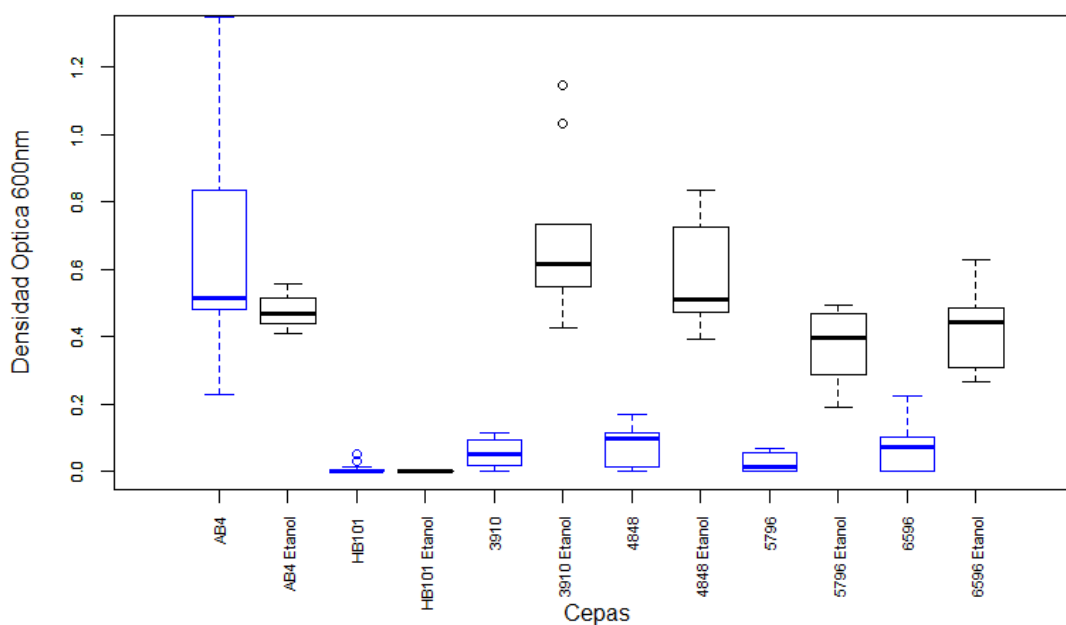


Figura 28: Influencia del etanol sobre la biomasa de biopelículas de *Acinetobacter* spp. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de etanol (Et). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas *A. baumannii*: 3910, 5796 y 6596; *Acinetobacter* spp: 4848.

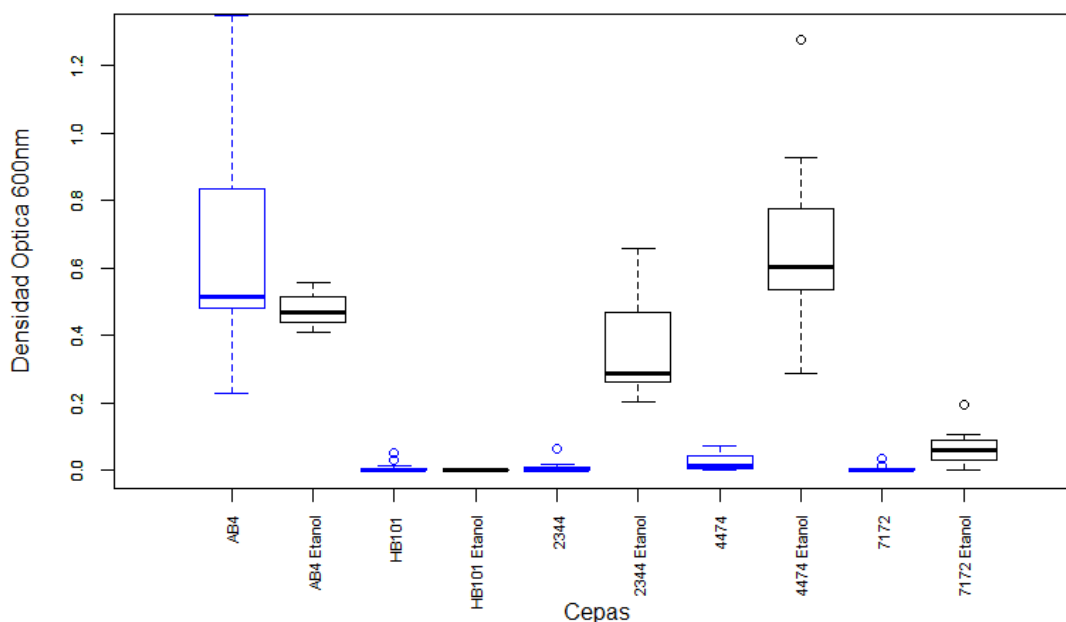


Figura 29: Influencia del etanol sobre la biomasa de biopelículas de *S. marcescens*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de etanol (Et). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas de *S. marcescens* 7172, 2344 y 4474.

El etanol al 1% estimuló la formación de biopelículas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens*. En presencia de etanol, hubo incremento de la densidad celular bacteriana (DO_a observado en UA). Por lo que el etanol a bajas concentraciones estimula, además, el crecimiento bacteriano.

En cuanto a las cepas de *E. coli* MG1655 y *E. coli* MG1655 Δdam se detectaron aumentos pocos relevantes en biomasa de biopelículas (ANOVA; $F = 8,337$; $df = 1$; $p < 0,01$) y unidades de adhesión (figura 30 y tabla 27), en presencia de cantidades trazas de etanol. La cepa *E. coli* MG1655 Δdam mantuvo su clasificación como formadora de biopelículas débiles.

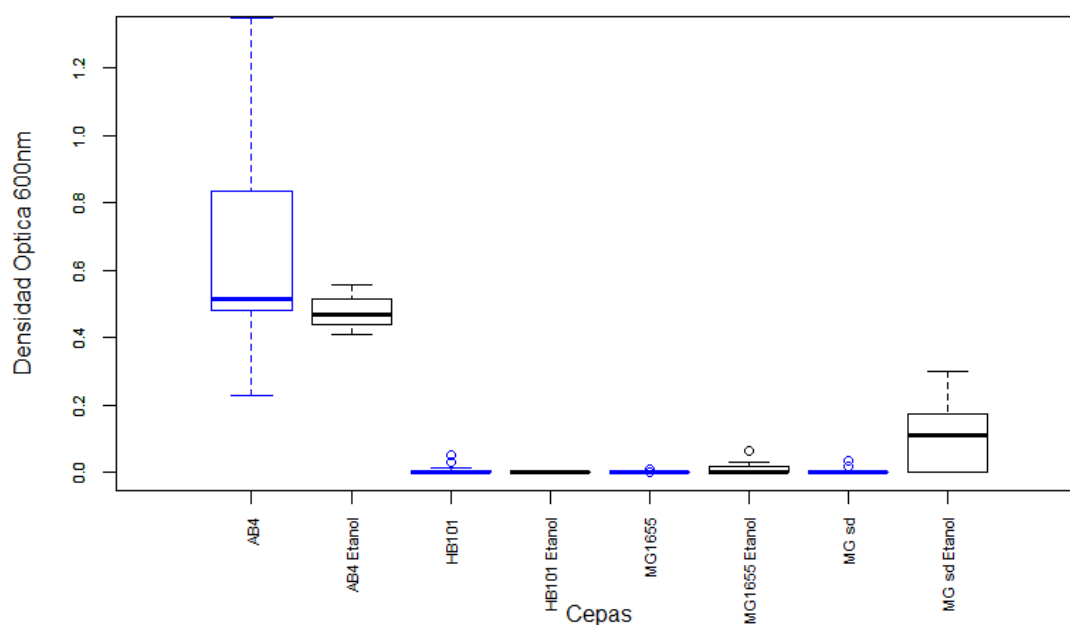


Figura 30: Influencia del etanol sobre la biomasa de biopelículas de *E. coli*. Se presentan los valores de DO biopelículas. En el eje Y, se presentan los valores de $DO_{\text{biopelículas}}$ obtenidos. En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de etanol (Et). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas de *E. coli* MG1655 (MG1655) y *E. coli* Δdam (MGsD).

Tabla 27: Efecto del etanol sobre las unidades de adhesión y la clasificación de la capacidad de formación biopelículas

	CN-37°C		CN + 1% etanol-37°C	
	UA	CB	UA	CB
Aba AB4	1,0689	3	0,8231	2
Eco HB101	0,0277	0	0,0000	0
Aba 3910	0,1153	1	0,5503	3
Asp 4848	0,1732	1	0,6198	2
Aba 5796	0,0469	1	0,2618	2
Aba 6596	0,1407	1	0,3374	2
Sma 7172	0,0123	0	0,0743	1
Sma 2344	0,0244	0	0,4715	2
Sma 4474	0,0492	1	0,6484	3
Eco MG1655	0,0030	0	0,0229	0
Eco Δdam	0,0125	0	0,2009	1

La clasificación numérica de la capacidad de formación de biopelículas, se basó en la interpretación de resultados propuesto por Stepanović (2007). CN: Caldo nutritivo; Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp.; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli*. UA: Unidades de adhesión; CB: Clasificación de biopelículas. 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

VII.3.4 EDTA

Se evaluó el efecto del EDTA en la formación de biopelículas, a una concentración de 30 mg/mL. Como resultado se detectó que, en todas las cepas de estudio (incluidos los controles), hubo una reducción en biomasa de biopelículas (ANOVA; $F = 52,437$; $df = 1$; $p < 0,001$) (ver figuras 31, 32 y 33) y en la capacidad de adhesión sobre superficies de poliestireno, clasificándose a las cepas como no formadoras de biopelículas en esta condición ensayada (tabla 28).

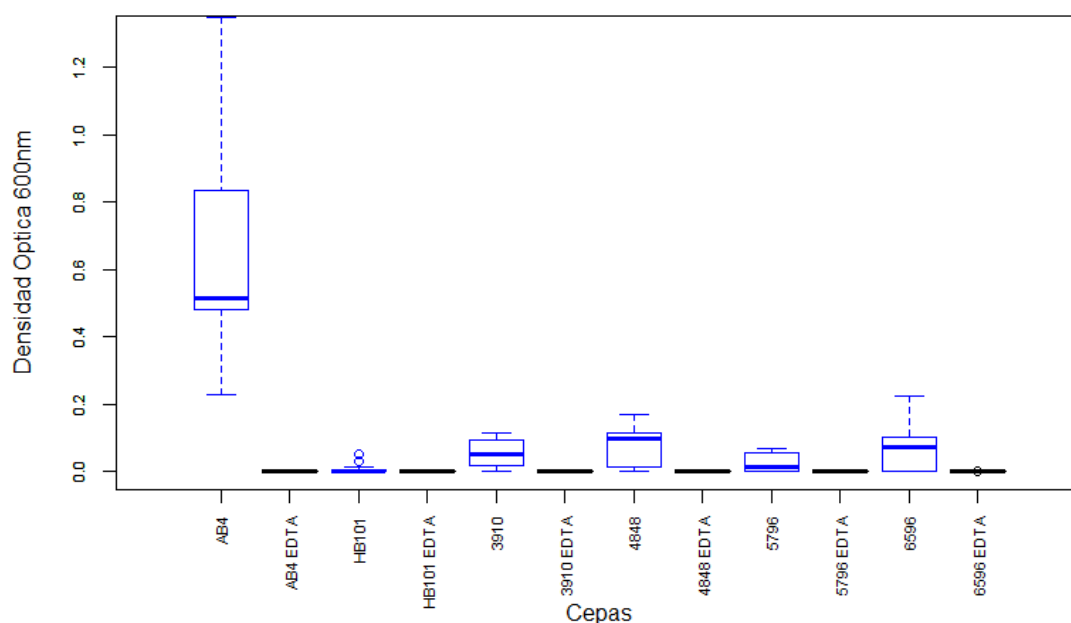


Figura 31: Influencia del EDTA sobre la biomasa de biopelículas de *Acinetobacter* spp. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de EDTA (EDTA). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas *A. baumannii*: 3910, 5796 y 6596; *Acinetobacter* spp: 4848.

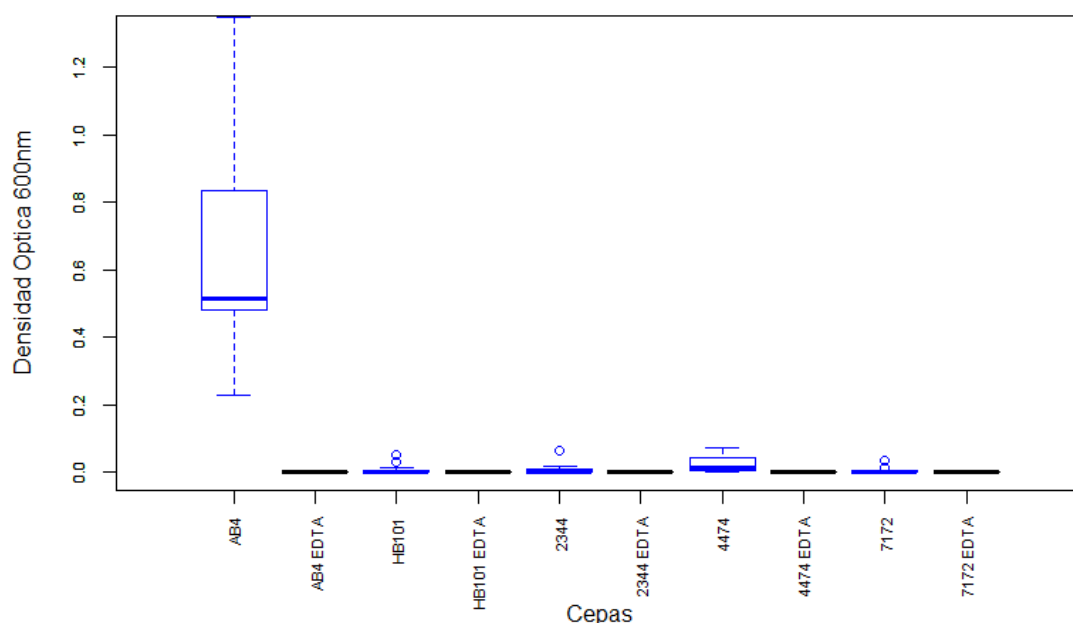


Figura 32: Influencia del EDTA sobre la biomasa de biopelículas de *S. marcescens*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de EDTA (EDTA). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas de *S. marcescens* 7172, 2344 y 4474.

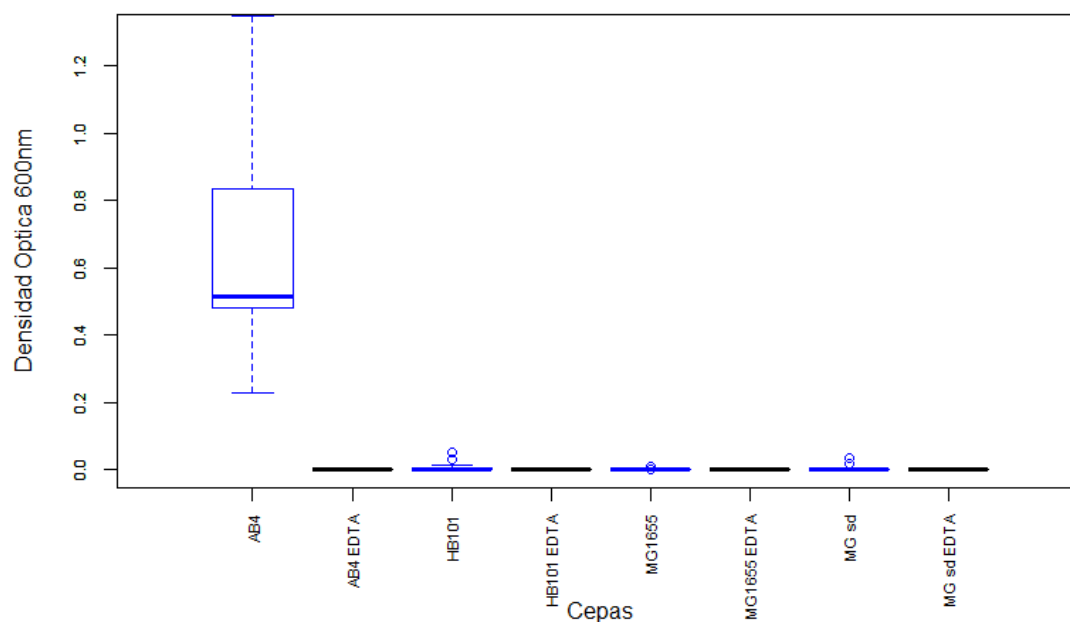


Figura 33: Influencia del EDTA sobre la biomasa de biopelículas de *E. coli*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de EDTA (EDTA). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas de *E. coli*: *E. coli* MG1655 (MG1655) y *E. coli* Δdam (MGsD).

Tabla 28: Efecto del EDTA sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas

	CN-37°C		CN+30mg/mL EDTA-37°C	
	UA	CB	UA	CB
Aba AB4	1,0689	3	0,0000	0
Eco HB101	0,0277	0	0,0000	0
Aba 3910	0,1153	1	0,0000	0
Asp 4848	0,1732	1	0,0000	0
Aba 5796	0,0469	1	0,0000	0
Aba 6596	0,1407	1	0,0064	0
Sma 7172	0,0123	0	0,0000	0
Sma 2344	0,0244	1	0,0000	0
Sma 4474	0,0492	1	0,0000	0
Eco MG1655	0,0030	0	0,0000	0
Eco Δdam	0,0125	0	0,0000	0

La clasificación numérica de la capacidad de formación de biopelículas, se basó en la interpretación de resultados propuesto por Stepanović (2007). CN: Caldo nutritivo; Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp.; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli*. UA: Unidades de Adhesión; CB: Clasificación de biopelículas. 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora débil de biopelículas; 2: cepa formadora moderada de biopelículas; 3: cepa formadora fuerte de biopelículas.

El EDTA presentó actividad inhibitoria sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp., *S. marcescens* y *E. coli*. En presencia de EDTA, se disminuyó además la densidad celular bacteriana (DO_a en UA), sugiriendo que el EDTA está afectando, además, el crecimiento bacteriano.

VII.3.5 Surfactantes

Se evaluaron los efectos de los surfactantes CTAB (Bromuro de CetilTrimetilAmonio) (0,9 mM) y SDS (DodecilSulfato Sódico) (7 mM) sobre la formación de biopelículas. Como resultado se detectó que en las cepas de estudio, hubo una reducción significativa en la biomasa de biopelículas (ANOVA; CTAB: $F = 441,39$; $df = 1$; $p < 0,001$ / SDS: (ANOVA; $F = 471,92$; $df = 1$; $p < 0,001$). Todas las biopelículas formadas por las cepas de estudio expuestas a surfactantes, fueron clasificadas como formadoras débiles (en

CTAB) o no formadoras de biopelículas (en SDS) (ver figuras 34, 35, 36 y tabla 29).

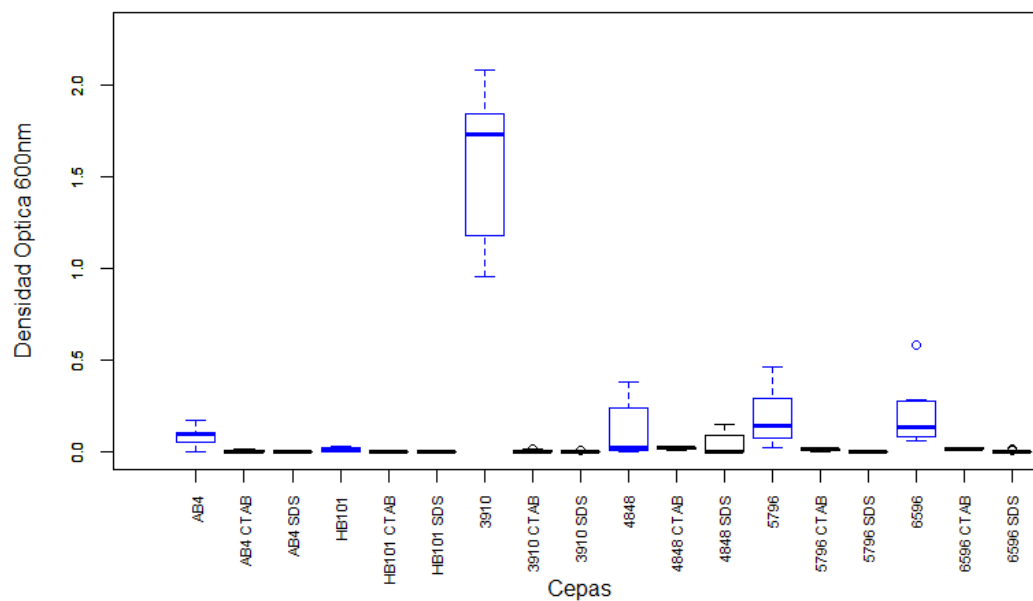


Figura 34: Influencia de los surfactantes CTAB y SDS sobre la biomasa de biopelículas de *Acinetobacter* spp. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de surfactantes (CTAB o SDS). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas *A. baumannii*: 3910, 5796 y 6596; *Acinetobacter* spp: 4848.

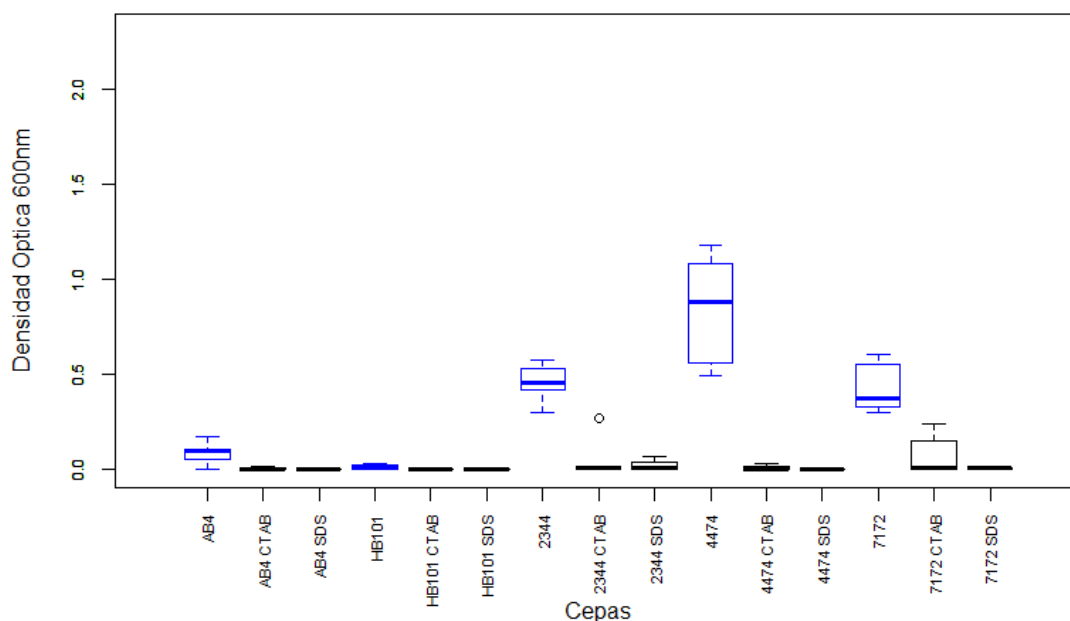


Figura 35: Influencia de los surfactantes CTAB y SDS sobre la biomasa de biopelículas de *S. marcescens*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de surfactantes (CTAB o SDS). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas de *S. marcescens* 7172, 2344 y 4474.

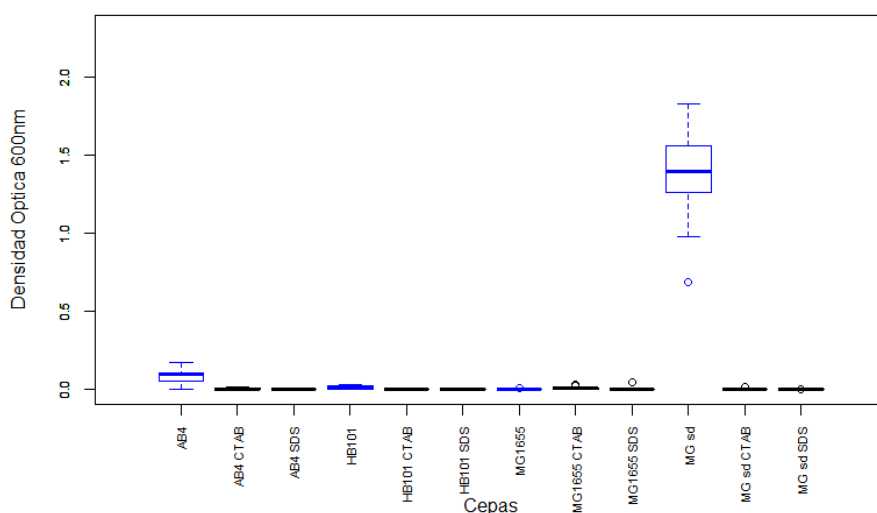


Figura 36: Influencia de los surfactantes CTAB y SDS sobre la biomasa de biopelículas de *E. coli*. En el eje Y, se presentan los valores de DO biopelículas ($DO_{\lambda=600nm}$). En el eje X, se organiza el número de registro de la cepa de estudio, seguido de la condición nutritiva de crecimiento ensayada. Para cada cepa, el orden asignado de las condiciones nutritivas fue: ausencia (el diagrama de caja y bigote está delineado en color azul) y presencia de surfactantes (CTAB o SDS). AB4: *A. baumannii* AB4; HB101: *E. coli* HB101. Cepas de *E. coli* MG1655 (MG1655) y *E. coli* Δdam (MGsd).

Tabla 29: Efecto de los surfactantes CTAB y SDS sobre las unidades de adhesión y clasificación de la capacidad de formación biopelículas

	M9-TA		M9+0,9mM CTAB-TA		M9+7mM SDS-TA	
	UA	CB	UA	CB	UA	CB
Aba AB4	2,2204	1	0,7530	0	0,5354	0
Eco HB101	0,2316	1	0,0000	0	0,0000	0
Aba 3910	10,7178	3	0,5829	1	0,0316	0
Asp 4848	0,3512	1	2,0268	1	3,1157	0
Aba 5796	0,6967	1	1,3288	1	0,0000	0
Aba 6596	1,4420	1	1,3751	1	0,3560	0
Sma 7172	0,7258	2	0,2702	1	0,0904	1
Sma 2344	0,6995	2	0,5779	1	0,3830	1
Sma 4474	1,2875	3	1,5406	1	0,0383	0
Eco MG1655	0,0019	0	1,4430	1	0,0363	0
Eco Δdam	3,3302	3	0,6549	1	0,0009	0

La clasificación numérica de la capacidad de formación de biopelículas, se basó en la interpretación de resultados propuesto por Stepanović (2007). M9 medio mínimo mineral M9; Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp.; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli*. UA: Unidades de Adhesión; CB: Clasificación de biopelículas. 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

En la tabla 30 se presenta un cuadro resumen de los resultados obtenidos en cuanto al efecto de los estímulos del entorno ensayados sobre la formación de las biopelículas de las respectivas cepas bacterianas de estudio, destacando los valores obtenidos en DO biopelículas y UA.

Tabla 30: Cuadro resumen de los efectos de estímulos del entorno sobre la formación de las biopelículas de las cepas clínicas *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp., *S. marcescens* y la cepa de referencia *E. coli* MG1655

Características de la muestra clínica			Agar Rojo Congo	Ensayos de formación de biopelículas											
				CN-TA		CN-37°C		M9-TA		M9-37°C		1/10 CN - TA		CN+500 mM glucosa-TA	
				UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB
Aba AB4 Eco HB101	NA	NA	rdar	1,136	3	1,069	3	2,2204	1	5,12	1	0,1701	1	1,9702	3
	NA	NA	pdar	0,166	1	0,028	0	0,2316	1	0,432	1	0,0967	1	0,5605	2
Aba 3910a*	Terapia de adultos	Secreción bronquial	pdar	0,112	1	0,115	1	10,718	3	8,994	3	3,3589	2	0,9868	3
Asp 4848	Hospitalización	Flictena	pdar	0,105	1	0,173	1	0,3512	1	1,446	2	0,5882	1	0,4173	2
Aba 5796	Ambulatorio	Úlcera	saw	0,063	1	0,047	1	0,6967	1	0,994	2	0,3129	1	0,7036	3
Aba 6596	Ambulatorio	Secreción inguinal	saw	0,101	1	0,141	1	1,442	1	2,679	2	0,9628	1	0,7963	2
Sma 7172b*	Terapia de adultos	Secreción bronquial	pdar	0,049	1	0,012	0	0,7258	2	0,251	1	1,0041	2	0,0840	1
Sma 2344	Ambulatorio	Secreción de pie	pdar	0,126	1	0,024	1	0,6995	2	0,473	2	1,0570	2	0,1289	2
Sma 4474	Ambulatorio	Orina	pdar	0,094	1	0,049	1	1,2875	3	1,01	3	1,4387	2	0,4729	3
Eco MG1655	NA	NA	pdar	0,011	0	0,003	0	0,0019	0	0,005	0	0,7958	1	0,0508	1
Eco Δdam	NA	NA	rdar a TA	1,085	2	0,013	0	3,3302	3	0,042	0	7,0692	3	0,1546	1

Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli* ; ^{a*} y ^{b*}: Aislados bacterianos tomados del mismo paciente, en distintos tiempos; NA: No Aplica; Morfotipo rdar: colonias rojas, secas y rugosas; pdar: colonias rosadas, secas y rugosas; saw: colonias blancas y lisas; CN: Caldo Nutritivo; M9: Medio Mínimo Mineral M9; TA: Temperatura ambiente; UA: Unidades de Adhesión; CB: Clasificación de biopelículas; 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

Tabla 30: Cuadro resumen de los efectos de estímulos del entorno sobre la formación de las biopelículas de las cepas clínicas *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp., *S. marcescens* y la cepa de referencia *E. coli* MG1655 (continuación)

Características de la muestra clínica			Agar Rojo Congo	Ensayos de formación de biopelículas											
				M9+0,5µM met-TA		M9+2,5µM met-TA		M9+5µM met-TA		M9+25µM met-TA		CN+30mg/mL EDTA-37°C		CN+1% etanol-37°C	
				UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB
Aba AB4	NA	NA	rdar	1,6196	1	1,8623	1	1,9653	2	0,8626	1	0	0	0,8231	2
Eco HB101	NA	NA	pdar	0,2528	1	0,2988	1	1,1672	1	0,2713	1	0	0	0	0
Aba 3910a*	Terapia de adultos	Secreción bronquial	pdar	5,8957	3	10,0784	3	5,2228	3	11,1329	3	0	0	0,5503	3
Asp 4848	Hospitalización	Flictena	pdar	0,1535	1	0,5	1	0,3214	1	0,3292	1	0	0	0,6198	2
Aba 5796	Ambulatorio	Úlcera	saw	2,5667	1	1,7236	1	2,1402	1	2,4511	2	0	0	0,2618	2
Aba 6596	Ambulatorio	Secreción inguinal	saw	3,1867	1	2,2984	1	2,184	1	2,594	1	0,0064	0	0,3374	2
Sma 7172b*	Terapia de adultos	Secreción bronquial	pdar	1,0465	3	0,597	2	0,7549	2	0,7828	2	0	0	0,0743	1
Sma 2344	Ambulatorio	Secreción de pie	pdar	1,4207	3	0,808	2	1,0481	3	1,0015	2	0	0	0,4715	2
Sma 4474	Ambulatorio	Orina	pdar	1,7372	3	2,652	3	1,7341	3	3,1723	3	0	0	0,6484	3
Eco MG1655	NA	NA	pdar	0,0283	0	0,006	0	0,029	1	0,0323	0	0	0	0,0229	0
Eco Δdam	NA	NA	rdar a TA	3,4335	3	4,9584	3	2,6047	3	3,3113	3	0	0	0,2009	1

Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli* ; ^{a*} y ^{b*}: Aislados bacterianos tomados del mismo paciente, en distintos tiempos; NA: No Aplica; Morfotipo rdar: colonias rojas, secas y rugosas; pdar: colonias rosadas, secas y rugosas; saw: colonias blancas y lisas; CN: Caldo Nutritivo; M9: Medio Mínimo Mineral M9; TA: Temperatura ambiente; UA: Unidades de Adhesión; CB: Clasificación de biopelículas; 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes.

Tabla 30: Cuadro resumen de los efectos de estímulos del entorno sobre la formación de las biopelículas de las cepas clínicas *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp., *S. marcescens* y la cepa de referencia *E. coli* MG1655 (continuación)

Características de la muestra clínica			Agar Rojo Congo	Ensayos de formación de biopelículas			
				M9+0,9mM CTAB-TA		M9+7mM SDS-TA	
Sala/Unidad	Fuente de la muestra			UA	CB	UA	CB
Aba AB4	NA	NA	rdar	0,753	0	0,5354	0
Eco HB101	NA	NA	pdar	0	0	0	0
Aba 3910a [*]	Terapia de adultos	Secreción bronquial	pdar	0,5829	1	0,0316	0
Asp 4848	Hospitalización	Flictena	pdar	2,0268	1	3,1157	0
Aba 5796	Ambulatorio	Úlcera	saw	1,3288	1	0	0
Aba 6596	Ambulatorio	Secreción inguinal	saw	1,3751	1	0,356	0
Sma 7172b [*]	Terapia de adultos	Secreción bronquial	pdar	0,2702	1	0,0904	1
Sma 2344	Ambulatorio	Secreción de pie	pdar	0,5779	1	0,383	1
Sma 4474	Ambulatorio	Orina	pdar	1,5406	1	0,0383	0
Eco MG1655	NA	NA	pdar	1,443	1	0,0363	0
Eco Δdam	NA	NA	rdar a TA	0,6549	1	0,0009	0

Aba: *A. baumannii*; Asp: *Acinetobacter* spp; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli* ; ^{a*} y ^{b*}: Aislados bacterianos tomados del mismo paciente, en distintos tiempos; NA: No Aplica; Morfotipo rdar: colonias rojas, secas y rugosas; pdar: colonias rosadas, secas y rugosas; saw: colonias blancas y lisas; CN: Caldo Nutritivo; M9: Medio Mínimo Mineral M9; TA: Temperatura ambiente; UA: Unidades de Adhesión; CB: Clasificación de biopelículas; 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes

VII.4 Análisis de la metilación del genoma de bacterias en biopelículas, mediante ensayos de restricción enzimática

Para vincular la metilación del ADN con los fenotipos de biopelículas, se emplearon ensayos de restricción enzimática. La digestión del cromosoma bacteriano se realizó con las enzimas de restricción Sau3AI, DpnI y MboI, que permitieron detectar los patrones de metilación global del ADN sobre los motivos GATC. El genoma de estudio se aisló de células formadoras de biopelículas, cultivadas en diferentes condiciones del entorno. Los productos de la digestión del ADN genómico fueron analizados para identificar los patrones de metilación del ADN. En la tabla 12 (de materiales y métodos) se describe los sitios de reconocimiento y catálisis de las enzimas de restricción empleadas.

Con la intención de detectar las variaciones en los patrones de metilación del genoma bacteriano creciendo en formato de biopelículas, se eligió replicar aquellas condiciones del entorno en las que se estimuló el desarrollo de biopelículas de las cepas clínicas *A. baumannii* 3910 y *S. marcescens* 4474, que fueron el exceso de glucosa y cantidades traza de etanol, respectivamente (tabla 11, de materiales y métodos). Se seleccionaron estas cepas clínicas debido a que presentaron los valores mayores de biomasa de biopelículas formadas, comparados con las otras cepas clínicas ensayadas (figuras 22 y 29). La formación de las biopelículas de *E. coli* MG1655 y *E. coli* MG1655 Δdam en presencia de metionina, se seleccionó para indagar un poco más sobre las rutas metabólicas relacionadas con los procesos de metilación del ADN (figura 27).

En la tabla 31 se resume la cantidad de biomasa de biopelículas recolectada y la concentración de ADN aislado.

Tabla 31: Cantidad de ADN genómico aislado de biopelículas bacterianas, mediante el kit de extracción

	Ensayo control		Ensayo tratamiento	
	Biomasa de biopelículas (mg)	Concentración de ADN (µg/mL)	Biomasa de biopelículas (mg)	Concentración de ADN (µg/mL)
<i>A. baumannii</i> 3910	158	194,4	113	144,6
<i>S. marcescens</i> 4474	203	129	203	129
<i>E. coli</i> MG1655	130	105	159	101
<i>E. coli</i> Δ dam	187	108	159	124

Los ensayos control son aquellas biopelículas crecidas en los medios de cultivo CN o MMM M9; mientras que los ensayos tratamiento dichos medios de cultivo se encuentran suplementados con los estímulos del entorno de estudio.

Los ensayos de digestión con Sau3AI permitieron observar patrones de restricción característicos, en los cuales deben estar representados todos los motivos GATC del genoma de *A. baumannii* 3910, *S. marcescens* 4474 y *E. coli* MG1655. La distribución de las bandas en el patrón de digestión difiere entre los tres géneros bacterianos de estudio, como se observan en las figuras 38, 40 y 42.

VII.4.1 Niveles de metilación global del ADN en biopelículas de *A. baumannii* 3910 formadas con exceso de glucosa

Se evaluaron los niveles de metilación global del ADN de biopelículas de *A. baumannii* 3910 formadas en CN a TA; y CN + 500 mM de glucosa, a TA. En la figura 37, se observa la digestión del genoma bacteriano con las enzimas de restricción Sau3AI, DpnI y MboI. El patrón de ADN digerido se obtuvo con las enzimas Sau3AI y MboI, en las condiciones ensayadas. La digestión del genoma de biopelículas de *A. baumannii* 3910 con la enzima MboI, mas no con la enzima DpnI, evidencian la ausencia de metilación de los motivos GATC presentes en el genoma de *A. baumannii* 3910.

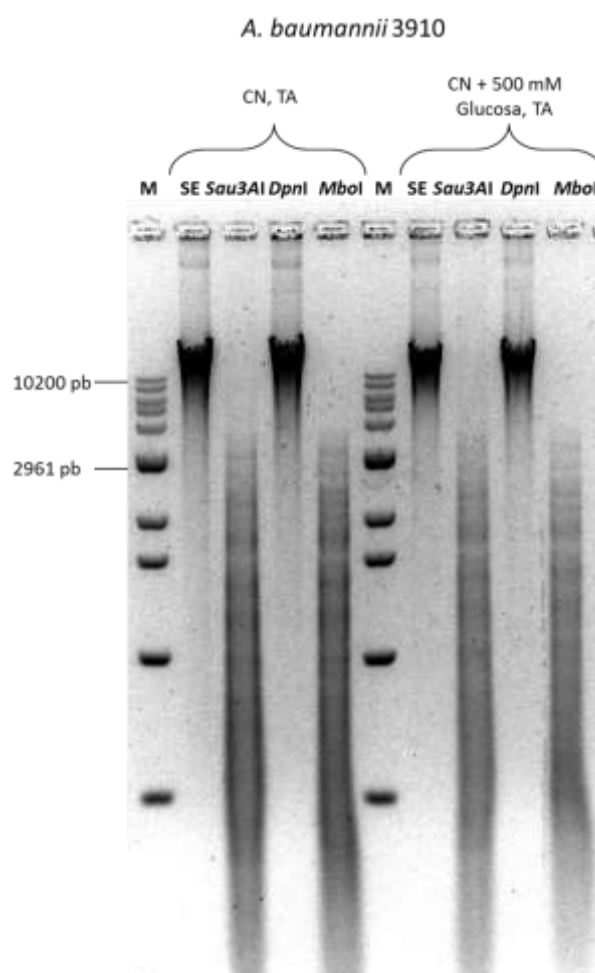


Figura 37: Registro fotográfico de la metilación global del ADN de biopelículas de *A. baumannii* 3910, formadas en distintas condiciones de glucosa. M: Marcador de Tamaño Molecular, de “1 kb DNA Ladder” (BIONEER); CN: Caldo nutritivo; SE: sin enzima, control negativo de reacción.

Las variaciones en los patrones de metilación del ADN se analizaron con la digestión del genoma bacteriano con las enzimas de restricción Sau3AI y MboI (figura 38). El ADN digerido con MboI presentó un patrón de bandas similar al de la digestión con Sau3AI. Su distribución consta de bandas de restricción de bajos tamaños moleculares. Se observó una distribución general en el patrón de bandas de ADN en biopelículas de *A. baumannii* 3910, en los distintos tratamientos. Sin embargo, se detectaron variaciones en la intensidad de bandas de ADN, particularmente en los patrones de bandas de restricción de ADN de biopelículas de *A. baumannii* 3910 formadas con exceso de

glucosa. Estas variaciones pueden ser por el efecto de las distintas concentraciones de ADN empleadas en los ensayos de restricción enzimática.

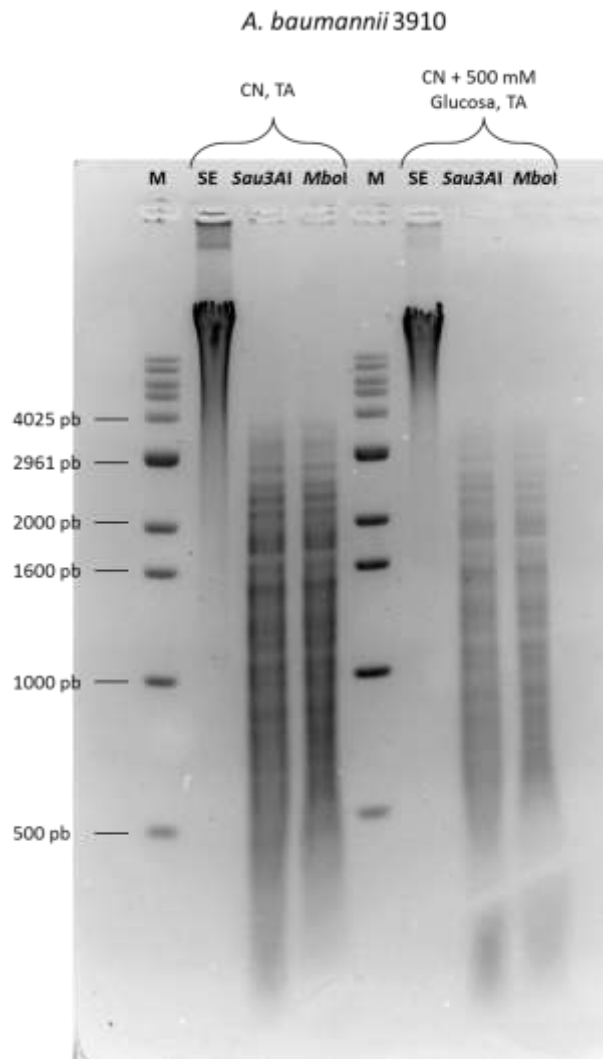


Figura 38: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas *A. baumannii*, formadas en distintas condiciones de glucosa. M: Marcador de Tamaño Molecular, de “1 kb DNA Ladder” (BIONEER); CN: caldo nutritivo; SE: sin enzima, control negativo de reacción.

VII.4.2 Niveles de metilación global del ADN en biopelículas de *S. marcescens* 4474 formadas en presencia de etanol 1 %

Se evaluaron los niveles de metilación global del ADN de biopelículas de *S. marcescens* 4474 formadas en CN a 37 °C; y CN + 1 % de etanol, a 37 °C. En la figura 39, se observa la digestión del genoma bacteriano con las enzimas de restricción Sau3AI, DpnI y MboI. El patrón de ADN digerido se obtuvo con las enzimas Sau3AI y DpnI, tanto en el genoma de *S. marcescens* 4474 aislado de biopelículas del ensayo control, como del tratamiento. La digestión del genoma de *S. marcescens* 4474 con la enzima DpnI, mas no con la enzima MboI, evidencian que los motivos GATC se encuentran metilados.

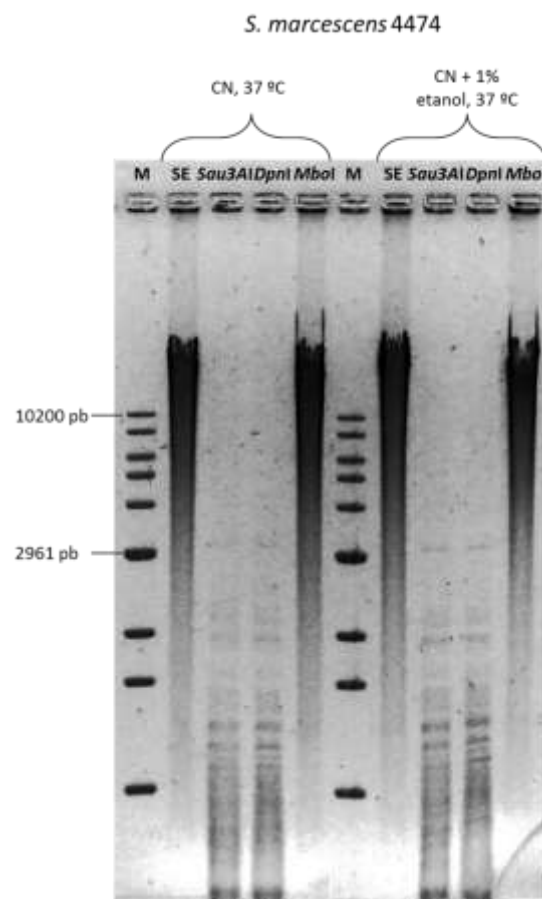


Figura 39: Registro fotográfico de la metilación global del ADN en biopelículas de *S. marcescens* 4474, formadas en distintas condiciones del entorno. M: Marcador de Tamaño Molecular, de “1 kb DNA Ladder” (BIONEER); CN: Caldo nutritivo; SE: sin enzima, control negativo de reacción.

Las variaciones en los patrones de metilación del ADN se analizaron con la digestión del genoma bacteriano con las enzimas de restricción Sau3AI y DpnI (figura 40). El ADN digerido con DpnI presentó un patrón de bandas similar al de la digestión con Sau3AI, en los distintos tratamientos. Su distribución consta de bandas visibles de restricción, de tamaños moleculares bajos. Se detectaron variaciones en la intensidad de bandas de ADN, entre los patrones de bandas de restricción del ADN de *S. marcescens* 4474 creciendo en biopelículas formadas en ausencia y presencia de etanol. Estos resultados revelan los posibles cambios de metilación del ADN entre las distintas condiciones ensayadas en el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens* 4474.

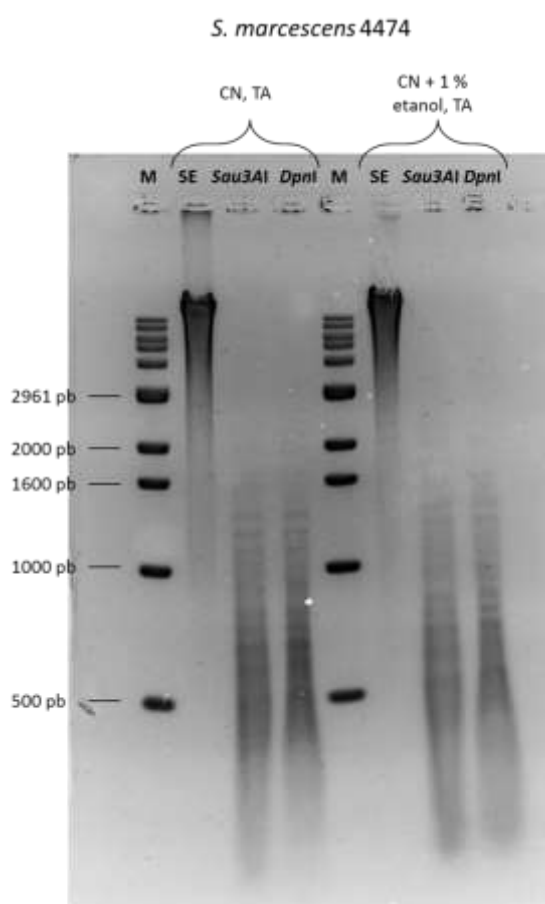


Figura 40: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas *S. marcescens*, formadas en ausencia y presencia de etanol. M: Marcador de Tamaño Molecular, de “1 kb DNA Ladder” (BIONEER); CN: caldo nutritivo; SE: sin enzima, control negativo de reacción.

VII.4.3 Niveles de metilación global del ADN en biopelículas de *E. coli* MG1655 y *E. coli* MG1655 Δdam formadas en presencia de metionina

Para la cepa *E. coli* MG1655 y su cepa isogénica mutante, se evaluaron los niveles de metilación global del ADN de biopelículas formadas en MMM M9, a TA; y MMM M9 + 5 μ M de metionina, a TA. En la figura 41, se observa la digestión del genoma bacteriano de ambas cepas, con las enzimas de restricción Sau3AI, DpnI y MboI. Se obtuvieron los patrones de restricción generales esperados: la digestión completa por DpnI del genoma de *E. coli* MG1655, mientras que en *E. coli* MG1655 Δdam ocurrió con la restricción catalizada por la enzima MboI. Este patrón de restricción fue similar para los genomas aislados de biopelículas del ensayo control, como del tratamiento. La digestión de los genomas de *E. coli* MG1655 y *E. coli* MG1655 Δdam , demuestran que los motivos GATC se encuentran metilados en el genoma de la cepa de *E. coli* MG1655 silvestre, mas no en el genoma de la cepa mutante.

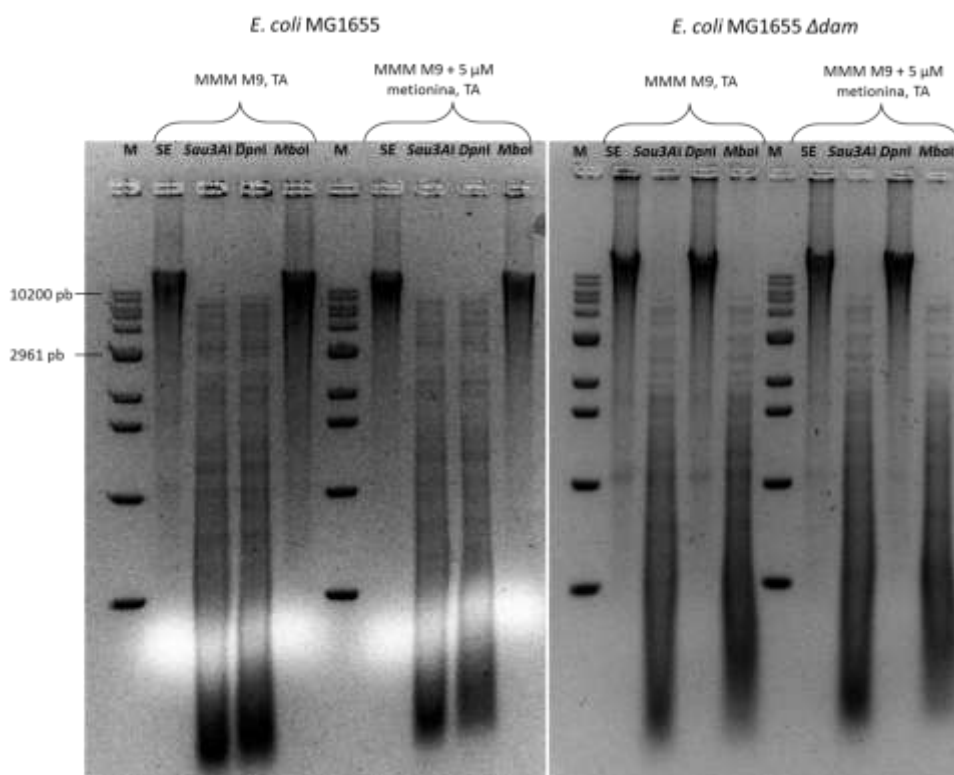


Figura 41: Registro fotográfico de la metilación global del ADN en biopelículas de *E. coli* MG1655 y su cepa isogénica Δdam , formadas en distintas condiciones del entorno. M: Marcador de Tamaño Molecular, de “1 kb DNA Ladder” (BIONEER); MMM: Medio mínimo mineral; TA: temperatura ambiente; SE: sin enzima, control negativo de reacción.

Las variaciones en los patrones de metilación del ADN se analizaron con la digestión del genoma bacteriano de la cepa silvestre *E. coli* MG1655, con las enzimas de restricción Sau3AI y DpnI (figura 42). La digestión del ADN de biopelículas de *E. coli* MG1655 con DpnI, presentó una distribución del patrón de bandas similar al de la digestión con Sau3AI, en los distintos tratamientos.

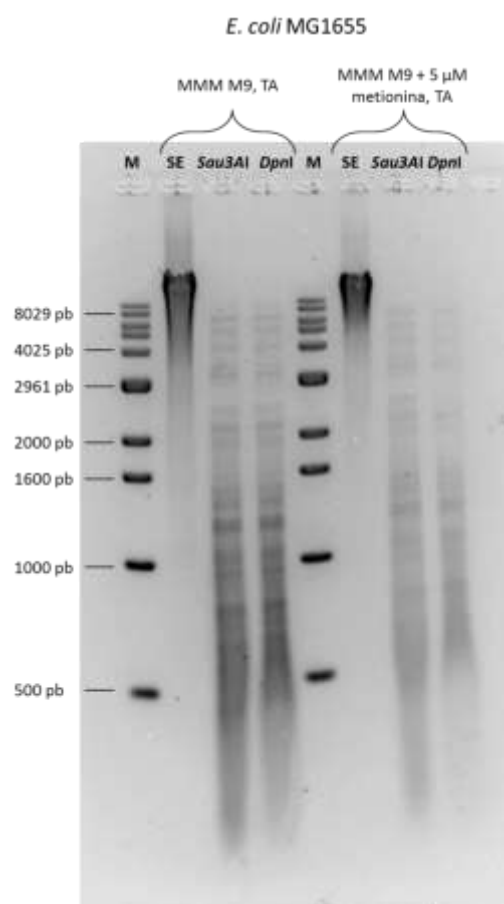


Figura 42: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas *E. coli*, formadas en ausencia y presencia de metionina. M: Marcador de Tamaño Molecular, de “1 kb DNA Ladder” (BIONEER); MMM: Medio mínimo mineral; SE: sin enzima, control negativo de reacción.

Sin embargo, en el patrón de bandas del ADN digerido con DpnI, de biopelículas de *E. coli* MG1655 formadas en presencia de 5 μ M de metionina, se detectaron variaciones sutiles en la intensidad de bandas presentes entre 8000 y 2000 pb. Tres bandas de restricción ADN no están presentes en el patrón de digestión con DpnI. En el patrón de restricción del ADN con Sau3AI, estas bandas tienen un tamaño estimado de 5917, 1965 y 1590 pb. La figura

43 se presenta un extracto del registro fotográfico, en el que se destaca las diferencias obtenidas en el patrón de digestión del ADN de *E. coli* MG1655.

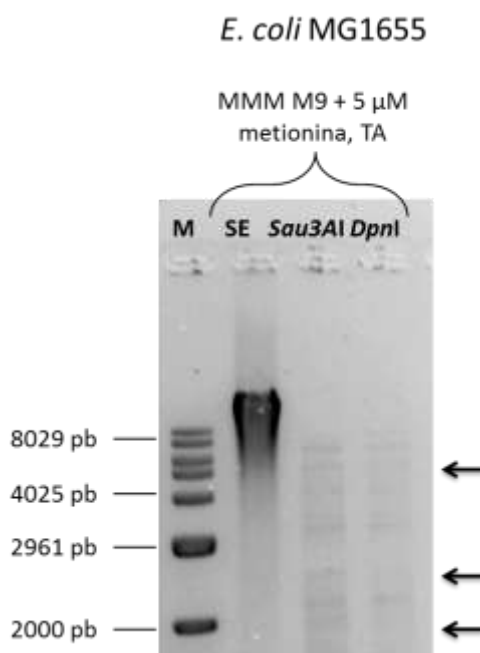


Figura 43: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas *E. coli* MG1655, formadas en presencia de metionina. M: Marcador de Tamaño Molecular, de “1 kb DNA Ladder” (BIONEER); MMM: Medio mínimo mineral; SE: sin enzima, control negativo de reacción. Las flechas señalan las bandas de ADN ausentes en el patrón de digestión del ADN con DpnI.

En cuanto a la digestión del ADN de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δ dam con las enzimas de restricción Sau3AI y MboI, presentaron una distribución del patrón de bandas similares entre sí, en ambas condiciones del entorno ensayadas (figura 44). Por lo tanto, en la cepa de *E. coli* MG1655 mutante, no parece haberse detectado cambios en la metilación de los motivos GATC durante la formación de biopelículas.

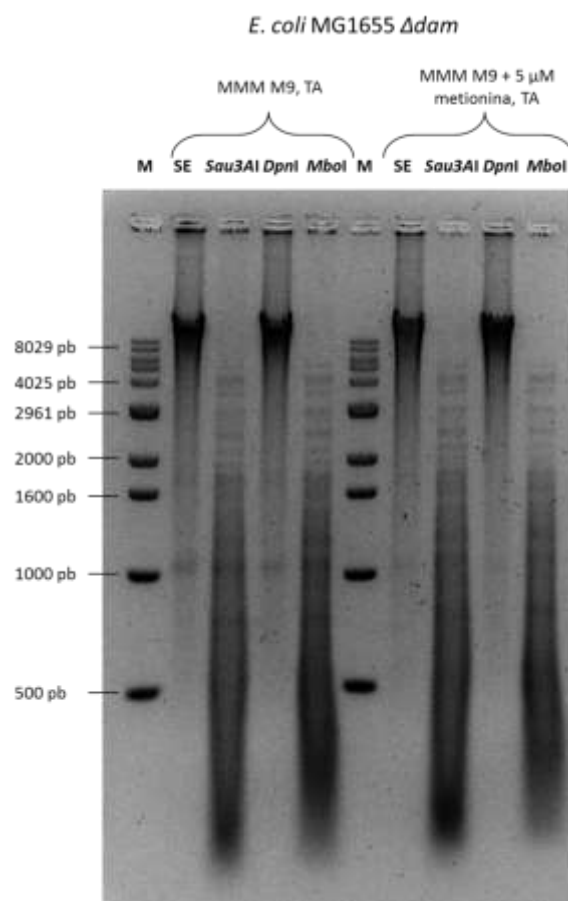


Figura 44: Registro fotográfico del efecto de la metilación global del ADN en biopelículas *E. coli* MG1655 Δdam , formadas en ausencia y presencia de metionina. M: Marcador de Tamaño Molecular, de “1 kb DNA Ladder” (BIONEER); MMM: Medio mínimo mineral; SE: sin enzima, control negativo de reacción.

En la tabla 32 se presenta un cuadro resumen de los resultados obtenidos, los cuales relacionan la capacidad de formación de biopelículas en las diferentes condiciones del entorno ensayadas, con las variaciones en los patrones de metilación del ADN detectados.

Tabla 32: Cuadro resumen de los efectos de la relación de la formación de las biopelículas de las cepas clínicas *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp., *S. marcescens* y la cepa de referencia *E. coli* MG1655; con respecto a las variaciones en el patrón de metilación del ADN detectadas

	Características de la muestra clínica		Agar Rojo Congo	Ensayos de formación de biopelículas												Patrones de metilación del ADN en los motivos GATC	
				CN-TA		CN+500 mM glucosa-TA		CN-37°C		CN+1% etanol-37°C		M9 -TA		M9+5µM met-TA		Metilación global de los motivos GATC	Cambios puntuales en los patrones de metilación del ADN entre tratamientos
	Sala/Unidad	Fuente de la muestra		UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB	UA	CB		
Aba 3910a *	Terapia de adultos	Secreción bronquial	pdar	0,112	1	0,9868	3	-	-	-	-	-	-	-	-	NO	NO
Sma 4474	Ambulatorio	Orina	pdar	-	-	-	-	0,049	1	0,6484	3	-	-	-	-	SI	SI
Eco MG1655	NA	NA	pdar	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0019	0	0,029	1	SI	SI
Eco Δdam	NA	NA	rdar a TA	-	-	-	-	-	-	-	-	3,3302	3	2,6047	3	NO	NO

Aba: *A. baumannii*; Sma: *S. marcescens*; Eco: *E. coli*; *: Aislado bacteriano tomado del mismo paciente, en distintos tiempos; Morfotipo rdar: colonias rojas, secas y rugosas; pdar: colonias rosadas, secas y rugosas; saw: colonias blancas y lisas; CN: Caldo Nutritivo; M9: Medio Mínimo Mineral M9; TA: Temperatura ambiente; UA: Unidades de Adhesión; CB: Clasificación de biopelículas; 0: cepa no formadora de biopelículas; 1: cepa formadora de biopelículas débiles; 2: cepa formadora de biopelículas moderadas; 3: cepa formadora de biopelículas fuertes; -: no aplica

VIII. DISCUSIÓN

Las bacterias son microorganismos fisiológicamente complejos con diversos mecanismos moleculares que confieren plasticidad fenotípica y genotípica, los cuales dan cabida a su capacidad de adaptación ante las condiciones fluctuantes e impredecibles del entorno.

En este trabajo nos enfocamos en analizar dos fenómenos biológicos que aportan bases para comprender los mecanismos de adaptación de las bacterias, particularmente, en el ámbito clínico. Estos son: la capacidad de formación de biopelículas y la metilación del ADN como mecanismo epigenético sobre la regulación de la expresión génica.

Los aislados bacterianos estudiados provenientes de muestras clínicas, fueron clasificados como *A. baumannii* y *S. marcescens*, reconocidos mundialmente como patógenos oportunistas causantes de un amplio rango de infecciones severas adquiridas en el hospital y en la comunidad.

Entre los resultados obtenidos de la identificación microbiológica destacó la secreción del pigmento prodigiosina en *S. marcescens*. La prodigiosina es un producto no difusible, metabolito secundario, con una estructura lineal de tres anillos pirrólicos dipirrometenos, que le confiere la coloración rosado oscuro a rojo. La prodigiosina presenta actividad antibiótica, con propiedades inmunosupresoras y anticancerígenas. Se considera que la síntesis de prodigiosina compensa el flujo metabólico, así como también se ha propuesto que sus características antibióticas le confiere ventajas ecológicas (Slater y col., 2003; Darshan y Manonmani, 2015).

Carbonell y colaboradores (2000) han reportado, a partir de muestras clínicas, una mayor frecuencia de cepas de *S. marcescens* incapaces de secretar prodigiosina, con respecto a cepas de *S. marcescens* pigmentadas, aun cuando ambas cepas presentan actividades citotóxicas. Las cepas pigmentadas de *S. marcescens* provienen usualmente de muestras ambientales, pudiendo colonizar temporalmente distintas áreas del cuerpo humano. Las escasas cepas pigmentadas clínicas causales de enfermedades infecciosas, se han aislado de muestras del tracto respiratorio o de huesos. En

este estudio se obtuvo que cinco de las ocho cepas clínicas de *S. marcescens* secretan prodigiosina en distintas tonalidades, las cuales fueron aisladas de secreciones del tracto respiratorio o de talón (tabla 20). Aunque no se pueden extraer características epidemiológicas concluyentes con el número de muestras de estudio, los resultados nos permiten afirmar que en el Laboratorio de Microbiología Clínica del Centro médico de Caracas se presentan casos clínicos de infecciones con cepas de *S. marcescens* tanto pigmentadas como no pigmentadas.

Se ha descrito que las cepas de *S. marcescens* no pigmentadas manifiestan una mayor resistencia a antibióticos, codificada por plásmidos, con respecto a las cepas pigmentadas (Carbonell y col., 2000). Entre los resultados obtenidos destaca que las cepas no pigmentadas *S. marcescens* 4474, 7172, 1315; y la cepa de *S. marcescens* 2344 con tonalidad tenue de pigmentación, tuvieron mayor capacidad de formación de biopelículas, comparadas con las cepas pigmentadas de *S. marcescens* 3710, 6991, 4680 y 3810 (tabla 20, figuras 19 y 20). Esta información puede indicar que los aislados clínicos de *S. marcescens* pierden la capacidad de secreción de prodigiosina, ya que garantiza un incremento de interacciones intercelulares, las cuales promueven el intercambio horizontal de información genética. La adquisición de genes de resistencia a los antibióticos confiere una ventaja selectiva a la sobrevivencia bacteriana en el ámbito clínico. En este sentido, se sugiere que la capacidad de formación de biopelículas de cepas no pigmentadas de *S. marcescens*, además de promover protección contra agentes deletéreos, confiere un entorno propicio para el intercambio horizontal del material genético.

Las cepas *Acinetobacter* spp. 4848 y 4840 no contienen el gen *bla_{oxa51}*, ni sus variantes, de manera intrínseca o adquirida (figura 13); tampoco crecen a una temperatura de 42 °C (tabla 16), por lo que no fueron identificadas como *Acinetobacter baumannii*. Se sugiere que las cepas *Acinetobacter* spp 4848 y 4840 pertenecen a la especie genómica (grupo) *A. baumannii*.

La clasificación de especies dentro del género *Acinetobacter* es compleja. Se emplean métodos de identificación genotípica para una diferenciación precisa entre especies, tales como: hibridación ADN-ADN,

Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLP), Análisis de Restricción de ADNr amplificados (ARDRA) y análisis de secuencia de ADN (Dijkshoorn y col., 2007).

Existen especies de *Acinetobacter* con propiedades fenotípicas y genotípicas muy similares entre sí, agrupándolas bajo el término operacional de especies genómicas o geno especie (Gevers y col., 2005). El complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus*, también conocido como grupo *A. baumannii*, agrupa las siguientes especies fenotípicamente indistinguibles y que, además, presentan relevancia clínica: *A. calcoaceticus* (geno especie 1), *A. baumannii* (geno especie 2), *A. pittii* (geno especie 3) y *A. nosocomialis* (geno especie 13TU). Las especies bacterianas del complejo *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* son comúnmente aisladas de los hospitales (Morris y col., 2019). El diagnóstico clínico mediante los sistemas semi-automatizados pueden reportar la identificación de especies *Acinetobacter* spp., como complejo *Acinetobacter baumannii* (Peleg y col., 2008; Kamolvit y col., 2014). Los resultados obtenidos, en conjunto con la bibliografía consultada, nos permiten proponer que las cepas *Acinetobacter* spp. 4848 y 4840 pueden ser clasificadas como una de las especies bacterianas de *A. calcoaceticus*, *A. pittii* o *A. nosocomialis*.

VIII.1 Condiciones del entorno sobre la formación de biopelículas de las cepas clínicas *A. baumannii* y *S. marcescens*

Las condiciones del entorno ensayadas afectaron de manera diversa las propiedades de adhesión y síntesis de biomasa de biopelículas de las cepas clínicas de estudio (tabla 30). Distintos trabajos han corroborado que el desarrollo de biopelículas dependen de las condiciones del entorno, presentando un grado de regulación la expresión de genes específicos a biopelículas (Hall-Stoodley y col., 2004; Rice y col., 2005; Wu y col., 2006; Nandhagopal y col., 2016). Es importante comprender aquellas condiciones del entorno que ejercen un rol modulador en biopelículas, como elementos a considerar para la prevención de contaminación y tratamiento de infecciones bacterianas (Moryl y col., 2014).

El desarrollo de las biopelículas es una actividad dinámica en composición, estructura y morfología, siendo inducida por señales nutritivas y fisicoquímicas del entorno. En general, en este trabajo se observó variabilidad en la biomasa de biopelículas cuantificadas, bajo las distintas condiciones del entorno ensayadas. Éstas variaciones pueden deberse a la respuesta diversa en la formación de biopelículas de los aislados clínicos de estudio, los cuales provienen de distintas fuentes biológicas, tal como se ha reportado con respecto al desarrollo de biopelículas de distintos aislados clínicos de *A. baumannii* (Eijkelkamp y col., 2013; Vijayakumar y col., 2016); así como en aislados clínicos de *S. liquefaciens* (Remuzgo-Martínez y col., 2015). Se ha descrito que la capacidad de formación de biopelículas de aislados clínicos, como es el caso de *A. baumannii*, no tienen relación con la procedencia de la muestra biológica clínica o la severidad de la enfermedad infecciosa (Wroblewska y col., 2008).

Los ensayos en Agar Rojo Congo demostraron que la mayoría de los aislados secretan componentes proteicos y polisacáridos, fenómeno característico en biopelículas. Los morfotipos adquiridos por las cepas de *A. baumannii* N° 6596, 7528 y 5796, indican la ausencia de secreción de componentes de fibras de tipo curli o de celulosa, coincidiendo con que estas cepas presentaron un menor contenido en biomasa de biopelículas crecidas en CN y MMM M9 (tabla 20, figuras 19 y 20). Se ha descrito que el uso de Agar Rojo Congo en *A. baumannii* no resulta útil para la identificación de la capacidad de formación de biopelículas, debido a la elevada variabilidad manifestada de la morfología de las colonias crecidas sobre Agar Rojo Congo (Chabane y col., 2014). De igual manera, con el ensayo Agar Rojo Congo se obtuvo una primera aproximación sobre la secreción de componentes extracelulares en bacterias de *A. baumannii*.

VIII.1.1 Efecto de las condiciones nutritivas

Las condiciones nutritivas del entorno ejercen un rol crucial sobre la formación de biopelículas (Pratt y Kolter, 1998; Rice y col., 2005; Zalewska-Piatek, 2013; Moryl y col., 2014). También se ha reportado que la fuente de

carbono modula el desarrollo de biopelículas, en función de la fisiología y genética de las especies bacterianas que la constituyen (Kalivoda y col., 2008), incluyendo a *A. baumannii* (Eze y col., 2018). Por ello, se evaluó el efecto de los nutrientes sobre la formación de biopelículas bacterianas de estudio.

La glucosa en exceso indujo el desarrollo de biopelículas clasificadas como moderadas y fuertes de *Acinetobacter* spp., tomando en cuenta que esta fuente de carbono se suplementó en CN, en el cual las biopelículas formadas fueron clasificadas como débiles. Incluso, la inducción por glucosa se detectó en biopelículas de *Acinetobacter* spp., formadas en MMM M9, que contiene 2 g/L de glucosa. Adicionalmente, la dilución del CN causó un incremento en la capacidad de adherencia a superficies, sin embargo, no se observaron cambios considerables en la biomasa de biopelículas, ni en su clasificación (figura 22, tabla 30).

Los resultados obtenidos concuerdan con los descritos por Nucleo y colaboradores (2009), los cuales confirman que la formación de biopelículas de *A. baumannii* está afectada por la composición del medio nutritivo. Los autores detectaron la inhibición de biopelículas en medio rico en nutrientes, mientras que su dilución en $\frac{1}{4}$, estimuló la adherencia a superficies. También reportan que la presencia de 2 % de glucosa en MMM M9, indujo el desarrollo de biopelículas. Los autores sugieren que la glucosa es un inductor específico en la secreción de EPS, particularmente de celulosa, para la producción de biomasa en biopelículas.

A nivel clínico, el transporte de glucosa en sangre, secreciones o dispositivos médicos, puede representar uno de los moduladores de la colonización e infecciones por biopelículas. La especie *A. baumannii* es uno de los agentes causales comunes de infecciones respiratorias e infecciones de diseminación sanguínea; ésta última se desencadena cuando el microorganismo ingresa al torrente sanguíneo, mediante el tracto respiratorio del hospedador (Nucleo y col., 2009; McConnell y col., 2012).

El rol de la glucosa como molécula señal inductora en la biosíntesis de EPS y formación de biopelículas también ha sido descrito en otros agentes

infecciosos, como *Proteus mirabilis* (Moryl y col., 2014) y cepas uropatogénicas de *E. coli* (Zalewska-Piatek, 2013).

Los niveles de glucosa en secreciones pulmonares no son detectables en pacientes sanos, mientras que el rango de los niveles de glucosa en sangre oscila entre 6,7 y 9,7 mM. Sin embargo, se ha reportado el incremento de los niveles de glucosa en secreciones pulmonares en pacientes con enfermedades respiratorias o diabéticos, considerándose un factor de riesgo que predispone la colonización bacteriana y establecimiento de infecciones (Philips y col., 2005). Se ha descrito que las biopelículas de *A. baumannii* provenientes de esputo son más robustas, comparadas con aquellas cepas provenientes de vía hematógena (Vijayakumar y col., 2016). Cabe destacar que las cepas de *A. baumannii* N° 7528, 2317, 3910 y *Acinetobacter* spp N° 4840, fueron aisladas de secreciones del tracto respiratorio. Las biopelículas de estas cepas, formadas en MMM M9 + glucosa 2 g/L a 37 °C, produjeron mayor cantidad de biomasa y capacidad de adherencia a superficies, comparadas con los otros cuatro aislados clínicos de estudio (figura 19). Además, la cepa *A. baumannii* 3910 crecida con exceso de glucosa, presentó un efecto mayor sobre la biomasa y producción de biopelículas, comparada con las cepas de *A. baumannii* N° 5796, 6596 y *Acinetobacter* spp. N° 4848 (tabla 30, figura 22). Con los resultados obtenidos se evidencian los efectos moduladores de la glucosa sobre el desarrollo de biopelículas de *A. baumannii*. La glucosa destaca como uno de los estímulos del entorno que induce la producción de biomasa de biopelículas de *A. baumannii*, en conjunto con el posible impacto que ejerce sobre el desarrollo de infecciones del tracto respiratorio. También se evidencia que la fisiología intrínseca de cada cepa bacteriana, según la procedencia clínica del aislamiento, parece modificar la formación de biomasa de biopelículas y la capacidad de adhesión bacteriana.

Sin embargo, y de forma contraria, la condición de CN suplementado con exceso de glucosa no indujo el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens*. La dilución de nutrientes del CN estimuló la capacidad de adherencia a superficies en estas cepas; así como promovió el desarrollo de biomasa de biopelículas moderadas en *S. marcescens* (tabla 30 y figura 23). En condiciones de crecimiento MMM M9 suplementado con 2 g/L de glucosa,

se detectó capacidad de adherencia y biomasa de biopelículas de *S. marcescens* (tabla 30, figura 20). Se sugiere que las condiciones nutritivas que suministra el CN, no estimulan de manera determinante el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens*.

Existen evidencias que confirman la capacidad de formación de biopelículas filamentosas de *S. marcescens* crecidas en caldo LB diluido en 1/10 sobre superficies de vidrio. El caldo LB es un medio de cultivo complejo de composición indefinida, y se ha sugerido que puede contener factores inhibidores de biopelículas (Rice y col., 2005). Sin embargo, otros trabajos describen que el exceso de glucosa en medio LB con agitación, estimula la sobreproducción de biopelículas de *S. marcescens* sobre superficies de vidrio de borosilicato (Kalivoda y col., 2008).

En la literatura se ha reportado que se han aislado cepas de *S. marcescens* como contaminantes de concentrados de plaquetas almacenados. Estas cepas tienen la capacidad de desarrollar biopelículas en concentrados de plaquetas, mas no así en condiciones de crecimiento con caldo LB (Greco-Stewart y col., 2012). Por otra parte, en aislados clínicos de *S. liquefaciens* se ha descrito el desarrollo de biopelículas en medio ricos nutritivos LB, TSB y BHIB; en la mayoría de los aislados se reportó menor biomasa de biopelículas en caldo LB. De igual manera, bajo condiciones nutritivas limitantes de crecimiento, se mantiene la capacidad de formación de biopelículas de distintas cepas clínicas de *S. liquefaciens* (Remuzgo-Martínez y col., 2015).

Según los resultados del presente trabajo, se evidencia que el incremento de biomasa de las biopelículas de *S. marcescens* ocurre cuando éstas son formadas en CN diluido, sobre microplacas de poliestireno en condiciones estáticas (figura 23). Por lo tanto, las condiciones nutritivas ensayadas, así como la superficie empleada, representan factores que determinan el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens*. Estos resultados suman evidencias que sugieren que los componentes del CN inhiben el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens*. El exceso de glucosa suplementada en CN, tampoco moduló positivamente el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens*. En apoyo a estas ideas, el uso del CN diluido

promueve la dilución de aquellos posibles factores inhibidores de biopelículas presentes en el medio nutritivo, por lo que ejerce efectos positivos sobre su formación.

En relación a los cambios de la temperatura de crecimiento para la formación de biopelículas, no hubo un efecto aparente en los resultados de los ensayos realizados. Este factor físico es atribuido como modulador en la incidencia de colonización bacteriana e infecciones. Se debe tomar en cuenta que este efecto pudiera estar combinado con otras condiciones físicas del entorno como la luz, humedad, entre otros. Las condiciones físicas establecidas *in vitro*, nos sugieren que el factor temperatura, por si mismo, no es un estímulo determinante que produzca cambios en el desarrollo de biopelículas.

VIII.1.2 Efecto de la metionina

El aminoácido metionina ejerce funciones cruciales en la biosíntesis proteica de las células vivas, siendo el único aminoácido que posee un enlace tioéster, conteniendo de esta manera, en la estructura de su cadena lateral, un átomo de azufre. Aunque se ha reportado una baja abundancia de este residuo aminoácido en proteínas, su presencia determina el inicio de la traducción y tiene un rol estructural en motivos hidrofóbicos proteicos (Ferla y Patrick, 2014).

En humanos la metionina es un aminoácido esencial, es decir, que es incorporado de forma exógena, mediante la dieta. En bacterias, la metionina es un aminoácido no esencial, ya que tienen la capacidad metabólica de sintetizarlo. La biosíntesis de metionina en bacterias representa una ruta metabólica única de la fisiología bacteriana, resultando un blanco potencial para el desarrollo de antibióticos (Jochim y col., 2019).

En el metabolismo de la metionina, se encuentra la ruta del ciclo del grupo metilo activo, en la que ocurre la síntesis de SAM, sustrato donador de grupos metilo y, a su vez, precursor global de la síntesis de moléculas autoinductoras del sistema "*quorum sensing*" (Yadav y col., 2012; Ruparell y col., 2016; Jochim y col., 2019).

Según los resultados obtenidos en las cepas clínicas de estudio, no existen diferencias significativas en el desarrollo de biopelículas, bajo las distintas concentraciones de metionina ensayadas. Sin embargo, la molécula de metionina ejerció un efecto variable sobre la biomasa de bacterias formadoras de biopelículas, ya que se registraron distribuciones amplias de biomasa de biopelículas formadas en presencia de metionina, con respecto a las biopelículas formadas en su ausencia (figuras 25 y 26).

En las cepas *A. baumannii* 3910 y *S. marcescens* 4474 se detectaron con mayor distinción la dispersión de los valores de biomasa de biopelículas formadas bajo la influencia de distintas concentraciones de metionina. En *A. baumannii* 3910, hubo una disminución en las UA y la biomasa de biopelículas formadas en presencia de concentraciones de 0,5 y 5 μ M de metionina, en comparación al ensayo control (MMM M9, TA), sin cambios en su clasificación en relación a la fortaleza de biopelículas (tabla 30; figuras 25 y 26). Por lo tanto, el suplemento exógeno de 0,5 y 5 μ M de metionina, disminuyó la formación de biopelículas de *A. baumannii* 3910, en términos de adherencia y biomasa, mas no causó su erradicación. Los resultados demuestran que *S. marcescens* 4474, incrementó la biomasa de biopelículas en función del aumento de la concentración de metionina, con cambios en las UA, mas no su clasificación del tipo de biopelículas formadas (tabla 30). Estos resultados nos permiten sugerir que la presencia exógena de metionina promovió el desarrollo de biomasa en biopelículas de *S. marcescens* 4474.

La presencia exógena de metionina suplementada en el MMM M9, el cual contiene cantidades trazas de azufre; puede estar influyendo sobre el flujo metabólico de la metionina, y en la disponibilidad de SAM. Esta condición podría repercutir sobre la actividad de las DnmTs bacterianas dependientes de SAM y sobre la síntesis de las moléculas autoinductoras. Estos ajustes metabólicos, motivados por la presencia de metionina exógena, pueden promover cambios de la expresión génica que afectan al desarrollo de biopelículas.

En la bibliografía se ha descrito que la presencia de 0,5 μ M de L-metionina exógena induce actividad anti-biopelículas en *P. aeruginosa*. En este

estudio los autores demuestran que al añadir esta concentración traza de metionina, se induce la expresión de cuatro genes que codifican para *DNasas*, las cuales degradan el ADN extracelular, causando la inhibición en la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* (Gnanadhas y col., 2015). Esta evidencia soporta nuestra sugerencia sobre el efecto de una concentración específica de metionina exógena, induciendo cambios de expresión génica. En este trabajo, además, se propone que la concentración de metionina con actividad anti-biopelícula, se deba a que concentraciones inferiores a 0,5 μM no son estímulos del entorno; mientras que a cantidades superiores, este aminoácido se asimila como fuente nutritiva (Gnanadhas y col., 2015). Este planteamiento pudiera justificar el efecto respuesta variable en el desarrollo de biopelículas, con distintas concentraciones de metionina exógena en *A. baumannii* y *S. marcescens* (tabla 30; figuras 25 y 26).

La mayoría de las bacterias se han descrito como protótrofas para metionina, garantizando así su disponibilidad metabólica. Jochim y colaboradores (2019) demostraron que en cepas mutantes de *S. aureus* y *P. aeruginosa*, auxótrofas para metionina; se reduce la capacidad de formación de biopelículas, en experiencias que fueron realizadas en presencia de metionina exógena, en concentraciones que restauran el crecimiento de las cepas. Adicionalmente, se han construido cepas de *A. baumannii* mutantes que presentan interrupción de genes involucrados en la biosíntesis de metionina, mediante una librería de transposones. La inoculación intranasal de ratones con estas cepas mutantes, demostró la disminución de la capacidad de infección pulmonar en murinos. Los autores concluyeron que los genes codificantes de las proteínas involucradas en el metabolismo de la metionina son esenciales en la infección pulmonar de *A. baumannii* (Wang y col., 2014).

Los resultados obtenidos en este trabajo (tabla 30; figuras 25 y 26), en conjunto con las evidencias bibliográficas, sugieren que diferentes concentraciones exógenas de metionina intervienen como una señal del entorno que afecta el desarrollo de las biopelículas bacterianas.

Estudios previos han demostrado la capacidad de la metionina como co-tratamiento en la erradicación de biopelículas (Gnanadhas y col., 2015; Cho y

col., 2018). Incluso, en la fisiología humana se ha descrito que la ausencia de aminoácidos en distintas secreciones y fluidos corporales, representan un mecanismo de defensa en contra de infecciones con bacterias patógenas (Wang y col., 2014).

En base a estos resultados se recomienda ampliar el estudio de la influencia del aminoácido metionina sobre el establecimiento de las biopelículas de *A. baumannii*, proyectándola como potencial estrategia de co-tratamiento que disminuya la capacidad de adhesión y desarrollo de la biomasa de biopelículas. En *S. marcescens*, con las concentraciones de metionina estudiadas, no parecen ser recomendables para uso como co-tratamiento o prevención en el desarrollo de biopelículas, ya que la presencia exógena de metionina no disminuyó la capacidad de producción de biomasa de biopelículas ni de la adhesión bacteriana.

VIII.1.3 Efecto del etanol

Los alcoholes son compuestos biológicos versátiles. Debido a sus propiedades físico-químicas, tienen la capacidad de interactuar con componentes celulares lipídicos, proteicos o ácidos nucleicos, afectando su síntesis y funciones. Los alcoholes pueden ser metabolizados como fuente de carbono, o ser una señal del entorno que induce respuestas de tolerancia al estrés celular o a la pérdida de viabilidad celular (Vulić y Kolter, 2002).

El etanol es un alcohol de cadena corta que se emplea comúnmente como desinfectante en el área clínica e industria alimentaria, a una concentración de 70% (v/v), debido a sus propiedades antimicrobianas sobre las bacterias planctónicas (Patterson y Ricke, 2015). La remoción de la biomasa de biopelículas, en cambio, ocurre de manera eficaz a concentraciones de etanol inferiores a 70%. En *Y. enterocolitica*, *A. hydrophila* y *X. oryzae*, se ha descrito la erradicación de biopelículas a concentraciones entre 40% a 50% (v/v) de etanol, aunque estas cantidades no ejercieron actividad bactericida óptima (Park y col., 2015). Las biopelículas de *S. aureus* y *C. parapsilosis* fueron erradicadas de catéteres y se previene el crecimiento

bacteriano, a una concentración de 25% de etanol, combinado con minociclina y EDTA (Raad y col., 2006). La inhibición en el desarrollo de biopelículas de *S. aureus in vitro*, ocurre a partir de concentraciones superiores al 5% de etanol (Peters y col., 2013).

Según nuestros resultados, la presencia de etanol al 1% en CN a 37 °C, indujo la formación de biopelículas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens* (tabla 30, figuras 28 y 29), tomando en cuenta que el medio de cultivo empleado fue previamente determinado como no óptimo para el desarrollo de biopelículas (figuras 22 y 23). Estos resultados nos permiten sugerir que el etanol 1% representa una señal del entorno que promueve el desarrollo de biopelículas de los aislados bacterianos de estudio.

En distintas especies de *Acinetobacter* se ha descrito que concentraciones de etanol igual o menores al 1% (v/v), promueven: tolerancia a condiciones de estrés específicos (como al NaCl); fenotipos virulentos e incrementan el crecimiento bacteriano (Smith y col., 2004). En los análisis de transcriptoma y proteoma de la cepa *A. baumannii* ATCC 17978, se identificó que, en presencia de etanol, se induce la expresión de genes asociados a la adaptación y tolerancia al estrés, seguido de genes relacionados al metabolismo central. Además, se reporta el incremento en la capacidad de formación de biopelículas, relacionado con la síntesis de EPS y con la disminución de la motilidad bacteriana (Nwugo y col., 2012). En este trabajo los autores consideran que el etanol no es un estímulo esencial para la formación de biopelículas como factor de virulencia (Smith y col., 2007; Nwugo y col., 2012). Es interesante proponer que, ante la condición de estrés inducida por la presencia de etanol al 1% en el cultivo, en la fisiología bacteriana se desarrolla mecanismos de sobrevivencia, tales como la formación de biopelículas.

En *S. marcescens* no existen estudios previos que determinen el efecto del etanol sobre la formación de biopelículas. En un aislado ambiental de *S. marcescens* se ha descrito que el etanol 1,5 % (v/v), se utiliza como fuente de carbono en el medio de cultivo, favoreciendo el crecimiento bacteriano, la síntesis de polisacáridos y de prodigiosina (Cang y col., 2000). Usualmente cantidades trazas de etanol 1% al 3%, suelen ser empleadas para resuspender

los compuestos hidrófobos en medios de cultivos (Patterson y Ricke, 2015). También se ha reportado que los ácidos grasos como fuente de carbono, favorecen el crecimiento bacteriano de *S. marcescens* (Giri y col., 2004).

Los resultados obtenidos en este trabajo (tabla 30), en conjunto con las evidencias bibliográficas, sugieren que el etanol 1% interviene como una señal del entorno que estimula el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens*. La presencia de 1% de etanol contrarresta los efectos inhibitorios de los componentes del CN sobre el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens*. Las cantidades trazas de etanol pudieran promover la disolución de sustratos hidrofóbicos presentes en CN, los cuales favorecen el crecimiento bacteriano de *S. marcescens* y el desarrollo de biopelículas, mediante la biosíntesis de exopolisacáridos.

En base a estos resultados se sugiere ampliar el estudio del efecto del etanol sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* y *S. marcescens*. Se debe establecer aquella concentración de etanol que inhiba el desarrollo de biopelículas de estas cepas bacterianas, que sirva como estrategia de tratamiento o prevención de biopelículas en el ámbito clínico, tomando en cuenta que cantidades trazas de etanol estimulan su formación.

VIII.1.4 Efecto del EDTA

El ácido EtilenDiaminoTetraAcético o EDTA es un compuesto orgánico que remueve a los iones metálicos de estructuras complejas, actuando como un agente quelante, mediante su unión y coordinación química. El EDTA ocasiona deficiencias en la disponibilidad de iones metálicos polivalentes como Calcio, Plomo, Cadmio, Zinc, Níquel e iones de metales pesados (Flora y Pachauri, 2010).

Los iones metálicos son nutrientes inorgánicos esenciales en la fisiología y metabolismo bacteriano. Por lo tanto, el secuestro de iones metálicos por el EDTA representa una condición de estrés, ya que compromete actividades enzimáticas dependientes de cofactores metálicos, desestabiliza estructuras moleculares, compromete las reacciones REDOX o mecanismos de

señalización celular asociados. Se ha descrito que la remoción de metales disminuye la densidad bacteriana y afecta las propiedades de adherencia entre bacterias y entre bacterias-superficie, lo cual desestabiliza el desarrollo de biopelículas (Raad y col., 2006; Lee y col., 2008; Feng y col., 2015).

El agente quelante EDTA tiene usos clínicos relevantes, tales como estrategias antibacterianas para la prevención de colonización y para la erradicación bacteriana. Las soluciones de bloqueo son una combinación de compuestos con propiedades anticoagulantes y antimicrobianas, empleadas sobre dispositivos médicos, tales como los catéteres. Se ha demostrado que el EDTA a una concentración de 30 mg/mL en combinación con otros bactericidas como minociclina y etanol, optimizan la erradicación de colonización y también previenen la bacteremia asociada a catéteres (Raad y col., 2006; Campos y col. 2011).

Se ha descrito además que el EDTA tetrasódico a concentración 40 mg/mL, presenta efectos inhibitorios en el desarrollo de biopelículas de *S. aureus*, *P. aeruginosa*, *E. coli*, *K. pneumoniae* y *Candida albicans*, en el interior de catéteres (Percival y col., 2005). En *A. baumannii*, las biopelículas en superficies de poliestireno, fueron inhibidas a una concentración de 0,125 mg/mL de EDTA, sin embargo, en esta condición no se afectó el crecimiento bacteriano (Lee y col., 2008).

La presencia de EDTA a una concentración de 30 mg/mL en CN a 37 °C, erradicó el crecimiento bacteriano y la formación de biopelículas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens* (tabla 30; figuras 31 y 32). En conjunto con los resultados obtenidos, estos datos nos sugieren que el EDTA es un agente eficiente para la remoción y prevención de biopelículas. Se ha descrito que concentraciones tales como 20, 30 y 40 mg/mL tienen el efecto de comprometer el crecimiento bacteriano y, consecuentemente, la formación de biopelículas. Sin embargo, el empleo de concentraciones inferiores (como 0,125 mg/mL), si bien mantiene la inhibición del desarrollo de biopelículas, éstas no ejercen efectos bactericidas (Lee y col., 2008). Estos datos nos permiten sugerir que se deben emplear las concentraciones de EDTA

adecuadas para la erradicación total, y no parcial, de agentes infecciosos que contaminen superficies inanimadas de uso clínico.

VIII.1.5 Efecto de surfactantes

Los surfactantes o agentes tenso-activos, son compuestos químicos anfifílicos que disminuyen la tensión superficial entre moléculas, mediante su partición en una interfaz, en función de su polaridad y la formación de enlaces de hidrógeno. Las propiedades detergentes de los surfactantes permiten degradar y disolver compuestos, lo que ha tenido aplicaciones industriales y biomédicas. En función de las propiedades físicoquímicas y de carga, los surfactantes son clasificados como aniónicos, catiónicos, no-iónicos o zwitter-iónicos, por lo que los surfactantes tienen distintos sitio de unión blanco en las células, presentando actividades antimicrobianas (Das Ghatak y col., 2018). Los surfactantes, además, alteran las propiedades de las superficies, disminuyendo la tensión superficial, por lo que inhiben la adhesión de los microorganismos a superficies. Por lo tanto, los surfactantes son agentes anti-adhesivos que disminuyen el desarrollo de biopelículas, ya que previenen la formación o la remoción de las biopelículas maduras (MacDonald y col., 2000; Simões y col., 2008).

El SDS (dodecil sulfato de sodio) es un surfactante sintético, aniónico, que reduce la permeabilidad de la pared bacteriana y disuelve la membrana celular. El SDS usualmente se emplea como detergente en diversos productos comerciales de limpieza. El CTAB (bromuro de cetiltrimetil amonio) es un surfactante sintético, catiónico, que se adsorbe a la superficie de la membrana celular y reacciona con componentes de carga negativa de la pared celular, como los fosfolípidos y causa la desnaturalización de proteínas, la precipitación de polisacáridos y de ácidos nucleicos. El CTAB se emplea como agente antiséptico tópico (Simões y col., 2008).

Según los resultados obtenidos (tabla 30; figuras 34 y 35) hubo una disminución generalizada tanto en el crecimiento bacteriano, como en el desarrollo de biopelículas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp. y *S.*

marcescens, en presencia de los surfactantes sintéticos CTAB (0,9 mM) y SDS (7 mM). Los surfactantes sintéticos de estudio afectaron la integridad celular de las cepas de *A. baumannii* y *S. marcescens*, mediante la degradación de los compuestos hidrofóbicos y la precipitación de polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos. Estos surfactantes, además, alteraron las propiedades de adhesión sobre las superficies de poliestireno ya que, las escasas bacterias sobrevivientes en estos ensayos, no tuvieron la capacidad de formación de biopelículas.

Se ha descrito que, en presencia de CTAB (0,9 mM) y SDS (7 mM), ocurre la remoción de biopelículas de *P. fluorescens* ATCC 13525, formadas sobre un cilindro de acero inoxidable, dentro de un bioreactor, con rotación de 300 min^{-1} (Simões y col., 2005). Sin embargo, según los autores, la remoción de las biopelículas de *P. fluorescens* no es definitiva, debido al posterior desarrollo de biopelículas, luego del tratamiento con SDS (Simões y col., 2008). Adicionalmente, se ha descrito que los poloxámeros son surfactantes no iónicos eficientes en la degradación de biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1 y *S. aureus* USA300 (Das Ghatak y col., 2018).

Actualmente, el estudio de los surfactantes se ha enfocado en evaluar a los biosurfactantes. Los surfactantes de origen microbiano, tienen como ventajas que son moléculas de acción específica, biodegradables y de baja toxicidad; que son estudiados para aplicaciones potenciales en biorremediación o agentes terapéuticos en biomedicina (Singh y Cameotra, 2004; Simões y col., 2008; Díaz De Rienzo y col., 2017). Por ejemplo, se ha descrito el efecto inhibitorio de los biosurfactantes lipopeptídicos sobre la formación de biopelículas en especies de *Bacillus* spp (Rivardo y col., 2009; Sriram y col., 2011). También se ha reportado que los biosurfactantes soforolípidos pueden formar parte de un tratamiento químico para inhibir la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* PAO1, *E. coli* NCTC 10418 y *B. subtilis* NCTC10400 (Díaz de Rienzo y col., 2017).

Estos datos nos permiten sugerir que los surfactantes CTAB y SDS en bajas concentraciones, pueden ser empleados como agentes antisépticos y de anti-adherencia, que previenen la formación de biopelículas de *A. baumannii* y

S. marcescens. Es interesante continuar con el estudio del efecto de los surfactantes sobre la formación de biopelículas bacterianas, ya que sus propiedades anti-bacterianas representan una estrategia para tratamientos alternativos de control de biopelículas asociadas a infecciones. A futuro se propone estudiar el efecto de los surfactantes CTAB y SDS sobre las biopelículas maduras de *A. baumannii* y *S. marcescens*; así como evaluar el efecto de los biosurfactantes sobre el desarrollo de biopelículas de *A. baumannii* y *S. marcescens*.

VIII.2 Variaciones en los patrones de metilación del genoma de bacterias en biopelículas en diferentes condiciones del entorno

VIII.2.1 Análisis de los patrones de metilación del ADN en la formación de biopelículas de las cepas clínicas

La distribución y función de la metilación del ADN ha sido descrita en aislados bacterianos provenientes de muestras clínicas. Los ensayos de secuenciación SMRT demostraron que cepas patógenas de *E. coli*, causantes de diarreas, tienen una representación del 94,9% de adenina y 2,7 % de citosina metiladas, sobre las 51972 bases detectadas con modificaciones. Por análisis bioinformáticos dedujeron que, en *E. coli* C227-11 (O104:H4), los residuos putativos metilados se encontraron en secuencias GATC, CTGCAG y ACCACC para adenina; seguido de CCWGG para citosina (Fang y col., 2012). En este estudio identificaron, además de Dam, a otras nueve Dnmts putativas, de las cuales tres no presentaron asociación con endonucleasas de restricción, es decir, son enzimas huérfanas. Una de ellas, fue identificada como la enzima no esencial YhdJ. Las otras dos enzimas, M.EcoGV y M.EcoGVII Dnmts, parecen estar codificadas por profagos no caracterizados, cuyos genes son parálogos al gen *dam* (Fang y col., 2012).

La ausencia de la enzima Dam también ha sido reportada en aislados clínicos. En cepas uropatogénicas de *E. coli* se han descrito cambios fenotípicos ante la ausencia del gen *dam*, destacando la reducción en un 50 % de la tasa de crecimiento bacteriano, y el aumento de la sensibilidad a los

antibióticos amoxicilina/ácido clavulánico, trimetoprim/sulfametoxazol, gentamicina y ciprofloxacina. También se han descrito alteraciones de la expresión génica, tales como aumento de *papIB* (genes regulatorios del operón *pap*, que expresa subunidades estructurales de tipo pili), y *qnrA* (gen de resistencia a quinolonas); y disminución de *arcA* (proteína de control de respiración aeróbica) y *mdh* (malato deshidrogenasa) (Stephenson y Brown, 2016).

En las biopelículas de *E. coli* uropatogénicas Δdam formadas sobre superficies de poliestireno de microplacas, se detectó un incremento de la biomasa adherida a la superficie, con respecto a la cepa silvestre, en ausencia o en presencia de estímulos del entorno, tales como estrés oxidativo o quinolonas (Stephenson y Brown, 2016). Además, se ha descrito un aumento en la adherencia a superficies bióticas (cultivo de células HeLa) en cepas de *E. coli* enterohemorrágicas O157:H7 que presentan una delección del gen *dam* (Campellone y col., 2007).

Por el contrario, en *S. enterica* se ha descrito que, en ausencia del gen *dam*, ocurre una disminución en la formación de biopelículas, con énfasis en disminución de la expresión del regulador transcripcional global *csgD*, modulador de la formación de biopelículas en *Salmonella* spp., y del gen *csgA*, que codifica la subunidad mayor de la fibras de tipo curli, uno de los componentes proteicos de la matriz extracelular en biopelículas de *S. enterica* (Aya y col., 2015). En *S. enterica* los análisis de los transcriptomas, comparando entre cepas silvestres e isogénicas Δdam , determinaron que la metilación mediada por la enzima Dam reprime la expresión génica. En ausencia de Dam, hubo alteraciones en los patrones de expresión de algunos genes, como los de motilidad, quimiotaxia y de virulencia (Pucciarelli y col., 2002; Balbontín y col., 2006).

Se discutirán, a continuación, los patrones de metilación del ADN obtenidos en este trabajo. Se debe tomar en cuenta que se ensayaron con biopelículas de las cepas clínicas de *A. baumannii* 3910 y *S. marcescens* 4474, formadas con exceso de glucosa y cantidades trazas de etanol, respectivamente. Se seleccionaron estas condiciones porque fueron los

estímulos del entorno estudiados que indujeron la formación de biopelículas, siendo las cepas ensayadas aquellas que presentaron una respuesta significativamente mayor en los parámetros del desarrollo de biopelículas evaluados.

Los cambios globales de metilación del ADN sobre las secuencias GATC, se evaluaron mediante ensayos de restricción con las enzimas Sau3AI, DpnI y MboI.

VIII.2.1.a Efecto del exceso de glucosa sobre la metilación del ADN de las biopelículas de *A. baumannii* 3910

En el genoma de la cepa clínica de *A. baumannii* 3910 no pudo ser detectada la metilación global de la adenina contenida en las secuencias GATC, en las condiciones de crecimiento ensayadas (CN, TA; CN + 500 mM glucosa, TA) (tabla 32, figura 37). Con los resultados obtenidos resulta evidente la ausencia de una actividad enzimática relacionada con Dam en *A. baumannii*, a pesar de la representación de motivos GATC en su genoma, detectados por el perfil de bandas de digestión con la enzima Sau3AI.

En *A. baumannii* no se han descrito genes homólogos a *dam*. Tampoco existen reportes previos sobre análisis de metilación global del genoma de *A. baumannii* que describan la distribución de las bases de adenina o citosinas metiladas en motivos específicos de ADN, que puedan dar soporte a las sugerencias propuestas; aun cuando las modificaciones por metilación de adenina y citosina, así como las secuencias GATC, son predominantes en gammaproteobacterias (Balbontín y col., 2006; Westphal y col., 2016).

Con los resultados obtenidos no se detectaron diferencias evidentes en el perfil de bandas de la digestión con las enzimas Sau3AI y MboI sobre el ADN proveniente de biopelículas de *A. baumannii* 3910 crecidas con exceso de glucosa, comparadas con el perfil de bandas de digestión con las enzimas Sau3AI y MboI sobre el ADN proveniente de biopelículas de *A. baumannii* crecidas en CN (tabla 32, figura 38).

Son pocos los trabajos previos que estudian un posible vínculo de la metilación del ADN con la formación de biopelículas de *A. baumannii*. Rumbo-Feal y colaboradores (2013) demostraron que en la bacteria *A. baumannii* existen diferencias importantes en los patrones de expresión génica, entre la condición de crecimiento planctónico y el crecimiento en biopelículas. En las biopelículas de *A. baumannii* ocurre la sobre-expresión de 1621 genes, los cuales en el transcriptoma de bacterias planctónicas se encontraban en niveles básicos de expresión o inhibidos. Los autores demostraron la expresión exclusiva de, al menos, 55 genes en formato de biopelículas de *A. baumannii*, evidenciándose dentro de ellos, la expresión de dos genes involucrados en la metilación del ADN. Por otra parte, se ha descrito la coexistencia estable de múltiples fenotipos de colonias de *A. baumannii*, mediante mecanismos de variación de fase, los cuales sugieren que están influenciados por la metilación del ADN en sitios regulatorios génicos, tal como ocurre en *E. coli* y *S. pneumoniae* (Tipton y col., 2015). Con estas evidencias presentadas, se destaca el efecto potencial de la metilación del ADN sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii*. Sin embargo, de existir la regulación de la expresión génica por este mecanismo epigenético en *A. baumannii*, no parece estar bajo el control de metilación por enzimas tipo Dam ni sobre las secuencias GATC.

Los únicos estudios que describen las funciones epigenéticas de Dnmts en los mecanismos patogénicos de *A. baumannii*, no han sido asociados a la capacidad de crecimiento en formato de biopelículas, por lo que este campo se encuentra virgen para continuar investigaciones futuras.

Existen variantes de *A. baumannii* que presentan fenotipos de hiper-movilidad y expresión acentuada de factores de virulencia. La cepa *A. baumannii* ATCC17978 surgió con la inactivación por transposición del gen *hns*, que codifica la proteína asociada H-NS. En esta cepa se determinó el rol de la regulación de H-NS sobre la expresión de genes adquiridos por transferencia horizontal, tal como una Dnmts dependiente de SAM, proveniente de arqueas (Eijkelkamp y col., 2013). En *E. coli* C227-11 (O104:H4) se han descrito dos genes que codifican enzimas Dnmts, parálogas de Dam, los cuales indican que fueron adquiridos por fagos (Fang y col., 2012). Si bien

estos reportes no se estudian el rol de la metilación del ADN sobre la expresión génica, traen consigo evidencias de las potenciales intervenciones de Dnmts adquiridas por transferencia horizontal de material genético, como mecanismo regulatorio epigenético. Sin embargo, tampoco se ha estudiado su asociación a la capacidad de formación de biopelículas.

La elevada tasa de plasticidad genómica en las cepas de *A. baumannii*, debido a su capacidad de adquisición de material genético por transferencia horizontal, y la ausencia de mecanismos de defensa por CRISPR, tal como existen en otras bacterias, causan que los genomas de *A. baumannii* contengan un conjunto de genes de contenido heterogéneo, y otra serie de genes únicos (Liu y col., 2014). Esto pudiera tener repercusiones sobre el contenido de genes que codifiquen Dnmts y los respectivos efectos de la metilación del ADN sobre la regulación de la expresión génica.

En bacterias clasificadas como *A. baumannii* existen mecanismos de regulación epigenéticos, modulados por las enzimas Dnmts. Sin embargo, se desconocen las funciones de estas enzimas en el desarrollo de biopelículas. La enzima Dam está ausente en *A. baumannii*, pero deben existir otros tipos de Dnmts. El efecto de la metilación del ADN sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* representa un campo de investigación de interés, que no ha sido del todo estudiado. En este trabajo se sugiere que este tipo de regulación epigenética sobre la formación de biopelículas de *A. baumannii* está influenciada por enzimas Dnmts distintas a Dam, las cuales resultan interesantes identificar y caracterizar a futuro, para así desglosar el sistema de regulación epigenético específico que se expresa en las bacterias de *A. baumannii*.

VIII.2.1.b Efecto del etanol sobre la metilación del ADN de las biopelículas de *S. marcescens* 4474

El genoma de la cepa clínica *S. marcescens* 4474, creciendo en formato de biopelículas, presenta metilación global del ADN en GATC, bajo las condiciones de crecimiento ensayadas (CN, 37 °C; CN + 1 % etanol, 37 °C) (tabla 32, figura 39). Las variaciones sutiles de la metilación del ADN de biopelículas entre diferentes tratamientos, pueden implicar cambios epigenéticos, que modulan la información de la expresión génica asociada al etanol como estímulo del entorno.

Existe un único reporte bibliográfico que señala el efecto del etanol sobre el crecimiento de *S. marcescens*, destacando la inducción de la elevada producción del pigmento prodigiosina (Cang y col., 2000). En *S. marcescens* se desconocen los cambios en la expresión génica vinculados a un fenotipo de tolerancia al etanol, tal como ha sido descrito en *E. coli* por Horinouchi y colaboradores (2010). No obstante, cabe destacar que la síntesis de prodigiosina en *Serratia* spp. puede estar modulada por una ruta dependiente del sistema “*quorum sensing*” (Slater y col., 2003) que, además, interviene en la formación de biopelículas (Morohoshi y col., 2007). Aunque la cepa clínica *S. marcescens* 4474 no es secretora de prodigiosina, se puede sugerir que cantidades trazas de etanol estimula mecanismos regulatorios globales de la expresión génica, como el sistema “*quorum sensing*” o la metilación del ADN mediada por Dam.

Con los resultados obtenidos se puede considerar que la metilación del ADN, como marca epigenética, etiqueta aquellos genes en los que se requieren cambios de su expresión ante una condición de estrés. La metilación del ADN mediada por Dam parece formar parte de la red regulatoria de la expresión génica durante la formación de biopelículas de *S. marcescens*. La baja concentración de etanol ensayada, estimuló el desarrollo de biopelículas. En conjunto, la presencia de etanol 1% condujo a alteraciones del entorno y de la fisiología bacteriana, tales que promovieron las alteraciones sutiles sobre los patrones de la metilación global en el genoma de *S. marcescens* 4474. Los cambios en la metilación del ADN, sumado a la señalización celular, mediada

por el sistema “*quorum sensing*”; pudieron haber influido sobre la formación de biopelículas de *S. marcescens* 4474, comparados con su desarrollo en ausencia de etanol (CN, 37 °C).

Por esto es interesante estudiar el papel de la metilación del ADN sobre la formación de biopelículas de *S. marcescens*. En este trabajo se propuso evaluar el efecto global de la metilación del ADN en ausencia de la enzima Dam sobre la formación de biopelículas de *S. marcescens*, mediante la construcción de cepas mutantes de *S. marcescens* con delección del gen *dam*. Sin embargo, no se pudo determinar el efecto global de la metilación del ADN en ausencia de Dam sobre la formación de biopelículas de *S. marcescens*, ya que no fue posible construir la cepa mutante de *S. marcescens* Δdam .

El paso limitante ocurrido durante la construcción de la cepa mutante, fue la transformación de los aislados clínicos de *S. marcescens* con el plásmido pkD46. En diversos protocolos de mutagénesis sitio dirigida descritos para *S. marcescens* (Reid y col., 1982; Rossi y col., 2003; Sapriel y col., 2003; van Houdt y col., 2006; Castelli y col., 2008; Shimuta y col., 2009), se emplean concentraciones elevadas de antibióticos para la selección de las bacterias transformantes. Se ha descrito que *S. marcescens* tiene capacidad de resistencia a los antibióticos considerablemente mayor respecto a otras bacterias (como *E. coli* K-12), aun cuando no posea genes de resistencia adquiridos como material extracromosómico (Takagi y Kisumi, 1985). Sin embargo, aun con estas consideraciones, no ocurrió la transformación de las cepas de *S. marcescens* con el plásmido pkD46, por lo que no fue posible inducir la mutagénesis sitio dirigida de Datsenko y Wanner (2000) en *S. marcescens*. En la bibliografía consultada, tampoco se reporta el funcionamiento de este sistema de mutagénesis en *S. marcescens*.

Los organismos de la especie *S. marcescens* son capaces de secretar un conjunto de proteínas extracelulares como Dnasas, quitinasas, lipasas y proteasas (Matsuyama y col., 1995). La presencia de Dnasas extracelulares puede dificultar la transformación con ADN foráneo en *S. marcescens* (Castelli y col., 2008).

Trabajos previos reportan la conjugación bacteriana como técnica de transformación para *S. marcescens* (Matsuyama y col., 1995; Lai y col., 2005; Shanks y col., 2007; Begic y Worobec, 2008; Castelli y col., 2008). Si bien se ha descrito el uso de electroporación (Rossi y col., 2003; Shimuta y col., 2009) para la transformación en *S. marcescens*, se han establecido modificaciones, tales como el uso de cepas mutantes que carezcan la actividad Dnasas y tratamientos previos de metilación del ADN foráneo a transformar, con la enzima metilasa *HpaII* (Hines y col., 1988).

Se ha reportado la construcción de una cepa de *S. marcescens* con delección del gen *dam*, mediante electroporación, en condiciones en las cuales la cepa silvestre empleada como receptora, *S. marcescens* Sr41, fue tratada con el mutágeno N-metil-N'-nitro-N-nitrosoguanidina (Ostendorf y col., 1999). Estas cepas mutantes se caracterizaron por carecer de actividades enzimáticas tipo exonucleasas, endonucleasas de restricción y sensibilidad a los antibióticos, tales como ampicilina y kanamicina (Takagi y Kisumi, 1985). Sólo con estas condiciones se ha reportado la adquisición de material foráneo en *S. marcescens* en condiciones *in vitro*.

Dada la importancia de comprender el rol de la metilación del ADN en el desarrollo de biopelículas de *S. marcescens* en el ámbito clínico, es interesante continuar a futuro la construcción de la cepa mutante *S. marcescens* Δdam , tomando en cuenta las modificaciones a realizar, para la incorporación exitosa del ADN foráneo durante el proceso de transformación bacteriana.

VIII.2.2.a Efecto de las condiciones del entorno sobre las biopelículas de *E. coli* MG1655 y su cepa isogénica *E. coli* MG1655 Δdam

A nivel fenotípico, la cepa *E. coli* MG1655 fue clasificada como no formadora o formadora de biopelículas débiles, bajo las condiciones del entorno ensayadas (tabla 32). De los resultados obtenidos, las colonias de *E. coli* MG1655 fueron descritas como incapaces de secretar fibras de tipo curli, debido al morfotipo “pdar” obtenido en Agar Rojo Congo. No obstante, la

elevación de tipo crateriforme en estas colonias, se observaron márgenes que adquirieron distintas intensidades de coloración roja (tabla 19).

Las fibras de tipo curli son el componente principal involucrado en la adhesión bacteriana y formación de biopelículas en *E. coli* y *S. enterica* (Brombacher y col., 2006). La cepa de referencia *E. coli* MG1655 presenta la capacidad potencial de síntesis de fibras curli, mas no del desarrollo de biopelículas. Aunque parecen afirmaciones contradictorias, existe soporte bibliográfico. Se han descrito cepas de laboratorio (incluida *E. coli* MG1655), así como aislados bacterianos ambientales y clínicos, deficientes en la síntesis de fibras curli, a pesar de contener estos genes funcionales. La expresión críptica de los operones *csgBAC* y *csgDEFG*, está relacionada con la pérdida parcial o total de síntesis de la proteína regulatoria global CsgD, cuya expresión génica se encuentra modulada por un promotor constitutivo débil (Hammar y col., 1995; Vidal y col., 1998; Brombacher y col., 2003; Brombacher y col., 2006; Gualdi y col., 2008). Se han descrito otros factores de adhesión, como la celulosa, que modulan la adhesión transitoria sobre superficies, promoviendo así el desarrollo de biopelículas débiles en cepas bacterianas que son deficientes en la síntesis de fibras curli (Schembri y col., 2003; Gualdi y col., 2008).

Se han descrito diferencias de la expresión génica global en cepas de laboratorio de *E. coli* (incluida *E. coli* MG1655), creciendo en formato planctónico y en biopelículas, mediante ensayos de microarreglos (Schembri y col., 2003; Beloin y col., 2004). En estos estudios los autores reportan que las alteraciones de la expresión ocurren en 5 al 10 % de los genes que codifican proteínas, durante la formación de biopelículas de *E. coli* MG1655 (Schembri y col., 2003). Los cambios de la expresión génica varían, incluso, en función de las distintas fases del desarrollo de las biopelículas (Beloin y col., 2004). Los niveles de expresión génica en formato de biopelículas que se encuentran alterados, destacan genes que codifican proteínas específicas a biopelículas, asociadas a respuestas adaptativas, metabolismo energético y de carbohidratos, regulatorias, de adhesión y de funciones desconocidas. Cabe destacar que no fue detectada la expresión de genes que codifican flagelos ni las fibras de tipo curli en el perfil de transcripción de *E. coli* MG1655 (Schembri

y col., 2003; Beloin y col., 2004). A pesar de la poderosa resolución de la tecnología de microarreglos, el análisis de biopelículas es limitado, ya que su diseño no permite resolver los perfiles de transcripción de la heterogeneidad fenotípica en biopelículas (An y Parsek, 2007). Las técnicas experimentales descritas para medir y visualizar la heterogeneidad fisiológica en biopelículas, y así mejorar la detección de la expresión génica diferencial en biopelículas, son: actividad respiratoria, permeabilidad diferencial de membrana, actividad sintética de ADN, fluorescencia de la matriz extracelular, genes reporteros, hibridación por fluorescencia *in situ*, microautoradiografía y microscopia de microdissección (Stewart y Franklin, 2008).

En conjunto, los resultados obtenidos sugieren que la cepa *E. coli* MG1655 no tiene la capacidad de formación de biopelículas moderadas o fuertes, debido a la ausencia de la expresión de genes que codifican para las fibras de tipo curli. La formación de biopelículas débiles en determinadas condiciones del entorno, se deben a alteraciones de la expresión de un número limitado de genes específicos, que conllevan la secreción de componentes de adhesión bacteriana alternos a las fibras de tipo curli.

La ausencia de la enzima Dam en *E. coli* MG1655, causó alteraciones fenotípicas importantes sobre la capacidad de formación de biopelículas, destacando la secreción de fibras de tipo curli (tabla 32). Se observaron efectos sobre la formación de biopelículas, en función de las condiciones del entorno ensayadas. Es posible que en *E. coli* MG1655 Δdam , se haya recuperado la expresión de genes específicos asociados a biopelículas, particularmente, la expresión de genes que codifican las fibras de tipo curli.

Se han descrito los efectos pleiotrópicos causados por la ausencia de metilación de la enzima Dam en *E. coli* creciendo en formato planctónico. Aunque los efectos no implican una pérdida de la viabilidad celular, se manifiestan alteraciones en el crecimiento, la morfología bacteriana, el sistema de reparación del ADN, la replicación y la estructura del cromosoma; así como la expresión génica (Calmann y Marinus, 2003). Diversos análisis de la expresión génica, mediante ensayos de microarreglos, han demostrado los cambios en los niveles de transcripción entre cepas de referencias silvestres de

E. coli, con respecto a sus cepas isogénicas, mutantes del gen *dam*. Para *E. coli* MG1655, se ha descrito que la ausencia del gen *dam* sólo afecta de manera significativa el aumento de la expresión génica del regulón SOS (*recA*, *oraA*, *recN*, *sulA*, *dinI* y *umuDC*), el cual incrementa la frecuencia de mutaciones espontáneas (Løbner y Olesen, 2002). Contradictoriamente, en otros ensayos de microarreglos, se han descrito que son al menos 200 los genes que presentan inducción en su expresión génica, en ausencia de Dam (Robbins-Manke y col., 2005). En la cepa isogénica de *E. coli* K-12 YK1100 se ha descrito que la ausencia del gen *dam* afecta los niveles de transcripción global de una amplia lista de genes, vinculados al metabolismo: energético, intermediario central, de aminoácidos, ácidos grasos, fosfolípidos, nucleótidos; la biosíntesis de: la envoltura celular y transporte; funciones regulatorias y respuestas al estrés, entre otros (Oshima y col., 2002).

Los efectos pleiotrópicos causados por la ausencia de metilación mediada por la enzima Dam sobre el desarrollo de biopelículas de *E. coli* MG1655 no han sido elucidados. Se ha reportado que en cepas de *E. coli* uropatogénicas y enterohemorrágicas, la ausencia de Dam causa un incremento de la adherencia y la biosíntesis de biomasa, durante el desarrollo de biopelículas (Campellone y col., 2007; Stephenson y Brown, 2016).

En este trabajo se observó la secreción de fibras curli en *E. coli* MG1655 Δdam , en placas de ARC incubadas a TA, mas no a 37 °C (tabla 21). La temperatura resultó ser un estímulo del entorno que modula la formación de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam (tabla 32). Se ha descrito que la temperatura regula la síntesis de las fibras de tipo curli y celulosa, mediada por los genes que codifican las proteínas regulatorias *crl* y *adrA*, respectivamente. La expresión de los genes *crl* y *adrA* dependen de temperaturas de incubación menores a 32 °C (Brombacher y col., 2006; Gualdi y col., 2008).

Estos resultados representan el primer reporte que destaca los efectos de la ausencia de metilación de los motivos GATC sobre la formación de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam . Es posible que en *E. coli* MG1655 Δdam , la falta de metilación de los motivos GATC cause alteraciones en la transcripción génica global, que promuevan la reversión fenotípica en la

adhesión a superficies, recuperándose la expresión de genes específicos asociados a biopelículas, tales como la síntesis de las fibras de tipo curli. La ausencia de metilación del ADN mediada por Dam en *E. coli* MG1655, en conjunto con las alteraciones de la expresión génica vinculadas, tuvo como efecto que determinados estímulos del entorno ensayados desencadenaran respuestas específicas en el desarrollo de biopelículas, las cuales no fueron detectadas en la cepa silvestre *E. coli* MG1655.

Se discutirán, a continuación, los efectos de los distintos estímulos del entorno ensayados sobre la formación de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam . Seguidamente, se discutirán los patrones de metilación del ADN obtenidos en el genoma de estas biopelículas de *E. coli*. Se debe tomar en cuenta que se ensayaron con biopelículas de las cepas *E. coli* MG1655 y *E. coli* MG1655 Δdam , formadas en ausencia y presencia de metionina. Los cambios globales de metilación del ADN sobre las secuencias GATC, se evaluaron mediante ensayos de restricción con las enzimas Sau3AI, DpnI y MboI.

VIII.2.2.a.i Efecto de las condiciones nutritivas sobre las biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam

La adición de exceso de glucosa en el medio de cultivo, inhibió el desarrollo de biopelículas de *E. coli* MG1655 carentes de la enzima Dam, mientras que la dilución de nutrientes del CN estimuló el desarrollo de biomasa de biopelículas fuertes. En esta cepa mutante, la ausencia de metilación del ADN restauró la capacidad de desarrollo de biopelículas que está ausente en *E. coli* MG1665 silvestre. Los resultados demuestran que un exceso de glucosa del entorno, actúa como molécula represora en la formación de biopelículas de *E. coli* MG1655 (tabla 30).

El rol inhibitorio que ejerce el exceso de glucosa en la formación de biopelículas también fue detectado previamente en la cepa mutante de *E. coli* MG1655 $\Delta csrA$ (Jackson y col., 2002). El gen *csrA* codifica una proteína reguladora global de la expresión génica, que actúa al nivel de la transducción.

En gran medida, el efecto respuesta de la glucosa sobre la expresión génica, indica que está modulado con el sistema de represión por catabolito (Jackson y col., 2002). En la cepa de referencia *E. coli* K12 (2K1056) también se detectó la influencia de los nutrientes sobre el desarrollo de biopelículas. Esta cepa forma biopelículas en medio LB y mínimo mineral, suplementado con casaminoácidos. Sin embargo, cuando el medio mínimo contiene glucosa como fuente única de carbono, ocurre la inhibición de la formación de biopelículas (Pratt y Kolter, 1998).

Los resultados obtenidos, en conjunto con la bibliografía consultada, indican que la presencia de glucosa en exceso no induce mecanismos de estrés que promuevan como respuesta fisiológica la formación de biopelículas de *E. coli*. El consumo y agotamiento de esta fuente de carbono en el medio de cultivo, puede inducir el desarrollo de biopelículas. Los resultados del presente trabajo permiten confirmar que la metilación del ADN bacteriano mediada por la enzima Dam, puede actuar como factor regulatorio global de la expresión génica e influye sustancialmente sobre la formación y el desarrollo de biopelículas de *E. coli*.

VIII.2.2.a.ii Efecto del etanol sobre las biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam

El etanol al 1% (v/v) indujo el desarrollo de biopelículas débiles en *E. coli* MG1655 Δdam , las cuales carecen de metilación del ADN por Dam. La viabilidad celular en *E. coli* MG1655 Δdam incrementó en presencia de la concentración traza de etanol evaluada, la cual se reflejó en el parámetro de UA, comparado con el ensayo control (CN + 37°C) (tabla 30). En la cepa silvestre de *E. coli* MG1655, si bien hubo un incremento en la viabilidad celular y el desarrollo de biopelículas en presencia de la baja concentración de etanol, este efecto fue menor, comparado con la cepa mutante de *E. coli* MG1655 Δdam . No hubo efecto de respuesta en relación al desarrollo de biopelículas de *E. coli* MG1655 silvestre en presencia de etanol al 1%.

En *E. coli* se ha descrito que en el metabolismo del etanol, se oxida a acetato; sin embargo, la exposición de concentraciones elevadas de etanol, inhibe el crecimiento bacteriano (Vulić y Kolter, 2002). En *E. coli* MG1655 se ha reportado concentraciones mínimas inhibitorias de etanol, igual o superiores al 5% (v/v) (Lupino y col., 2008), por lo que una concentración traza de etanol al 1%, no implica una inhibición del crecimiento bacteriano. En la cepa de *E. coli* W3110 se ha reportado que la capacidad de tolerancia al etanol como condición de estrés, implica un incremento en la tasa de crecimiento, junto a cambios en la expresión génica, destacando un aumento en la expresión de genes relacionados con el metabolismo del hierro, la biosíntesis de aminoácidos, osmoregulación y biosíntesis de la pared celular (Horinouchi y col., 2010). Los cambios fenotípicos en bacterias tolerantes al etanol no surgen sólo por la aparición de mutaciones génicas; también se reporta la manifestación de plasticidad fenotípica, sin alteración del material genético. Por esta razón se ha sugerido a los procesos de metilación del ADN como un mecanismo epigenético que establece los cambios fenotípicos adaptativos (Horinouchi y col., 2015).

Los resultados del presente trabajo, en conjunto con la bibliografía consultada, sugieren que la cepa mutante *E. coli* MG1655 Δdam desencadena un mecanismo de respuesta de tolerancia al etanol como condición de estrés, que estimula el desarrollo de biopelículas bacterianas. Es interesante considerar que los cambios de la metilación del genoma de *E. coli* MG1655 Δdam , influyeron en la regulación de la expresión de genes asociados a biopelículas. En la cepa mutante *E. coli* MG1655 Δdam , la ausencia de metilación de los motivos GATC puede ejercer efectos sobre el perfil de la expresión génica de manera tal que, la presencia de etanol al 1%, resultara como estímulo del entorno que promueve la formación de biopelículas. A futuro se propone continuar con el estudio de los efectos de concentraciones trazas de etanol sobre la formación de biopelículas bacterianas, haciendo énfasis sobre la asociación potencial que presenta con la metilación del ADN, como mecanismo de regulación de la expresión génica.

VIII.2.2.a.iii Efecto del EDTA y de los surfactantes sobre las biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam

La ausencia de la actividad Dam no promovió efectos pleiotrópicos sobre el desarrollo de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam , en presencia del agente quelante EDTA, ni de los surfactantes SDS y CTAB (tabla 30). La viabilidad celular en *E. coli* MG1655 Δdam disminuyó en los distintos ensayos realizados, la cual se reflejó en el parámetro de *UA*, comparado con el ensayo control (MMM M9 + TA).

El agente quelante EDTA y los surfactantes CTAB y SDS implican una condición de estrés en el entorno que causan efectos deletéreos sobre el crecimiento y viabilidad celular bacteriana, incluyendo la inhibición en la capacidad de formación de biopelículas (Ishikawa y col., 2002; Feng y col., 2015).

Con los resultados obtenidos se evidencian que los agentes químicos de estudio, afectaron la capacidad de adherencia a superficies y la integridad de la fisiología bacteriana, reportándose una disminución significativa sobre la formación de biopelículas en *E. coli* MG1655 Δdam .

En este sentido, se sugiere que la ausencia de metilación del ADN sobre los motivos GATC en *E. coli* MG1655 Δdam , no parece proporcionar cambios en la expresión génica que desencadene el desarrollo de biopelículas como posible respuesta adaptativa, ante las condiciones de estrés ensayadas. Este planteamiento es importante, ya que destaca la existencia de tratamientos químicos potenciales con efectos deletéreos sobre la fisiología bacteriana, que limitan la capacidad de formación de biopelículas bacterianas. Estas señales deletéreas del entorno pueden ser propuestas como posibles estrategias de tratamiento anti-biopelículas, las cuales son insensibles a los efectos de la metilación del ADN.

VIII.2.2.a.iii Efecto de la metionina sobre las biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam

Los resultados de este trabajo reportan un aumento en la capacidad de producción de biopelículas de *E. coli* MG1655 en presencia de 5 μM de metionina (figura 27), sin cambios significativos en su biomasa, siendo reclasificada como formadora de biopelículas débiles, con un aumento de las $UA = 0,0290$ (tabla 30). Estos datos indican que, en presencia de metionina suplementada al MMM M9, incrementa la capacidad de adhesión a superficies de las bacterias *E. coli* MG1655.

Los cambios evidenciados sobre el desarrollo de biopelículas de *E. coli* MG1655 en presencia de metionina, pueden sugerir que este aminoácido estimula la formación de estructuras de adhesión en las células bacterianas.

La presencia de 5 μM de metionina en MMM M9 a TA, también afectó el desarrollo de biopelículas de células *E. coli* MG1655 Δdam , pero reflejándose, contrariamente al caso anterior, en una disminución en las UA y la biomasa, en comparación de estos parámetros con el ensayo control (MMM M9 a TA), y con los otros ensayos de tratamientos con distintas concentraciones trazas de metionina exógena (tabla 30). Sin embargo, no se indujeron cambios detectables en la clasificación de las biopelículas formadas.

La mayoría de las especies bacterianas poseen rutas metabólicas, con diversas estrategias, para la biosíntesis del aminoácido metionina, las cuales están bien caracterizadas en *E. coli*. Estas reacciones anabólicas se encuentran estrechamente coordinadas y reguladas. La metionina funciona como un modulador alostérico, con efectos inhibitorios, en su biosíntesis. Esta ruta anabólica de la metionina está acoplada con la ruta de síntesis de SAM y de las moléculas autoinductoras del sistema “*Quorum Sensing*”, que representa uno de los mecanismos de señalización en la formación de biopelículas de *E. coli* (Ferla y Patrick, 2014).

Por lo tanto, con los resultados obtenidos (tabla 30) se puede sugerir que las rutas metabólicas vinculadas con el aminoácido metionina ejercen un efecto regulatorio sobre el desarrollo de biopelículas.

Una concentración de 5 μ M metionina exógena parece representar una señal del entorno que disminuyó la capacidad de adhesión a superficies y la síntesis de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam . Con los resultados obtenidos, en conjunto con la bibliografía consultada, se puede sugerir que la formación de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam , fue producto de la influencia de la metionina exógena en la biosíntesis de los metabolitos SAM y acil homoserina lactonas. La acumulación de estos metabolitos pudo ejercer efectos moduladores sobre los mecanismos de señalización de la adhesión bacteriana y la formación de biopelículas. Aunque se pudiera considerar que la presencia de moléculas autoinductoras del “*quorum sensing*” promueven el desarrollo de biopelículas bacterianas, el efecto observado en células de *E. coli* MG1655 Δdam fue distinto. Si bien se requieren de otras experiencias para corroborarlo, se sugiere que la ausencia de metilación de los motivos GATC en la cepa mutante *E. coli* MG1655 Δdam , sumado con los otros cambios probables sobre el patrón de metilación del ADN por la inducción del sustrato SAM, mediada por otras enzimas Dnmts, causan alteraciones en la expresión génica tales que, como efecto sinérgico, limitaron el desarrollo de biopelículas.

Este planteamiento también puede justificar el amplio rango de valores obtenidos en cuanto a la biomasa de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam en los ensayos realizados. La ausencia de metilación del ADN por Dam en la cepa mutante de *E. coli* MG1655, influyó sobre la formación de biopelículas crecidas en MMM M9 a TA, comparada con la cepa silvestre. Las posibles alteraciones adicionales sobre la metilación global del ADN, inducidas por las condiciones del entorno ensayadas, pueden también ocasionar efectos variables de la expresión génica entre las células de un mismo ensayo, entre tratamientos y entre réplicas.

VIII.2.2. a.iv Efecto de la metionina sobre el patrón de metilación del ADN de biopelículas de *E. coli* MG1655 y su cepa isogénica *E. coli* MG1655 Δdam

El genoma de la cepa de referencia *E. coli* MG1655, aislado de bacterias creciendo en formato de biopelículas, formadas en las diferentes condiciones de crecimiento ensayadas (MMM M9, TA; MMM M9 + 5 μ M metionina, TA), está metilado en las secuencias GATC (tabla 32, figura 41). Con los ensayos enzimáticos empleados, se observaron patrones de restricción de ADN, identificando aquellos que se encuentran o no metilados. Los genomas aislados de células de *E. coli* MG1655 creciendo en biopelículas, en las condiciones del entorno ensayadas, presentaron variaciones sutiles en los patrones de digestión enzimática.

La metilación global del genoma es una condición fisiológica bacteriana característica (Camacho y Casadesús, 2005), que permite etiquetar y discriminar entre distintas moléculas o hebras de ADN, ejerciendo distintas funciones biológicas esenciales, tales como: protección del ADN celular en contra de la degradación por sistemas de RM, reparación del ADN, control de la replicación del ADN y del ciclo celular (Jeltsch, 2002).

En la cepa *E. coli* K-12 W3110 se ha descrito el mantenimiento del patrón de metilación global de las secuencias GATC, durante las fases de crecimiento: exponencial, estacionaria temprana (8 a 16 h de incubación), estacionaria tardía (24 a 48 h de incubación), post muerte (72 h de incubación) y estacionaria de largo plazo (96 a 120 h de incubación) (Westphal y col., 2016). Los reportes previos confirman la metilación global y completa del genoma bacteriano durante la fase estacionaria de crecimiento, utilizando ensayos de secuenciación SMRT (Kahramanoglou y col., 2012; Westphal y col., 2016).

El genoma de *E. coli* K-12 se han reportado más de 37400 motivos GATC. La mayoría de estos motivos conservan los niveles de metilación, durante el crecimiento logarítmico bacteriano. Sin embargo, ciertos motivos GATC presentan cambios en los patrones de metilación, con una frecuencia de distribución específica en el genoma bacteriano. En el genoma de *E. coli*

W3110 se han identificado 66 motivos GATC con alteraciones significativas en la metilación durante la fase estacionaria de crecimiento. Trece de los 66 motivos GATC detectados, se encuentran en regiones no codificantes del genoma bacteriano, destacando regiones regulatorias y promotoras (Westphal y col., 2016). Desde otra perspectiva, se ha descrito que alrededor del 50 % de los genes de *E. coli* K-12 YK1100 (*trpC9941*), contienen más de dos motivos GATC en las 500 pb río arriba del inicio de transcripción (Oshima y col., 2002).

Estas secuencias GATC presentan patrones de cambios cuantitativos y temporales de metilación del ADN (Westphal y col., 2016). Se han caracterizado los mecanismos moleculares del control epigenético mediado por Dam en los operones *traJ* (Camacho y Casadesús, 2005), *gtr* (Broadbent y col., 2010), *std* (García-Pastor y col., 2019) de *S. enterica*; y los operones *pap* (VAN DER Woude y col., 1998) y *agn43* de *E. coli* (Haagmans y VAN DER Woude, 2000). Las características previamente mencionadas sobre la distribución y cambios en los niveles de metilación de un conjunto de secuencias GATC, proporcionan fundamentos genómicos sobre una función adicional de la metilación del ADN, asociada con la regulación de la expresión génica.

También se ha descrito la distribución de la metilación global de citosina en el genoma de *E. coli* MG1655. Sobre los motivos CCWGG, se cataliza la transferencia del grupo metilo, por la enzima Dcm, estando completamente metilados durante la fase estacionaria de crecimiento. Se han reportado 24090 motivos CCWGG en el genoma de *E. coli* MG1655, de los cuales tan sólo cerca del 7 % están distribuidos en regiones promotoras. La mayoría de los motivos CCWGG están representados dentro de los genes, con tendencia de encontrarse en secuencias de ADN en las que pueden ocurrir mutaciones no sinónimas. Adicionalmente, la ausencia del gen *dcm* en *E. coli* MG1655 causó el incremento de la expresión de genes de respuesta al estrés, asociados a la fase estacionaria. Si bien se sugiere el rol regulador de la metilación de citosina en CCWGG durante la fase estacionaria en *E. coli*, el análisis de secuencias indican la poca relevancia estadística que parece representar la metilación de la citosina en la regulación de la expresión génica, en comparación con la metilación de adenina en GATC. No se descarta el efecto de la citosina sobre la estructura y propiedades mecánicas del ADN, que pueden afectar la

expresión génica por mecanismos aun no elucidados (Kahramanoglou y col., 2012; Militello y col., 2016).

Sin embargo, estos patrones globales de metilación del ADN reportados en la bibliografía, sólo están descritos para células bacterianas en crecimiento planctónico. Los resultados obtenidos en este trabajo (tabla 32, figura 41) parecen indicar que el patrón global de metilación del ADN sobre secuencias GATC se conserva constante durante el desarrollo de biopelículas de *E. coli* MG1655. Si bien resulta evidente la metilación global del genoma en biopelículas de *E. coli* MG1655 (figura 42), existe una menor proporción de motivos GATC que presentan variaciones de metilación. Por lo tanto, se sugiere que, durante la formación de biopelículas bacterianas, deben existir cambios en la metilación del ADN, los cuales ejercen efectos regulatorios sobre la expresión de genes asociados a biopelículas. Hay que recordar que, si bien la cepa de referencia *E. coli* MG1655 es usualmente clasificada como no formadora de biopelículas, en la condición del entorno evaluada (MMM M9 + 5 μ M metionina, TA) se reportó un aumento en la capacidad de producción de biopelículas (tabla 32).

En la cepa mutante *E. coli* MG1655 Δdam ocurre la pérdida permanente de metilación del ADN de la adenina en la secuencia GATC. El análisis global del patrón de metilación del ADN obtenido, corrobora que las secuencias GATC del genoma de la cepa mutante proveniente de biopelículas, no se encuentran metiladas (tabla 32, figura 44). Las biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam formadas en presencia de 5 μ M de metionina, presentaron una disminución en su producción y la biomasa. Por lo tanto, se sugiere que la falta de metilación de los motivos GATC por la enzima Dam, pueden influir sobre la expresión génica, tal que la presencia de metionina sea percibida como una señal del entorno que limita el desarrollo de biopelículas.

En la cepa de *E. coli* W3110 se han descrito al menos 11 genes asociados al metabolismo de compuestos de azufre, que contienen en sus regiones promotoras motivos GATC; como el gen *metH*, que codifica la enzima metionina sintasa (Westphal y col., 2016). Por otra parte, la cepa mutante de *E. coli* K-12 YK1100 Δdam , presenta un incremento en la transcripción de genes

vinculados al metabolismo de aminoácidos, en condiciones aeróbicas de crecimiento (Oshima y col., 2002).

Con los resultados obtenidos, en conjunto con las referencias bibliográficas, se evidencian que las variaciones en la metilación global de los motivos GATC y la influencia de 5 μ M de metionina sobre el desarrollo de biopelículas, pueden estar relacionados por procesos epigenéticos, los cuales forman parte de los mecanismos generadores de las alteraciones de la expresión de genes asociados a biopelículas.

VIII.3 Efecto global de las condiciones del entorno sobre la formación de biopelículas bacterianas

La formación de biopelículas es una estrategia de sobrevivencia bacteriana, que se induce ante condiciones de estrés, además de la influencia de la fisiología bacteriana. Con los resultados obtenidos en este trabajo (tabla 30) se evidenciaron que los distintos estímulos biológicos, físicos y químicos presentes en el entorno, ejercen efectos diversos sobre la capacidad de adhesión bacteriana y el desarrollo de biomasa de biopelículas. Aun con estas variaciones, las condiciones del entorno estudiadas tienen efectos tanto generalizados como especie-específicos sobre el desarrollo de biopelículas.

Las condiciones nutritivas, como el exceso de glucosa, tiene efectos especie-específicos sobre el desarrollo de biopelículas en los tres géneros bacterianos estudiados. La asimilación de esta fuente de carbono depende de la fisiología intrínseca bacteriana. Por lo tanto, los mecanismos de señalización asociados al exceso de glucosa, también deben responder en función de la fisiología microbiana.

El suplemento de metionina en el entorno tiene efectos variables sobre la formación de biopelículas bacterianas. Las tendencias observadas parecen manifestar efectos especie-específicos sobre las biopelículas bacterianas. El metabolismo de la metionina depende de la fisiología bacteriana, por lo que el suplemento de metionina tiende a influir de manera especie-específica sobre la formación de las biopelículas bacterianas.

El etanol al 1 % es una condición de estrés en el entorno, que tiene como efecto estimular la formación de biopelículas bacterianas. Para los tres géneros bacterianos estudiados, la cantidad traza de etanol incrementó la capacidad de adhesión y la biomasa de biopelículas. Por lo tanto, en los ambientes hospitalarios se sugiere evitar el uso del etanol en condiciones subletales, ya que estimulan los mecanismos de sobrevivencia bacteriana, promoviendo su persistencia en el entorno, lo que dificulta la remoción de la contaminación.

El agente quelante EDTA y los surfactantes CTAB y SDS, tienen también efectos negativos generalizados sobre las biopelículas bacterianas. La presencia de estos agentes químicos en el entorno, reduce la viabilidad celular y la capacidad de adhesión bacteriana, lo cual reduce el desarrollo de biopelículas. Se recomienda el empleo de surfactantes y de agentes quelantes, como potenciales estrategias anti-biopelículas en superficies inanimadas para control de los ambientes clínicos.

De igual manera, se sugiere extender la evaluación de los efectos de estos estímulos del entorno sobre la formación de biopelículas bacterianas e, incluso, sumar a este estudio la determinación de los efectos sobre las biopelículas pre-formadas, tomando en cuenta la importancia de remoción de biopelículas en el tratamiento de las enfermedades infecciosas. Es recomendable, por ejemplo, estimar la concentración inhibitoria del etanol en biopelículas de *A. baumannii*, *S. marcescens* y *E. coli*, así como estudiar el efecto de los biosurfactantes y de fuentes externas de azufre que pueden afectar el metabolismo de SAM, sobre el desarrollo de biopelículas bacterianas.

VIII.4 Biopelículas bacterianas, metilación del ADN e implicaciones clínicas

En este trabajo se detectaron variaciones en los patrones de metilación del ADN de células creciendo como biopelículas bacterianas, bajo distintas condiciones de crecimiento (tabla 32).

La metilación del genoma representa un conjunto de etiquetas que marcan regiones específicas del ADN, las cuales establecen una programación específica de expresión génica. En organismos eucariotas, este mecanismo epigenético se asocia con un suiche que produce los cambios en la expresión génica y la plasticidad fenotípica, teniendo un rol esencial en la diferenciación durante el crecimiento y desarrollo. Por ejemplo, los genomas de plantas tienen el mayor contenido de secuencias CpGs metiladas, junto con el sistema de metilación más complejo del ADN en eucariotas ya que se han descrito Dnmts, secuencias de metilación y enzimas demetilasas específicas a especies, tejidos, organelos, e incluso en edad de las plantas. Estas marcas epigenéticas, además, pueden perpetuarse durante la división celular, resultando un patrón heredable de la expresión génica (Vanyushin, 2006).

En biopelículas bacterianas ¿qué efectos ejerce la metilación del ADN sobre la regulación de la expresión génica? En el análisis de los genomas de comunidades bacterianas estudiadas en el ambiente natural, se ha descrito la dinámica del estado de metilación del ADN como un mecanismo regulador de adaptación a las condiciones del entorno.

La composición de la comunidad bacteriana cambia en función de la profundidad de sedimentos marinos. Las bacterias anaerobias facultativas y estrictas incrementan en abundancia, en la profundidad de estos sedimentos. El sedimento marino también difiere en sus propiedades fisicoquímicas, disminuyendo gradualmente los recursos energéticos e incrementando las condiciones de estrés del entorno en las profundidades del sedimento. Los estudios metagenómicos demostraron que, en esta comunidad bacteriana, existe la metilación diferencial de motivos CpG, los cuales disminuyen en las profundidades del sedimento. Por lo que los autores consideran la metilación

del ADN como elemento regulador genético en condiciones espacio-temporales (Hiraoka y col., 2019; Rambo y col., 2019).

En células creciendo en biopelículas se presenta un escenario similar. Dentro de las biopelículas se constituyen gradientes fisicoquímicos complejos. La comunidad bacteriana se distribuye de manera espacio-temporal en estos micro-entornos establecidos, manifestando heterogeneidad fenotípica.

En los ensayos realizados se observaron como resultados un amplio rango de valores de biomasa de biopelículas (valores dispersos de DO biopelículas). Por otra parte, según los patrones de restricción de ADN obtenidos, se detectaron variaciones sutiles en cuanto a intensidad de bandas o su distribución. Estos resultados permiten sugerir que la heterogeneidad fenotípica en las biopelículas es responsable de los resultados variables fenotípicos y genotípicos obtenidos. En la figura 45 se propone un modelo que esquematiza este planteamiento. La heterogeneidad fenotípica es una estrategia de sobrevivencia bacteriana que garantiza las diferentes respuestas en una población bacteriana; siendo también responsable de los valores amplios de dispersión de los datos obtenidos en las diferentes réplicas de los experimentos, ya que no siempre la misma cantidad de células sobrevivientes ante una condición de estrés, adquieren un fenotipo determinado. De esta manera, se promueve una respuesta adaptativa que parece ser única, en función de las condiciones del entorno y de la fisiología microbiana. En este modelo, la metilación del ADN implicaría una fuerza promotora que determina los diversos patrones de la expresión génica que dan respuesta a la heterogeneidad fenotípica. Se propone que, durante el desarrollo de las biopelículas, las subpoblaciones bacterianas contienen distintos perfiles de metilación del ADN, conocidos también como metilomas. Por lo tanto, en la complejidad de las biopelículas bacterianas debe existir una estrecha relación entre la metilación del ADN, la fisiología bacteriana y las condiciones del entorno.

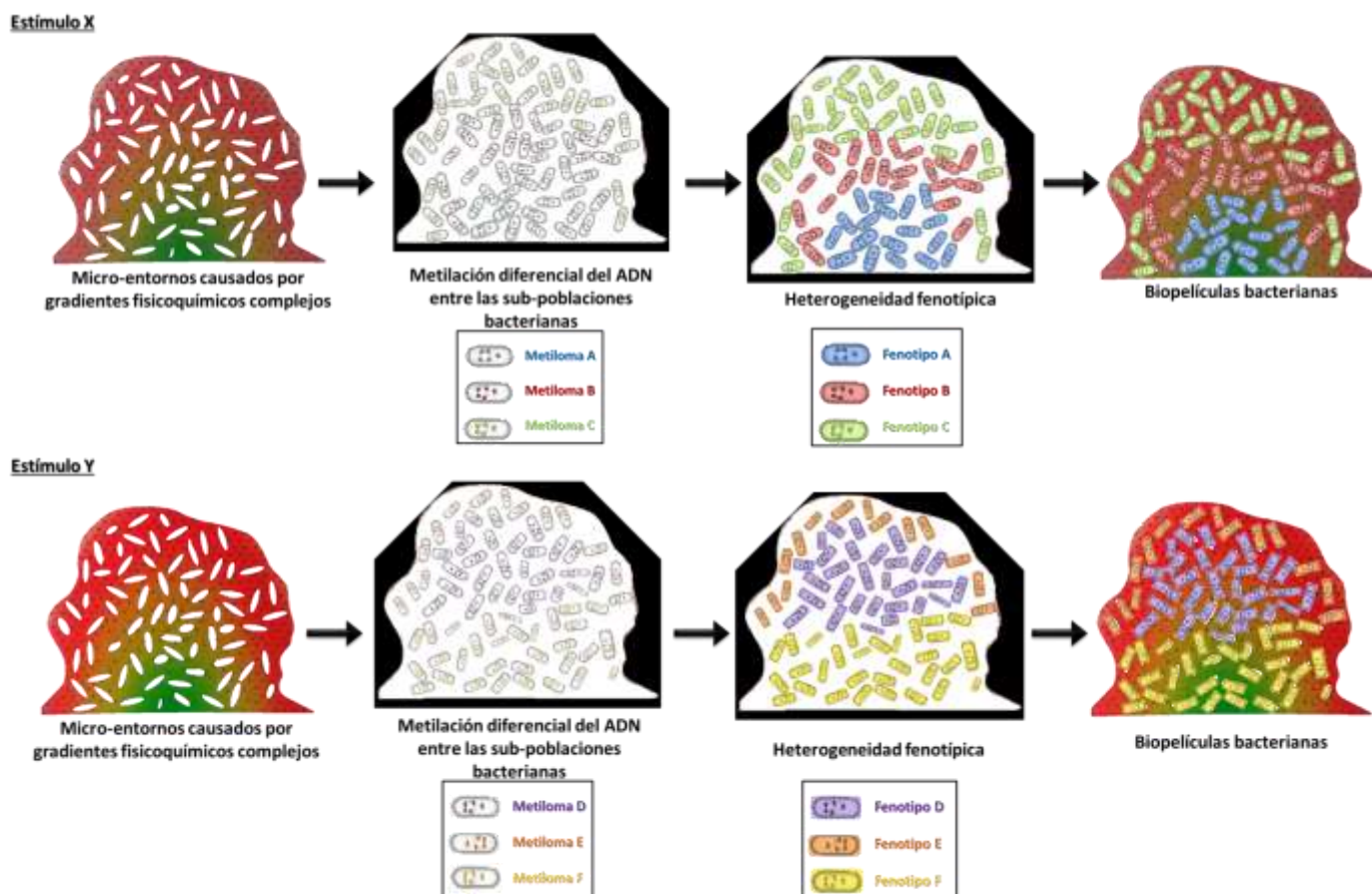


Figura 45: Esquema del modelo que propone la posible relación de la metilación del ADN y las biopelículas bacterianas. La distribución de las distintas subpoblaciones bacterianas dentro de las biopelículas, están marcadas a nivel epigenético con distintos patrones de metilación del ADN y éstas parecen variar en función de las condiciones del entorno. Los metilomas parecen estar asociados con el establecimiento de la heterogeneidad fenotípica como estrategia bacteriana de sobrevivencia, ya que modulan la expresión génica diferencial dentro de las biopelículas. En función de los estímulos de un entorno (tales como estímulos “X” o “Y”), se determinan diferentes patrones de metilación del ADN, los cuales determinan otra distribución en la heterogeneidad fenotípica.

La metilación del genoma bacteriano es global y dinámica. El ADN aislado de biopelículas tiene una representación de todas las subpoblaciones establecidas en la biopelícula, lo que complica detectar las diferencias de los patrones de metilación, mediante la digestión de ADN con enzimas de restricción. Tal como indican An y Parsek (2007), se requieren diseños experimentales que puedan resolver la heterogeneidad espacial y funcional de la comunidad bacteriana en las biopelículas, para establecer con mayor

precisión estos cambios de metilación del ADN causante de la heterogeneidad fenotípica.

Los mecanismos responsables de la heterogeneidad fenotípica de las biopelículas están vinculados con la expresión génica diferencial entre estas sub-poblaciones bacterianas (Vlamakis y col., 2008). Se han descrito estrategias genéticas y epigenéticas responsables de causar la diferenciación fenotípica en bacterias, tales como: procesos de hipermutabilidad, variación de fase, bi-estabilidad, expresión génica estocástica y edad celular (Casadesús y Low, 2013; Bury-Moné y Sclavi, 2017).

La regulación de la expresión de genes por marcas epigenéticas, confieren información adicional a la secuencia nucleotídica, sin implicar eventos de mutaciones del ADN. De esta manera, la información proporcionada por la epigenética, produce cambios sobre la dinámica en la estructura y función del genoma, sin comprometer la estabilidad de la información codificante esencial (Walworth y col., 2017; Rambo y col., 2019). La epigenética dictamina las diferencias de la expresión génica y acumulación de productos génicos que caracterizan la variabilidad fenotípica de una población bacteriana. En biopelículas de *B. subtilis* se ha demostrado la existencia de subpoblaciones celulares, con una distribución dinámica en espacio y tiempo de fenotipos entre bacterias móviles, formadoras de esporas y productoras de la matriz extracelular (Vlamakis y col., 2007).

Cabe destacar que, en términos evolutivos, los mecanismos epigenéticos forman parte del proceso de asimilación genética ("*genetic assimilation*"), que se considera como la fijación genética de un rasgo fenotípico inducido ante una condición de estrés del entorno. Por lo tanto, las señales del entorno producen cambios del epigenoma que, a su vez, altera los patrones de la expresión génica (Nishikawa y Kinjo, 2018). De igual manera, la heterogeneidad fenotípica bajo condiciones fluctuantes del entorno es considerada una estrategia adaptativa con consecuencias importantes sobre el fitness bacteriano (Bury-Moné y Sclavi, 2017).

Con los resultados obtenidos y basándonos en la bibliografía reportada, este trabajo representa una contribución al estudio de la metilación del ADN

sobre la formación de biopelículas bacterianas. Principalmente por no estar elucidada la existencia de alguna relación de la formación de biopelículas con la metilación del ADN. Se determinó que las bacterias de *S. marcescens* 4474 y *E. coli* MG1655, creciendo en formato de biopelículas, mantienen un patrón de metilación global del ADN, en los motivos GATC, mediada por Dam. Los cambios sutiles detectados en los patrones se asociaron con la influencia de las concentraciones trazas de etanol y el suplemento de metionina, sobre la formación de biopelículas de *S. marcescens* 4474 y *E. coli* MG1655, respectivamente (tabla 32).

Por lo tanto, el desarrollo de biopelículas es una respuesta adaptativa de una población celular bacteriana, en la que se establece la heterogeneidad fenotípica (figura 45). El modelo sugiere que la metilación del ADN representa un mecanismo de señalización epigenética que vincula los efectos de cambios en gradiente del entorno con la regulación de la expresión génica diferencial en una parte de la población bacteriana. Se puede sugerir el mismo planteamiento en las biopelículas formadas por *A. baumannii* 3910, sólo que los patrones de metilación del ADN están modulados por enzimas Dnmts distintas de Dam. Con la cepa isogénica mutante *E. coli* MG1655 Δdam , se evidenció que la alteración global de la metilación del ADN por la ausencia de Dam, desencadena efectos pleiotrópicos sobre la formación de biopelículas bacterianas, que incluyen los efectos de las señales del entorno ensayadas.

Es interesante proponer como estudios futuros la detección espacio-temporal de los cambios de los perfiles de metilación del ADN, durante el desarrollo de biopelículas bacterianas. En este sentido, se pudiera resolver y comprender el rol de la metilación del ADN en el establecimiento de perfiles de la expresión génica diferencial que intervienen en la heterogeneidad fenotípica en biopelículas.

En virtud de lo expuesto anteriormente y, desde una perspectiva biomédica, el formato de vida bacteriana en biopelículas implica un grave problema sanitario. Las biopelículas se consideran como uno de los mecanismos de patogenicidad y virulencia que dificultan la prevención o tratamiento de infecciones bacterianas.

Los agentes anti-biopelículas de origen natural o sintético, intervienen en procesos naturales o inducidos que conllevan a una disminución de la biomasa bacteriana, afectando la formación, integridad y/o calidad de las biopelículas. Los mecanismos anti-biopelículas implementados abarcan la prevención de la formación de biopelículas sobre superficies abióticas de catéteres o implantes médicos (Miquel y col., 2016). Se han desarrollado diversas estrategias para el control de biopelículas: la inhibición de la adhesión bacteriana sobre superficies, la remoción de la biomasa y la inhibición por “*quorum quenching*” (Subhadra y col., 2018). Sin embargo, aún no existe una estrategia idónea de erradicación de biopelículas. En gran medida, debido a que estas estrategias no consideran la complejidad de las biopelículas mixtas (Miquel y col., 2016), ni la heterogeneidad fenotípica.

Una estrategia efectiva para combatir las biopelículas, consiste en la remoción completa de la biomasa. Para ello, las condiciones o agentes terapéuticos a ensayar, deben contener propiedades de anti-adherencia y/o de degradación de los componentes de las biopelículas. Dada la respuesta versátil y multifactorial del fenotipo de biopelículas en las especies bacterianas, se propone emplear una combinación de factores anti-biopelículas con efectos sinérgicos, que involucren agentes físicos, químicos, mecánicos e, incluso, biológicos. También se destaca la importancia de desarrollar agentes anti-biopelículas que inhiban la virulencia bacteriana, con efectos menores sobre el crecimiento. Para ello, se han evaluado posibles blancos terapéuticos sobre sistemas regulatorios que modulan la expresión de genes de virulencia asociados con biopelículas (Bryers, 2008; Miquel y col., 2016).

Con los resultados del presente trabajo se propone que en el diseño de estrategias anti-biopelículas se incluyan blancos terapéuticos sobre los patrones de metilación del ADN. Estos agentes pudieran atenuar la heterogeneidad fenotípica dentro de las biopelículas, afectando la expresión génica diferencial, sin inducir cambios genéticos adaptativos que causen efectos de resistencia o tolerancia, como los agentes antimicrobianos. En este sentido, se recomienda continuar el estudio del efecto de los perfiles de metilación global del ADN sobre el desarrollo de biopelículas de aislados clínicos bacterianos. La investigación propuesta implica profundizar en la

caracterización de las enzimas Dnmts solitarias con funciones reguladoras de la expresión génica; identificar los patrones de metilación del ADN de los aislados bacterianos creciendo en formato de biopelículas y evaluar la factibilidad de potenciales blancos terapéuticos asociados con la metilación del ADN, sobre la inhibición en el desarrollo de biopelículas bacterianas.

En este trabajo se propone un modelo que justifica la posible relación de la metilación del ADN y las condiciones del entorno, sobre la formación de las biopelículas bacterianas. La metilación del ADN interviene en la regulación de la expresión génica de una población bacteriana. Los distintos patrones de metilación del ADN pueden ser una de las causas de la heterogeneidad fenotípica. Esta estrategia de sobrevivencia bacteriana garantiza que se manifieste una respuesta adaptativa ante, prácticamente, cualquier condición de estrés del entorno. Las biopelículas bacterianas resultaron ser un compendio interesante para el estudio de estos fenómenos biológicos.

IX. CONCLUSIONES

Se corroboró la identificación a nivel microbiológico y molecular de 16 aislados bacterianos de los géneros *Acinetobacter* y *Serratia*, provenientes de muestras clínicas. Se caracterizaron 6 aislados como *A. baumannii*, 2 como *Acinetobacter* spp y 8 aislados como *S. marcescens*.

Se construyó una cepa mutante isogénica de *E. coli* MG1655, con delección del gen *dam*. Con la metodología empleada no se lograron construir mutantes Δdam con cepas clínicas de *S. marcescens*.

Las cepas clínicas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp y *S. marcescens* manifestaron respuestas diversas en el desarrollo de biopelículas, en función de las condiciones del entorno evaluadas. Se determinó la capacidad de las cepas clínicas de secretar sustancias poliméricas extracelulares. Se determinó una mayor capacidad de producción de biopelículas en medio mínimo mineral M9 a temperatura ambiente.

Las condiciones nutritivas tienen efectos especie-específicos sobre el desarrollo de biopelículas bacterianas. El exceso de glucosa (500 mM) en caldo nutritivo, promueve la síntesis de biomasa y la producción de biopelículas de *A. baumannii*. En cambio, la dilución de nutrientes presentes en caldo nutritivo (1/10 CN), promueven la síntesis de biomasa y la producción de biopelículas de *S. marcescens*. La presencia de glucosa excedente inhibe la producción de biopelículas de *E. coli* MG1655 Δdam .

El suplemento del medio mínimo mineral con metionina, afecta el desarrollo de biopelículas bacterianas. En las cepas clínicas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp y en *E. coli* MG1655 Δdam , la presencia de metionina disminuyó la capacidad de formación de biopelículas. En cambio, para las cepas clínicas de *S. marcescens* estimuló la acumulación de biomasa de biopelículas.

Los agentes químicos EDTA, CTAB y SDS, disminuyeron la capacidad de formación de biopelículas de cepas clínicas de *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp. y *S. marcescens*. Estos agentes no influyeron sobre el desarrollo de biopelículas de *E. coli* MG1655, ni en su cepa mutante isogénica. En cambio,

una dosis sub-inhibitoria de etanol (1 %) estimuló el desarrollo de biopelículas *A. baumannii*, *Acinetobacter* spp., *S. marcescens* y *E. coli* MG1655 Δdam .

En el genoma de las biopelículas de *A. baumannii* 3910, las secuencias GATC no se encuentran metiladas. Las variaciones detectadas en los perfiles de bandas de la digestión en presencia de exceso de glucosa, pueden estar vinculadas con Dnmts distintas a Dam. Deben existir otras Dnmts solitarias con funciones epigenéticas que modulen la expresión de genes específicos al desarrollo de biopelículas de *A. baumannii*.

En el genoma de *S. marcescens* 4474, los motivos GATC se encuentran metilados. Las variaciones detectadas entre los patrones de metilación del ADN de biopelículas de *S. marcescens* 4474 formadas con diferentes tratamientos, sugieren que el etanol 1% causa cambios sobre la metilación del ADN que, a su vez, influye sobre la formación de biopelículas.

La ausencia de metilación de los motivos GATC en el genoma de *E. coli* MG1655 Δdam , promovió la secreción de fibras de tipo curli y el desarrollo de biopelículas. Las biopelículas formadas en presencia de metionina, presentaron una disminución en su producción y la biomasa. Se sugiere que la falta de metilación de los motivos GATC por la enzima Dam, pueden influir sobre la expresión génica, tal que la presencia de metionina sea percibida como una señal del entorno que limita el desarrollo de biopelículas.

Se propone un modelo que explica el efecto de la metilación del ADN y de diferentes estímulos del entorno sobre la formación de biopelículas bacterianas. Los patrones de metilación del ADN median la heterogeneidad fenotípica en una población bacteriana, siendo esta última una propiedad característica de las biopelículas.

X. BIBLIOGRAFÍA

- An, D., Parsek, M. 2007. The promise and peril of transcriptional profiling in biofilm communities. *Curr Opin Microbiol.* **10**: 292-296
- Anderson, G., O'toole, G. 2008. Innate and induced resistance mechanisms of bacterial biofilms. *Bacterial biofilms*, Springer, Berlin, Heidelberg
- Antypas, H., Choong, F., Libberton, B., Brauner, A., Richter-Dahlfors, A. 2018. Rapid diagnostic assay for detection of cellulose in urine as biomarker for biofilm-related urinary tract infections. *Npj Biofilms Microbiomes.* **4** (26): 1-7
- Aparna, M., Yadav, S. 2008. Biofilms: microbes and disease. *Braz J Infect Dis.* **12** (6): 526-530
- Arnqvist, A., Olsen, A., Pfeifer, J., Russell, D., Normark, S. 1992. The Crl protein activates cryptic genes for curli formation and fibronectin binding in *Escherichia coli* HB101. *Mol Microbiol.* **6** (17): 2443-52
- Atlas, R. 1997. Principles of microbiology. 2^{da} edición, Wm C Brown Publishers, EEUU
- Aya Castañeda, M., Sarnacki S.H., S., Noto, M., López, A., Nancy, M., Cerquetti, M. 2015. Dam methylation is required for efficient biofilm production in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis. *Int J Food Microbiol.* **193**: 15-22
- Bakkiyaraj, D., Sivasankar, C., Karutha, S. 2012. Inhibition of quorum sensing regulated biofilm formation in *Serratia marcescens* causing nosocomial infections. *Bioorg Med Chem Lett.* **22** (9): 3084-3094
- Balbontín, R., Rowley, G., Pucciarelli, M. G., López-Garrido, J., Wormstone, Y., Lucchini, S., Casadesús, J. 2006. DNA adenine methylation regulates virulence gene expression in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. *J Bacteriol.* **188** (23), 8160-8168.
- Barghouti, S. 2011. A Universal Method for the Identification of Bacteria Based on General PCR Primers. *Indian J Microbiol.* **51** (4): 430-444
- Beaulaurier, J., Schadt, E., Fang, G. 2018. Deciphering bacterial epigenomes using modern sequencing technologies. *Nat Genet.* **20** (2019): 157-172
- Begic, S., Worobec, E. 2008. Characterization of the *Serratia marcescens* SdeCDE multidrug efflux pump studied via gene knockout mutagenesis. *Can J Microbiol.* **54**: 411-416
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., Ghigo, J. M. 2004. Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Mol Microbiol.* **51**(3): 659-674

- Beumer, A., Robinson, J. 2005. A Broad-Host-Range, Generalized Transducing Phage (SN-T) acquires 16S rRNA genes from different genera of Bacteria. *Appl Environ Microb.* **71** (12): 8301-8304
- Bhargava, N., Sharma, P., Capalash, N. 2010. Quorum sensing in *Acinetobacter*: an emerging pathogen. *CRC CR REV Microbiol.* **36** (4): 349-360
- Bird, A., Macleod, D. 2004. Reading the DNA methylation signal. Epigenetics, *Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology*. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Bjarnsholt, T. 2013. The role of bacterial biofilms in chronic infections. *APMIS.* **121** (136): 1-54
- Blasi, F., Page, C., Rossolini, G., Pallecchi, P., Matera, M., Rogliani, P., Cazzola, M. 2016. The effect of N-acetylcysteine on biofilms: implications for the treatment of respiratory tract infections. *Resp Med.* **117**: 190-197
- Blossom, D., Srinivasan, A. 2008. Drug-resistance *Acinetobacter baumannii-calcoaceticus* complex, an emerging nosocomial pathogen with few treatment options. *Infect Dis Clin Prac.* **16** (1): 1-3
- Boudarel, H., Mathias, J., Blaysat, B., Grédiac, M. 2018. Towards standardized mechanical characterization of microbial biofilms: analysis and critical review. *Npj Biofilms and Microbiomes.* **4** (17): 1-15
- Brandwein, M., Steinberg, D., Meshner, S. 2016. Microbial biofilms and the human skin microbiome. *Npj Biofilms Microbiomes.* **2** (3): 1-6
- Broadbent, S., Davies, M., Van Der Woude, M. 2010. Phase variation controls expression of *Salmonella* lipopolysaccharide modification genes by a DNA methylation-dependent mechanism. *Mol Microbiol.* **77** (2): 337-353
- Brombacher, E., Dorel, C., Zehnder, A., Landini, P. 2003. The curli biosynthesis regulator CsgD co-ordinates the expression of both positive and negative determinants for biofilm formation in *Escherichia coli*. *Microbiol* **149** (10): 2847-2857.
- Brombacher, E., Baratto, A., Dorel, C., Landini, P. 2006. Gene expression regulation by the curli activator CsgD protein: modulation of cellulose biosynthesis and control of negative determinants for microbial adhesion. *J Bacteriol.* **188** (6): 2027-2037
- Bryers, J. 2008. Medical biofilms. *Biotechnol Bioeng.* **100** (1): 1-18
- Bury-Mone, S., Sclavi, B. 2017. Stochasticity of gene expression as a motor of epigenetics in bacteria: from individual to collective behaviors. *Res Microbiol.* **168** (6), 503-514.
- Calmann, M., Marinus, M. 2003. Regulated expression of the *Escherichia coli* gene. *J Bacteriol.* **185** (16): 5012-5014

- Camacho, E., Casadesús, J. 2005. Regulation of *traJ* transcription in the Salmonella virulence plasmid by strand-specific DNA adenine hemimethylation. *Mol Microbiol.* **57** (6): 1700-1718
- Campellone, K., Roe, A., Løbner-Olesen, A., Murphy, K., Magoun, L., Brady, M., Donohue-Rolfe, A., Tzipori, S., Gally, D., Leong, J., Marinus, M. 2007. Increased adherence and actin pedestal formation by *dam*-deficient enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Mol Microbiol.* **63** (5): 1468-1481
- Campos, R., do Nascimento, M., Chula, D., Riella, M. 2011. Minocycline-EDTA lock solution prevents catheter-related bacteremia in hemodialysis. *J Am Soc Nephrol.* **22**: 1939-1945
- Cang, S., Sanada, M., Johdo, O., Ohta, S., Nagamatsu, Y., Yoshimoto, A. 2000. High production of prodigiosin by *Serratia marcescens* grown on ethanol. *Biotechnol Lett.* **22** (22): 1761-1765.
- Carbonell, G., Colleta, H., Yano, T., Darini, A., Levy, C., Fonseca, B. 2000. Clinical relevance and virulence factors of pigmented *Serratia marcescens*. *FEMS Immunol Med Mic.* **28** (2): 143-149
- Casadesús, J., Low, D. 2006. Epigenetic gene regulation in the bacterial world. *Microbiol Mol Biol R.* **70** (3): 830-856
- Casadesús, J., Low, D. 2013. Programmed heterogeneity: epigenetic mechanisms in bacteria. *J Biol Chem.* **288** (20): 13929-13935
- Castelli, M., Fedrigo, G., Clementín, A., Ielmini, V., Feldman, M., García, E. 2008. Enterobacterial common antigen integrity is a checkpoint for flagellar biogenesis in *Serratia marcescens*. *J Bacteriol.* **190** (1): 213-220
- Cedar, H., Bergman, Y. 2012. Programming of DNA Methylation Patterns. *Annu Rev Biochem.* 2012. **81**: 97-117
- Cerqueira, G., Peleg, A. 2011. Insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenicity. *IUBMB Life.* **63** (12): 1055-1060
- Chabane, Y., Marti, S., Rihouey, C., Alexandre, S., Hardouin, J., Lesouhaitier, O., Vila, J., Kaplan, J., Jouenne T., Dé, E. 2014. Characterisation of pellicles formed by *Acinetobacter baumannii* at the air-liquid interface. *PLoS ONE.* **9** (10): 1-10
- Cheng, X., Roberts, R. 2001. AdoMet-dependent methylation, DNA methyltransferases and base flipping. *Nucleic acids research.* **29** (18): 3784-3795.
- Cho, D, Lim, D., Mackey, C., Weeks, C., Peña Garcia, J., Skinner, D. y colaboradores. 2018. L-Methionine anti-biofilm activity against *Pseudomonas aeruginosa* is enhanced by the cystic

fibrosis transmembrane conductance regulator potentiator, ivacaftor. *Int Forum Allergy Rhinol.* **8** (5): 577-583

Collier, J. 2009. Epigenetic regulation of the bacterial cell cycle. *Curr Opin Microbiol.* **12**: 722-729

Contreras, M., Morales, A., García-Amado, M., De Vera, M., Bermúdez, V., Gueneau, P. 2007. Detection of *Helicobacter*-like DNA in the gastric mucosa of Thoroughbred horses. *Lett Appl Microbiol.* **45**: 553-557

Darshan, N., Manonmani, H. 2015. Prodigiosin and its potential applications. *J Food Sci Technol.* **52** (9): 5393-5407

Díaz De Rienzo, M. A., Stevenson, P., Marchant, R., Banat, I. 2015. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and-negative bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, **363** (2), fnv224.

Ghatak, P., Mathew-Steiner, S., Pandey, P., Roy, S., Sen, C. 2018. A surfactant polymer dressing potentiates antimicrobial efficacy in biofilm disruption. *Sci Rep-UK*, **8** (1): 873

Datsenko, K., Wanner, B. 2000. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc Natl Acad Sci.* **97** (12): 6640–6645

Díaz De Rienzo, M., Stevenson, P., Marchant, R., Banat, I. 2015. Antibacterial properties of biosurfactants against selected Gram-positive and-negative bacteria. *FEMS Microbiol Lett*, **363** (2), fnv224.

Dijkshoorn, L., Nemec, A., & Seifert, H. 2007. An increasing threat in hospitals: multidrug-resistant *Acinetobacter baumannii*. *Nat Rev Microbiol*, **5** (12): 939-51

Doerfler, W. 2005. On the biological significance of DNA methylation. *Biochemistry (Moscow)*, **70** (5), 505-524.

Donlan, R. 2002. Biofilms: Microbial life on surfaces. *Emer Infect Dis.* **8** (9): 881-890

Dunne, W. 2002. Bacterial adhesion: seen any good biofilms lately?. *Clin Microbiol Rev.* **15** (2): 155-166

Eijkelkamp, B., Stroeher, U., Hassan, K., Elbourne, L., Paulsen, I., Brown, M. 2013. H-NS plays a role in expression of *Acinetobacter baumannii* virulence features. *Infect Immun*, **81**(7): 2574-2583

Eze, E., Chenia, H., Zowalaty, M. 2018. *Acinetobacter baumannii* biofilms: effects of physicochemical factors, virulence, antibiotic resistance determinants, gene regulation, and future antimicrobial treatments. *Infect Drug Resist.* **15** (11): 2277-2299

- Fälker, S., Schilling, J., Schmidt, M., Heussipp, G. 2007. Overproduction of DNA adenine methyltransferase alters motility, invasion, and the lipopolysaccharide O-antigen composition of *Yersinia enterocolitica*. *Infect Immun.* **75** (10): 4990-4997
- Fang, G., Munera, D., Friedman, D., Mandlik, A., Chao, M. C., Banerjee, O., Deikus, G. 2013. Genome-wide mapping of methylated adenine residues in pathogenic *Escherichia coli* using single-molecule real-time sequencing. *Nat Biotechnol* **31** (6): 566
- Fauci, A., Braunwald, E., Isselbacher, K., Wilson, J., Martin, J., Kasper, D., Hauser, S., Longo, D. 2000. Principios de Medicina Interna. Vol. 1, 14^a edición, Mc Graw Hill, España
- Feng, G., Cheng, Y., Wang, S., Borca-Tasciuc, D., Worobo, R., Moraru, C. 2015. Bacterial attachment and biofilm formation on surfaces are reduced by small-diameter nanoscale pores: how small is small enough? *Npj Biofilms and Microbes.* **1** (15022): 1-9
- Ferla, M., Patrick, W. 2014. Bacterial methionine biosynthesis. *Microbiology*, **160** (8), 1571-1584.
- Frid, P., Anisimov, S., Popivic, N. 2007. Congo red and protein aggregation in neurodegenerative diseases. *Brain Res Rev.* **53** (1): 135-160
- Flemming, H., Wingender, J. 2010. The biofilm matrix. *Nat Rev Microbiol.* **8** (9): 623-633
- Flemming, H., Wingender, J., Szewzyk, U., Steinberg, P., Rice, S., Kjelleberg, S. 2016. Biofilms: an emergent form of bacterial life. *Nat Rev Microbiol.* **14** (9): 563-575
- Flora, S., Pachauri, V. 2010. Chelation in metal intoxication. *Int J Res Public Health.* **7**: 2745-2788
- Fournier, E., Vallenet, D., Barbe, V., Audic, S., Ogata, H., Poirel, L., Richet, H., Robert, C., Mangenot, S., Abergel, C., Nordmann, P., Weissenbach, J., Raoult, D., Claverie, J. 2006. Comparative genomics of multidrug resistance in *Acinetobacter baumannii*. *PloS Genet.* **2** (1): 62-72
- García-Pastor, L., Sánchez-Romero, M., Jakomin, M., Puerta-Fernández, E., Casadesús, J. 2019. Regulation of bistability in the std fimbrial operon of *Salmonella enterica* by DNA adenine methylation and transcription factors HdfR, StdE and StdF. *Nucleic Acids Res.* **47** (15): 7929-7941
- Garrett, T., Bhakoo, M., Zhang, Z. 2008. Bacterial adhesion and biofilms on surfaces. *Pro Nat Sci.* **18** (9): 1049-1056
- Gene Bridges. 2014. Quick and easy *E. coli* deletion kit by Red/ET recombination. <https://www.genebridges.com/storage/NeueManuals/K006%20Ecoli%20Gene%20Deletion%20Kit%20-%20Version%202.4%20-%202014.pdf>

- Gevers, D., Cohan, F. M., Lawrence, J. G., Spratt, B. G., Coenye, T., Feil, E. J. y colaboradores. (2005). Re-evaluating prokaryotic species. *Nat Rev Microbiol*, **3** (9): 733-739
- Giri, A., Anandkumar, N., Muthukumaran, G., Pennathur, G. 2004. A novel medium for the enhanced cell growth and production of prodigiosin from *Serratia marcescens* isolated from soil. *BMC Microbiology*, **4** (1): 11-21.
- Gnanadhas, D., Elango, M., Datey, A., Chakravortty, D. 2015. Chronic lung infection by *Pseudomonas aeruginosa* biofilm is cured by L-methionine in combination with antibiotic therapy. *Sci Rep-UK*. **5** (2015): 16043
- Gómez-Díaz, E., Jordà, M., Peinado, M., Rivero, A. 2012. Epigenetics of Host-Pathogen interactions: the road ahead and the road behind. *PLoS Pathog*. **8** (11): e1003007
- Greco-Stewart, V., Brown, E., Parr, C., Kalab, M., Jacobs, M. R., Yomtovian, R., Ramírez-Arcos, S. 2012. *Serratia marcescens* strains implicated in adverse transfusion reactions form biofilms in platelet concentrates and demonstrate reduced detection by automated culture. *Vox sanguinis*, **102** (3): 212-220
- Gualdi, L., Tagliabue, L., Bertagnoli, S., Ieranò, T., De Castro, C., Landini, P. 2008. Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. **154** (Pt 7): 2017-2024
- Haagmans, W., van Der Woude, M. 2000. Phase variation of Ag43 in *Escherichia coli*: Dam-dependent methylation abrogates OxyR binding and OxyR-mediated repression of transcription. *Mol Microbiol*, **35** (4): 877-887
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J., Stoodley, P. 2004. Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nat Rev Microbiol*. **2** (2): 95-108
- Hammar, M., Arnqvist, A., Bian, Z., Olsén, A., Normark, S. 1995. Expression of two csg operons is required for production of fibronectin-and congo red-binding curli polymers in *Escherichia coli* K-12. *Mol microbiol*, **18**(4): 661-670
- Hancock, V., Ferrières, L., Klemm, P. 2006. Biofilm formation by asymptomatic and virulent urinary tract infectious *Escherichia coli* strains. *FEMS Microbiol Lett*. **267** (1): 30-37
- Heyn, H., Esteller, M. 2015. An adenine code for DNA: A second life for N6-methyladenine. *Cell*. **161**: 1-4
- Hejazi, A., Falkner, F. 1997. *Serratia marcescens*. *J Med Microbiol*. **46**: 903-912
- Hines, D., Saurugger, P., Ihler, G., Benedik, M. 1988. Genetic analysis of extracellular proteins of *Serratia marcescens*. *J Bacteriol*. **170** (9): 4141-4146

- Hiraoka, S., Okazaki, Y., Anda, M., Toyoda, A., Nakano, S., Iwasaki, W. 2019. Metaepigenomic analysis reveals the unexplored diversity of DNA methylation in an environmental prokaryotic community. *Nat Commun.* **10** (1): 159
- Høiby, N., Bjarnsholt, T., Moser, C. Bassi, G., Coenye, T., Donelli, G., Hall-Stoodley, L., y col. ESCMID guideline for the diagnosis and treatment of biofilm infections 2014. *Clin Microbiol Infec.* **21** (S1): S1-S25
- Horinouchi, T., Tamaoka, K., Furusawa, C., Ono, N., Suzuki, S., Hirasawa, T., Yomo, T., Shimizu, H. 2010. Transcriptome analysis of parallel-evolved *Escherichia coli* strains under ethanol stress. *BMC genomics*, **11** (1): 579
- Ishikawa, S., Matsumura, Y., Katoh-Kubo, K., & Tsuchido, T. 2002. Antibacterial activity of surfactants against *Escherichia coli* cells is influenced by carbon source and anaerobiosis. *J Appl Microbiol.* **93** (2): 302-309
- Jackson, D., Simecka, J., Romeo, T. 2002. Catabolite repression of *Escherichia coli* biofilm formation. *J Bacteriol*, **184** (12): 3406-3410
- Jeltsch, A. 2002. Beyond Watson and Crick: DNA methylation and molecular enzymology of DNA methyltransferases. *ChemBioChem.* **3**: 274-293
- Jochim, A., Shi, T., Belikova, D., Schwarz, S., Peschel, A., Heilbronner, S. 2019. Methionine limitation impairs pathogen expansion and biofilm formation capacity. *Appl Environ Microbiol.* **85** (9): e00177-19
- Joyner, J., Wanless, D., Sinigalliano, C., Lipp, E. 2014. Use of quantitative Real-Time PCR for direct detection of *S. marcescens* in marine and other aquatic environments. *Appl Environ Microb.* **80** (5): 1679-1683
- Kahramanoglou, C., Prieto, A., Khedkar, S., Haase, B., Gupta, A., Benes, V., Seshasayee, A. 2012. Genomics of DNA cytosine methylation in *Escherichia coli* reveals its role in stationary phase transcription. *Nat Commun*, **3**, 886
- Kalivoda, E., Stella, N., O'Dee, D., Nau, G., Shanks, R. 2008. The cyclic AMP dependent Catabolite Repression system of *Serratia marcescens* mediates biofilm formation through regulation of type 1 fimbriae. *Appl Environ Microb.* **74** (11): 3461-3470
- Kalivoda, E., Brothers, K., Stella, N., Schmitt, M., Shanks, R. 2013. Bacterial cyclic AMP-phosphodiesterase activity coordinates biofilm formation. *PLoS ONE.* **8** (7): 1-11
- Kamolvit, W., Higgins, P., Paterson, D., Seifert, H. 2013. Multiplex PCR to detect the genes encoding naturally occurring oxacillinases in *Acinetobacter* spp. *J Antimicrob Chemoth*, **69** (4), 959-963

- Karatan, E., Watnick, P. 2009. Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiol Mol Biol R.* **73** (2): 310-347
- Kolodkin-Gal, I., Romero, D., Cao, S., Clardy, J., Kolter, R., Losick, R. 2010. D-amino acids trigger biofilm disassembly. *Science*, **328** (5978): 627-629
- Koo, H., Falsetta, M., Klein, M. 2013. The exopolysaccharide matrix: a virulence determinant of cariogenic biofilm. *J Den Res.* **92** (12): 1065-1073
- Koo, H., Allan, R., Howlin, R., Stoodley, P., Hall-Stoodley, L. 2017. Targeting microbial biofilms: current and prospective therapeutic strategies. *Nat Rev Microbiol.* **15** (12): 740-755
- Kostakioti, M., Hadjifrangiskou, M., Hultgren, S. 2013. Bacterial biofilms: development, dispersal, and therapeutic strategies in the dawn of postantibiotic era *Cold Spring Harb Perspect Med.* **3** (4): 1-23
- Kwiatek, A., Mrozek, A., Bacal, P., Pjekarowicz, A., Adamczyk, M. 2015. Type III methyltransferase M.NgoAX from *Neisseria gonorrhoeae* FA1090 regulates biofilm formation and interactions with human cells. *Front Microbiol.* **6** (1426): 1-15
- Law, J., Jacobsen, S. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat Rev Genet.* **11** (3): 204-220
- Lai, H., Soo, P., Wei, J., Yi, W., Liaw, S., Horng, Y., Lin, S., Ho, S., Swift, S., Williams, P. 2005. The RssAB two component signal transduction system in *Serratia marcescens* regulates swarming motility and cell envelope architecture in response to exogenous saturated fatty acids. *J Bacteriol.* **187** (10): 3407-3414
- Lebeaux, D., Chauhan, A., Rendueles, O., Beolin, C. 2013. From *in vitro* to *in vivo* models of bacterial biofilm-related infections. *Pathogens.* **2**: 288-356
- Lebeaux, D., Ghigo, J., Beloin, C. 2014. Biofilm-related infections: bridging the gap between clinical management and fundamental aspects of recalcitrance toward antibiotics. *Microbiol Mol Rev.* **78** (3): 510-543
- Lee, H., Koh, Y., Kim, J., Lee, J., Lee, Y., Seol, S., Cho, D., Kim, J. 2008. Capacity of multidrug-resistance clinical isolates of *Acinetobacter baumannii* to form biofilm and adhere to epithelial cell surfaces. *Clin Microbiol Infec.* **14** (1): 1-6
- Leiman, S., May, J., Lebar, M., Kahne, D., Kolter, R., Losick, R. 2013. D-aminoacids indirectly inhibit biofilm formation in *Bacillus subtilis* by interfering with protein synthesis. *J Bacteriol.* **195** (23): 5391-5395

- Liu, F., Zhu, Y., Yi, Y., Lu, N., Zhu, B., Hu, Y. 2014. Comparative genomic analysis of *Acinetobacter baumannii* clinical isolates reveals extensive genomic variation and diverse antibiotic resistance determinants. *BMC genomics*, **15** (1): 1163
- Løbner-Olesen, A., Skovgaard, O., Marinus, M. 2005. Dam methylation: coordinating cellular processes. *Curr Opin Microbiol.* **8**: 154-160
- Low, D., Casadesús, J. 2008. Clock and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Curr Opin Microbiol.* **11**: 106-112
- Low, D., Casadesús, J. 2008. Clock and switches: bacterial gene regulation by DNA adenine methylation. *Curr Opin Microbiol.* **11**: 106-112
- Lu Jahn-Hi., Perng, Cherng-Lih., Lee, Shih-Yi., Wan, Chih-Chieng. 2000. Use of PCR with Universal primers and restriction endonuclease digestions for detection and identification of common bacterial pathogens in cerebrospinal fluid. *J Clin Microbiol.* **38** (6): 2076-2080
- Lupino, K., Romano, K., Simons, M., Gregg, J., Panepinto, L., Cruz, G., Hecht, G. 2018. A recurrent silent mutation implicates *fecA* in ethanol tolerance by *Escherichia coli*. *BMC Microbiol*, **18** (1): 36
- MacDonald, R., Santa, M., Brözel, V. 2000. The response of a bacterial biofilm community in a simulated industrial cooling water system to treatment with an anionic dispersant. *J Appl Microbiol.* **89**: 225-235
- MacFaddin, J. 2004. Pruebas bioquímicas para la identificación de bacterias de importancia clínica. 3^{era} edición, Editorial Médica Panamericana, Argentina
- Mahlen, S. 2011. *Serratia* infections: from military experiments to current practice. *Clin Microbiol Rev.* **24** (4): 755-791
- Matsuyama, T., Bhasin, A., Harshey, R. 1995. Mutational analysis of flagellum-independent surface spreading of *Serratia marcescens* 274 on a low agar medium. *J Bacteriol.* **177** (4): 987-991
- McBain, A. 2009. *In vitro* biofilm models: an overview. *Adv Appl Microbiol.* **69**: 99-132
- McConnell, M., Actis, L., Pachón, J. 2012. *Acinetobacter baumannii*: human infections, factors contributing to pathogenesis and animal models. *FEMS Microbiol Rev.* **37**: 130-155
- McKelvie, J., Richards, M., Harmer, J., Milne, T., Roach, P., Oyston, P. 2012. Inhibition of *Yersinia pestis* DNA adenine methyltransferase *in vitro* by a stibonic acid compound: identification of a potential novel class of antimicrobial agents. *Brit J Pharmacol.* **168**: 172-188
- Merritt, J., Kadouri, D., O'Toole, G. 2005. Growing and analyzing static biofilms. *Curr Protocol Microbiol.* **1B.1**: 1-29

- Militello, K., Simon, R., Mandarano, A., DiNatale, A., Hennick, S., Lazatin, J., Cantatore, S. 2016. 5-azacytidine induces transcriptome changes in *Escherichia coli* via DNA methylation-dependent and DNA methylation-independent mechanisms. *BMC Microbiol*, **16** (1): 130
- Ministerio del Poder Popular para la Ciencia, Tecnología e Industrias Intermedias. Fondo Nacional de Ciencia, Tecnología e Innovación. 2009. Código de Bioética y Bioseguridad. 3^{era} edición. Caracas, República Bolivariana de Venezuela.
- Minogue, E., Tuite, N., Smith, C., Reddington, K., Barry, T. 2015. A rapid culture independent methodology to quantitatively detect and identify common human bacterial pathogens associated with contaminated high purity water. *BMC Biotechnol*. **15** (6): 1-10
- Miquel, S., Lagrèfeuille, R., Souweine, B., Forestier, C. 2016. Anti-biofilm activity as a health issue. *Front Microbiol*, **7**: 592
- Morohoshi, T., Shiono, T., Takidouchi, K., Kato, M., Kato, N., Kato, J., & Ikeda, T. 2007. Inhibition of quorum sensing in *Serratia marcescens* AS-1 by synthetic analogs of N-acylhomoserine lactone. *Appl Environ Microbiol.*, **73** (20): 6339-6344
- Morris, F., Dexter, C., Kostoulas, X., Uddin, M., Peleg, A. 2019. The mechanisms of disease caused by *Acinetobacter baumannii*. *Front Microbiol*. **10**:1601
- Moryl, M., Kaleta, A., Strzelecki, K., Różalska, S., Różalski, A. 2014. Effect of nutrient and stress factors on polysaccharides synthesis in *Proteus mirabilis* biofilm. *Acta Biochim Pol.* **61** (1): 133-139
- Murray, P., Baron, E., Pfaller, M., Tenover, F., Tenover, R. 1995. Manual of clinical microbiology. 6^{ta} edición, ASM PRESS, EEUU
- Murphy, K. 2015. Λ recombination and recombineering. *EcoSal Plus*. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0011-2015
- Mussi, M., Gaddy, J., Cabruja, M., Arivett, B., Viale, B., Rasia, R., Actis, L. 2010. The opportunistic human pathogen *Acinetobacter baumannii* senses and responds to light. *J Bacteriol*. **192** (24): 6336-6345
- Nadell, C., Xavier, J., Foster, K. 2008. The sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol Rev*. **33** (1): 206-224
- Nishikawa, K., & Kinjo, A. R. (2018). Mechanism of evolution by genetic assimilation. *Biophys Rev*, **10** (2): 667-676
- Nandhagopal, G., Subashkumar, R. 2016. Effect of environmental factors on biofilm formation by *Serratia marcescens* isolates. *IJRMAR*. **3** (7): 1601-1604
- Nucleo, E., Steffanoni, L., Fugazza, G., Migliavacca, R., Giacobone, E., Navarra, A., Pagani, L., Landini, P. 2009. Growth in glucose-based medium and exposure to subinhibitory concentrations of imipenem induce biofilm formation in multidrug-resistant clinical isolates of *Acinetobacter baumannii*. *BMC Microbiol*. **9** (270): 1-14
- Nwugo, C., Arivett, B., Zimble, D., Gaddy, J., Richards, A., Actis, L. 2012. Effect of ethanol on differential protein production and expression of potential virulence functions in the opportunistic pathogen *Acinetobacter baumannii*. *PLoS ONE*. **7** (12): 1-16

- Oshima, T., Wada, C., Kawagoe, Y., Ara, T., Maeda, M., Masuda, Y., Mori, H. 2002. Genome-wide analysis of deoxyadenosine methyltransferase-mediated control of gene expression in *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, **45** (3): 673-695
- Ostendforf, T., Cherepanov, P., de Vries, J., Wackernagel, W. 1999. Characterization of a *dam* mutant of *Serratia marcescens* and nucleotide sequence of the *dam* region. *J Bacteriol*. **181** (13): 3880-3885
- O'Toole, G. 2011. Microtiter Dish Biofilm Formation Assay. *JoVE*. **47**: 1-2
- Park, H., Ham, Y., Shin, K., Kim, J., Kim T. 2015. Sanitizing effect of ethanol against biofilms formed by three Gram-negative pathogenic bacteria. *Curr Microbiol*. **71** (1): 70-75
- Parsek, M., Singh, P. 2003. Bacterial biofilms: an emerging link to disease pathogenesis. *Annu Rev Microbiol*. **57**: 677-701
- Patterson, J., Ricke, C. 2015. Effect of ethanol and metanol on growth of ruminal bacteria *Selenomonas ruminantium* and *Butyrivibrio fibrisolvens*. *J Environ Sci Heal B*. **50**: 62-67
- Peleg, A., Seifert, H., Paterson, D. 2008. *Acinetobacter baumannii*: emergence of a successful pathogen. *Clin Microbiol Rev*. **21** (3): 538-582
- Percival, S., Kite, P., Eastwood, K., Murga, R., Carr, J., Arduino, M., Donlan, R. 2005. Tetrasodium EDTA as a novel central venous catheter lock solution against biofilm. *Infect Con Hosp Ep*. **26** (6): 515-519
- Peters, B., Ward, R., Rane, H., Lee, S., Noverr, M. 2013. Efficacy of ethanol against *Candida albicans* and *Staphylococcus aureus* polymicrobial biofilms. *Antimicrob Agents Ch*. **57**(1): 74-82
- Philips, B., Redman, J., Brennan, A., Wood, D., Holliman, R., Baines, D., Baker, E. 2005. Glucose in bronchial aspirates increases the risk of respiratory MRSA in intubated patients. *Thorax*, **60** (9): 761-764.
- Pratt, L. A., Kolter, R. 1998. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Mol Microbiol*, **30** (2): 285-293
- Pucciarelli, M., Prieto, A., Casadesús, J., García-del Portillo, F. 2002. Envelope instability in DNA adenine methylase mutants of *Salmonella enterica*. *Microbiology*, **148** (4): 1171-1182.
- Raad, I., Hanna, H., Dvorak, T., Chaiban, G., Hachem, R. 2006. Optimal antimicrobial catheter lock solution, using different combinations of minocycline, EDTA, and 25-percent ethanol, rapidly eradicates organisms embedded in biofilm. *Antimicrob Agents Ch*. **51** (1): 78-83
- Rambo, I., Marsh, A., Biddle, J. 2019. Cytosine methylation within marine sediment microbial communities: potential epigenetic adaptation to the environment. *Frontiers in Microbiology*, **10** (1291)
- Ramos, Y. 2014. Caracterización fenotípica, funcional y molecular de la resistencia a desinfectantes expresada por aislados de *A. baumannii* y *S. maltophilia*. Estudio en células libres y en biopelículas. Tesis Doctoral. Universidad Central de Venezuela. Caracas, Venezuela

- Reid, J., Stoufer, S., Ogrydziak, D. 1982. Efficient transformation of *Serratia marcescens* with pBR322 plasmid DNA. *Gene*. **17**: 107-112
- Remuzgo-Martínez, S., Lázaro-Díez, M., Mayer, C., Aranzamendi-Zaldumbide, M., Padilla, D., Calvo, J., Ramos-Vivas, J. 2015. Biofilm formation and quorum-sensing-molecule production by clinical isolates of *Serratia liquefaciens*. *Appl Environ Microbiol.*, **81**(10): 3306-3315
- Rivardo, F., Turner, R., Allegrone, G., Ceri, H., Martinotti, M. 2009. Anti-adhesion activity of two biosurfactants produced by *Bacillus* spp. prevents biofilm formation of human bacterial pathogens. *Appl Microbiol Biotechnol.* **83**: 541-553
- Rice, S., Koh, K., Queck, S., Labbate, M., Lam, K., Kjelleberg, S. 2005. Biofilm formation and sloughing in *Serratia marcescens* are controlled by quorum sensing and nutrient cues. *J Bacteriol.* **187** (10): 3477-3485
- Robbins-Manke, J., Zdraveski, Z. Marinus, M., Essigmann, J. 2005. Analysis of global gene expression and double-strand-break formation in DNA adenine methyltransferase-and mismatch repair-deficient *Escherichia coli*. *J Bacteriol*, **187** (20): 7027-7037
- Robinson, V., Oyston, P., Titball, R. 2005. A *dam* mutant of *Yersinia pestis* is attenuated and induces protection against plague. *FEMS Microbiol Lett.* **252**: 251-256
- Römling, U. 2005. Characterization of the *rdar* morphotype, a multicellular behavior in Enterobacteriaceae. *Cell Mol Life Sci.* **62**: 1234-1246
- Rossi, M., Paquelin, A., Ghigo, J., Wandersman, C. 2003. Haemophore-mediated signal transduction across the bacterial cell envelope in *Serratia marcescens*: the inducer and the transported substrate are different molecules. *Mol Microbiol.* **48** (6): 1467-1480
- Rothman, K. 2000. Declaration of Helsinki should be strengthened. *BMJ.* **321**(7258): 442-445
- Rumbo-Feal, S., Gómez, M., Gayoso, C., Álvarez-Fraga, L., Cabral, M., Aransay, A., Rodríguez-Ezpeleta N., Fullaondo, A., Valle, J., Tomás, M., Bou, G., Poza, M. 2013. Whole transcriptome analysis of *Acinetobacter baumannii* assessed by RNA-sequencing reveals different mRNA expression profiles in biofilm compared to planktonic cells. *PLOS ONE.* **8** (8): 1-19
- Ruparell, A., Dubern, J., Ortori, C., Harrison, F., Halliday, N., Emtage, A., Ashawesk, M., Laughton, C., Diggle, S., Williams, P., Barrett, D., Hardie, K. 2016. The fitness burden imposed by synthesising quorum sensing signals. *Sci Rep-UK* **6** (2016): 33101
- Sarnacki, S., Marolda, C., Noto-Llana, M., Giacomodonato, M., Valvano, M., Cerquetti, M. 2009. Dam methylation controls O-antigen chain length in *Salmonella enterica* serovar Enteritidis by regulating the expression of Wzz protein. *J Bacteriol.* **191** (21): 6694–6700
- Sambrook, J., Fritsch, E., Maniatis, T. 1989. Molecular cloning, A laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd edition

- Sapriel, G., Wandersman, C., Delepelaire, P. 2003. The SecB chaperone is bifunctional in *Serratia marcescens*: SecB is involved in the Sec pathway and required for HasA secretion by the ABC transporter. *J Bacteriol.* **185** (1): 80-88
- Schembri, M., Kjærgaard, K., Klemm, P. 2003. Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Mol Microbiol*, **48** (1): 253-267
- Shanks, R., Stella, N., Kalivoda, E., Doe, M., O'Dee, M., O'Dee, R., Lathrop, K., Guo, F., Nau, G. 2007. A *Serratia macescens* OxyR homolog mediates Surface attachment and biofilm formation. *J. Bacteriol.* **189** (20): 7262-7272
- Shimuta, K., Ohnishi, M., Iyoda, S., Gotoh, N., Koizumi, N., Watanabe, H. 2009. The hemolytic and cytolytic activities of *Serratia marcescens* phospholipase A (PhlA) depend on lysophospholipid production by PhlA. *BMC Microbiology.* **9** (261): 1-10
- Simões, M., Pereira, O., Vieira, M. 2005. Effect of mechanical stress on biofilms challenged by different chemicals. *Water Res.* **39**: 5142-5152
- Simões, M., Simões, L., Pereira, M., Vieira, M. 2008. Sodium dodecyl sulfate allows the persistence and recovery of biofilms of *Pseudomonas fluorescens* formed under different hydrodynamic conditions. *The Journal of Bioadhesion and Biofilm Research.* **24** (1): 35-44
- Singh, P., Cameotra, S. 2004. Potential applications of microbial surfactants in biomedical sciences. *TRENDS Biotechnol.* **22** (3): 146-146
- Slater, H., Cow, M., Everson, L., Salmond, G. 2003. Phosphate availability regulates biosynthesis of two antibiotics, prodigiosin and carbapenem, in *Serratia* via both quorum-sensing-dependent and -independent pathways. *Mol Microbiol.* **47** (2): 303-320
- Smith, M., Des Etages, S., Snyder, M. 2004. Microbial synergy via an ethanol-triggered pathway. *Mol Cell Biol.* **24** (9): 3874-3884
- Smith, M., Gianoulis, T., Pukatzki, S., Mekalanos, J., Ornston, L., Gerstein, M., Snyder, M. 2007. New insights into *Acinetobacter baumannii* pathogenesis revealed by high-density pyrosequencing and transposon mutagenesis. *Gene Dev.* **21**: 601-614
- Soto, S., Smithson, A., Horcajada, J., Martinez, J., Mensa, J., Vila, J. 2006. Implication of biofilm formation in the persistence of urinary tract infection caused by uropathogenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Infec.* **12** (10): 1034-1036
- Stanley, N., Lazzazera, B. 2004. Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. **52** (4): 917-924
- Stephenson, S., Brown, P. 2016. Epigenetic influence of Dam methylation on gene expression and attachment in uropathogenic *Escherichia coli*. *Front Public Health.* **4** (131): 1-17

- Sriram, M., Kalishwaralal, K., Deepak, V., Gracerosept, R., Srisakthi, K., Gurunathan, S. 2011. Biofilm inhibition and antimicrobial action of lipopeptide biosurfactant produced by heavy metal tolerant strain *Bacillus cereus* NK1. *Colloid and surface B*. **85**: 174-181
- Stepanović, S., Vuković, D., Dakić, I., Savić, B., Švabić-Vlahović, M. 2007. A modified microtiter-plate test for quantification of staphylococcal biofilm formation. *J Microbiol Meth*. **40** (2): 175-179
- Stephenson, S., Brown, P. 2016. Epigenetic influence of Dam methylation on gene expression and attachment in uropathogenic *Escherichia coli*. *Front Public Health*. **4** (131): 1-17
- Stewart, P., Franklin, M. 2008. Physiological heterogeneity in biofilms. *Nat Rev Microbiol*. **6** (3): 199-210
- Subhadra, B., Kim, D., Woo, K., Surendran, S., Choi, C. 2018. Control of biofilm formation in healthcare: recent advances exploiting Quorum-sensing interference strategies and multidrug efflux pump inhibitors. *Materials*. **11**: 1676
- Srikhanta, Y., Dowideit, S., Edwards, J., Falsetta, M., Wu, H., Harrison, O., Fox, K., Seib, K., Maguire, T., Wang, A., Maiden, M., Grimmond, S., Apicella, M., Jennings, M. 2009. Phasevarions mediate random switching of gene expression in pathogenic *Neisseria*. *PLOS Pathog*. **5** (4): 1-22
- Takagi, T., Kisumi, M. 1985. Isolation of a versatile *Serratia marcescens* mutant as a host and molecular cloning of the aspartase gene. *J Bacteriol*. **161** (1): 1-6
- Tipton, K., Dimitrova, D., Rather, P. 2015. Phase-variable control of multiple phenotypes in *Acinetobacter baumannii* strain AB5075. *J Bacteriol*, **197** (15): 2593-2599
- Tomaras, A., Dorey, C., Edelmann, R., Actis, L. 2003. Attachment to and biofilm formation on abiotic surfaces by *Acinetobacter baumannii*: involvement of a novel chaperone-usher pili assembly system. *Microbiology*. **149**: 3473-3484
- Torretta, S., Pignataro, L. 2018. The role of biofilms in upper respiratory tract infections. *Infections of the Ears, Nose, Throat, and Sinuses*. https://doi.org/10.1007/978-3-319-74835-1_3
- Turton, J., Woodford, N., Glover, J., Yarde, S., Kaufmann, M., Pitt, T. 2006. Identification of *Acinetobacter baumannii* by detection of the *bla_{OXA51like}* carbapenemase gene intrinsic to this species. *J Clin Microbiol*. **44** (8): 2974-2976
- Valdevenito, S. 2008. Infección urinaria recurrente en la mujer. *Rev Chilena Infectol*. **25** (4): 268-276
- Van Der Woude, M., Hale, W. B., & Low, D. A. (1998). Formation of DNA Methylation Patterns: Nonmethylated GATC Sequences in gut and pap Operons. *J Bacteriol*, **180** (22): 5913-5920

- Van Houdt, R., Givskov, M., Michiels, C. 2007. Quorum sensing in *Serratia*. *FEMS Microbiol Rev.* **31**: 407-424
- Vanyushin, B. 2006. DNA methylation and epigenetics. *Russ J Genet.* **42**: 985
- Vidal, O., Longin, R., Prigent-Combaret, C., Dorel, C., Hooreman, M., Lejeune, P. 1998. Isolation of an *Escherichia coli* K-12 mutant strain able to form biofilms on inert surfaces: involvement of a new *ompR* gene allele that increases curli expression. **180** (9): 2442-2449
- Vijayakumar, S., Rajenderan, S., Laishram, S., Anandan, S., Balaji, V., & Biswas, I. (2016). Biofilm formation and motility depend on the nature of the *Acinetobacter baumannii* clinical isolates. *Front Public Health*, **4** (105): 1-9
- Vlamakis, H., Aguilar, C., Losick, R., Kolter, R. Control of cell fate by the formation of an architecturally complex bacterial community. *Gene Dev.* **22** (7); 945-953
- Vulić, M., Kolter, R. 2002. Alcohol-induced delay of viability loss in stationary-phase cultures of *Escherichia coli*. *J Bacteriol.* **184** (11): 2898-2905
- Wallecha, A., Munster, V., Correnti, J., Chan, T., van der Woude, M. 2002. Dam- and OxyR-dependent phase variation of *agn43*: essential elements and evidence for a new role of DNA methylation. *J Bacteriol.* **184** (12): 3338-3347
- Walworth, N., Hutchins, D., Dolzhenko, E., Lee, M., Fu, F., Smith, A., Webb, E. 2017. Biogeographic conservation of the cytosine epigenome in the globally important marine, nitrogen-fixing cyanobacterium *Trichodesmium*. *Environ Microbiol*, **19** (11), 4700-4713.
- Wang, N., Ozer, E., Mandel, M., Hauser, A. 2014. Genome-wide identification of *Acinetobacter baumannii* genes necessary for persistence in the lung. *MBio*: **5** (3): e01163-14
- Watnick, P., Kolter, R. 2000. Biofilm, city of microbes. *J bacterial.* **182** (10): 2675-2679
- Westphal, L., Sauvey, P., Champion, M., Ehrenreich, I., Finkel, S. 2016. Genomewide Dam methylation in *Escherichia coli* during long-term stationary phase. *MSystems*, **1** (6): e00130-16
- Wion, D., Casadesús, J. 2006. N⁶-methyl-adenine: an epigenetic signal for DNA-protein interactions. *Nat Rev Microbiol.* **4** (3): 183-192
- Wroblewska, M. M., Sawicka-Grzelak, A., Marchel, H., Luczak, M., Sivan, A. 2008. Biofilm production by clinical strains of *Acinetobacter baumannii* isolated from patients hospitalized in two tertiary care hospitals. *FEMS Immunol Med Mic*, **53** (1), 140-144
- Wu, H., Lipmann, J., Oza, J., Zeng, M., Fives-Taylor, P., Reich, N. 2006. Inactivation of DNA adenine methyltransferase alters virulence factors in *Actinobacillus actinomycetemcomitans*. *Oral Microbiol Immun.* **21** (4): 238-244
- Yadav, M., Chae, S., Song, J. 2012. Effect of 5-azacytidine on *in vitro* biofilm formation of *Streptococcus pneumoniae*. *Microb pathogenesis.* **53**: 219-226

Yadav, M., Park, S., Chae, S., Song, S. 2014. Sinefungin, a natural nucleoside analogue of S-Adenosylmethionine, inhibits *Streptococcus pneumoniae*. *Biomed Res Int.* **2014** (2014): 1-10

Zalewska-Piątek, B., Wilkanowicz, S., Bruździak, P., Piątek, R., & Kur, J. 2013. Biochemical characteristic of biofilm of uropathogenic *Escherichia coli* Dr+ strains. *Microbiol Res.* **168** (6): 367-378.

Zogaj, X., Bokranz, W., Nimtz, M., Römling, U. 2003. Production of cellulose and curli fimbriae by members of the family *Enterobacteriaceae* isolated from the human gastrointestinal tract. *Infect Immun.* **71** (7): 4151-4158

Zhou, H., Zhou, W., Xu, M., Shen, Y., Wei, D. 2007. Molecular characterization of *Serratia marcescens* strains by RFLP and sequencing of PCR-amplified 16S rDNA and 16S-23S rDNA intergenic spacer. *Lett Appl Microbiol.* **45**: 174-178

Recursos electrónicos:

<http://www.biofeng.com> [Consulta: Septiembre 2017]

<https://international.neb.com> [Consulta: Enero 2019]

<http://www.gelalyzer.com/> [Consulta: Junio 2019]

<https://www.genome.jp/kegg/pathway.html> [Consulta: Enero 2018]