

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**



**TESIS**

**ANTIMICROBIANOS NATURALES SOBRE LA VIABILIDAD,  
MOVILIDAD TIPO SWARMING Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS  
EN PATOTIPOS DE *E. coli***

**POR**

**BQ. CAROLINA EUGENIA GIL SOLÍS**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE  
MAESTRÍA EN CIENCIAS CON ORIENTACIÓN EN MICROBIOLOGÍA**

**OCTUBRE, 2018**

**ANTIMICROBIANOS NATURALES SOBRE LA VIABILIDAD, MOVILIDAD  
TIPO SWARMING Y FORMACIÓN DE BIOPELÍCULAS  
EN PATOTIPOS DE *E. coli***

Comité de Tesis

---

Dr. Jorge Esteban de Jesús Dávila Aviña  
Presidente

---

Dr. Eduardo Franco Frías  
Secretario

---

Dr. Ángel Merino Mascorro  
Vocal

---

Dr. Norma L. Heredia Rojas  
Vocal

---

Dr. José Santos García Alvarado  
Vocal

El presente trabajo se realizó en el laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos de la Facultad de Ciencias Biológicas de la U.A.N.L. bajo la dirección del Dr. Jorge Esteban De Jesús Dávila Aviña y financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología de México con el proyecto de investigación básica SEP-CONACYT (CB-2014-01, No. 236642).

## DEDICATORIAS

*A mi madre y hermanos, por su amor y apoyo incondicional.*

*Al amor más grande y profundo de mi ser*

*Elba y MariFer*

*Simplemente por existir.*

## AGRADECIMIENTOS

A Dios, por su Gracia y Misericordia hacia mi persona.

A la UASLP-UAM Zona Huasteca por impulsar la capacitación de su recurso humano al concederme la prestación de año sabático para la realización de este proyecto.

A CONACYT por poseer los programas económicos y administrativos que facilitaron mi preparación académica durante la realización de este trabajo de investigación.

A los Doctores del Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos por su apoyo, orientación y consejos para la mejora continua de esta investigación: Dr. Santos, Dra. Norma, Dra. Luisa, Dr. Ángel y Dr. Eduardo, y en especial a mi Director de Tesis, Dr. Jorge por su pronto auxilio en momentos de dificultad. Gracias a todos por permitirme formar parte del equipo de trabajo del LABGEM y por las experiencias obtenidas.

A mis amigos y compañeros de posgrado Alejandra, Alonso, Dianelys, Gilberto, Hugo, Lupita, Mario Alberto, Mario, Mayra y Silvia, por todos los buenos momentos y sustos que pasamos juntos.

A Axel, Dante, Alberto, Janeth, amigos y compañeros de laboratorio y a todo el personal de Servicio Externo para análisis de alimentos del LABGEM, quienes siempre me brindaron consejos y palabras de aliento.

A Yara, que fue enviada a mí para darme el apoyo preciso que necesité en uno de los momentos más difíciles de mi existencia, por brindarme el soporte que sólo un gran ser humano puede dar, por su apoyo incondicional, por estar conmigo y por ayudarme a salir adelante en las dificultades citométricas y experimentales de la qPCR.... Gracias Yara, no tenías por qué hacerlo, sin embargo, me enseñaste que el amor y la amistad pueden más .

## CONTENIDO

	Página
AGRADECIMIENTOS.....	VI
LISTA DE TABLAS.....	VIII
LISTA DE FIGURAS.....	IX
RESUMEN.....	XI
ABSTRACT.....	XIII
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. ANTECEDENTES.....	3
2.1 <i>Escherichia coli</i> .....	3
2.2 Brotes producidos por EPEC, EHEC y ETEC.....	10
2.3 Movimiento tipo swarming.....	11
2.4 Formación de biopelículas.....	15
2.5 Regulación inversa entre la motilidad y la adhesión mediada por curli en <i>E. coli</i> .....	21
2.6 Compuestos fenólicos con actividad antibacteriana.....	23
2.7 Ensayos de toxicidad en modelo de <i>Artemia salina</i> .....	26
3. JUSTIFICACIÓN.....	27
4. HIPÓTESIS.....	29
5. OBJETIVOS.....	30
6. MATERIALES Y MÉTODOS.....	31
6.1 Compuestos naturales comerciales.....	31
6.2 Cepas microbianas y condiciones de cultivo y ajuste de inóculo.....	31
6.3 Determinación de la CMB.....	32
6.4 Determinación del efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles sobre el crecimiento de patotipos de <i>E. coli</i> .....	32
6.5 Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles en <i>Artemia salina</i> .....	33
6.6 Ensayo de viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo .....	33
6.7 Ensayo de movilidad tipo swarming .....	35
6.8 Determinación del índice de formación de biopelículas .....	35
	VI

6.9 Ensayo para determinar el efecto de polifenoles en la expresión de genes asociados a motilidad tipo swarming y formación de biopelículas...	36
6.10 Análisis estadístico.....	39
7. RESULTADOS.....	40
8. DISCUSIÓN.....	55
9. CONCLUSIONES.....	66
10. LITERATURA CITADA.....	67

## LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Variables importantes en la unión celular, formación y desarrollo de biopelículas.....	19
Tabla 2. Genes y primers usados para detectar la expresión de genes asociados a swarming y biopelícula en patotipos de <i>E. coli</i> después del tratamiento con polifenoles.....	38
Tabla 3. Concentraciones mínimas bactericidas para patotipos de <i>E. coli</i> ( $\mu\text{g/ml}$ )..	40
Tabla 4. Índices de formación de biopelícula por efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles ( $\mu\text{g/ml}$ ) sobre 3 patotipos de <i>E. coli</i> .....	47

## LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Ciclo de vida general de células nadadoras (swarmer).....	13
Figura 2. Procesos que gobiernan la formación de biopelículas.....	18
Figura 3. Red de comunicación entre las cascadas de regulación FlhDC/motilidad y $\sigma^S$ /curli.....	22
Figura 4. Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles en poblaciones bacterianas de EPEC, EHEC y ETEC.....	41
Figura 5. Mortalidad de larvas de <i>Artemia salina</i> expuestas a concentraciones sub-inhedorias de polifenoles.....	42
Figura 6. Dot plots de compensación en citometría de flujo para BL1-A (Syto9, verde fluorescente) vs. BL3-A (IP, rojo fluorescente) de EHEC.....	43
Figura 7. Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles sobre la viabilidad de a) EPEC, b) EHEC y c) ETEC medidos por citometría de flujo.....	44
Figura 8. Movilidad tipo swarming de patotipos de <i>E. coli</i> .....	45
Figura 9. Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles en el diámetro de crecimiento de las colonias swarming de EHEC y ETEC.....	46
Figura 10. Reducción de la movilidad swarming de EHEC y ETEC por efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles.....	46
Figura 11. Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles sobre el índice de formación de biopelículas de EPEC, EHEC y ETEC.....	49
Figura 12. Expresión relativa de genes relacionados a swarming en EPEC por efecto de concentraciones sub-inhedorias de AT, AG, MG y EGCG.....	50
Figura 13. Expresión relativa de genes relacionados a swarming en EHEC por efecto de concentraciones sub-inhedorias de AT, AG, MG y EGCG.....	51
Figura 14. Expresión relativa de genes relacionados a swarming en ETEC por efecto de concentraciones sub-inhedorias de AT, AG, MG y EGCG.....	52

Figura 15. Expresión relativa de genes relacionados a formación de biopelícula en EPEC por efecto de concentraciones sub-inhedorias de AT, AG, MG y EGCG..... 52

Figura 16. Expresión relativa de genes relacionados a formación de biopelícula en EHEC por efecto de concentraciones sub-inhedorias de AT, AG, MG y EGCG..... 53

Figura 17. Expresión relativa de genes relacionados a formación de biopelícula en ETEC por efecto de concentraciones sub-inhedorias de AT, AG, MG y EGCG..... 54

## RESUMEN

*Escherichia coli* es una bacteria que está presente de forma natural en la microbiota intestinal de animales de sangre caliente; sin embargo, existe un subconjunto de cepas con capacidad de causar infecciones entéricas en humanos. La seguridad y la calidad microbiológica de los alimentos se han convertido en un desafío para la industria alimentaria. En la actualidad la búsqueda de antimicrobianos derivados de plantas que inhiban bacterias de interés alimentario y brinden alternativas al uso de conservadores sintéticos se ha incrementado. En este contexto, los fitoquímicos del tipo polifenol se han reportado como alternativas ideales para ese propósito a debido a su capacidad antimicrobiana.

En este trabajo se evaluó la actividad de compuestos polifenólicos sobre el crecimiento, la viabilidad, la motilidad swarming y el índice de formación de biopelícula (IFB) en patotipos de *E. coli* (EPEC, EHEC y ETEC).

Se determinaron concentraciones mínimas bactericidas (CMB) de ácido tánico (AT), ácido gálico (AG), metil galato (MG) y galato de epigalocatequina (EGCG) mediante el método de microdilución en placa. El efecto de concentraciones sub-inhedoras (CS) sobre el crecimiento y la viabilidad se evaluó mediante el método de la placa vertida y la integridad de la membrana mediante citometría de flujo. La motilidad swarming se determinó en agar suave LB. El IFB se determinó por un método colorimétrico. Mediante el sistema qPCR SYBR Green Supermix se evaluó la expresión relativa de genes asociados a la motilidad swarming (*flhC*, *fliA* y *fliC*) y genes asociados a la formación de biopelículas (*csgA*, *csgD* y *cyaA*). El rARN 16S (un gen constitutivo) se usó para normalizar y comparar los niveles de expresión de genes diana detectados entre cepas tratadas y control (no tratadas), midiendo los cambios en la expresión del número de veces usando el método delta Ct.

Se encontró que las CMBs de compuestos polifenólicos contra los tres patotipos de *E. coli*, estuvieron en rango de concentración de 80-2500 µg/ml. El MG fue el más potente para inhibir el crecimiento de todas las bacterias probadas (80-600 µg/ml), mientras que el AT fue el que menos (1800-2400 µg/ml). EPEC fue la cepa más susceptible (80-2100 µg/ml), mientras que ETEC fue la cepa más resistente (600-2400 µg/ml). Las CS de los

compuestos no afectaron la viabilidad bacteriana según crecimiento en placas de agar. Todas las CS de los compuestos redujeron la motilidad swarming entre un 20% a 100%. Ambas CS de AT mostraron 100% de reducción y AG a 1250 µg/ml logró más del 90% de reducción en EHEC y ETEC; mientras que en EPEC este ensayo no se llevó a cabo por tratarse de una cepa no móvil. AG a 1250 µg/ml produjo el mayor efecto en la reducción del IFB en EPEC, EHEC y ETEC. Los resultados de la expresión relativa de genes mostraron que AG a 1250 µg/ml está actuando positivamente en la represión del sistema de genes curli pero no así en el sistema flagelar, aun cuando se haya encontrado disminución en swarming. TA indujo el aumento en el valor de IFB en EPEC, así también MG y EGCG incrementaron el IFB en EHEC y ETEC.

En general, todos los polifenoles mostraron actividad bactericida contra los tres patotipos de *E. coli*, sin embargo las CS tuvieron diferentes efecto sobre swarming y biopelículas (positivo o negativo). AG a la CS de 1250 µg/ml fue el compuesto que simultáneamente tuvo el mayor efecto positivo contra la disminución de la motilidad swarming y formación de biopelículas en los tres patotipos de *E. coli*, en tanto que los demás compuestos afectaron la expresión de estos factores de virulencia en grado variable.

## ABSTRACT

*Escherichia coli* is a bacterium that is normally present in the intestinal microbiota of warm-blooded animals; however, there is a subset of strains capable of causing enteric infections in humans. The safety and microbiological quality of food has become a challenge for the food industry. Currently, the search for antimicrobials derived from plants that inhibit bacteria of food interest and provide alternatives to the use of synthetic preservatives has increased. In this context, phytochemicals such as polyphenolic compounds have been reported as good alternatives for that purpose due to their antimicrobial capacity.

In this work we evaluated the activity of polyphenolic compounds on growth, viability, swarming motility and biofilm formation index (BFI) in *E. coli* pathotypes (EPEC, EHEC and ETEC).

Minimal bactericidal concentrations (MBC) of tannic acid (TA), gallic acid (GA), methyl gallate (MG) and epigallocatechin gallate (EGCG) were determined by the microdilution method. The effect of subinhibitory concentrations (SC) on growth and viability was assessed by the spiked plate method and the integrity of the membrane by flow cytometry. The swarming motility was determined in soft agar LB. The BFI was determined by a colorimetric method. The qPCR SYBR Green Supermix system was used to evaluate the relative expression of genes associated with swarming motility (*flhC*, *fliA* and *fliC*) and genes associated with the formation of biofilms (*csgA*, *csgD* and *cyaA*). The 16S rRNA, a constitutive gene, was used to normalize and compare the expression levels of target genes detected between treated and control strains (untreated), by measuring changes in the number of times expression using the delta Ct method.

It was found that the MBC of polyphenolic compounds against the three *E. coli* pathotypes were in the concentration range of 80-2500 µg/ml. The MG was the most potent to inhibit the growth of all the bacteria tested (80-600 µg/ml), whereas the TA was the least (1800-2400 µg/ml). EPEC was the most susceptible (80-2100 µg/ml), while ETEC was the most resistant (600-2400 µg/ml). The SC of the compounds did not affect the bacterial growth. All the compounds in SC reduced the swarming motility between 20% to 100%. Both AT CS showed 100% reduction and AG at 1250 µg/ml

achieved more than 90% reduction in EHEC and ETEC; while in EPEC this test was not carried out because it is a non-mobile strain. GA at 1250 µg/ml produced the greatest inhibitory effect on the BFI for EPEC, EHEC and ETEC. The results of the relative expression of genes showed that AG at 1250 µg/ml is acting positively in the repression of the curli gene system but not in the flagellar system, even though a decrease in swarming has been found. TA induced an increase in the BFI in EPEC, while MG and EGCG increased the BFI in EHEC and ETEC.

In general, all polyphenols showed bactericidal activity against the three *E. coli* pathotypes; however, SC had different effects on swarming and biofilms (positive or negative). AG at 1250 µg/ml was the compound that simultaneously had the greatest positive effect against the decrease in swarming motility and biofilm formation in the three *E. coli* pathotypes, while the other compounds affected the expression of these virulence factors to a variable degree.

# 1. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* (*E. coli*) es un importante comensal de la microbiota intestinal de animales y humanos, la cual es normalmente inofensivo, sin embargo, existen cepas patógenas que se han asociado desde hace mucho tiempo a brotes de enfermedades transmitidas por alimentos en todo el mundo (Patzí-Vargas *et al.*, 2015).

La *E. coli* es casi exclusivamente de origen fecal y se transmite a través de la contaminación fecal de los alimentos y del agua o a través de la contaminación cruzada o por contacto directo humano durante la preparación de alimentos (Galli *et al.*, 2016).

Existen reportes de brotes de *E. coli* asociados principalmente a productos de carne picada cruda o poco cocinada, la leche cruda y las hortalizas contaminadas por materia fecal. Su presencia en alimentos representa un desafío a nivel mundial en el desarrollo de nuevas metodologías que garanticen o promuevan la inocuidad alimentaria (Feng *et al.*, 2015).

Las cepas de *E. coli* diarreogénicas (ECD) con capacidad de causar infecciones entéricas se han clasificado en seis grupos o patotipos denominados como: enterotoxigénica (ETEC), enterohemorrágica (EHEC), enteroinvasiva (EIEC), enteropatógena (EPEC), enteroagregativa (EAEC) y de adherencia difusa (DAEC), esto de acuerdo con el tipo de signos y síntomas que producen en los seres humanos y a sus características patógenas (Croxen and Finlay, 2010).

En virtud de la tendencia por consumir alimentos inocuos, libres de conservadores químicos y menos procesados, es que se han buscado alternativas naturales para combatir algunas de las enfermedades transmitidas por alimentos (Sabaté *et al.*, 2008).

Una alternativa que en años recientes ha mostrado efectividad contra la problemática anterior es el uso y selección de plantas como fuente de compuestos antimicrobianos, ya que éstas producen naturalmente una amplia gama de metabolitos secundarios que actúan como una línea de defensa química contra microorganismos en su entorno (Silva *et al.*, 2016).

Aun cuando el enfoque tradicional basado en el empleo de antibióticos para combatir las infecciones en algunos casos permanece como eficaz, dirigirse a la disminución o eliminación de factores de virulencia en lugar de la supervivencia, parece ser una estrategia adecuada, ya que la modulación de los factores de virulencia podría conducir a una menor presión selectiva previniendo el desarrollo de la resistencia (Silva *et al.*, 2016).

Se sabe que en ambientes húmedos y ricos en nutrientes *E. coli* exhibe movimiento tipo swarming, el cual es un movimiento grupal y coordinado que facilita a la bacteria llevar a cabo su proceso invasivo, derivando en muchos casos en la colonización de ambientes tales como tejidos, alimentos, materiales y/o superficies. Estos agregados bacterianos favorecen la formación de biopelículas, las cuales tienen como base de construcción a una sustancia polimérica extracelular (SPE). La secreción de SPE junto con otros materiales tales como materia orgánica, nutrientes, minerales, etc., forman una matriz protectora que contribuye al incremento de la supervivencia de la comunidad bacteriana ya que estas biopelículas resisten la actividad de desinfectantes, sanitizantes, antibióticos y defensas del sistema inmune (Srey *et al.*, 2013).

Silva *et al* (2016) reportaron que el movimiento tipo swarming y las biopelículas son dos de los siete factores de virulencia que forman parte del arsenal bacteriano en general, siendo los otros cinco quorum sensing, formación de toxinas, pigmentos, surfactantes y enzimas implicadas directamente en la patogénesis, destacando el uso de polifenoles y otros metabolitos como una alternativa natural para combatir estos factores de virulencia.

Por último es importante resaltar que se ha estudiado mucho la actividad de productos naturales para inhibir el crecimiento de *E. coli* O147:H7, pero se sabe poco del efecto de polifenoles a concentraciones que no maten pero inhabiliten factores de virulencia en patotipos de importancia en alimentos. Por ello, la presente investigación tuvo como propósito estudiar el efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles (ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigalocatequina) sobre la formación de swarming, biopelículas y la expresión de algunos genes relacionados en EPEC, EHEC y ETEC.

## 2. ANTECEDENTES

Las enfermedades transmitidas por los alimentos (ETAs) son una constante amenaza para la salud pública y un impedimento significativo para el desarrollo socioeconómico alrededor del mundo. El informe de la OMS sobre las estimaciones de la carga mundial de enfermedades de transmisión alimentaria reconoce a los patotipos de *E. coli* en el grupo de ETAs diarreicas, agrupándolo dentro de los 31 principales agentes patógenos transmitidos por los alimentos (WHO, 2015).

### 2.1 *Escherichia coli*

*Escherichia coli* es un bacilo de la familia *Enterobacteriaceae*, Gram negativo, anaeróbico facultativo, oxidasa negativo, fermentador de lactosa. Ésta bacteria coloniza el intestino del hombre pocas horas después del nacimiento, convirtiéndose en un miembro más de la microbiota intestinal, representando menos de 0.1% de las células bacterianas totales, sin embargo, debido a la alta densidad celular en general en el colon, este pequeño porcentaje se traduce en alrededor de  $10^8$  células/ml. Mide aproximadamente 0.5  $\mu\text{m}$  de diámetro por 1.0 a 3.0  $\mu\text{m}$  de longitud. Es una bacteria comúnmente fimbriada. Los pili tipo I son los más comunes y son o no expresados, conduciendo a estados piliados o no piliados. Aunque generalmente se define como comensales, *E. coli* en realidad contribuye a la fisiología humana a través de la digestión de los alimentos y la producción de vitamina B y K con algunas cepas que incluso exhiben características probióticas sustanciales. *E. coli* es una bacteria benéfica que protege el epitelio intestinal ante otras bacterias dañinas, debido a que producen la acidificación del nicho, además de activar continuamente al sistema inmune. Por otro lado, *E. coli* es uno de los patógenos humanos más importantes (Vidal Roberto M. *et al.*, 2016) (Kaper *et al.*, 2004).

Algunas cepas diarreogénicas tienen la habilidad de tolerar exposiciones de pH 2.0. Tal choque de ácido imita el tránsito por el estómago e induce la expresión de conjuntos de genes implicados en la supervivencia y patogenicidad, tales como el gen RpoS, el cual controla la expresión de proteínas de choque ácido o aquellos que forman parte de los sistemas glutamato y arginina descarboxilasa (Chung *et al.*, 2006). Usualmente, *E. coli* es móvil en medio líquido a través de flagelos peritricos. El comportamiento swarming y

diferenciación en bacilos hiperflagelados y elongados son muy similares a *Proteus* cuando crecen en medio sólido. Uno de los rasgos comúnmente codificados en grandes islas genéticas de diferentes patotipos de *E. coli* son pilis adicionales (tipo chaperonas y familias de pilis tipo IV y adhesinas no piliadas) (Welch, 2006).

Algunas cepas han adquirido algunos elementos genéticos móviles (plásmidos, islas de patogenicidad, transposones, bacteriófagos), los cuales al movilizarse entre las diferentes cepas, pueden crear nuevas combinaciones de factores de virulencia. Solamente las combinaciones más exitosas de factores de virulencia que han persistido se han convertido en patotipos específicos de *E. coli*, los cuales son capaces de causar enfermedad en individuos sanos, entre las que se incluyen diarrea acuosa, disentería, sepsis, meningitis, síndrome urémico hemolítico e infecciones en el tracto urinario. Tres síndromes clínicos generales pueden resultar de la infección con uno de esos patotipos: enfermedad entérica/diarreica, infecciones del tracto urinario (UTIs) y sepsis/meningitis (Kaper *et al.*, 2004). Las *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) más comúnmente aisladas son la *E. coli* uropatogénica (UPEC) y la *E. coli* meningitis neonatal (NMEC) (Croxen and Finlay, 2010).

Para determinar el grupo patógeno al que pertenecen los patotipos de *E. coli*, Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que son caracterizados por el antígeno somático O (lipopolisacárido, LPS), el antígeno H (flagelar) y el antígeno K (capsular). Los serogrupos están definidos por el antígeno somático O solamente y los serotipos por los antígenos O y H, el cual en ocasiones se asocian con un cuadro clínico en particular. Actualmente el sistema de serotipificación comprende 186 antígenos somáticos O, 56 flagelares H (Fratamico *et al.*, 2016) y 60 capsulares (K).

Basados en la presencia de factores de virulencia específicos, su epidemiología y las manifestaciones clínicas de la enfermedad, las cepas de *E. coli* diarreogénicas (DEC) son clasificadas en patotipos, los cuales incluyen a *E. coli* enteropatogénica (EPEC), *E. coli* productoras de shiga toxina (STEC), patotipo al cual pertenece la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), *E. coli* enteroagregativa (EAEC), *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli*

adherente invasiva (AIEC) que ha sido asociada con la enfermedad de Crohn, así como patotipos híbridos, entre los que destaca *E. coli* enteroagregativa hemorrágica (EAHEC) la cual lleva genes de virulencia asociados a STEC y EAEC. Como ejemplo de serotipo híbrido EAHEC se encuentra O104:H4, una EAEC que ha adquirido el fago que lleva el gen de la toxina shiga de STEC y el cual causó un brote alimentario de gran magnitud en 2011 en Alemania, derivando en 3800 individuos enfermos y 54 muertes (Croxen *et al.*, 2013; Fratamico *et al.*, 2016; Vidal Roberto M. *et al.*, 2016).

### ***E. coli* enteropatogénica (EPEC)**

EPEC es una de las principales causantes de diarreas en niños de seis meses hasta dos años de edad. Las cifras de letalidad en países subdesarrollados van de 20 a 50% (Castro, 2014). El cuadro clínico que produce EPEC se manifiesta con diarrea aguda, la cual puede ser leve o grave, puede ser mucosidad pero comúnmente no sanguinolenta, vómito, fiebre baja, deshidratación y mala absorción (Rodríguez-Angeles, 2002). Los síntomas pueden durar desde periodos breves hasta varios días.

Los brotes por EPEC se han relacionado con el consumo de agua potable contaminada, así como algunos productos cárnicos (Nataro and Kaper, 1998). A través de los estudios de alimentación voluntaria se ha estimado que la dosis infecciosa de EPEC en adultos sanos es de  $10^6$  organismos (Feng *et al.*, 2015), aunque la dosis puede variar de  $10^5$  a  $10^{10}$  organismos (Park *et al.*, 2014) dependiendo de la condición del huésped, mientras que la dosis infectiva que causa la enfermedad en niños es desconocida.

Existen dos tipos de EPEC, un patotipo típico (tEPEC) que posee los genes *eae* para íntima y el plásmido EAF (*EPEC adherence factor*), en el cual también se localiza otro factor de virulencia importante, denominado *pilus* BFP (del inglés “bundle forming pilus”, pilis formadores de penachos) el cual favorece la adherencia íntima al enterocito, y se dice que son atípicas (aEPEC), cuando sólo se tiene el gen (*eae*) de A/E de las cepas típicas de EPEC, pero han perdido el plásmido EAF que media la formación de BFP (Nataro and Kaper, 1998). La enfermedad por EPEC es generalmente el resultado del crecimiento de la bacteria en el intestino delgado y carecen de toxinas Shiga.

Esta bacteria causa la lesión de “adherencia y borramiento” (A/E, del inglés, attachment-effacement) en el epitelio intestinal, la cual induce la degeneración de las microvellosidades alterando la morfología de la región apical del enterocito y formando estructuras tipo pedestal. Esta unión provoca rearrreglos en el citoesqueleto con movimientos de actina, haciendo que la membrana forme proyecciones alrededor de la bacteria (Castro, 2014) favoreciendo la internalización de EPEC dentro de vesículas endocíticas y la desaparición de las microvellosidades absorptivas (Vidal *et al.*, 2007).

Las cepas de EPEC típicas tienen la capacidad de formar auto-agregados bacterianos, esféricos, apretados cuando son cultivadas en medio líquido. Al igual que adherencia localizada durante la primera etapa de la interacción de la bacteria con las células del huésped, la autoagregación requiere BFP.

Las EPEC típicas también forman biopelículas en superficies abióticas bajo condiciones estáticas o en un flujo a través de sistemas de cultivo continuo. Se han identificado estructuras adhesivas participantes en la agregación bacteriana durante la formación de biopelículas en superficies abióticas, tales como pili tipo I, el antígeno 43, BFP y el filamento EspA (Moreira *et al.*, 2006).

Se ha demostrado que BFP es un factor predominante requerido para la unión inicial de EPEC típicas (Cleary *et al.*, 2004), mientras que el filamento EspA promueve la unión aunque de una forma menos eficiente, podría mediar la adherencia de cepas que carecen de BFP (Croxen *et al.*, 2013).

### ***E. coli* enterohemorrágica (EHEC)**

Este organismo comparte con EPEC la habilidad de causar la lesión A/E, pero EHEC se diferencia por la posesión de toxinas denominadas Shiga-like y por la presentación de los síntomas clínicos de la enfermedad (Welch, 2006).

EHEC causa enfermedad en el intestino grueso, la cual puede presentarse como una simple diarrea acuosa y luego progresar hasta heces con sangre con ulceraciones del intestino. En un pequeño subconjunto de individuos enfermos se presenta el síndrome hemolítico-urémico (SUH) después de varios días de enfermedad grave, el cual puede

poner en riesgo la vida. SUH implica una tríada de anemia hemolítica, trombocitopenia e insuficiencia renal.

Puesto que además del serotipo O157:H7 existen otros serotipos productores del síndrome urémico hemolítico, en la actualidad este virotipo se ha clasificado en serotipos O157:H7 y serotipos no O157:H7, dentro de éstos últimos están los serogrupos O26, O91, O103, O104, O111, O113, O117, O118 O121 O128 Y O145 (Castro, 2014).

EHEC corresponde a un subconjunto de STEC; el cual incluye cepas de diferentes serotipos que presentan las mismas características patogénicas del serotipo O157:H7, el cual es considerado como prototipo del grupo. EHEC se ha asociado además con la etiopatogénesis de colitis hemorrágica afebril y con púrpura trombocitopénica.

Las cepas causantes de estos síndromes elaboran una o más citotoxinas denominadas toxinas Shiga (Stx1 y Stx2). El operón *stx* suele encontrarse dentro de la secuencia de un bacteriófago inducible y lisogénico de tipo lambda (Castro, 2014; Gomes *et al.*, 2016).

EHEC coloniza el intestino de ganado vacuno y de animales de granja (por lo que la colitis hemorrágica por EHEC O157:H7 se considera una zoonosis). Se asocia a la ingestión de alimentos, principalmente de carne de origen bovino mal cocida, leche no pasteurizada y agua. Se estima que la dosis infectiva para O157:H7 es de 10 a 100 células; pero no hay información disponible para otros serotipos EHEC (Feng *et al.*, 2015).

Esta bacteria puede crecer a temperaturas que oscilan entre 7°C y 50°C, con una temperatura óptima de 37°C. Algunas EHEC pueden proliferar en alimentos ácidos, hasta pH de 4.4, y en alimentos con una actividad de agua ( $A_w$ ) mínima de 0.95. Se destruye cociendo los alimentos hasta que todas las partes alcancen una temperatura de 70°C o más. *E. coli* O157:H7 es el serotipo de EHEC más importante por su impacto en la salud pública, pero hay también otros serotipos frecuentemente implicados en brotes y casos esporádicos (OMS, 2016).

Durante la lesión A/E, la bacteria coloniza el intestino y libera sus toxinas. El receptor para Stx1 y Stx2 en humanos es el receptor globotriaosilceramida o Gb3. Luego que la toxina se une a su receptor a través de la subunidad B, la subunidad A se internaliza en

la célula blanco e interacciona con la subunidad 60S de los ribosomas de las células intestinales, que por escisión del enlace N-glucosídico de adenina 4324 en 28S rRNA, evita que se una al tRNA lo que resulta en inhibición de la síntesis de proteínas llevando ello a la muerte celular (Gomes *et al.*, 2016).

Las lesiones de tipo de A/E, se deben a la presencia del gen cromosomal *eae* que codifica para una proteína de membrana externa (OMP) de 94 kDa, llamada intimina cuya expresión es regulada por genes plasmídicos y al igual que las cepas de EPEC, las *E. coli* enterohemorrágicas presentan la isla de patogenicidad de 35 Kb llamada locus de esfacelamiento del enterocito (LEE) (Castro, 2014).

LEE ha sido descrito en los principales serotipos EHEC/STEC responsables por una alta proporción de casos de colitis hemorrágica y síndrome urémico hemolítico en diferentes países, su presencia no es una condición necesaria para la aparición de infecciones más graves como se pensaba inicialmente, porque algunas cepas LEE negativas también son capaces de causar brotes y casos esporádicos de SUH (Gomes *et al.*, 2016).

### ***E. coli* enterotoxigénica (ETEC)**

Esta bacteria es la causa más común de la “diarrea del viajero” y una de las principales causas de diarrea acuosa aguda entre niños y adultos en países en desarrollo. Esta bacteria representa una carga para la salud asociada principalmente con la pobreza, y a la falta de saneamiento, agua potable y tratamiento de aguas residuales (Vidal Roberto M. *et al.*, 2016).

También representa una carga económica para agricultores y la industria, donde es un importante patógeno de gallinas de engorda, cerdos, ganado y otros animales de granja (Gomes *et al.*, 2016). El consumo de agua y alimentos contaminados y posiblemente el contacto persona a persona influyen para la transmisión y elevado número de casos de diarrea.

La habilidad del organismo para sobrevivir a temperatura ambiente por largos periodos de tiempo en alimentos cocinados, vegetales crudos, y agua purificada y/o potable, es un factor importante en la prevalencia de este organismo en comunidades con poca higiene (Vidal Roberto M. *et al.*, 2016).

La bacteria es transmitida por ingestión de agua y alimentos contaminados con  $10^6$  a  $10^{10}$  unidades formadoras de colonia (Nataro and Kaper, 1998), y estimándose un promedio de  $10^8$  en adultos como dosis infectiva, mientras que para los jóvenes, los mayores de edad y las personas inmunosuprimidas pueden ser susceptibles a más bajos niveles (Feng *et al.*, 2015).

Dentro de un periodo de 14 a 50 horas después de la ingestión, la bacteria coloniza la mucosa epitelial del intestino delgado, produciendo diarrea secretora sin signos evidentes de destruir o invadir el epitelio o causar inflamación. Además de la diarrea, algunos pacientes pueden manifestar otros síntomas tales como dolor de cabeza, fiebre, náuseas y vómito.

Los síntomas usualmente desaparecen dentro de los primeros 5 días sin necesidad de tratamiento antibiótico. Los casos letales están casi exclusivamente asociados con niños, debido a deshidratación severa y falta de inmunidad protectora (Vidal Roberto M. *et al.*, 2016).

Las cepas de ETEC tienen como característica el producir adhesinas o factores de colonización CFs (del inglés *colonization factor*), complejos proteínicos que pueden tomar la forma de estructuras fimbriales, fibrilares, o no fimbriales en la superficie de la bacteria. Las adhesinas expresadas por ETEC facilitan la adherencia de la bacteria a la mucosa intestinal y confieren especificidad del huésped a diferentes cepas (Gomes *et al.*, 2016).

La colonización del intestino delgado está mediada por adhesión a las células epiteliales a través de factores de colonización (del inglés *colonization factor antigens* CFAs), siendo el antígeno de superficie CS6 codificado en plásmido uno de los más comunes CFAs detectados en aislados clínicos de diferentes partes del mundo (Nicklasson, 2010). CFs y flagelos anclan a ETEC durante la adherencia inicial al huésped, pero la unión más íntima puede ser facilitada por proteínas de la membrana externa tales como Tia y TibA.

Después de la adherencia a la mucosa intestinal, las cepas de ETEC producen enterotoxinas las cuales son reconocidas como el segundo componente asociado con la

diarrea. Ésta es mediada por 1 o 2 toxinas codificadas en plásmidos: la toxina termoestable (ST) y/o la toxina termolábil (LT). Aproximadamente un tercio de todas las cepas ETEC aisladas mundialmente según informes, producen ST solamente, un tercio produce LT y ST y otro tercio produce LT solamente (Gomes *et al.*, 2016). Ambos tipos de toxinas median la desregulación de los canales iónicos de la membrana del epitelio, lo que conduce a la pérdida masiva de iones y agua, presentándose diarrea acuosa que es la principal característica causada por esta cepa (Gomes *et al.*, 2016).

La bacteria se ancla a los enterocitos del intestino delgado a través de factores de colonización (CFs) y una adhesina que se encuentra en la punta de los flagelos (EtpA). La adhesión más estrecha es mediada por Tia y TibA. Dos toxinas, la enterotoxina termolábil (LT) y la enterotoxina termoestable (ST), se secretan y causan diarrea a través de la activación del regulador de la conductancia transmembrana de la fibrosis quística (CFTR) mediada por AMP cíclico (cAMP) - GMP cíclico (GMPC) (Croxen and Finlay, 2010).

Las toxinas LT y ST, separadamente o en combinación, son capaces de inducir un desequilibrio agua-electrolito en la célula, el cual seguramente contribuye a la patogénesis de ETEC (Gomes *et al.*, 2016).

## **2.2 Brotes producidos por EPEC, EHEC y ETEC**

*Escherichia coli* es considerado el principal contaminante microbiano del agua y su origen es debido a la contaminación de cuerpos de agua con excretas humanas y animales. Los alimentos usualmente adquieren la contaminación por agua contaminada circundante o del uso de agua no potable en su preparación y procesamiento (Gupta *et al.*, 2013).

El Centro para el Control y Prevención de Enfermedades (CDC, Atlanta-EU), reportó tres brotes por ECD durante al año 2016. El primero de ellos fue debido al consumo de germinado de alfalfa contaminado con EHEC en donde fueron infectadas 11 personas, de las cuales, dos de ellas fueron hospitalizadas y ninguna derivó en síndrome urémico hemolítico. Posteriormente 63 personas enfermaron por consumo de harina de trigo y sus productos, resultando 17 personas hospitalizadas, donde STEC O121/STEC O26 fueron los serogrupos asociados. En el último brote de este mismo año el alimento

implicado fue la carne de res, ternera y bisonte, enfermando a 11 personas por STEC O157:H7. Para el año 2017 se reportó como primer brote el relacionado al consumo de mantequilla de soya contaminada por EHEC, en la cual se reportaron 32 casos de enfermedad y 12 hospitalizaciones. El último brote de ese año fue debido al consumo de vegetales de hoja verde donde estuvo implicado STEC O157:H7, enfermando a 25 personas, hospitalizando a 9 y muriendo una persona más. El brote más reciente (abril 2018) que ha reportado el CDC ha sido asociado al consumo de lechuga romana picada, enfermando a 35 personas y hospitalizando a 22. Aquí también estuvo implicada *E. coli* O157:H7.

### **2.3 Movimiento tipo swarming**

El movimiento de bacterias que poseen flagelos peritricos y que se encuentran cerca de las superficies es relevante, pues contribuyen a la comprensión de las primeras etapas de formación de biopelículas y de la infección por patógenos. Este movimiento difiere de la trayectoria de recorrido al azar de células en solución libre.

El swarming bacteriano es un modo colectivo de movimiento en el cual las bacterias flageladas migran rápidamente sobre superficies, y es caracterizado por grupos de bacterias densamente empacados moviéndose en patrones de torbellinos coherentes y flujos que pueden persistir durante varios segundos (Ariel *et al.*, 2015), además de ser el modo de translocación bacteriano más rápido que se conoce sobre una superficie y posibilita la rápida colonización de ambientes ricos en nutrientes (O'May and Tufenkji, 2011).

La habilidad de *E. coli* patogénica para causar infecciones es incrementada por este movimiento y por la formación de biopelículas, ya que permiten la colonización y persistencia en diferentes ambientes (García-Heredia *et al.*, 2013) donde existan superficies semisólidas con características viscoso-gelatinosas, como por ejemplo, en las células epiteliales (Ha *et al.*, 2014a). Así también, las comunidades swarming representan una problemática en una serie de contextos ambientales y clínicos, debido a su mayor resistencia a agentes antimicrobianos. La identificación de compuestos que

impiden la motilidad bacteriana ofrece la potencial aplicación de tales compuestos para la limitación de la colonización bacteriana sobre superficies (O'May and Tufenkji, 2011).

El movimiento tipo swarming ha sido reportado en muchas especies Gram negativas entre los géneros *Proteus*, *Vibrio*, *Serratia*, *Salmonella*, *Escherichia*, *Azospirillum*, *Aeromonas* y en algunas especies de Gram positivas entre los géneros *Bacillus* y *Clostridium* (Lai *et al.*, 2009). Los flagelos son los requerimientos más importantes para la motilidad swarming junto con el incremento de su biosíntesis, así también se requiere el incremento en las interacciones célula-célula y la presencia de surfactantes (Kearns, 2010).

Swarming comienza con la introducción de una o más células en una superficie hidrogel. En el laboratorio, esto típicamente se lleva a cabo por inoculación en el centro de una superficie de agar con una pequeña gota de células en suspensión líquida (Copeland and Weibel, 2009). En contraste con el swimming, donde las bacterias se mueven a través de canales de agua en el agar (0.2-0.3% de agar), el swarming es un fenómeno social a través del agar (0.35-1.2% de agar) (Banitz *et al.*, 2012). Las células swarming en esta región migran a través de una capa delgada de líquido de aproximadamente 1  $\mu\text{m}$  de altura (Swiecicki *et al.*, 2013). A diferencia de la motilidad swarming, la motilidad swimming también requiere de flagelos, pero no necesita del sistema de comunicación *quorum sensing* ni biosurfactantes (Ha *et al.*, 2014b).

La incrementada viscosidad (superficie de contacto) y las señales intracelulares (estado nutricional) se integran, resultando en una célula swarmer hiperflagelada, elongada y multinucleada (Lai *et al.*, 2009). Esas células móviles se mueven en grupos o *rafts* (balsas), organizadas paralelamente a lo largo de su eje para maximizar el contacto célula-célula, colonizando enteramente la superficie disponible. Las células reclutadas en el *raft* se mueven con el grupo, mientras que las células que van quedando al interior se vuelven rápidamente no móviles (Kearns, 2010). El frente de migración es precedido por una capa visible de material extracelular limoso, el cual da a las colonias un efecto de brillo. Como consecuencia de esta incorporación en una matriz extracelular polimérica, la densidad poblacional es extremadamente alta en esas comunidades

adheridas a superficies (Daniels *et al.*, 2004). El fenotipo swarming es reversible y se sabe que las células swarmer vuelven a su estado planctónico cuando se transfieren a un medio líquido (Figura 1).

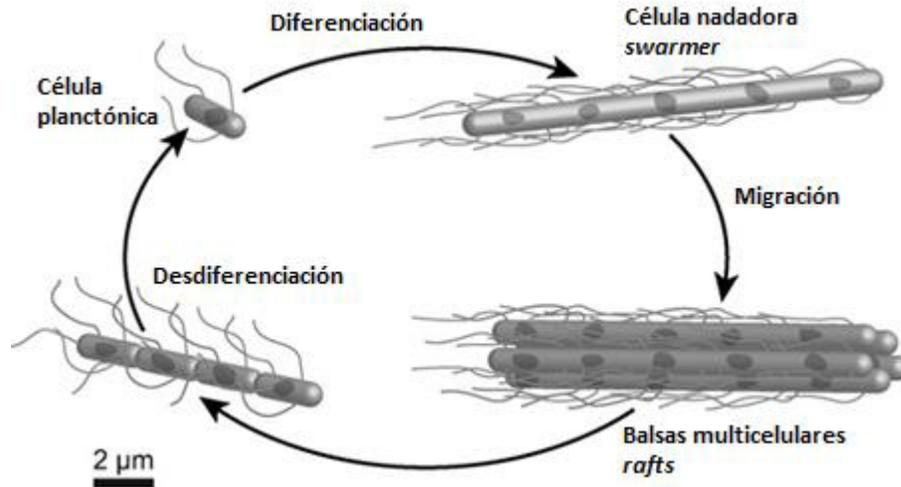


Figura 1. Ciclo de vida general de células nadadoras (swarmer). Tomado y modificado de Copeland and Weibel (2009).

La longitud de los flagelos en relación a la longitud de las células y el número de flagelos por célula swarmer ha sido reducida para mayor claridad. Las manchas ovaladas representan el cromosoma bacteriano (Copeland and Weibel, 2009).

La presencia de células flageladas en el frente de propagación de la colonia es consistente con la motilidad swarming, ya que se ha visto que la mayoría de las células swarmer poseen flagelos peritricos ordenados aleatoriamente, los cuales al rotar coordinadamente generan la fuerza necesaria para moverse eficientemente en líquidos viscosos (Kearns, 2010). La densidad de los flagelos en la superficie bacteriana incrementa de 3-50 veces por unidad de área superficial, aunque este no es siempre el caso, ya que algunas especies de géneros de *Bacillus* y *Pseudomonas* no se elongan y podrían solamente duplicar el número de flagelos después de la diferenciación (Copeland and Weibel, 2009).

Ahora bien, la correlación entre flagelos peritricos y swarming no es absoluta, y algunas bacterias con un solo flagelo originado en un polo pueden nadar por ejemplo, *Vibrio*

*parahaemolyticus* tienen un solo flagelo polar que es suficiente para realizar nado en medios líquidos, pero deberá inducir la síntesis de flagelos peritricos (también llamados flagelos laterales) para nadar en sobre superficies.

Los flagelos polares y laterales son codificados por diferentes genes, con motores independientes regulados diferencialmente, por lo que la expresión alternativa de motores es al menos una forma para facilitar el swarming además del uso de flagelos peritricos. Mutaciones que reducen la expresión de genes flagelares o reducen el número de flagelos reduce o impide el swarming y mutaciones que aumenta la expresión de genes flagelares incrementan el movimiento swarming (Kearns, 2010).

Por otra parte, muchas bacterias swarming sintetizan y secretan surfactantes (moléculas anfipáticas que reducen la tensión entre el sustrato y la célula bacteriana) que permiten su extensión sobre las superficies y que a menudo se manifiestan como una capa acuosa clara que precede al frente de las células swarm. Cuando las bacterias fallan en sintetizar surfactante podrán solamente swarm en agar especial con una tensión superficial inherentemente baja debido quizás a la presencia de un tensoactivo en el propio agar. Los surfactantes que sintetizan *Bacillus subtilis* y *Serratia liquefaciens* son surfactina y serrawetina respectivamente, ambos de naturaleza lipopeptídica, mientras que *Pseudomonas aeruginosa* sintetiza  $\beta$ -hydroxydecanoyl- $\beta$ -hydroxydecanoato, dos ramnolípidos con efectos potencialmente antagónicos (Daniels *et al.*, 2004).

El aspecto swarming puede variar grandemente de acuerdo a las especies e incluso a las condiciones de crecimiento utilizadas (Lai *et al.*, 2009), por ejemplo, las especies de *Proteus* forman círculos concéntricos, mientras que en *Pseudomonas aeruginosa* las células swarm forman complejos patrones similares a fractales.

El comportamiento swarming se parece mucho al que se presenta en las biopelículas (biofilm) en que ambos representan fenómenos sociales coordinados, requiriendo cierto grado de diferenciación y regulación celular a través de la comunicación célula-célula (*quorum sensing*), además de incrementar su resistencia a una variedad de antibióticos (Lai *et al.*, 2009). Diversas líneas de evidencia soportan el hecho de que la diferenciación en el estado celular swarmer es acoplado a la expresión de ciertos factores de virulencia (Daniels *et al.*, 2004).

La función primaria del operón master *flhDC* es el control de la biogénesis del flagelo, pero en *E. coli*, *Serratia liquefaciens* y *P. mirabilis* FlhDC también reprime la división celular (Fraser *et al.*, 2000), además de ser el regulador clave en la diferenciación celular swarmer en varias *Enterobacteriaceae*, tales como *P. mirabilis*, *Serratia*, *E. coli*, *Salmonella* y *Yersinia* y en Gram positivas como *B. subtilis* (Daniels *et al.*, 2004). Algunos genes flagelares asociados a movimiento tipo swarming en *E. coli* son *fimA*, *fimH*, *flhD*, *motB*, *qseB*, *qseC* (Yang *et al.*, 2016) y *fliC* (Sheikh *et al.*, 2013).

El swarming al ser una motilidad dependiente de flagelo, contribuye a la virulencia de patógenos mediante la colonización del huésped y otras formas de comportamientos coloniales complejos, incluyendo la formación de biopelículas (Silva *et al.*, 2016).

## **2.4 Formación de biopelículas**

Se sabe que las bacterias pueden existir en la naturaleza bajo dos disposiciones: a) bacterias planctónicas, de libre flotación y suspendidas en un fluido y b) bacterias sésiles (formadoras de biopelículas) creciendo en colonias de microorganismos adheridas a superficies sólidas. Se estima que el 99% de todas las células bacterianas existen bajo la forma de biopelículas y tan sólo 1% viven en un momento dado, flotando libremente o en estado planctónico (Ramadan *et al.*, 2005).

Microbiológicamente, las biopelículas son definidas como comunidades de microorganismos creciendo embebidas en una matriz de exopolisacárido y adheridas a una superficie inerte, a un tejido vivo o a un alimento. Las biopelículas pueden encontrarse en cualquier nicho ecológico y son de particular importancia para la industria alimentaria en general y para los alimentos perecederos en particular. En esencia, si las bacterias están presentes en cualquier superficie que combine abundante humedad y nutrientes, es susceptible a la formación de biopelículas (Galli *et al.*, 2016).

La formación de biopelículas ha sido observada en la mayoría de las bacterias encontradas en ambientes naturales, en dispositivos clínicos y superficies industriales, pudiéndose convertir en una fuente constante de contaminación en la industria de procesamiento de alimentos (Zahir *et al.*, 2015). Aunque las biopelículas pueden tener

solo una especie bacteriana (patógeno o deteriorante), usualmente varias especies están presentes en ellas al mismo tiempo.

Los diferentes tipos de bacterias que forman una biopelícula se comunican a través de un mecanismo de señalización célula-célula conocido como *quorum sensing*. Los sistemas *lux* se han estudiado extensamente en *Pseudomonas* spp y *E. coli*, y se les considera necesarios para la maduración de la biopelícula y activación de numerosos genes de factores de virulencia. Davies *et al.* (1998) demostraron que en la formación de biopelícula en *P. aeruginosa* están implicados dos sistemas diferentes de señalización célula-célula: lasR-lasI (reguladores globales de la expresión genética en *P. aeruginosa*).

Una vez conseguida una densidad suficiente de población, estas señales alcanzan las concentraciones requeridas para activar los genes implicados en la diferenciación de la biopelícula. Mutantes incapaces de elaborar estas señales producen biopelículas notoriamente más delgadas y sin su arquitectura típica. Además, pueden ser removidas mucho más fácilmente de su superficie mediante el uso de surfactantes. La adición de lactona homoserina al medio que contiene las biopelículas mutantes da origen a películas similares a los de bacterias no mutantes, confirmando la participación de este tipo de moléculas en su desarrollo y estructura (Davies *et al.*, 1998).

Las biopelículas bacterianas les permiten sobrevivir en escenarios impredecibles y bajo condiciones de estrés, tales como cambios de temperatura, pH, secado, y luz ultravioleta, entre otros. En su estado maduro, las células de la biopelícula utilizan energía para la producción de exopolisacáridos, que a su vez se utiliza como nutriente. Las bacterias en las biopelículas pueden ser 100 veces más resistentes a antibióticos y hasta 300 veces más resistentes a algunos agentes desinfectantes (Galli *et al.*, 2016).

Los microorganismos en las biopelículas viven inmersas en una matriz hidratada (se forman microcolonias separadas por canales llenos de agua) de sustancias poliméricas extracelulares (SPE) que ellos mismos producen en su entorno inmediato y en el que pueden encontrarse una o varias especies. SPE son principalmente polisacáridos, proteínas, ácido nucleicos y lípidos, los cuales proveen estabilidad mecánica a la biopelícula mediante su adhesión a superficies, formando un polímero cohesivo tridimensional que interconecta e inmoviliza transitoriamente a las células en la

biopelícula. La celulosa es un componente de las matrices de muchas bacterias, desempeñando una función importante en infecciones relacionadas con biopelículas causadas por *E. coli* (Flemming and Wingender, 2010).

Otras funciones que la sustancia polimérica extracelular provee a la biopelícula consiste en permitir la agregación bacteriana, retiene humedad, sirve de barrera protectora, en ella se lleva a cabo la sorción de compuestos orgánicos y iones, permite una intensa actividad enzimática y el intercambio de información genética (Flemming and Wingender, 2010). La estructura de la biopelícula provee protección a las células contra los mecanismos de defensa del huésped, fagocitos, biocidas, fuerzas de cizallamiento hidrodinámico, desecación, temperatura extrema y tratamiento antibiótico en relación a las células planctónicas que crecen libres en medio líquido. Se ha considerado que las biopelículas son responsables del 65% de todas las infecciones bacterianas.

La formación de biopelículas comprende una serie de pasos secuenciales descritos en la figura 2: 1) pre-acondicionamiento de la superficie de adhesión por macromoléculas presentes en el líquido o por recubrimiento de las mismas sobre una superficie, 2) transporte de células planctónicas del líquido a la superficie, 3) adsorción de las células a la superficie, 4) desorción reversible de las células adsorbidas, 5) adsorción irreversible de las células bacterianas a la superficie, 6) producción de moléculas de señalización célula-célula, 7) transporte de sustratos hacia y dentro de la biopelícula, 8) metabolismo de los sustratos por las células unidas a la biopelícula y transporte de los productos fuera de la biopelícula. Estos procesos son acompañados por crecimiento celular, replicación y producción de SPE, 9) remoción de la biopelícula por liberación o desprendimiento, con lo cual las células adquieren un estado planctónico y por lo tanto pueden formar biopelículas en otras superficies (Simões *et al.*, 2010). En el entorno de la biopelícula, existe una intensa actividad enzimática que posibilita la digestión de macromoléculas exógenas para la adquisición de nutrientes y degradación estructural del SPE, lo que permite la liberación de las células de la biopelícula (Flemming and Wingender, 2010). La separación y erosión proporcionan los mecanismos para que las bacterias migren desde zonas densamente colonizadas a áreas desnudas que podrían favorecer mejor su desarrollo, logrando así formar nuevas biopelículas en sitios distantes.

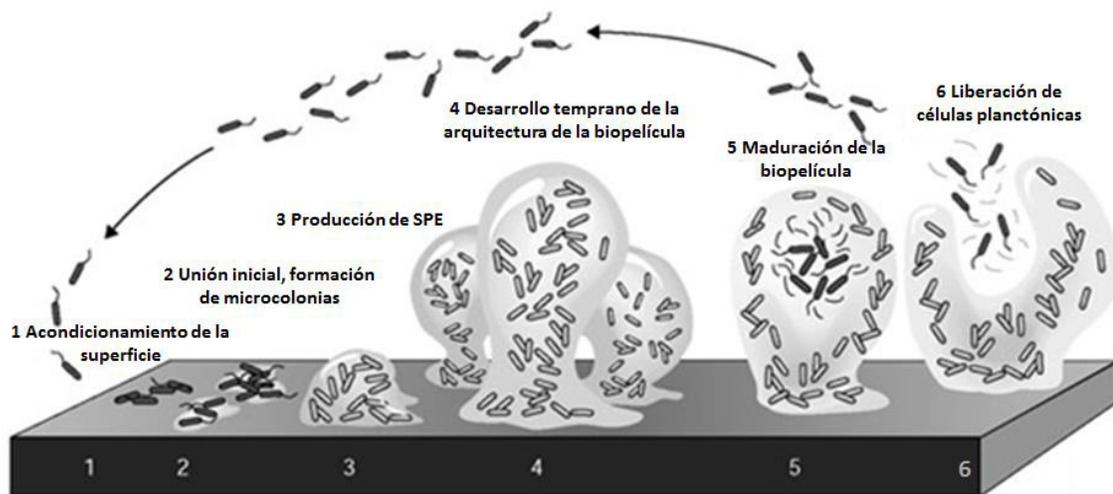


Figura 2. Procesos que gobiernan la formación de biopelículas. Tomado y modificado de Monroe (2007).

La adherencia de los microorganismos a las superficies y el desarrollo de biopelículas es un proceso complejo afectado por diversas variables. Se ha visto que la unión ocurrirá más fácilmente en superficies que son rugosas, más hidrofóbicas y recubiertas por películas de acondicionamiento superficial (materia orgánica). Propiedades de la superficie celular, particularmente la presencia de apéndices extracelulares y las interacciones que intervienen en la comunicación célula-célula y la producción del SPE son importantes para la formación y desarrollo de la biopelícula (Simões *et al.*, 2010).

La colonización inicial de una superficie por las bacterias es reversible y puede ser mediada por fimbrias y flagelos, en tanto que la adhesión irreversible a la superficie es a menudo asociada con la expresión de material extracelular y la formación de poblaciones adyacentes a la matriz tridimensional de la biopelícula adheridas unas a otras entre sí y a las superficies (Zahir *et al.*, 2015). La tabla 1 muestra algunas otras variables que son de importancia en la unión a superficies durante la formación de biopelículas.

La forma en que se produce la dispersión afectaría, aparentemente, las características fenotípicas de los microorganismos. Los conglomerados desprendidos desde la biopelícula conservarían, probablemente, ciertas características de éste, tales como la resistencia antimicrobiana. En cambio, las células bacterianas liberadas de manera

aislada, parecen volver rápidamente a su fenotipo planctónico, tornándose nuevamente susceptibles a las defensas del huésped y a los antimicrobianos.

Tabla 1. Variables importantes en la unión celular, formación y desarrollo de biopelículas. Tomado y modificado de Donlan and Costerton (2002).

Superficie de adhesión	Fluido	Célula
Textura o rugosidad	Velocidad de flujo	Hidrofobicidad de superficie celular
Hidrofobicidad	Temperatura	Apéndices extracelulares
Naturaleza química de la superficie	Cationes	Sustancia polimérica extracelular
Carga	Presencia de productos antimicrobianos	Moléculas de señalización
Película de acondicionamiento	Disponibilidad de nutrientes	

El efecto protector de las biopelículas bacterianas es multifactorial. Esto incluye disminución de la penetración de los agentes antimicrobianos en las capas profundas de las biopelículas, la captura de moléculas positivamente cargadas por la matriz polimérica extracelular de la biopelícula, o la capacidad de las matrices de biopelícula para concentrar las enzimas bacterianas que inactivan antibióticos. Gradientes de nutrientes, metabolitos, oxígeno, pH, potencial redox o antibióticos que penetran en la biopelícula producen estrés ambiental en la bacteria, resultando en la expresión de mecanismos de resistencia inducible, aumento de la tasa de mutabilidad y cambios bacterianos de tipo fenotipo adaptativo. Estos cambios conducen a la supresión metabólica en las bacterias, que causan una mayor capacidad de sobrevivir a la exposición a antibióticos y una tasa creciente de formación de células persistentes. Estas sobreviven a la terapia antimicrobiana y pueden provocar el resurgimiento de focos de infección en paciente después de la terapias antimicrobianas, lo que resulta en una recaída de la enfermedad (Slobodníková *et al.*, 2016).

La formación de biopelículas puede aumentar la persistencia de patógenos en plantas de alimentos y superficies, sirviendo como una fuente constante de contaminación (Kumar and Anand, 1998). La habilidad para adherirse, colonizar y formar biopelículas en los alimentos y diversos tipos de superficies (por ejemplo, vidrio y poliestireno) puede ser

una importante fuente y/o vehículo de transmisión de EHEC/STEC. Se ha visto una estrecha relación entre la formación de biopelículas y la expresión de fimbrias curli y celulosa en cepas O157. Ahora bien, además del curli, la presencia de otros factores tales como fimbria tipo 1 se asocia con la habilidad para formar biopelículas en superficies bióticas o abióticas, lo que sugiere la habilidad para persistir en diferentes ambientes e interactuar con el huésped (Gomes *et al.*, 2016).

Dentro del intestino, las biopelículas pueden desarrollarse como cepas comensales y patógenas coexistentes de *E. coli*. La producción de fimbrias curli y el exopolisacárido celulosa son posiblemente los contribuyentes más comunes durante la formación de biopelículas por *E. coli* y *Salmonella* spp. En aislados humanos de *E. coli* comensales, del 46 al 79% producen curli, celulosa o ambos componentes dependiendo de la temperatura. Aquellas cepas que expresen ambos o uno de esos componentes tuvieron de media a alta capacidad de formación de biopelícula. En *E. coli* y *Salmonella* spp., la co-expresión de curli y celulosa dirige a la colonia a un fenotipo agregativo (Uhlich *et al.*, 2009).

La producción de fimbria curli y celulosa en *E. coli* es compleja e involucra muchos reguladores, entre ellos CsgD el cual es el regulador transcripcional clave que modula la transición del estado planctónico al estado multicelular, a través del control de la producción de curli y celulosa (Uhlich *et al.*, 2009). El sistema de dos componentes Cpx compuesto por CpxA (sensor) y CpxR (regulador), controla la respuesta al estrés y la adaptación celular en el ambiente, incluyendo la formación de biopelículas (Uhlich *et al.*, 2009). Se ha encontrado que algunos fitoquímicos son capaces de desregular los genes curli y reducir la formación de biopelículas bacterianas (Yang *et al.*, 2016).

Se ha visto que en EPEC adhesinas tales como BFP y EspA, (importantes en la formación de microcolonias en células epiteliales), están también involucradas en la agregación bacteriana durante la formación de biopelículas en superficies abióticas y se ha demostrado que los genes que codifican para BFP y EspA son expresados durante la formación de biopelículas (Moreira *et al.*, 2006). En EHEC *csgD*, *csgA* y *cyaA* tienen implicación directa en la formación de biopelículas, mientras que en ETEC están los genes *cyaA* y *fliC*. Estudios han revelado que los flagelos también afectan la virulencia

bacteriana por liberación de factores de virulencia y median la formación de biopelículas, la adhesión bacteriana y la invasión. Entre los genes flagelares asociados a la producción de biopelículas en *E. coli* son *flgB*, *flgC*, *flhD*, *fliA*, *fliC*, *fliY* (Ito *et al.*, 2008; Zhou *et al.*, 2015). De los genes de *E. coli* K-12, el 38% fueron expresados diferencialmente durante la formación de biopelículas (Zahir *et al.*, 2015).

## **2.5 Regulación inversa entre la motilidad y la adhesión mediada por curli en *E. coli***

Dependiendo de las condiciones medioambientales, las bacterias pueden exhibir diferentes “estilos de vida”. Ellas pueden presentarse en un estado móvil individual (planctónico) o como células sedentarias que usan fimbrias adhesivas para agruparse y formar biopelículas en superficies. Con *E. coli* creciendo en un medio complejo, estos estados pueden ser observados sucesivamente, con células que se vuelven de forma transitoria altamente móviles durante la fase de crecimiento post-exponencial, seguida de la inducción de fimbrias curli adhesivas durante el ingreso de la fase estacionaria. Se puede esperar que la motilidad y la adhesión sean mutuamente excluyentes. Una vía conveniente para realizar tal función inversa podría ser la de dotar al sistema de control motilidad/flagelar con al menos un componente que desempeñe un papel de inhibidor en el sistema de control de la adhesión y viceversa (Pesavento *et al.*, 2008).

En *E. coli* la motilidad y la adhesión mediada por curli está bajo el control regulador de cascadas de pre-alimentación, cada una con un regulador maestro en la parte superior que actúa como integrador de la señal masiva. Para la expresión y motilidad flagelar el regulador maestro es el complejo FlhDC, el cual activa la expresión de operones que codifican la parte interna del flagelo (por ej., el gancho del cuerpo basal, que también actúa como un sistema de secreción para componentes externos), así como la subunidad  $\sigma$  de la RNA polimerasa, FliA ( $\sigma^{28}$  o  $\sigma^F$ ) y el factor anti- $\sigma$ , FlgM. Tras la secreción de FlgM, que ocurre tan pronto como el sistema de secreción del cuerpo basal es funcional, FliA se libera para activar los genes que codifican las subunidades de la parte externa del flagelo y proteínas adicionales que se requieren para la función flagelar y la quimiotaxis (Pesavento *et al.*, 2008).

Por otra parte, las fimbrias adhesivas curli son expresadas al inicio de la fase estacionaria (en células creciendo por debajo de 30 °C). Las fimbrias curli están

involucradas en la agregación célula-célula y en la adhesión a superficies. La cascada del control del curli está modulada dentro de la respuesta general al estrés, para el cual la subunidad  $\sigma$  del  $\sigma^S$  (RpoS) de la RNA polimerasa actúa como el regulador maestro. La RNA polimerasa que contiene  $\sigma^S$  ( $E\sigma^S$ ) activa la expresión de MlrA y a YdaM, quienes juntos con  $E\sigma^S$ , son esenciales para activar la transcripción del gen *csgD*. La proteína CsgD es un activador esencial para los genes estructurales del operón (*csgBAC*) y coopera con la RNA polimerasa del promotor de *csgB* (Pesavento *et al.*, 2008). La figura 3 sintetiza la red de comunicación entre las cascadas de regulación FlhDC/motilidad y  $\sigma^S$ /curli y la función de diferentes módulos de control del c-di-GMP.

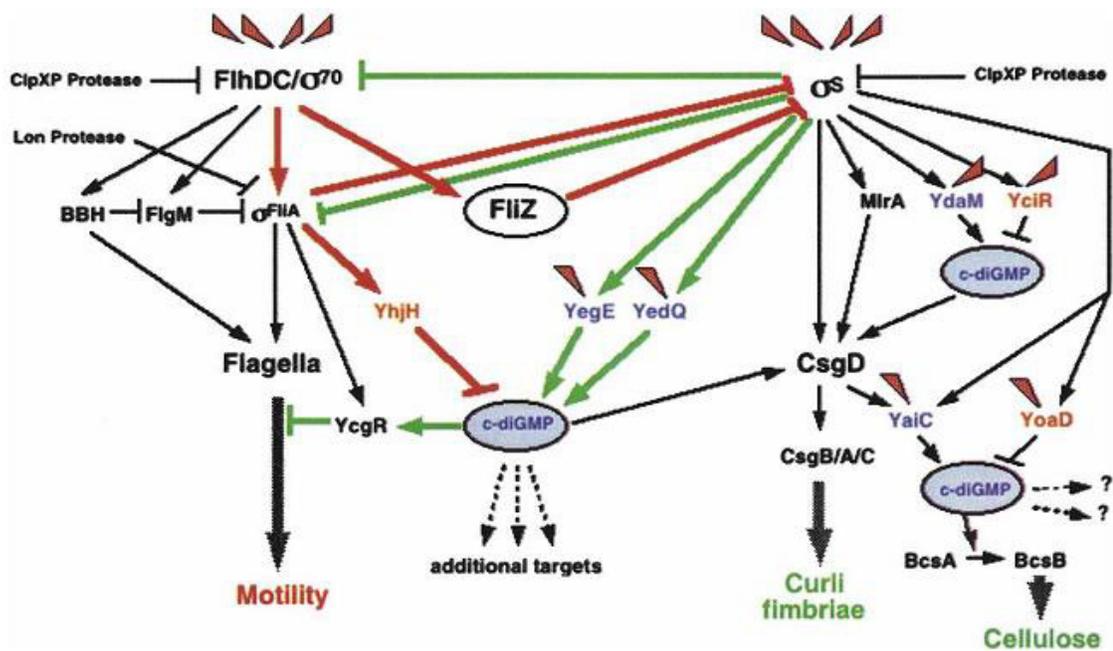


Figura 3. Red de comunicación entre las cascadas de regulación FlhDC/motilidad y  $\sigma^S$ /curli. Efectos negativos del sistema FlhDC/motilidad sobre el sistema  $\sigma^S$ /curli se resalta en rojo y los efectos por los cuales el sistema  $\sigma^S$ /curli regula por disminución el sistema FlhDC/motilidad están en verde. *FliZ* es una proteína controlada por FlhDC y actúa como un inhibidor de  $\sigma^S$ . Los triángulos indican una entrada de señal adicional no especificada. Tomado de Pasavento *et al.*, (2008).

Otra función clave en el control de la motilidad y la expresión del curli es la molécula de señalización bis-(3'-5')-diguanosina monofosfato cíclico (c-di-GMP). La sobreproducción de diguanilato ciclasas (DGC, síntesis de c-di-GMP) interfiere con la

motilidad y activa fuertemente la expresión de fimbrias curli y la formación de celulosa, componente de la matriz en biopelículas de bacterias entéricas, mientras que la sobreproducción de fosfodiesterasas (PDE, degradación de c-di-GMP) produce el fenotipo opuesto (Pesavento *et al.*, 2008).

## **2.6 Compuestos fenólicos con actividad antibacteriana**

Compuestos de plantas con actividad antimicrobiana se han vuelto populares como alternativa a los antibióticos, cuya resistencia a éstos ha ido en aumento dramático en ciertos microorganismos, incluyendo patógenos transmitidos por alimentos que no sólo son resistentes a los antibióticos, sino también más tolerantes a varios métodos de procesamiento y conservación de alimentos (Lucera *et al.*, 2012).

La percepción de los posibles efectos negativos de los conservadores sintéticos en la salud frente a los beneficios de los aditivos naturales (incluyendo antioxidantes) se han convertido en una opción popular para los consumidores y ha generado interés entre los investigadores en el desarrollo y uso de productos naturales para inhibir el crecimiento de microorganismos indeseables en los alimentos (Negi, 2012).

Los polifenoles de plantas representan una amplia clase de metabolitos biológicamente activos, entre los que se incluyen flavonoides, taninos, antocianinas, ácidos fenólicos, estilbenos, coumarinas, lignanos y ligninas. Estas sustancias juegan una función importante en la resistencia contra patógenos y protege contra radicales libres y toxinas (Slobodníková *et al.*, 2016).

Hoy en día, los polifenoles vegetales disfrutan de un reconocimiento cada vez mayor no sólo por la comunidad científica, sino también, y lo más notable, por el consumidor, debido a su presencia y abundancia en frutas, semillas, verduras, alimentos y bebidas, cuyo consumo regular se ha afirmado que es beneficioso para la salud, debido a que en muchas ocasiones también posee capacidad para eliminar el daño oxidativo generado por radicales libres, que subyace a su utilidad en la reducción del riesgo de ciertos procesos degenerativos relacionados con la edad y enfermedades (Slobodníková *et al.*, 2016).

Se han descrito múltiples mecanismos de actividad antibacteriana en polifenoles: interacción con proteínas bacterianas y estructuras de la pared celular, daño a membranas citoplasmáticas, reducción de la fluidez de la membrana, inhibición de la síntesis de ácidos nucleicos, de la síntesis de la pared celular o del metabolismo energético (Cushnie and Lamb, 2011; Daglia, 2012; Gyawali and Ibrahim, 2014).

Múltiples investigaciones han mostrado la actividad antibacteriana de polifenoles, por ejemplo: Widsten *et al.* (2014), encontraron que el ácido tánico es un agente antibacterial más potente que el ácido el ácido gálico contra patógenos transmitidos por alimentos como *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. fluorescens*, *Serratia liquefaciens*, *S. Enteritidis*, *P. phosphoreum*, *Hafnia alvei*, *S. Typhimurium*, *S. putrefaciens*, *Y. enterocolitica*, *Lactobacillus* sp. Específicamente en *E. coli* se determinó la concentración mínima inhibitoria del ácido tánico a  $1.88 \pm 0.67$  mg/ml (Widsten *et al.*, 2014).

Díaz *et al.* (2014) reportaron la disminución en los valores de absorbancia y del número de unidades formadoras de colonias por el efecto antimicrobiano de ácido gálico y catequina en cultivos de *E. coli* probados en medio líquido. El ácido gálico mostró efecto anti *E. coli* más pronunciado que la catequina, con disminución en el crecimiento a concentraciones de 2.5 mg/ml, y estableciendo una concentración mínima inhibitoria para el ácido gálico de 3.25 mg/ml (Díaz-Gómez *et al.*, 2014).

Ekaprasada *et al.* (2015) encontraron actividad antimicrobiana del metil galato (aislado de las hojas de *Toona sureni Blume Merr*) contra *E. coli*, *S. aureus* y *B. subtilis*, a una CMI de 7.5 mg/ml mediante el método de disco de papel impregnado (Ekaprasada *et al.*, 2010).

Lee *et al.* (2009) reportaron la efectividad del galato de epigallocatequina del té verde contra fenotipos de virulencia y la expresión de quorum sensing de *E. coli* O157:H7 a concentraciones de 1 a 100 µg/ml (concentraciones más bajas que la CMI establecida de  $539 \pm 22$  µg/ml). Los autores sugirieron que concentraciones por debajo de la CMI de galato de epigallocatequina mostraron un efecto antipatogénico significativo contra *E. coli* O157:H7 (Lee *et al.*, 2009) .

Las actividades antimicrobianas de muchos de estos compuestos han indicado que los niveles necesarios para inhibir el crecimiento bacteriano son considerablemente mayores en los alimentos que en los medios de cultivo, afectando de manera significativa el sabor de los alimentos, sin embargo, su eficacia se puede mejorar al utilizar el aditivo en combinación sinérgica con factores de estrés, lo que pudiera reducir las concentraciones necesarias para su eficacia (Alzamora *et al.*, 1998).

### **Concentración Mínima Inhibitoria y Concentración Mínima Bactericida**

Por otra parte, la cuantificación de la actividad *in vitro* de los antimicrobianos se evalúa habitualmente mediante algunas de las variantes de los métodos de dilución. La Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) se define como la concentración mínima de antimicrobiano que inhibe el crecimiento visible de un microorganismo después de 24 horas de incubación a 37 °C. La CMI se ha establecido como "estándar de oro" frente a otros métodos que evalúan susceptibilidad antimicrobiana (Andrews, 2001).

La Concentración Mínima Bactericida (CMB), se define como la concentración mínima de antimicrobiano que elimina a más del 99.9% de los microorganismos viables después de un tiempo determinado de incubación (generalmente 24 horas). En contraste con los ensayos de CMI, el inóculo de microorganismos para CMB debe estar en la fase logarítmica de crecimiento, debido a que muchos agentes antimicrobianos ejercen su efecto bactericida solamente en la fase de crecimiento bacteriano (Isenberg, 1999). La CMB previene el crecimiento de un organismo después de subcultivarlo en un medio libre de antimicrobiano (Andrews, 2001).

Las concentraciones sub-inhedorias de antibacterianos permiten que las cepas sigan creciendo, lo que a veces se traduce en una tasa de crecimiento reducida en comparación con la tasa de crecimiento que se observa en ausencia del antibacteriano, es decir, las bacterias expuestas a concentraciones sub-inhedorias son inhibidas en términos de crecimiento pero usualmente no son muertas (Andersson and Hughes, 2014).

## **2.7 Ensayos de toxicidad en modelo de *Artemia salina***

Los bioensayos en *Artemia salina* son métodos alternativos para probar la toxicidad en animales invertebrados (crustáceos). Esos métodos han tenido alto grado de correlación con la toxicidad aguda registrada en roedores (ratas, ratones) y pueden ser predictivos para la citotoxicidad de cultivo de células de humanos. Este método es uno de los más comunes para probar la toxicidad de extractos de plantas y compuestos naturales (Olaru *et al.*, 2014).

### 3. JUSTIFICACIÓN

La formación de swarming y de biopelículas bacterianas se puede encontrar en cualquier nicho ecológico y son de particular importancia para la industria alimentaria en general y para los alimentos perecederos en particular. En esencia, si hay bacterias presentes, cualquier superficie que combine abundante humedad y nutrientes es responsable de la formación de swarming y biopelículas.

Patotipos de *Escherichia coli* están vinculados directamente con brotes de enfermedades transmitidas por alimentos. Ésta bacteria posee entre sus factores de virulencia la capacidad para formar swarming y biopelículas, habilitando así a la bacteria para resistir ante condiciones de almacenamiento, uso de sanitizantes y antimicrobianos habituales en la industria de alimentos.

Muchos investigadores han explorado el efecto inhibitor de diversos polifenoles en bacterias planctónicas, particularmente sobre factores de virulencia de bacterias asociadas a enfermedades transmitidas por alimentos. De entre los patotipos de *E. coli* más estudiados se encuentra la O157:H7, siendo esta la de mayor importancia en los países industrializados, sin embargo, existen otros patotipos también importantes en países en vías de desarrollo tales como EPEC y ETEC, y para los cuales los estudios del efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles sobre factores de virulencia son escasos.

Los polifenoles son un vasto grupo de metabolitos secundarios que de forma general, han mostrado actividad antimicrobiana contra bacterias específicas, sin embargo, aún queda por investigar la actividad de un gran número de ellos sobre bacterias de interés en alimentos.

Aunque los enfoques tradicionales para combatir las infecciones microbianas permanecen eficaces, dirigirse a la virulencia microbiana en lugar de la supervivencia parece ser una estrategia prometedora, ya que la modulación de los factores de virulencia podría conducir a una presión evolutiva más leve para el desarrollo de la resistencia.

Por lo anterior, es necesario generar conocimiento científico sobre el efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles específicos (ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigalocatequina) sobre la capacidad de sobrevivencia, formación de biopelícula y movilidad tipo swarming de los tres patotipos más comunes de *E. coli*.

La información generada durante el desarrollo del presente estudio servirá para ampliar el conocimiento en el tema, contribuirá al entendimiento de la respuesta biológica de microorganismos patógenos de importancia en alimentos además de generar alternativas al uso de las técnicas de control de microorganismos con antimicrobianos de origen natural, como una medida tendiente de la industria de alimentos para disminuir el deterioro y la contaminación durante el manejo, conservación y almacenamiento de alimentos.

#### **4. HIPÓTESIS**

El uso de concentraciones sub-inhedorias de compuestos antimicrobianos naturales de origen vegetal (polifenoles), afectan la viabilidad, la movilidad tipo swarming y la formación de biopelícula de tres patotipos de *E. coli* (EPEC, EHEC y ETEC).

## 5. OBJETIVOS

### General:

- Evaluar el efecto de concentraciones sub-inhedorias de antimicrobianos naturales sobre la viabilidad, movilidad tipo swarming y formación de biopelícula de EPEC, EHEC y ETEC.

### Específicos:

- Determinar las concentraciones sub-inhedorias de ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigalocatequina sobre EPEC, EHEC y ETEC.
- Evaluar el efecto de las concentraciones sub-inhedorias de ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigalocatequina sobre la integridad de membrana, movilidad tipo swarming y formación de biopelícula de EPEC, EHEC, y ETEC.
- Evaluar el efecto de las concentraciones sub-inhedorias de ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigalocatequina sobre la expresión de genes asociados a movilidad y formación de biopelícula de EPEC, EHEC, y ETEC.

## 6. MATERIALES Y MÉTODOS

El estudio se realizó en el Laboratorio de Bioquímica y Genética de Microorganismos del Departamento de Microbiología e Inmunología de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

### 6.1 Compuestos naturales comerciales

Los compuestos polifenólicos naturales utilizados en este estudio fueron ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina de la casa comercial Sigma-Aldrich (USA). Se prepararon soluciones stock a concentraciones de 50 mg/ml empleando como disolvente etanol al 35%. Estas soluciones se mantuvieron en refrigeración y resguardadas de la luz durante el tiempo de uso, y a partir de las cuales se prepararon las diferentes concentraciones empleadas en los ensayos, tomando la cantidad necesaria del extracto y aforando con agua destilada al volumen deseado.

### 6.2 Cepas microbianas, condiciones de cultivo y ajuste de inóculo

Las cepas utilizadas fueron tres patotipos de *E. coli*: EPEC cepa O111:NM (43887 CDC B170), EHEC cepa O157:H7 (43895 CDC EDL 933) y ETEC cepa O78:H11 (35401 H10407) de la colección American Type Culture Collection (ATCC), las cuales al encontrarse como cultivos de reserva a -80 °C fueron activadas en caldo infusión cerebro corazón (ICC) a 37 °C por 24 horas, para posteriormente cultivarse en placas de ICC, e incubarse a 37 °C por 24 horas. Para su almacenamiento y utilización, se inocularon en agar ICC inclinado y se mantuvieron a 4 °C por periodos no mayores a tres meses. Dependiendo del ensayo, la activación de los cultivos fue en placas de agar Mueller Hinton (MH) o en caldo Luria Bertani (LB), incubando ambos a 37 °C/24 h.

Para los ensayos de CMI, CMB y el efecto de concentraciones sub-inhedoras de los polifenoles sobre el crecimiento bacteriano, las cepas fueron ajustadas a  $1 \times 10^8$  UFC/ml, tomando algunas colonias del cultivo crecido en agar MH y colocándolas en tubos con solución salina (0.85% p/v) hasta lograr una  $T_{600}$  de  $74.3 \pm 0.2$

Para los ensayos de formación de biopelícula y motilidad tipo swarming, la activación se describe en cada apartado.

### **6.3 Determinación de la CMB**

Se utilizaron microplacas estériles de 96 pozos y a las cuales se adicionaron 122.5 µl de caldo MH 2X, más 125 µl de solución de polifenoles a diferentes concentraciones más 2.5 µl de suspensión bacteriana ajustada a  $1 \times 10^8$  UFC/ml. Como control positivo se utilizó 122.5 µl de caldo MH 2X más 125 µl de agua estéril más 2.5 µl de bacteria ajustada y como control negativo se utilizó 125 µl de caldo MH 2X más 125 µl de agua estéril sin bacteria. Las placas se incubaron a 37 °C durante 24 h. Al término del lapso de incubación, se tomaron 10 µl de cada pozo y se sembraron por goteo en placas de agar MH, incubándose a 37 °C/24 h. La CMB se estableció como la concentración más baja del polifenol que inhibió completamente el crecimiento bacteriano en placas de agar.

### **6.4 Determinación del efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles sobre el crecimiento de patotipos de *E. coli***

Se probaron dos concentraciones por debajo del 75% de las CMB establecidas para cada polifenol, siendo de 750 y 1250 µg/ml, para ácido tánico y ácido gálico; 50 y 200 µg/ml para metil galato y galato de epigallocatequina.

Se recrearon las condiciones del pozo de una microplaca en matraces obteniéndose un volumen final de 15,000 µl. Se agregaron en cada matraz un volumen de 7,350 µl de caldo MH 2X, más 7,500 µl de las concentraciones baja y alta para cada polifenol, más 150 µl de suspensión bacteriana ajustada de cada patotipo de *E. coli*. Para el control positivo de crecimiento se sustituyeron los volúmenes de solución de polifenoles por agua estéril. Todos los matraces se incubaron a 37 °C y con agitación constante a 60 rpm por un periodo de 24 horas. Se llevaron a cabo muestreos al tiempo cero y después cada 2 h, hasta las 12 y 24 h. Para el monitoreo de la  $T_{600}$  nm se tomaron alícuotas de 1 ml y la cuantificación del crecimiento se llevó a cabo por diluciones seriadas, empleando como inóculo 200 µl de muestra en 1,800 µl de solución salina al 0.85% estéril. Se tomaron 100 µl de cada tubo de dilución y se sembraron por la técnica de placa vertida empleando agar MH e incubándose a 37 °C por 24 h. Las siembras en placa se llevaron a cabo por duplicado y con los resultados obtenidos por la cuantificación de colonias se elaboraron curvas de crecimiento (log UFC/ml) y de  $T_{600}$  contra el tiempo.

## 6.5 Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles en *A. salina*

Se investigó el posible efecto tóxico de las concentraciones sub-inhedorias de polifenoles utilizando como modelo de estudio de toxicidad a *Artemia salina*. Se agregaron 1 mg de quistes en agua de mar artificial (8.5 g de sal marina en 250 ml de agua destilada) manteniendo el sistema a una temperatura de 25 a 28 °C. La eclosión de la casi totalidad de las larvas se logró después de 48 horas bajo aireación constante y luz por 16 horas y 8 de oscuridad. Utilizando microplacas de 12 pozos, se colocaron en cada uno de ellos 500 µl de agua de mar, conteniendo 50 Artemias en el estadio de nauplio. Posteriormente se adicionaron 500 µl de la solución de polifenoles a concentraciones sub-inhedorias bajas y altas a cada pozo de prueba y las placas se resguardaron por 24 horas a temperatura ambiente. Tiempo finalizado se procedió a contar a las larvas vivas y muertas con ayuda de un estereoscopio. Se consideró la muerte de la larva al no detectar movimiento después de 30 segundos de observación. Los resultados se expresaron como porcentaje de mortalidad empleando la fórmula siguiente:

$$\% \text{ Mortalidad de } Artemia \text{ salina} = \frac{\Sigma \text{ nauplios muertos}}{\Sigma \text{ total de nauplios}} \times 100$$

Los experimentos se realizaron por triplicado y como control de supervivencia se utilizaron pozos con Artemias libres de polifenoles.

## 6.6 Ensayo de viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo

Los cambios en la permeabilidad de la membrana celular bacteriana posteriores a los tratamientos con concentraciones sub-inhedorias de polifenoles fueron investigados mediante citometría de flujo (FCM) según la metodología propuesta por (Witkowska *et al.*, 2013).

De cada tratamiento se tomaron 12.5 ml del cultivo y se centrifugaron a 5000 rpm/6 min. Una vez eliminado el sobrenadante, se agregaron 10 ml de solución salina al 0.85%, filtrada (0.45 µm) y estéril, dejándose en incubación por una hora a temperatura ambiente y agitando suavemente cada 15 min.

La preparación de los controles de posición fue a partir de 12.5 ml de cultivo de bacterias en caldo MH sin polifenoles, los cuales se centrifugaron a 5000 rpm/6 min. Una vez eliminado el sobrenadante se agregaron 2 ml de solución salina filtrada y esterilizada, separando éste volumen en dos tubos independientes de 1 ml cada uno, en los cuales se prepararon células vivas y células muertas para la compensación del equipo, aforándose cada uno de ellos con 9 ml de solución salina y con 9 ml de isopropanol, generando así al control positivo de integridad de membrana y al control positivo de daño a la membrana respectivamente. Ambos tubos se incubaron a temperatura ambiente por una hora y con agitación suave cada 15 minutos.

Una vez transcurrido el tiempo de incubación para los tubos problema y para los controles, se procedió a lavar con 10 ml de solución salina, para finalmente restituir el pellet a un volumen final de 5 ml, del cual se tomó el volumen necesario para ajustar los tubos con 3 ml de solución salina hasta lograr una  $T_{670}$  de 0.03. A partir de este tubo se prepararon nuevas diluciones, bajando la concentración en una proporción de 2:100 con agua miliQ estéril (20  $\mu$ l de suspensión bacteriana más 980  $\mu$ l de agua). La tinción de las células se llevó a cabo usando el kit de tinción LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fisher Scientific). Una vez aplicados los tintes a los controles y a las muestras, se dejaron reposar por 15 minutos resguardados de la luz.

El kit de tinción LIVE/DEAD BacLight (Thermo Fisher Scientific) consiste de dos colorantes para ácidos nucleicos: Syto 9 verde fluorescente y yoduro de propidio (IP) rojo fluorescente. La tinción Syto 9 verde fluorescente marcó todas las células bacterianas, mientras que el IP penetró solamente en las células que sufrieron daño en su membrana, causando una reducción en la tinción de Syto 9 cuando ambos colorantes estuvieron presentes. Así, las bacterias con su membrana celular intacta permanecieron verdes, mientras que las bacterias con daño en sus membranas se tiñeron de rojo fluorescente.

Las muestras se analizaron en un citómetro de flujo Attune<sup>®</sup> Acoustic Focusing Cytometer Maintenance Log, equipado con láser cyan de 20 mW 638 y 488 nm láser (rojo y azul). Se obtuvieron datos en dispersión frontal (FSC) y lateral (SSC), a parámetros de fluorescencia predeterminados. Se utilizó emisión de 530/30 (FL1) para

SYBR Green I. Este equipo tiene la propiedad de mostrar la estadística asociada a la adquisición de datos, por lo que se obtuvieron resultados en porcentajes de células muertas y viables en 10,000 eventos en EPEC, 8,000 eventos en EHEC y 10,000 eventos en ETEC. Los resultados se expresaron en porcentajes de poblaciones vivas y muertas. La comprobación de la viabilidad bacteriana se hizo mediante la inoculación por goteo de 5 µl de la suspensión del control y de cada tratamiento en placas de agar MH, las cuales se incubaron por 24 horas a 37 °C para verificación de crecimiento.

### **6.7 Ensayo de movilidad tipo swarming**

Para el ensayo de movilidad tipo swarming se siguió la metodología propuesta por (García-Heredia *et al.*, 2016) con algunas modificaciones. Se prepararon placas de agar suave de LB (0.35% agar) conteniendo la proporción necesaria para obtener las concentraciones bajas y altas de los polifenoles a probar. Se inocularon por goteo en el centro de la placa alícuotas de 5 µl de cultivos activados y ajustados a una concentración de  $1 \times 10^8$  células/ml ( $T_{600}$  0.85-0.90) en caldo LB. El grado de movilidad swarming se determinó mediante la medición del diámetro de la colonia, y se calculó el porcentaje de reducción de la migración swarming, empleando como control positivo las cepas de estudio inoculadas en agar suave sin polifenol. El ensayo se llevó a cabo por triplicado.

### **6.8 Determinación del índice de formación de biopelículas**

Se prepararon microplacas de 96 pozos con caldo LB 2X con los mismos volúmenes empleados para la determinación de la CMB, pero utilizando las concentraciones sub-inhedoras bajas y altas establecidas para cada polifenol y para cada patotipo (inóculos previamente ajustados a  $1 \times 10^8$  UFC/ml en solución salina 0.85%). Posteriormente se incubaron a 37 °C por 24 h, tiempo transcurrido llevó a cabo la lectura de absorbancia (630 nm) utilizando un espectrofotómetro Bio-Tek Epoch. Se retiró la suspensión de células de cada pozo con micropipeta y se lavó con agua, retirándola posteriormente y dejando secar a temperatura ambiente. Una vez seca la microplaca se agregaron 250 µl de solución de cristal violeta al 0.1% e incubándose a 37 °C/15 min, posteriormente se lavó la microplaca 3 veces con agua destilada para eliminar el exceso de colorante y se dejó secar a temperatura ambiente por segunda vez. Se resuspendió el colorante embebido en la biopelícula con 250 µl de etanol al 96% dejando reposar 5 minutos a 37

°C previo a la medición de su absorbancia a 570 nm. Se utilizaron dos controles de ensayo: en uno de ellos se usaron pozos con medio de cultivo más cada uno de los compuestos polifenólicos a las concentraciones sub-inhedorias probadas y el otro control consistió de medio de cultivo solo.

La formación de biopelícula se cuantificó como valor absoluto empleando la fórmula:  $IFB = (AB - CW)/G$ , donde para el caso del control (biopelículas bacterianas sin polifenoles), AB representó a la biopelícula teñida y medida a 570 nm y CW representó al medio libre de microorganismos teñido y medido a 570 nm. Para evaluar el efecto de los polifenoles sobre biopelículas, AB representó la absorbancia a 570 nm del medio de cultivo más el polifenol más el inóculo bacteriano y CW representó al medio de cultivo más polifenol pero sin inóculo bacteriano medido a 570 nm. En ambos casos G representó la  $A_{630}$  del crecimiento celular en cultivo suspendido medido. De acuerdo al valor IFB, las bacterias se clasificaron como fuertes formadores si el índice es mayor de 1.10, moderado si se encuentra entre 0.70-1.09, débil si está entre 0.35-0.69 y no formador de biopelícula si es menor a 0.35 (García-Heredia *et al.*, 2013).

### **6.9 Ensayo para determinar el efecto de polifenoles en la expresión de genes asociados a motilidad tipo swarming y formación de biopelículas**

Para evaluar la expresión de genes asociados a movilidad tipo swarming y formación de biopelículas, se utilizaron los patotipos de *E. coli* tratados con concentraciones sub-inhedorias bajas y altas, tomándose las muestras para el análisis de expresión genética del borde de la colonia swarming y de la biopelícula formada en cinco pozos de microplaca por tratamiento a 37 °C/24 h de incubación. La RT-qPCR se llevó a cabo según se describe a continuación:

#### **Extracción de RNA**

Las muestras fueron colectadas con PBS a un volumen final de 1 ml, centrifugándose a 12,000 g/5 min, una vez descartado el sobrenadante se añadieron 500 µl del reactivo de Trizol (Sigma Aldrich, USA), resuspendiendo varias veces para lisar el paquete celular. Se dejó incubar a temperatura ambiente por 5 min. Se añadieron 0.2 ml de cloroformo por ml de trizol (100 µl), agitando vigorosamente por 15 seg. y dejando reposar por 3

min más a temperatura ambiente. Después se centrifugaron los tubos a 12,000 g por 15 min a 4 °C. Tiempo transcurrido, se colectó la fase superior acuosa (sin color), a la cual se adicionaron 500 µl de isopropanol puro por ml de trizol (250 µl), incubándose a temperatura ambiente por 10 min. Tiempo transcurrido, se centrifugó a 12,000 g por 10 minutos a 4 °C. El lavado de RNA se hizo mediante la remoción del sobrenadante, teniendo cuidado de no desprender el pellet, el cual se lavó con etanol al 70% (500 µl), dando un pulso breve de vórtex y centrifugando a 7500 g/5 min a 4 °C. Una vez eliminado el exceso de alcohol se dejó secar el resto del etanol y resuspendiendo el RNA obtenido en un volumen de 30 µl de agua miliQ. Las muestras fueron conservadas a -80 °C hasta su uso. La concentración de RNA y la pureza se determinaron mediante la relación 260/280.

### **Retrotranscripción**

A partir del RNA obtenido se sintetizó el cDNA mediante el iScript™ cDNA Synthesis Kit (BIO-RAD) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Las condiciones del termociclador para RT-PCR fueron 5 min a 95 °C, (1x), más 35 ciclos de tres pasos: 95 °C/15s, 59.8 °C/15s, 72 °C/30s con un paso final de 3 min a 72 °C. La concentración de RNA y la pureza se determinaron mediante la relación 260/280.

### **PCR cuantitativa**

La cuantificación relativa se utilizó para obtener la magnitud de los cambios fisiológicos en los niveles de expresión genética de los genes de interés en comparación con uno o más genes de referencia. Este análisis de la expresión relativa de genes se llevó a cabo por medio del kit iQ™ SYBR® Green Supermix (BIO-RAD) y empleando el Sistema de PCR en tiempo real PikoReal™ (Thermo Scientific™). Las condiciones de trabajo fueron 3 min a 95 °C, (1x), seguido de 40 ciclos a 95 °C por 15seg y 60 °C por 45seg. Las secuencias de los primers utilizados se detallan en la tabla 2:

Tabla 2. Genes y primers usados para detectar la expresión de genes asociados a swarming y biopelícula en patotipos de *E. coli* después del tratamiento con polifenoles.

Gen de interés	Proceso fisiológico en el que participa	Secuencia	Ensayo
<i>flhC</i>	Activador transcripcional	F- CGGCAGGATTCTGGGAAAGT R- CTGGACATTGGTGCGGTTTG	Swarming
<i>fliA</i>	Biosíntesis flagelar factor sigma	F- TTAGGGATCGATATTGCCGATT R- CGTAGGAGAAGAGCTGGCTGTT	
<i>fliC<sub>EH</sub></i>	Flagelina en EHEC	F- TCAAGTTGCCTGCATCGTCT R- ACCCTTCATGCTGATGTGGG	
<i>fliC<sub>ET</sub></i>	Flagelina en ETEC	F- TGTCGCTGTTGACCCAGAAT R- AGAGAGACGTTCAATGGCGG	
<i>csgA</i>	Subunidad principal de curlina	F- TGGCAGGTGTTGTTTCCTCAGT R- GTCAGAGTTACGGGCATCAGTTT	Biopelícula
<i>csgD</i>	Regulador transcripcional	F- CCGCTTGTGTCCGGTTTT R- GAGATCGCTCGTTCGTTGTTT	
<i>cyaA</i>	Adenilato ciclasa	F- AGCTTTGGCGAGAATCAAAA R- CGCAGATGCTGGCTATAACA	
<i>rrsH</i>	rRNA 16S	F- CGATGCAACGCGAAG R- CCGGACCGCTGGCAA	Gen constitutivo

Como control interno se utilizó el gen rRNA 16S (*rrsH*), el cual se utilizó para normalizar y comparar los niveles de expresión de los genes de interés en las muestras sin tratar y con tratamiento. El cálculo de la expresión se llevó a cabo mediante el método delta delta Ct, estimando el cambio del número de veces de la expresión de los genes de interés. Las bacterias sin tratamiento se usaron como controles y como línea base para comparar la expresión génica de acuerdo con la fórmula siguiente:

$$Expresión\ relativa = \frac{(E_{target})^{\Delta CP_{target}(promedio\ del\ control - promedio\ de\ la\ muestra)}}{(E_{ref})^{\Delta CP_{ref}(promedio\ del\ control - promedio\ de\ la\ muestra)}}$$

En esta ecuación la expresión relativa del gen en estudio se expresa en una muestra frente a un control en comparación con un gen de referencia.  $E_{target}$  representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del amplicon en estudio;  $E_{ref}$  representa la eficiencia de la PCR en tiempo real del gene de referencia;  $\Delta CP_{target}$  es la desviación en Ct del promedio del control menos el promedio de la muestra del gene en estudio; y  $\Delta CP_{ref}$  es

la desviación en Ct del promedio del control menos el promedio de la muestra del gen de referencia. Todas las muestras se analizaron por triplicado.

### **6.10 Análisis estadístico**

Los diseños experimentales fueron completamente al azar. Se realizó un ANOVA ( $p \leq 0.05$ ) para estimar diferencias significativas entre los tratamientos y se aplicó la prueba de comparación de medias por el método de Tukey-Kramer. Se utilizó el software NCSS (2007).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 Concentración Mínima Bactericida

Se determinó la CMB de ácido tánico (AT), ácido gálico (AG), metil galato (MG) y galato de epigallocatequina (EGCG) para cada patotipo de *E. coli* mediante el método de dilución en microplaca, encontrando concentraciones que variaron desde 80 a 2500 µg/ml (tabla 3).

Tabla 3. Concentraciones mínimas bactericidas para patotipos de *E. coli* (µg/ml).

	CMB (µg/ml) de patotipos de <i>E. coli</i>		
	EPEC	EHEC	ETEC
Ácido tánico	1800	2500	2400
Ácido gálico	2100	2100	2200
Metil galato	80	400	600
Galato de epigallocatequina	120	300	600

Los resultados encontrados mostraron diferencias en la CMB entre compuestos y patotipos estudiados, siendo metil galato el más efectivo para inhibir el crecimiento a concentraciones de 80 a 600 µg/ml, mientras que ácido tánico fue el que menos, a concentraciones de 1800 a 2500 µg/ml. EPEC fue el patotipo más susceptible a los polifenoles probados a concentraciones de 80 a 2100 µg/ml, mientras ETEC fue el patotipo más resistente, a concentraciones de 600 a 2400 µg/ml.

### 7.2 Efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles sobre el crecimiento de patotipos de *E. coli*

Se seleccionaron arbitrariamente dos concentraciones sub-inhedoras de cada polifenol. Para el caso ácido tánico y ácido gálico se utilizaron las concentraciones de 750 y 1250 µg/ml y para metil galato y galato de epigallocatequina se utilizaron 50 y 200 µg/ml. No hubo disminución significativa ( $p \leq 0.05$ ) en el crecimiento de la población de bacterias sometidas a los tratamientos cuando fueron comparados respecto al control (figura 4). Para el caso de EPEC, solamente se probó la concentración de 50 µg/ml, ya que la concentración de 200 µg/ml sobrepasaba la CMB establecida para metil galato y galato

de epigallocatequina (80 y 120  $\mu\text{g}/\text{ml}$  respectivamente). Al no verse disminuidas las poblaciones bacterianas debido a las concentraciones sub-inhedorias seleccionadas, se tuvo la certeza para probar el efecto de éstas sobre factores de virulencia tales como motilidad swarming y formación de biopelículas de EPEC, EHEC y ETEC.

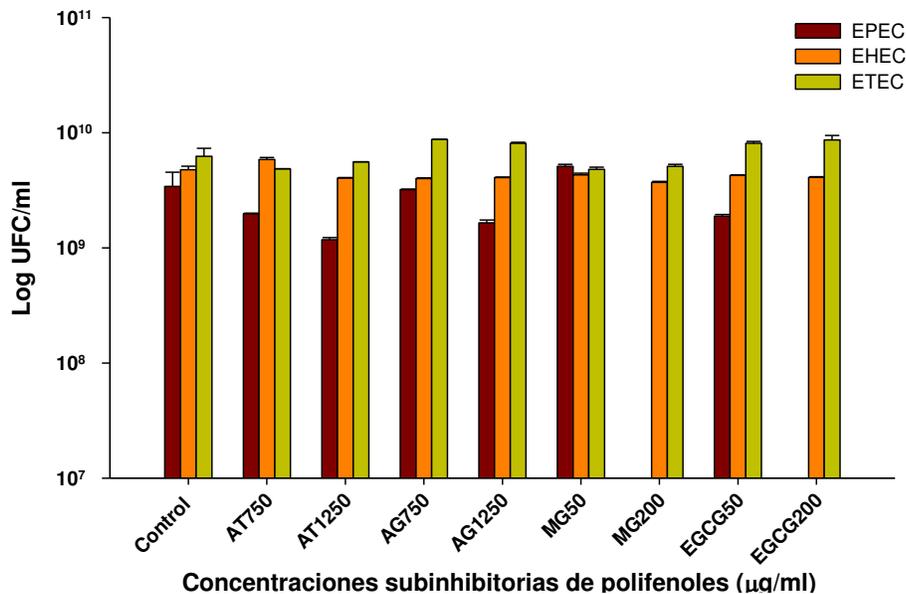


Figura 4. Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles en poblaciones bacterianas de EPEC, EHEC y ETEC.

### 7.3 Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles en *Artemia salina*

Una forma sencilla para investigar la toxicidad de los polifenoles en estudio fue a través de un bioensayo empleando larvas de *A. salina*, en el cual se determinó el porcentaje de mortalidad cuando fueron sometidas a las concentraciones sub-inhedorias (Figura 5). No hubo diferencias en el porcentaje de mortalidad entre el control (7.7%) y los tratamientos con ácido tánico (6.6 y 7.7%), metil galato (4.7 y 5.5%) y galato de epigallocatequina (4.6 y 3.9%) a las concentraciones sub-inhedorias probadas. Los tratamientos con ácido gálico a 750 y 1250  $\mu\text{g}/\text{ml}$  mostraron 93.7 y 99.8% de mortalidad respectivamente, encontrando diferencias respecto al control y los demás tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

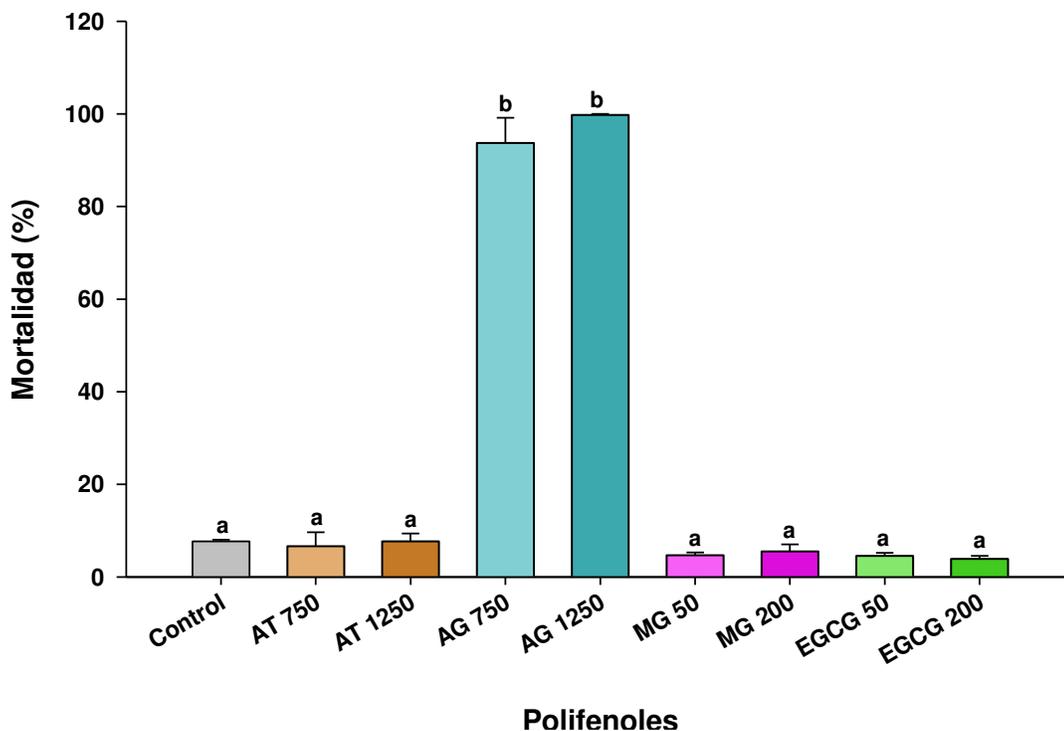


Figura 5. Mortalidad de larvas de *Artemia salina* expuestas a concentraciones sub-inhedoras de polifenoles.

#### 7.4 Efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles sobre la viabilidad bacteriana mediante citometría de flujo

El análisis por citometría de flujo de bacterias expuestas a polifenoles y su tinción con Syto 9/ioduro de propidio permitió la diferenciación de subpoblaciones bacterianas en células intactas/viables o células permeabilizadas/dañadas. Los perfiles de fluorescencia obtenidos se basaron en dos poblaciones control de referencia, una de las cuales correspondió a las células sin tratar (intactas/vivas) y las otras tratadas con alcohol isopropílico, indicadoras de células muertas (permeabilizadas/dañadas). Se estableció la compensación necesaria en función de FSC y SSC para establecer los ajustes de las intensidades de señal y los controles de posición. Para cada cepa de estudio los controles de bacterias no tratadas fueron teñidos con Syto 9 y localizados en el cuadrante inferior derecho (vivas). Para el control de las células inactivadas con alcohol isopropílico, la población fue teñida con ioduro de propidio y fueron localizadas en el cuadrante superior izquierdo (muertas).



a) vivas

b) muertas

Figura 6. Dot plots de compensación en citometría de flujo para BL1-A (Syto 9, verde fluorescente) vs. BL3-A (IP, rojo fluorescente) de EHEC.

Una vez ajustado el equipo, se analizaron los controles de viabilidad de los experimentos y los tratamientos para cada patotipo. Se observó que los tratamientos con concentraciones sub-inhedoras de ácido tánico y ácido gálico (750 y 1250  $\mu\text{g/ml}$ ), metil galato y galato de epigalocatequina (50 y 200  $\mu\text{g/ml}$ ) provocaron cambios en la permeabilidad de la membrana en los patotipos de *E. coli* analizados.

La figura 7 muestra la distribución del efecto de concentraciones sub-inhedoras de los polifenoles estudiados en EPEC, EHEC y ETEC. El análisis citométrico acoplado a la tinción con Syto 9/ioduro de propidio mostró en la figura 7a) 89.2% de células intactas en el control de EPEC, mientras que el menor porcentaje de permeabilidad (11.6) lo tuvo el metil galato a la concentración más baja, en tanto que el mayor porcentaje (16.5) lo tuvo galato de epigalocatequina a la concentración más alta. La figura 7b) muestra en el control de EHEC 90.8% de células intactas, mientras que el menor porcentaje de permeabilidad (12.6) lo tuvo el ácido tánico a la concentración baja en tanto que el mayor porcentaje (36.0) también lo tuvo ácido tánico pero a la concentración más alta. La figura 7c) muestra que los menores porcentajes de células permeabilizadas se obtuvieron en ETEC, cuyo control mostró 98.8% de células intactas, mientras que el menor porcentaje de permeabilidad (2.6) lo tuvo el ácido gálico a la concentración más alta, en tanto que el mayor porcentaje (11.5) lo tuvo el metil galato también a la concentración más alta.

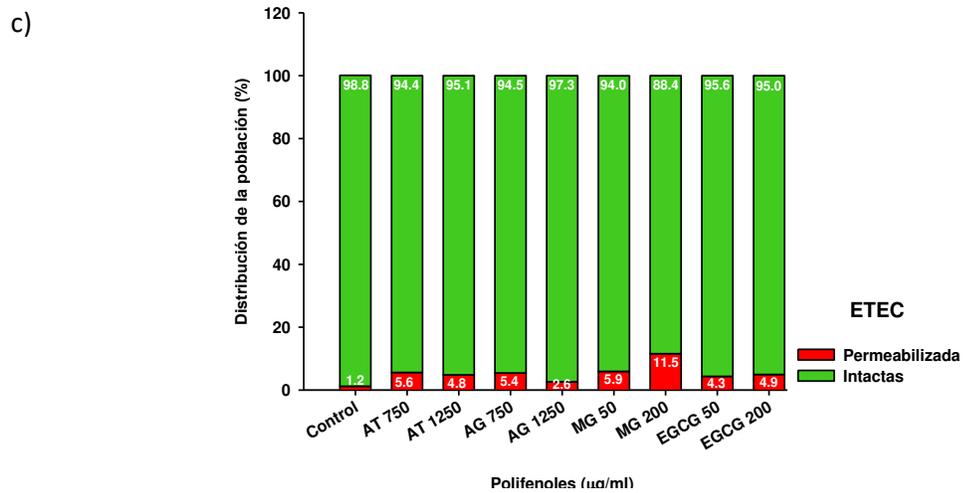
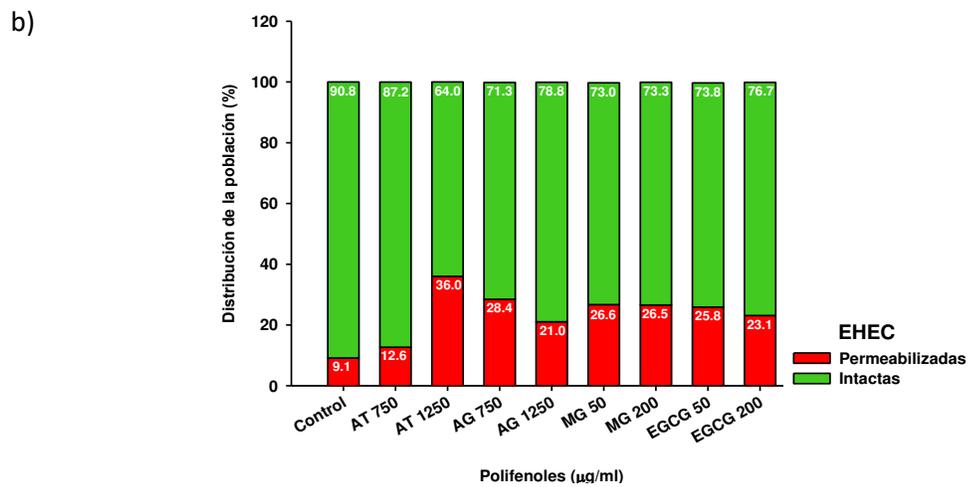
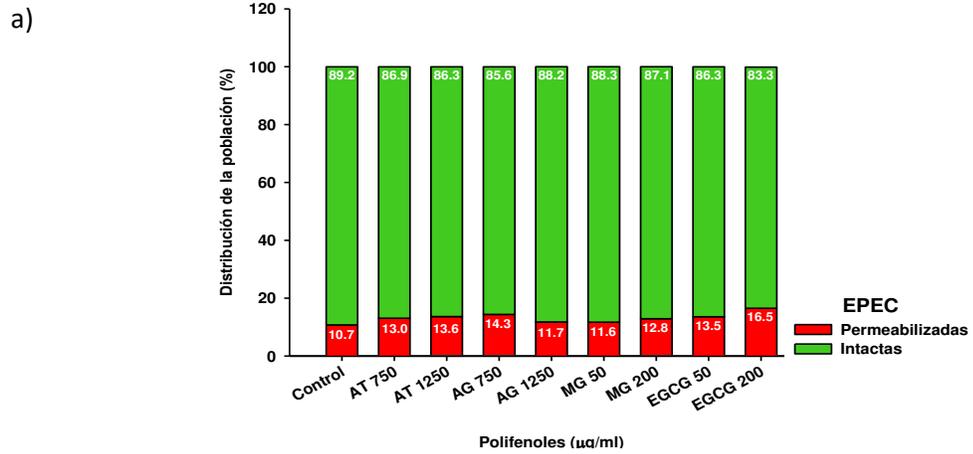


Figura 7. Efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles sobre la permeabilidad de membrana en a) EPEC, b) EHEC y c) ETEC medidos por citometría de flujo.

Para la mayoría de los casos, la mortalidad no fue dependiente de la concentración de los compuestos. Respecto a los controles, el menor porcentaje de mortalidad fue de 1.2% para de ETEC seguido de 9.1% para EHEC y 10.7% para EPEC. Comparando a los tratamientos en relación a los tres patotipos, el ácido gálico en su concentración alta (1250  $\mu\text{g/ml}$ ) fue el que provocó la menor mortalidad (2.6%) en ETEC en tanto que ácido tánico a su concentración alta (1250  $\mu\text{g/ml}$ ) fue el que indujo la mayor permeabilización de membrana con 36.0 % en EHEC.

Aunque los cultivos bacterianos mostraron lesiones por permeabilidad en membrana tanto en los controles como en los tratamientos, la viabilidad celular de los tres patotipos no fue afectada por la acción de las concentraciones sub-inhedorias de AT, AG, MG y EGCG, quedando esto demostrado por los datos de recuento en placa de agar (cinéticas de crecimiento previamente efectuadas, figura 4), por lo que se tuvo la seguridad que éstas concentraciones no afectarían el crecimiento de las bacterias durante los ensayos subsecuentes de swarming y formación de biopelícula.

### **7.5 Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles sobre la movilidad tipo swarming**

De los tres patotipos probados en este ensayo, solamente EHEC y ETEC mostraron la movilidad tipo swarming. EPEC no se evaluó debido a que corresponde a un serotipo no móvil. El diámetro de la colonia del control positivo de EHEC fue de 76 mm, y del control positivo de ETEC fue de 79 mm (Figura 8).

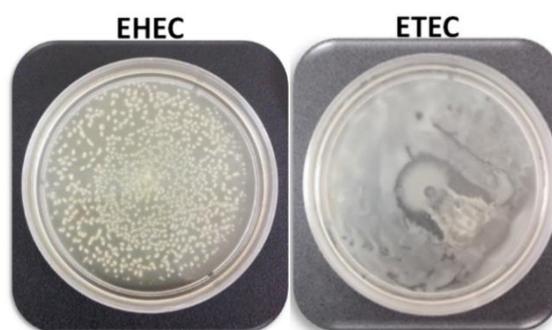


Figura 8. Movilidad tipo swarming de patotipos de *E. coli*.

El crecimiento de las colonias swarming mostró alta variación en dependencia de la cepa, tipo y concentración de polifenol. La figura 9 muestra el efecto de los polifenoles en el crecimiento (diámetro) de las colonias swarming.

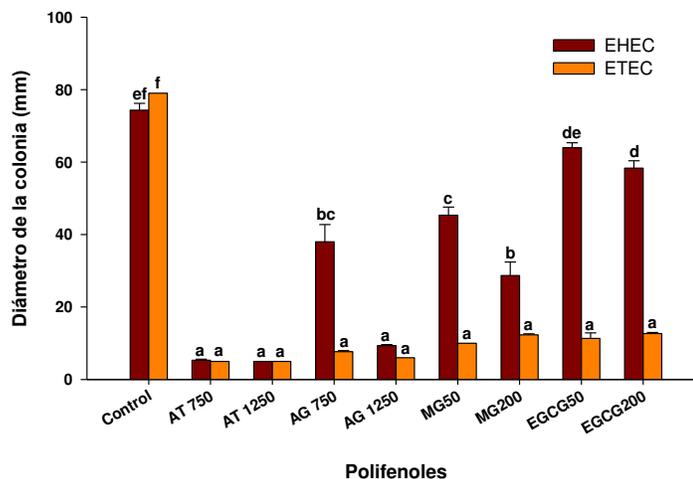


Figura 9. Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles en el diámetro de crecimiento de las colonias swarming de EHEC y ETEC.

En general los resultados encontrados muestran diferencias en la disminuci3n del movimiento tipo swarming de los patotipos estudiados por efecto de los tratamientos respecto a los controles ( $p \leq 0.05$ ), siendo el ácido tánico a las dos concentraciones sub-inhedorias probadas (750 y 1250  $\mu\text{g/ml}$ ) el compuesto que present3 la mayor inhibici3n de swarming en EHEC y ETEC, con porcentajes de 99.5 y 100% de inhibici3n respectivamente en ambos casos. La figura 10 muestra los datos en porcentajes de reducci3n de swarming.

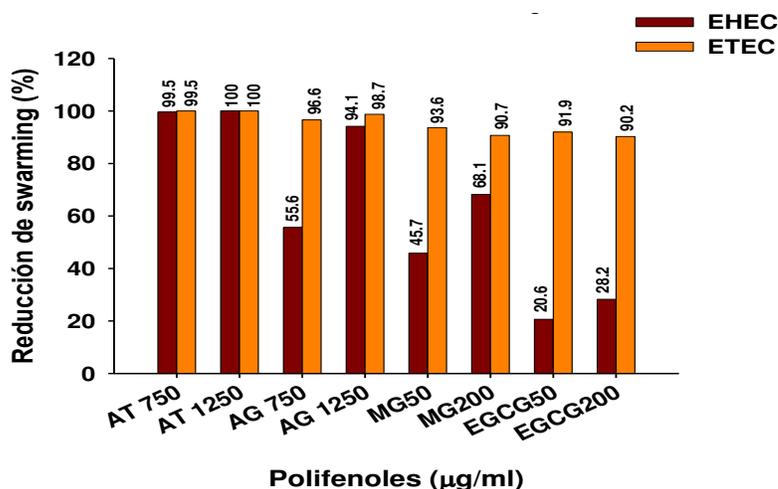


Figura 10. Reducci3n de la movilidad swarming de EHEC y ETEC por efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles.

El ácido gálico, metil galato y el galato de epigallocatequina a las concentraciones probadas inhibieron significativamente el movimiento swarming de EHEC, mostrando reducciones en rango de 20.6 al 94.1%, sin embargo, la mayor inhibición de swarming fue en ETEC, con reducciones del 90.2 al 98.7%. El galato de epigallocatequina a 50 µg/ml fue el compuesto que mostró la menor reducción de swarming en EHEC, con 20.6%, mientras que a 200 µg/ml mostró la menor reducción en ETEC, con 90.2%.

### **7.6 Efecto de concentraciones sub-inhedorias de polifenoles sobre la formación de biopelículas**

Se estableció el índice de formación de biopelículas (IFB) para los controles del ensayo a 37 °C por 24 horas, clasificando a EPEC como moderado formador (IFB: 0.94), a EHEC como débil formador (IFB: 0.53) y a ETEC como fuerte formador (IFB: 1.15). La figura 11 muestra el efecto de los tratamientos a concentraciones sub-inhedorias de los polifenoles sobre el IFB de EPEC, EHEC y ETEC después de 24 horas de incubación a 37 °C en caldo Mueller Hinton.

En EPEC (figura 11a) ambas concentraciones de ácido tánico (750 y 1250 µg/ml), incrementaron el IFB de moderado a fuerte mientras que ambas concentraciones de ácido gálico lo mantuvieron en moderado. No se encontraron diferencias significativas en la formación de biopelícula por los tratamientos con ambas concentraciones de ácido tánico, ácido gálico y a la concentración más baja de galato de epigallocatequina ( $p \leq 0.05$ ). Para el caso del metil galato, la concentración baja (50 µg/ml) provocó una considerable reducción del IFB, cambiando de moderado a no formador ( $p \leq 0.05$ ). En cambio, galato de epigallocatequina a la misma concentración mantuvo el IFB en moderado, no habiendo cambio respecto al control ( $p \leq 0.05$ ).

En EHEC (figura 11b) la concentración baja de ácido tánico (750 µg/ml) modificó el IFB de débil a fuerte, encontrándose diferencia significativa respecto al control ( $p \leq 0.05$ ), mientras que el mismo compuesto a la concentración alta (1250 µg/ml) mantuvo el IFB respecto al control, no encontrándose diferencia significativa ( $p \leq 0.05$ ). Ambas concentraciones de ácido gálico (750 y 1250 µg/ml), y de metil galato (50 y 200 µg/ml) y la concentración alta de galato de epigallocatequina (200 µg/ml), cambiaron el índice de EHEC, de débil a no formador encontrándose diferencia significativa respecto al

control ( $p \leq 0.05$ ), mientras que la concentración baja del galato de epigallocatequina ( $50 \mu\text{g/ml}$ ) incrementó el índice a moderado ( $p \leq 0.05$ ).

No se encontraron diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en los tratamientos con las concentraciones de metil galato y galato de epigallocatequina ( $50$  y  $200 \mu\text{g/ml}$ ) ya que mantuvieron el IFB de ETEC en fuerte (figura 11c). Ambas concentraciones de ácido tánico ( $750$  y  $1250 \mu\text{g/ml}$ ) disminuyeron el índice de esta bacteria a moderado y la concentración baja de ácido gálico ( $750 \mu\text{g/ml}$ ) cambió el índice a débil, encontrándose diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ). Ácido gálico a  $1250 \mu\text{g/ml}$  mostró la mayor inhibición en la formación de biopelícula, encontrando diferencia significativa respecto al control ( $p \leq 0.05$ ), ya que éste tratamiento modificó el índice de esta bacteria de fuerte a no formador.

La tabla 4 concentra los cambios en los IFB por efecto de estas concentraciones en los tres patotipos de *E. coli*.

Tabla 4. Índices de formación de biopelícula por efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles ( $\mu\text{g/ml}$ ) sobre 3 patotipos de *E. coli*.

IFB	EPEC (moderado)	EHEC (débil)	ETEC (fuerte)
Fuerte	AT 750, 1250	AT 1250	mG 50, 200, gE 50, 200
Moderado	AG 750, 1250, gE 50	gE 50	AT 750, 1250
Débil	---	AT 1250	AG 750
No formador	mG 50	AG 750, 1250, mG 50, 200, gE 200	AG 1250

En general, se observa que para EPEC el mayor efecto inhibitorio fue por metil galato a la concentración baja utilizada ( $50 \mu\text{g/ml}$ ), en EHEC fue por ácido gálico y metil galato a ambas concentraciones ( $750$ ,  $1250 \mu\text{g/ml}$  y  $50$ ,  $200 \mu\text{g/ml}$  respectivamente), y galato de epigallocatequina a la concentración alta ( $200 \mu\text{g/ml}$ ). Ácido gálico a la concentración baja ( $750 \mu\text{g/ml}$ ) fue el compuesto que logró el mayor efecto en ETEC al evitar la formación de biopelícula por esta bacteria.

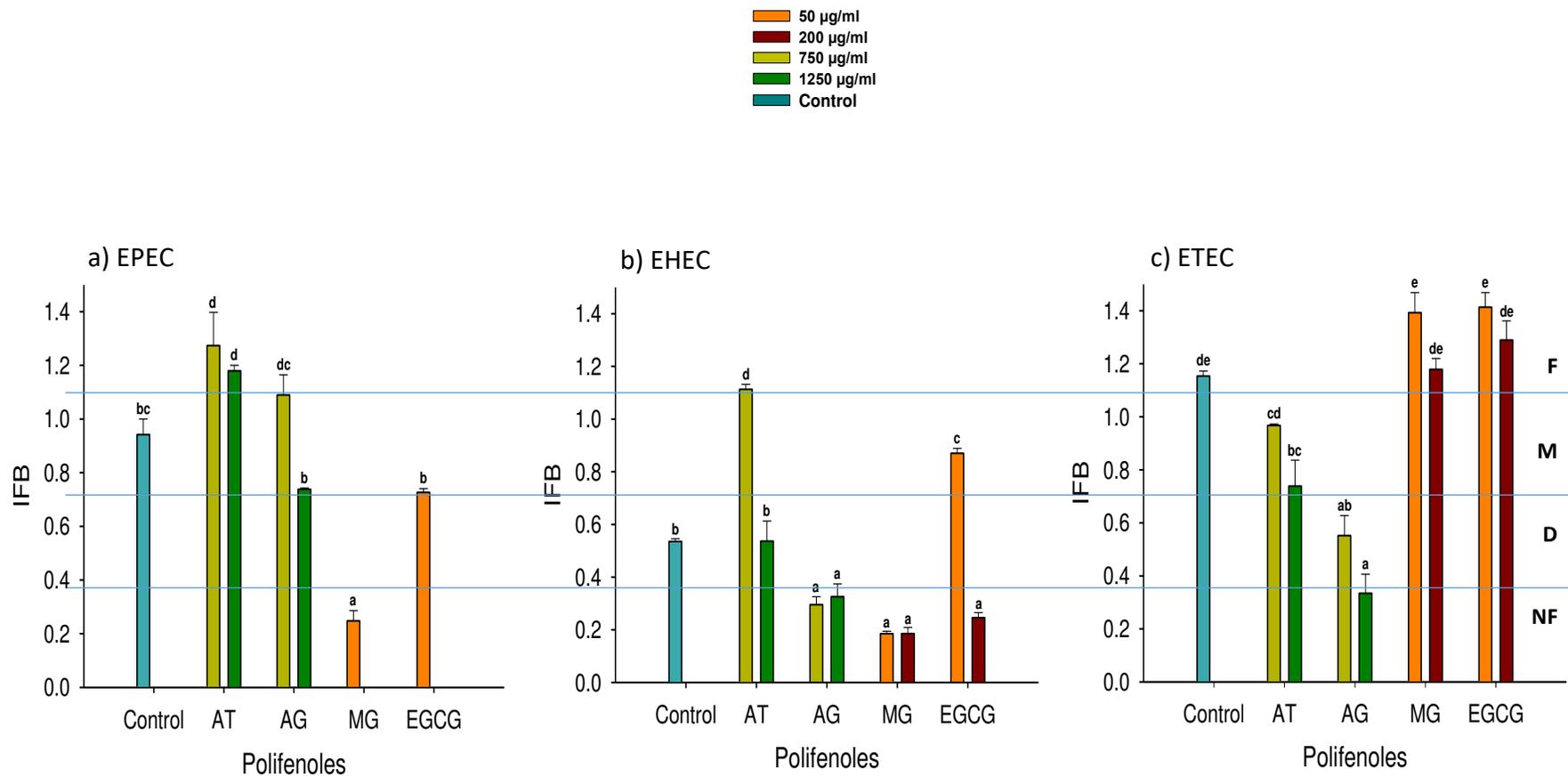


Figura 11. Efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles sobre el índice de formación de biopéculas de EPEC, EHEC y ETEC. Las líneas horizontales delimitan los rangos del IFB (NF:no formador, D:débil, M:moderado, F:fuerte).

## 7.7 Efecto de concentraciones sub-inhedoras de polifenoles en la expresi3n de genes asociados a motilidad tipo swarming y formaci3n de biopel3culas

Se analiz3 el efecto de concentraciones sub-inhedoras de 3cido t3nico, 3cido g3lico, metil galato y galato de epigalocatequina sobre la expresi3n de los genes *flhC*, *fliA* y *fliC*, los cuales est3n relacionados con la motilidad swarming en EPEC, EHEC y ETEC, comparando la variaci3n en su expresi3n con el gen normalizador *rrsH* del rRNA 16S. Valores por encima de la unidad indican sobre-expresi3n y valores por debajo de la unidad indican sub-expresi3n del gen de inter3s.

El gr3fico de la figura 12 muestra la expresi3n de genes relacionados a swarming en EPEC, en donde se observa la sobre-expresi3n de los genes *flhC* y *fliA* debido a los tratamientos con 3cido t3nico a 750 y 1250  $\mu\text{g/ml}$ . Se encontraron diferencias entre los tratamientos con AT respecto a los dem3s tratamientos en donde hubo sub-expresi3n de *flhC* y *fliA*.

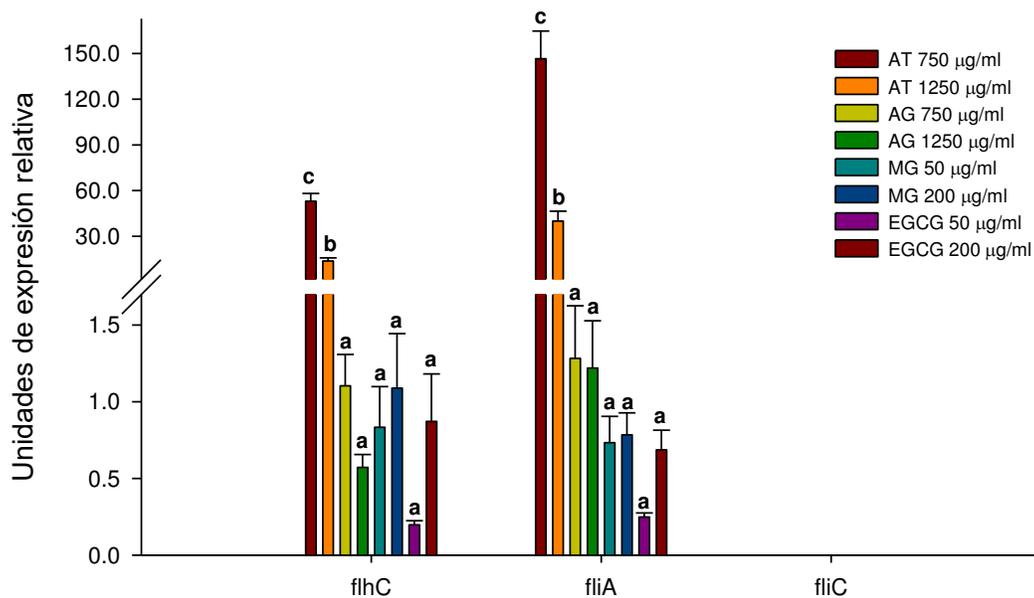


Figura 12. Expresi3n relativa de genes relacionados a swarming en EPEC debidos a tratamientos con concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG. El gen *fliC* no se analiz3 por tratarse de una cepa no m3vil.

No se encontraron diferencias entre los tratamientos con AG, MG, y EGCG pero si sub-expresi3n de *flhC* y *fliA*. ( $p \leq 0.05$ ). No se llev3 a cabo los an3lisis de la expresi3n de *fliC*

en EPEC debido a que se trata de una cepa no móvil y este gen está directamente relacionado a la construcción del flagelo.

El gráfico de la figura 13 muestra que no hubo diferencias significativas en la expresión de los genes *flhC*, y *fliA* debido a los tratamientos con concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG en EHEC ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo, sí mostraron sobre-expresión variable. Por otra parte, los tratamientos con ambas concentraciones de AT y EGCG mostraron sub-expresión del gen *fliC* en EHEC. Los tratamientos con ácido gálico (750  $\mu\text{g/ml}$ ) y metil galato a 50 y 200  $\mu\text{g/ml}$  mostraron diferencia significativa en la sobre-expresión de *fliC* respecto al resto de los tratamientos ( $p \leq 0.05$ ).

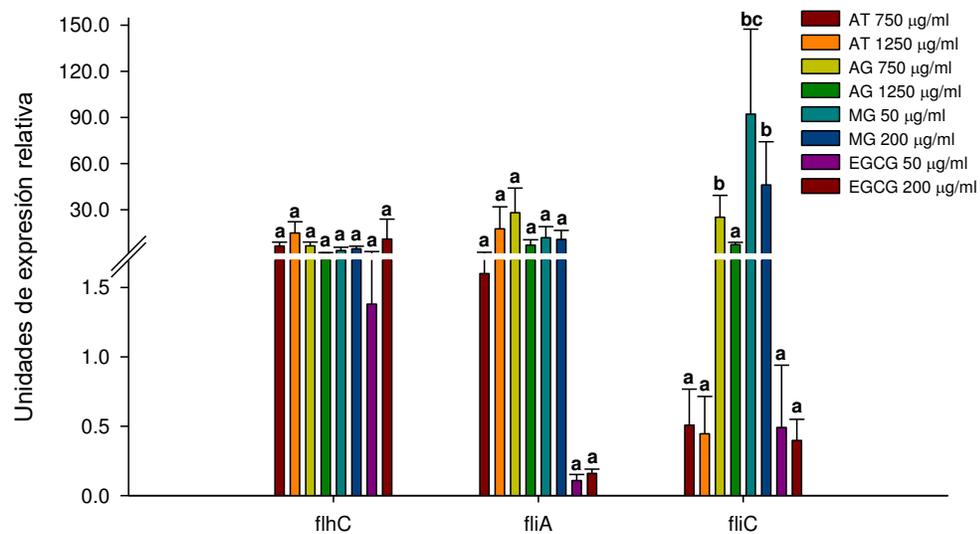


Figura 13. Expresión relativa de genes relacionados a swarming en EHEC por efecto de concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG.

El gráfico de la figura 14 muestra que no hubo diferencias significativas en la expresión de genes relacionados a swarming debida a los tratamientos con concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG en ETEC, sin embargo, se mostró sub-expresión de *flhC* con AG a 1250  $\mu\text{g/ml}$ , y de EGCG a 50 y 200  $\mu\text{g/ml}$ . Ambas concentraciones sub-inhedoras de EGCG se relacionaron a la sub expresaron de *fliA*, en tanto que AT a 750  $\mu\text{g/ml}$  y EGCG a 50 y 200  $\mu\text{g/ml}$  indujeron sub-expresión en *fliC* ( $p \leq 0.05$ ).

Al realizar el análisis de la expresión de los genes y *csgD*, *csgA* y *cyaA* relacionados a la

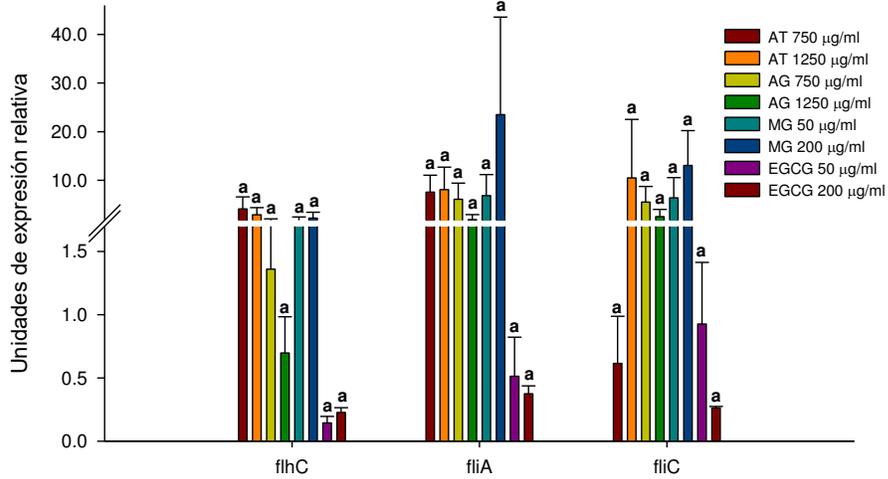


Figura 14. Expresión relativa de genes relacionados a swarming en ETEC por efecto de concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG.

formación de biopelículas en EPEC, EHEC y ETEC, se pudo observar variación en su expresión tomando como base la comparación con el gen normalizador *rrsH* del rRNA 16S. Valores por encima de la unidad indican sobre-expresión y valores por debajo de la unidad indican sub-expresión del gen de interés.

La gráfica de la figura 15 no mostró diferencias significativas en la expresión de los genes *csgD*, *csgA* y *cyaA* en EPEC, sin embargo, se indujo sub-expresión de *csgD*, *csgA* y *cyaA* debido a los tratamientos con AG a 750 y 1250 µg/ml ( $p \leq 0.05$ ).

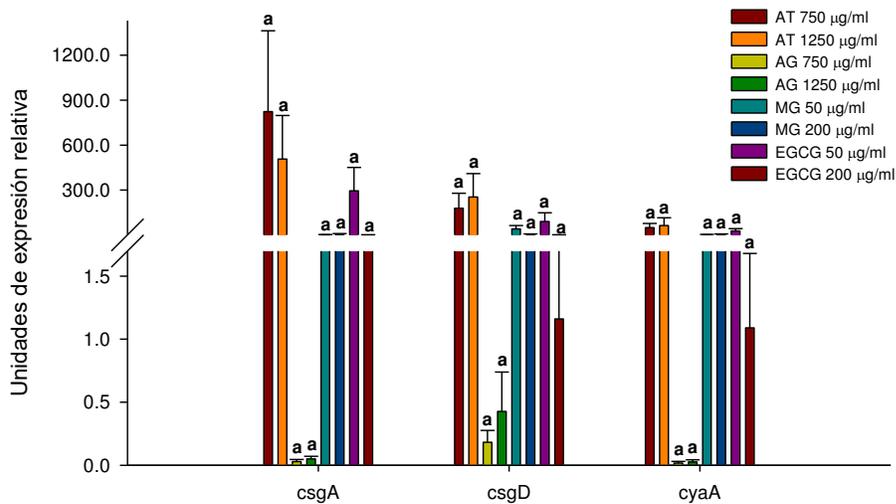


Figura 15. Expresión relativa de genes relacionados a formación de biopelícula en EPEC por efecto de concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG.

La gráfica de la figura 16 muestra el efecto de concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG sobre la expresión de genes relacionados a biopelículas en EHEC.

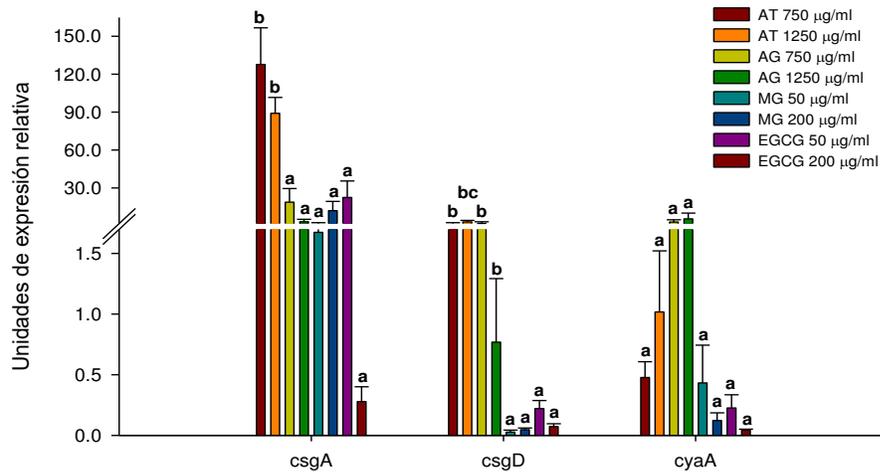


Figura 16. Expresión relativa de genes relacionados a formación de biopelícula en EHEC por efecto de concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG.

El análisis estadístico no mostró diferencias significativas ( $p \leq 0.05$ ) en la sobre expresión de *csgA* y *csgD* debido a los tratamientos con AT a ambas concentraciones (750 y 1250 µg/ml). *csgD* también se muestra sobre expresado por la concentración más alta de ácido gálico y sub expresado en la baja. No hubo diferencias significativas en los tratamientos para el gen *cyaA* ( $p \leq 0.05$ ), sin embargo, solamente los tratamientos a ambas concentraciones de AG (750 y 1250 µg/ml) indujeron sobre expresión de este gen. Los tratamientos restantes indujeron la sub-expresión de *cyaA* en EHEC.

La gráfica 17 muestra el efecto concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG sobre la expresión de genes relacionados a biopelículas en ETEC. Se encontró diferencia significativa en la expresión de *csgA* y *csgD* debido a los tratamientos de ambas concentraciones de AT y la concentración baja de EGCG en relación a los demás tratamientos, mostrando la sobre expresión de *csgA* y *csgD* en los tratamientos de ácido tánico a 750 y 1250 µg/ml y galato de epigallocatequina a 50 µg/ml ( $p \leq 0.05$ ).

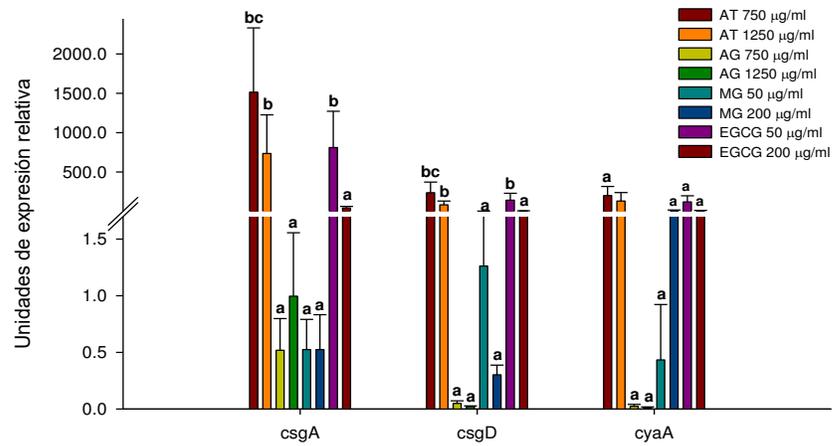


Figura 17. Expresión relativa de genes relacionados a formación de biopelícula en ETEC por efecto de concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG.

Para el caso del gen *cyaA* no hubo diferencias significativas entre los tratamientos, sin embargo, ambas concentraciones de ácido gálico y la concentración más baja de metil galato indujeron sub-expresión de este gen en ETEC ( $p \leq 0.05$ ).

## 8. DISCUSIÓN

El uso de compuestos antimicrobianos naturales en los alimentos ha ganado atención por parte de los consumidores y de la industria alimentaria. Esto se debe principalmente a que el uso inapropiado de los antibióticos ha dado lugar al dramático incremento de cepas multirresistentes y a cepas más tolerantes a procesos de elaboración y métodos conservación (Gyawali and Ibrahim, 2014).

Los enfoques tradicionales para combatir las infecciones bacterianas se fundamentan en la interrupción del crecimiento celular o la muerte de las bacterias. Los tratamientos anti-virulencia surgen como una alternativa a este problema, y se basan en el uso de compuestos naturales derivados de plantas en los cuales el blanco de acción está dirigido hacia algún factor de virulencia en lugar de la viabilidad de los patógenos. Para ello se emplean concentraciones de antimicrobianos que no maten a los microorganismos con la ventaja de que, la modulación de los factores de virulencia podría conducir a una menor presión evolutiva para el desarrollo de la resistencia. Se han identificado factores de virulencia como blancos de acción, tal es el caso de la formación de biopelículas y la motilidad bacteriana entre otros (Roy *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2016).

Múltiples estudios se han llevado a cabo utilizando extractos de plantas, basándose la mayoría de ellos en el análisis del efecto de éstos sobre factores de virulencia, e identificándose entre los compuestos activos a los de tipo polifenólico. Comúnmente estos y otros compuestos activos con propiedades antimicrobianas se encuentran en mezclas complejas, requiriendo la mayoría de las veces grandes cantidades de extracto para abolir algún factor de virulencia, sin embargo, se ha reportado recientemente que el uso de compuestos puros de tipo polifenólico pueden inhibir eficientemente el crecimiento de patógenos transmitidos por alimentos, entre ellos *E. coli* (Díaz-Gómez *et al.*, 2014).

En este trabajo se determinó la actividad de compuestos polifenólicos puros sobre índices fisiológicos de tres patotipos de *E. coli*, tales como viabilidad, integridad de membrana, movilidad tipo swarming y formación de biopelículas así como la expresión de genes asociados a estos factores de virulencia.

Las CMB de polifenoles sobre EPEC, EHEC y ETEC mostraron diferencias entre cepas, comprendiendo un rango de 80 a 2500 µg/ml. Estas variaciones pueden deberse a características físicas y químicas de la propia actividad antimicrobiana de los polifenoles utilizados, tales como el tamaño de molécula, su hidrofobicidad, la concentración del inóculo, especie de microorganismo y diferencias de susceptibilidad de las cepas atribuidas a su estructura (Daglia, 2012).

Las CMB de AT fueron similares a las reportadas por Taguri *et al.* (2004) contra EHEC de 1680 µg/ml y 2560 µg/ml para ETEC (Taguri *et al.*, 2004), mientras que la CMB de AG más alta encontrada en nuestro trabajo (2200 µg/ml para ETEC) estuvo muy por debajo a lo reportado por Borges *et al.* (2013) de 5000 µg/ml contra *E. coli* ATCC 25922. El uso de compuestos puros comerciales hace posible utilizar cantidades menores del compuesto en relación a los extractos obtenidos de plantas. Esta observación coincide con la de Yanagawa *et al.* (2003) que afirman que los polifenoles en extractos de plantas son compuestos antibacterianos menos eficaces que los correspondientes compuestos puros (Yanagawa *et al.*, 2003). No se encontraron reportes referentes al uso del MG en presentación de compuesto puro comercial, por lo que las CMB de MG establecidas en nuestro trabajo usualmente estuvieron muy por debajo a las reportadas por varios autores, por ejemplo, Ekprasada *et al.* (2015) reportaron CMB de 7.5 mg/ml contra *E. coli* cuando emplearon extractos de hojas de *Toona sureni*, planta medicinal de uso común en Indonesia utilizada como remedio contra enfermedades diarreicas, caracterizándose como principio activo al metil galato (Ekprasada *et al.*, 2015). Respecto al EGCG se obtuvieron concentraciones similares a las reportadas por Lee *et al.* (2009) de 539 µg/ml contra *E. coli* O157:H7 y de 720 µg/ml reportadas por Taguri *et al.* (2004) para ETEC. Cui *et al.* (2012) demostraron que el EGCG afectaba la envoltura celular de bacterias Gram positivas y Gram negativas de diferente manera, confirmando por citometría que la afectación de bacterias Gram negativas por este compuesto es por estrés oxidativo, mientras que en el caso de las Gram positivas el efecto es por unión a componentes de pared. En general se puede apreciar que el MG fue el compuesto que presentó la mayor actividad antimicrobiana para los tres patotipos, debido a que fue el compuesto que requirió las CMB más bajas para los tres patotipos.

De acuerdo a la susceptibilidad de las cepas estudiadas, se encontró que EPEC fue la cepa más susceptible en un rango que va de 80 a 2100  $\mu\text{g/ml}$ , mientras que para inhibir a ETEC se necesitaron concentraciones mayores que van de 600 a 2400  $\mu\text{g/ml}$ . Choi *et al.* (2014) probaron extractos de *Galla Rhois* contra 10 cepas de *Salmonella* encontrando un rango de variabilidad en las CMB de 3.9 a 125  $\mu\text{g/ml}$ , siendo el MG el principio activo mayoritario identificado para esta planta (Choi *et al.*, 2014). Las variaciones entre cepas son similares a las encontradas en la presente investigación, es decir, aquí también obtuvimos variaciones en las CMB para los patotipos de *E. coli*, lo que indica que no todas las cepas de un mismo género tienen la misma susceptibilidad cuando son retadas con antimicrobianos naturales. Lo anterior también queda confirmado por Taguri *et al.* (2004) quienes mostraron la variabilidad en CMB de  $1519 \pm 949$   $\mu\text{g/ml}$  en al menos 20 cepas de *E. coli* (entre ellas cuatro cepas no patogénicas, diez cepas de EHEC, dos cepas de EIEC y cinco cepas de ETEC) cuando emplearon el método de microdilución en caldo. Estos autores sugieren que la razón principal de las diferencias en la susceptibilidad bacteriana podrían ser características o estructuras muy específicas entre patotipos, así como variaciones en la composición de la membrana externa que rodea la pared celular en las bacterias Gram negativas, la cual restringe la difusión de compuestos a través de la cubierta lipopolisacáridica. Además, el espacio periplásmico contiene enzimas que son capaces de romper moléculas extrañas que han logrado penetrar al interior y que en un momento dado puedan causar variación en la respuesta ante el antimicrobiano (Klančnik *et al.*, 2010).

A diferencia de los antibióticos que tienen como objetivo inhibir el crecimiento celular, a últimas fechas se ha vuelto importante el encontrar inhibidores de factores de virulencia que no afecten el crecimiento bacteriano, y en consecuencia reducir la posibilidad de desarrollar resistencia a los antibióticos/antimicrobianos (Lee *et al.*, 2013). Es por ello que a últimas fechas ha habido numerosas investigaciones en las cuales se hace uso de concentraciones sub-inhedoras. Así entonces, una vez establecidas las CMB, se probaron dos concentraciones sub-inhedoras de AT, AG, MG y EGCG con el propósito de evaluar su efecto en la expresión fenotípica de dos factores de virulencia seleccionados en EPEC, EHEC y ETEC. Para ello fue necesario comprobar primeramente que dichas concentraciones no tuvieran efecto sobre el crecimiento y viabilidad de las cepas. Esto se

hizo mediante el conteo de colonias en placa de agar MH. Los resultados mostraron que las concentraciones subletales seleccionadas (750 y 1250 µg/ml para AT y AG; 50 y 200 µg/ml para MG y EGCG) no tuvieron efecto sobre el crecimiento respecto al control ( $p \leq 0.05$ ), por lo que se tuvo la seguridad de utilizar estas concentraciones para evaluar su efecto sobre la motilidad tipo swarming y la formación de biopelículas. Un reporte similar al nuestro en el que emplearon concentraciones sub-inhedoras contra factores de virulencia es el reportado por Dusane *et al.* (2015), quienes utilizaron concentraciones sub-inhedoras de 0 a 125 µg/ml de AT y de 0 a 1000 µg/ml de AG para ver su efecto sobre el crecimiento, motilidad y formación de biopelículas en cepas de *C. violaceum* (las CMI fueron de 250 µg/ml para AT y 2000 µg/ml para AG), encontrando inhibición variable en la formación de swarming y biopelículas.

Lee *et al.* (2009) probaron concentraciones sub-inhedoras de EGCG en *E. coli* O157:H7 en un rango que va de 1 a 100 µg/ml (La CMI fue de  $539 \pm 22$  µg/ml), encontrando que a 25 µg/ml, la tasa de crecimiento no fue afectada, pero la concentración del autoinductor 2 (AI-2), la formación de biopelículas y la motilidad swarming disminuyeron. Aunque en nuestro trabajo no se evaluó la concentración de autoinductores, también se encontró la disminución en la movilidad swarming y formación de biopelícula en EHEC por efecto del EGCG. Los autores argumentan que estos resultados sugieren que el efecto inhibidor de EGCG en la formación de biopelículas y motilidad swarming está asociado con la producción reducida de AI-2. Numerosos reportes han demostrado que swarming y biopelículas son fenotipos regulados por *quorum sensing* (Daniels *et al.*, 2004; Roy *et al.*, 2011; Yang *et al.*, 2016).

La supervivencia y muerte bacteriana puede ser observada con métodos de cultivo tradicionales, sin embargo, éstos consumen tiempo considerable. Recientemente la citometría de flujo se ha vuelto una herramienta potente en microbiología, ya que permite evaluar el efecto de diversos tratamientos sobre patógenos transmitidos por los alimentos más rápidamente. Permite dar seguimiento a los cambios en la morfología celular y estimación del mecanismo de acción de antimicrobianos sobre patógenos transmitidos por alimentos (Gyawali *et al.*, 2014). Una de las formas de investigar la viabilidad bacteriana es a través de la evaluación de la integridad de su membrana mediante el uso del kit de

tinción Live/Dead BacLight (Thermo Fisher Scientific) en combinación con citometría de flujo.

Se ha reportado que la actividad antimicrobiana de polifenoles puede ser debida a diferentes mecanismos, entre los cuales, el daño a membrana celular es un blanco de acción. La afectación a las membranas puede ser de diferentes tipos, tales como la alteración de su composición, aumento de su permeabilidad o hiperpolarización. Otros daños atribuidos a polifenoles incluyen la disminución de la concentración de ATP celular y disminución del pH citoplásmico (Borges *et al.*, 2013). Así entonces, fué de nuestro interés conocer si las concentraciones sub-inhedorias de AT, AG, MG y EGCG seleccionadas tenían efecto sobre la viabilidad bacteriana debido a daño en membranas.

Algunos autores sugieren que el grupo activo -OH de los polifenoles promueve la deslocalización de electrones que actúan como intercambiadores de protones y gradiente a través de la membrana citoplasmática de las bacterias. Esto causará el colapso de la fuerza motriz del protones y el agotamiento del pool de ATP y finalmente conduciendo a la muerte celular por despolarización de la membrana (Gyawali and Ibrahim, 2014).

Aun cuando los ensayos citométricos hayan mostrado reducción en las poblaciones de los tratamientos, el conteo de UFC en placas confirmó la viabilidad de las bacterias en log 10<sup>9</sup>. El menor porcentaje de viabilidad (64%) se encontró en el tratamiento de EHEC con AT a alta concentración, no mostrando diferencia significativa en el recuento en placa ( $p \leq 0.05$ ). Esta inconsistencia puede ser atribuida a variaciones experimentales durante la preparación de la muestra, además de considerar que el ensayo citométrico fue de muestra única para todos los tratamientos. Por otra parte es posible considerar la capacidad de recuperación de *E. coli* ante los polifenoles.

Cetin-Karaca and Newman (2015) reportaron la capacidad de recuperación de *E. coli* O157:H7 posterior a tratamientos con MIC de diferentes compuestos polifenólicos expuesta por 24 y 60 horas de incubación. En general, las bacterias después del tratamiento con polifenoles mostraron una gran cantidad de material adherido alrededor de la pared celular. Estos resultados fueron confirmados por microscopía electrónica de barrido, la cual evidenció la distorsión y expansión de la estructura física celular, sugiriendo que esta expansión podría provocar la desestabilización y aumento en la

permeabilidad de la membrana y fuga de varios constituyentes intracelulares vitales, tales como iones, ATP, ácidos nucleicos y aminoácidos. En base a sus hallazgos, los autores también concluyen que los patógenos (*S. paratyphi* y *E. coli* O157:H7) tratados con los diversos polifenoles se recuperaron y volvieron resistentes con la incubación prolongada, sugiriendo que la adaptación de estas bacterias a los compuestos fenólicos puede conducir a la resistencia, lo que puede interferir con el almacenamiento a largo plazo de alimentos tratados con polifenoles (Cetin-Karaca and Newman, 2015).

La motilidad bacteriana es un proceso complejo que emplea mecanismos tales como swimming y swarming los cuales contribuyen a la subsecuente formación de biopelículas, siendo fundamentales en la interacción huésped-microbio y en su patogénesis (Shi *et al.*, 2017). En este estudio, encontramos que todas las concentraciones sub-inhedoras probadas redujeron en grado variable la motilidad tipo swarming de EHEC y ETEC, siendo el más efectivo para ello el AT en sus dos concentraciones (99.5% y 100% de reducción para ambos casos), sin embargo, ambas concentraciones de este compuesto incrementaron el IFB en dos cepas (EPEC y EHEC) y disminuyeron el índice en una de ellas (ETEC). Nuestros resultados fueron similares a los obtenidos por Dusane *et al.* (2015) cuando obtuvieron disminución del swarming de *C. violaceum* tratado con sub-MIC de  $\geq 60$   $\mu\text{g/ml}$  de AT pero incremento en la formación de biopelículas (Dusane *et al.*, 2015). La función primaria del operón master *flhDC* es el control de la biogénesis del flagelo, pero en *E. coli*, *Serratia liquefaciens* y *P. mirabilis* FlhDC también reprime la división celular (Fraser *et al.*, 2000), además de ser el regulador clave en la diferenciación celular swarmer en varias *Enterobacteriaceae*. El análisis de la expresión de genes reveló sobre-expresión de *flhC* y *fliA* con ambas concentraciones de AT para las tres cepas, sin embargo, la expresión de *fliC* (gen para la expresión subunidad proteica de flagelina que se polimeriza para formar el filamento del flagelo bacteriano) estuvo disminuida en EHEC y ETEC por la concentración más baja de AT y por la concentración más alta pero solo en EHEC. Debido a que ambas concentraciones mostraron disminución significativa de swarming, esto sugiere que el AT podría estar actuando de dos formas, una de ellas mediante la disminución de la expresión de flagelina (en el caso de EHEC) y el otro mediante la probable obstrucción física del compuesto con el flagelo (en el caso de ETEC), ya que autores como O'May *et al.* (2012) proporcionaron algunas evidencias de

la interacción física entre el AT y los flagelos bacterianos de *P. aeruginosa*, y sugieren que tal interacción bloquea el swarming de la bacteria resultando en el incremento de la formación de biopelículas. Los autores también demostraron que el AT también proveía de mayor protección a las bacterias ante los efectos de algunos antibióticos probados. Respecto al análisis de genes relacionados a biopelículas, numerosos autores han señalado que la producción de flagelos, fimbria Tipo 1, curli, exopolisacáridos de celulosa y adhesinas específicas de membrana externa (Niba *et al.*, 2007) son sin duda los más comunes contribuyentes a la formación de biopelículas por *E. coli* y *Salmonella* spp. La producción de fimbria curli y celulosa en *E. coli* es compleja e involucra a muchos reguladores y está regulado de forma inversa con el sistema del flagelo. El análisis de la expresión de genes relacionados a la formación de curli reveló de forma general, sobre-expresión de *csgA*, *csgD* y *cyaA* para los tratamientos con AT en las tres cepas, lo que es congruente con la formación de biopelículas en grado variable. *csgD* es un regulador transcripcional clave que controla la transición del estado planctónico al multicelular mediante la regulación de la producción de curli y celulosa, participa en el control de la respuesta al estrés y la adaptación celular al medio ambiente y junto con *csgA* y otros reguladores influyen a favor de la formación de biopelículas (Uhlich *et al.*, 2009). La formación de biopelícula y la sobre-expresión de estos genes ponen de manifiesto la respuesta al estrés por parte de estas bacterias. Se concluye que AT fue efectivo en la disminución de swarming pero no así en la disminución significativa en la formación de biopelículas por parte de los patotipos de *E. coli*.

El AG a la concentración sub-inhibitoria alta disminuyó casi por completo el swarming de EHEC y ETEC en 99.9%, mientras que esta misma concentración logró disminuir el IFB de EHEC de débil a no formador y en ETEC de fuerte a débil formador. Estos resultados coinciden a los reportados por Dusane *et al.* (2015) cuando probaron concentraciones sub-MIC de AG (250-1000 µg/ml) en *C. violaceum*, donde también obtuvieron reducción de la biopelícula sin incremento de swarming. En EPEC éste compuesto mantuvo el índice sin cambio respecto al control, aunque, la concentración más alta logró una disminución parcial en la biopelícula. Se encontró sobre-expresión de los genes flagelares por los tratamientos con AG en EHEC y ETEC y ligera sub-expresión de *flhC* en EPEC a la concentración más alta. Por otra parte se encontró represión en *csgA*, *csgD* y *cyaA* en

EPEC y ETEC a ambas concentraciones y en EHEC solo a la concentración más alta. Debido a que EPEC mantuvo la formación de biopelícula respecto al control, esto nos hace pensar que la bacteria posiblemente utiliza otros sistemas de adhesión diferentes al sistema curli, incluyendo al “pili formador de penachos” (BFP “*bundle forming pili*” por sus siglas en inglés) y al filamento EspA (Moreira *et al.*, 2006). En general estos resultados indican que el AG a 1250 µg/ml está actuando positivamente en la represión del sistema de genes curli pero no así en el sistema flagelar. El hecho de que las bacterias conserven sin alteración sus genes flagelares y no realicen swarming puede deberse a que el compuesto actúe a otro nivel. Ali *et al.* (2014) sugieren que la actividad inhibitoria del AG puede ser debida a la quelación de iones metálicos que funcionan como cofactores, los cuales son necesarios para la actividad enzimática y crecimiento de la célula, ocasionando un daño generalizado en la fisiología de la célula sin verse afectado el crecimiento (Ali *et al.*, 2014). Se concluye que éste fue el compuesto que a la concentración más alta logró disminuir el IFB en los tres patotipos simultáneamente con el bloqueo del swarming.

Ahora bien, en nuestra investigación el tratamiento con AG fue el único que mostró mayor porcentaje de mortalidad y diferencia significativa en los ensayos con *Artemia salina*. Esto pudo deberse a la elevada concentración utilizada en este modelo de estudio, ya que Faried *et al.* (2006) al estudiar el efecto anticancerígeno del AG aislado de una hierba medicinal y ensayar su toxicidad en nauplios de *A. salina*, determinando una DL<sub>50</sub> de 5.8 µg/ml, concentración muy por debajo de las utilizadas en nuestra investigación (750 y 1250 µg/ml). Esta DL<sub>50</sub> ubica a AG como un compuesto extremadamente tóxico (Robles-García *et al.*, 2016). Sin embargo, Faried *et al.* (2006) reportaron que este compuesto inhibe el crecimiento celular de varias líneas celulares cancerígenas de manera dosis-dependiente y que a diferencia de esto, no hubo reducción de la expresión proteica relacionada con la supervivencia en células CHEK-1 no cancerosas, por lo que sugieren que es tentador especular que AG podría ser menos dañino para las células normales (Faried *et al.*, 2007).

Las concentraciones subletales de MG disminuyeron la formación de biopelículas en EHEC, cambiando el IFB de débil a no formador, en tanto estas mismas concentraciones disminuyeron parcialmente el swarming sin lograr abolirlo por completo (aproximadamente 50% de disminución). Los genes flagelares *flhC*, *fliA* y *fliC* mostraron sobre-expresión en EHEC debida a ambos tratamientos de MG, lo que explica el swarming formado por esta bacteria, en tanto que *csgD* y *cyaA* mostraron fuerte sub-expresión lo que podría explicar el cambio del IFB de débil a no formador. Por otro lado *csgA* (gen responsable de la producción de la curlina) mostró sobre-expresión, sin contribuir ésto en la producción de una biopelícula mejorada respecto al control. Lo anterior pudo deberse a que al estar sub-expresado *csgD*, no pudo llevarse a cabo de manera favorable la producción de celulosa, pues ésta es necesaria para el establecimiento de biopelículas por una vía diferente a *csgA* (Pesavento *et al.*, 2008). Para el caso de ETEC se encontró una relación inversa entre swarming y la producción de biopelícula, debido a que MG redujo significativamente el swarming (aproximadamente 90% de reducción), manteniendo el IFB en fuerte formador pero incrementando el valor respecto al control. La relación inversa entre swarming y la formación de biopelículas en *E. coli* O157:H7 ha sido reportada por Lee *et al.* (2013), quienes usaron mutantes deficientes en su capacidad swarming y estudiando su relación con la producción de biopelículas cuando utilizaron trans-resveratrol extraído de una fuente vegetal (Lee *et al.*, 2013). Ahora bien, se encontró sobre-expresión de los genes flagelares y sub-expresión de la mayoría de los genes asociados a la producción de curli en ETEC. Al estar bloqueado casi completamente el swarming de ETEC y al estar en sobre-expresión los genes flagelares con una formación robusta de biopelícula, podemos suponer que los flagelos participan en la formación de biopelículas por una vía diferente al sistema curli. Rossez *et al.* (2015) reportan que la adherencia mediada por flagelos no tiene que ser directa; ya que ellos pueden actuar como andamios moleculares extendidos para otras adhesinas secretadas. EtpA, una exoproteína de adhesión de ETEC, interactúa con la región conservada de flagelina, al acceder al lado distal del flagelo. Este "puente" permite la adhesión indirecta de los flagelos a los tejidos de la mucosa intestinal (Rossez *et al.*, 2015). Luego del contacto, la expresión de EtpA disminuye; mientras que la expresión de la fimbria tipo 1 y

la adhesina EaeH aumentan (Fleckenstein *et al.*, 2010). EtpA es degradada por EatA con lo cual se modula la adhesión y se aumenta la secreción de la toxina LT. Se ha propuesto que el flagelo con EtpA acerca la bacteria al epitelio para ayudar a la interacción de los factores de colonización (CF por sus siglas en inglés). Luego, EatA degrada a EtpA y finalmente, Tia y TibA (proteínas adhesivas en ETEC) realizan una adherencia más cercana (Clements *et al.*, 2012). Ambas están involucradas en la invasión y adherencia al epitelio, participando Tia en la autoagregación y la formación de biopelículas (Croxen *et al.*, 2013). También se ha reportado que los flagelos expresados por EHEC y ETEC median la unión a espinacas, lechugas y hojas de albahaca (Rossez *et al.*, 2015). Aunque hubo sobre-expresión de los genes relacionados a la producción de biopelículas en EPEC, el ensayo fenotípico mostró la disminución del IFB, debido probablemente a interferencia del MG en la expresión o actividad del BFP y EspA. Moreira *et al.*, (2006) reportaron que mutantes que no expresan BFP o EspA producen biopelículas mas difusas en relación al control , sugiriendo que BFP está juega un papel preponderante en la agregación interbacterial durante el desarrollo de la biopelícula (Moreira *et al.*, 2006). Por otra parte, Choi *et al.* (2014) reportó que el mecanismo primario de acción del MG es vía inhibición de la DNA girasa de Salmonella, sin interferencia con la síntesis de pared celular (Choi *et al.*, 2014). Después de la revisión de la literatura, encontramos que a la fecha son casi nulos los reportes sobre el uso del MG puro comercial en patotipos de *E. coli* y su efecto en swarming y biopelículas.

De los compuestos ensayados, ambas concentraciones de EGCG fueron las que produjeron la menor reducción del swarming en EHEC (20.6% y 28.2%) a pesar de que *fliA* y *fliC* se encontraron sub-expresados, lo que supondría la nula o poca producción de swarming. Ahora bien, el cambio en el IFB de EHEC de débil a no formador debido a la concentración más alta de EGCG (200 µg/ml) fue consistente con la sub-expresión de los genes asociados a curlí. Se ha demostrado que mutantes de *E. coli* deletados en genes relacionados a la biosíntesis flagelar y genes de motilidad, de entre los que se incluyen *cyaA*, mostraron severos defectos en la formación de biopelícula y pérdida de motilidad (Niba *et al.*, 2007; Hufnagel *et al.*, 2016). Para el caso de ETEC la sub-expresión de los genes flagelares se acompañó con la disminución en poco más del 80% de swarming, en tanto que la formación de biopelícula fue aumentada en su índice por ambas

concentraciones, situación que es consistente con la sobre-expresión de *csgA*, *csgD* y *cyaA* también a ambas concentraciones. De igual forma se encontró la sub-expresión de *flhC* y *fliA* y la sobre-expresión de genes curli en EPEC, lo que explica la formación de biopelícula en el mismo índice respecto al control. Los resultados en la expresión de genes de EPEC y ETEC fueron los más consistentes respecto al control inverso entre los sistemas FlhDC/motilidad y el sistema  $\sigma^S$ /curli (Pesavento *et al.*, 2008). Un posible mecanismo de acción fue reportado por Cui *et al.*, (2012), quienes observaron mediante microscopía de fuerza atómica alteraciones morfológicas inducidas por concentraciones sub-inhedoras de EGCG en bacterias Gram positivas y Gram negativas, entre ellas *E. coli* O157:H7, demostrando que este compuesto induce perforaciones y surcos en la envoltura celular que eventualmente desaparecen, manifestando una eventual recuperación por parte de las bacterias ante el EGCG (Cui *et al.*, 2012).

## 9. CONCLUSIONES

- 1) El ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina (compuestos puros comerciales) poseen actividad antibacteriana contra los patotipos de *Escherichia coli* EHEC, EPEC y ETEC.
- 2) En función de la CMB, metil galato fue el compuesto que mostró la mayor actividad antimicrobiana, siendo EPEC la cepa más sensible, seguida de EHEC y posteriormente ETEC.
- 3) La exposición a concentraciones sub-inhedorias de ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina no tuvieron efecto sobre el crecimiento de los cultivos, pero sí sobre los factores de virulencia swarming y formación de biopelículas.
- 4) Existió amplia variación en la motilidad swarming y formación de biopelículas entre los patotipos de *E. coli* por efecto de las concentraciones subletales de ácido tánico, ácido gálico, metil galato y galato de epigallocatequina.
- 5) Todos los tratamientos con polifenoles disminuyeron en grado variable la formación de swarming en las tres cepas, sin embargo, la formación de biopelícula fue aumentada o disminuida dependiendo del compuesto y su concentración.
- 6) En algunos tratamientos se observó relación directa entre la expresión de los genes asociados a swarming (*flhC*, *fliA* y *fliC*) y biopelículas (*cga*, *csgD* y *cyaA*) con el fenotipo obtenido, sin embargo, en algunos otros casos no se encontró esta relación, lo que hace suponer que las concentraciones sub-inhedorias de estos polifenoles interfieren con los factores de virulencia por mecanismos de acción diferentes.
- 7) El ácido gálico a la concentración sub-inhedoria alta (1250 µg/ml) fue el compuesto que logró inhibir al mismo tiempo swarming y biopelículas en EHEC y ETEC, mientras que para el caso de EPEC ésta concentración no modificó significativamente la formación de biopelículas respecto al control.

## 10. LITERATURA CITADA

1. Ali, S.I., El-Baz, F.K., El-Emary, G.A., Khan, E.A., Mohamed, A.A., 2014. HPLC-analysis of polyphenolic compounds and free radical scavenging activity of pomegranate fruit (*Punica granatum* L.). *Int J Pharm Clin Res* 6, 348-355.
2. Alzamora, S., Tapia, M., Chanes, J.W., 1998. New strategies for minimally processed foods. The role of multitarget preservation/Nuevas estrategias para los alimentos mínimamente procesados. La conservación "multiblancos". *Revista de Agaroquímica y Tecnología de Alimentos* 4, 353-361.
3. Andersson, D.I., Hughes, D., 2014. Microbiological effects of sublethal levels of antibiotics. *Nature Reviews Microbiology* 12, 465-478.
4. Andrews, J.M., 2001. Determination of minimum inhibitory concentrations. *Journal of antimicrobial Chemotherapy* 48, 5-16.
5. Ariel, G., Rabani, A., Benisty, S., Partridge, J.D., Harshey, R.M., Be'Er, A., 2015. Swarming bacteria migrate by Lévy Walk. *Nature communications* 6.
6. Banitz, T., Johst, K., Wick, L.Y., Fetzer, I., Harms, H., Frank, K., 2012. The relevance of conditional dispersal for bacterial colony growth and biodegradation. *Microbial ecology* 63, 339-347.
7. Borges, A., Ferreira, C., Saavedra, M.J., Simoes, M., 2013. Antibacterial activity and mode of action of ferulic and gallic acids against pathogenic bacteria. *Microbial Drug Resistance* 19, 256-265.
8. Castro, A.M., 2014. *Bacteriología médica basada en problemas*. Editorial El Manual Moderno.
9. Cetin-Karaca, H., Newman, M.C., 2015. Antimicrobial efficacy of plant phenolic compounds against *Salmonella* and *Escherichia coli*. *Food Bioscience* 11, 8-16.
10. Cleary, J., Lai, L.-C., Shaw, R.K., Straatman-Iwanowska, A., Donnenberg, M.S., Frankel, G., Knutton, S., 2004. Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adhesion to intestinal epithelial cells: role of bundle-forming pili (BFP), EspA filaments and intimin. *Microbiology* 150, 527-538.
11. Clements, A., Young, J.C., Constantinou, N., Frankel, G., 2012. Infection strategies of enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Gut microbes* 3, 71-87.
12. Copeland, M.F., Weibel, D.B., 2009. Bacterial swarming: a model system for studying dynamic self-assembly. *Soft matter* 5, 1174-1187.
13. Croxen, M.A., Finlay, B.B., 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* 8, 26-38.
14. Croxen, M.A., Law, R.J., Scholz, R., Keeney, K.M., Wlodarska, M., Finlay, B.B., 2013. Recent advances in understanding enteric pathogenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 26, 822-880.

15. Cui, Y., Oh, Y., Lim, J., Youn, M., Lee, I., Pak, H., Park, W., Jo, W., Park, S., 2012. AFM study of the differential inhibitory effects of the green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate (EGCG) against Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Food Microbiology* 29, 80-87.
16. Cushnie, T.T., Lamb, A.J., 2011. Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoids. *International journal of antimicrobial agents* 38, 99-107.
17. Choi, J.-G., Mun, S.-H., Chahar, H.S., Bharaj, P., Kang, O.-H., Kim, S.-G., Shin, D.-W., Kwon, D.-Y., 2014. Methyl gallate from *Galla rhois* successfully controls clinical isolates of *Salmonella* infection in both in vitro and in vivo systems. *PLoS one* 9, e102697.
18. Chung, H., Bang, W., Drake, M., 2006. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive reviews in food science and food safety* 5, 52-64.
19. Daglia, M., 2012. Polyphenols as antimicrobial agents. *Current opinion in biotechnology* 23, 174-181.
20. Daniels, R., Vanderleyden, J., Michiels, J., 2004. Quorum sensing and swarming migration in bacteria. *FEMS microbiology reviews* 28, 261-289.
21. Davies, D.G., Parsek, M.R., Pearson, J.P., Iglewski, B.H., Costerton, J.t., Greenberg, E.P., 1998. The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science* 280, 295-298.
22. Díaz-Gómez, R., Toledo-Araya, H., López-Solís, R., Obreque-Slier, E., 2014. Combined effect of gallic acid and catechin against *Escherichia coli*. *LWT-Food Science and Technology* 59, 896-900.
23. Dusane, D.H., O'May, C., Tufenkji, N., 2015. Effect of tannic and gallic acids alone or in combination with carbenicillin or tetracycline on *Chromobacterium violaceum* CV026 growth, motility, and biofilm formation. *Canadian journal of microbiology* 61, 487-494.
24. Ekaprasada, M.T., Nurdin, H., Ibrahim, S., Dachriyanus, D., 2010. Antioxidant activity of methyl gallate isolated from the leaves of *Toona sureni*. *Indonesian Journal of Chemistry* 9, 457-460.
25. Ekaprasada, M.T., Nurdin, H., Ibrahim, S., Dachriyanus, D., 2015. Antibacterial Activity of Methyl Gallate Isolated from the Leaves of *Toona sureni*. *International Journal on Advanced Science, Engineering and Information Technology* 5, 280-282.
26. Faried, A., Kurnia, D., Faried, L., Usman, N., Miyazaki, T., Kato, H., Kuwano, H., 2007. Anticancer effects of gallic acid isolated from Indonesian herbal medicine, *Phaleria macrocarpa* (Scheff.) Boerl, on human cancer cell lines. *International journal of oncology* 30, 605-613.
27. Feng, P., Weagant, S.D., Jinneman, K., 2015. Diarrheagenic *Escherichia coli* In: Administration, U.S.F.a.D. (Ed.), *Bacteriological Analytical Manual*.
28. Fleckenstein, J.M., Hardwidge, P.R., Munson, G.P., Rasko, D.A., Sommerfelt, H., Steinsland, H., 2010. Molecular mechanisms of enterotoxigenic *Escherichia coli* infection. *Microbes and Infection* 12, 89-98.

29. Flemming, H.-C., Wingender, J., 2010. The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8, 623-633.
30. Fraser, G.M., Furness, R.B., Hughes, C., 2000. Swarming migration by *Proteus* and related bacteria. *Prokaryotic Development*. American Society of Microbiology, pp. 381-401.
31. Fratamico, P.M., DebRoy, C., Liu, Y., Needleman, D.S., Baranzoni, G.M., Feng, P., 2016. Advances in molecular serotyping and subtyping of *Escherichia coli*. *Frontiers in microbiology* 7.
32. Galli, L., Brusa, V., Rodríguez, R., Signorini, M., Oteiza, J.M., Leotta, G.A., 2016. *Escherichia coli* in Food Products. *Escherichia coli in the Americas*. Springer, pp. 173-203.
33. García-Heredia, A., García, S., Merino-Mascorro, J.Á., Feng, P., Heredia, N., 2016. Natural plant products inhibits growth and alters the swarming motility, biofilm formation, and expression of virulence genes in enteroaggregative and enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Food Microbiology* 59, 124-132.
34. García-Heredia, A., Orue, N., Heredia, N., García, S., 2013. Efficacy of citrus-based disinfectants to inhibit growth, swarming, and biofilm formation of *Salmonella* and decontaminate parsley. *Journal of Food, Agriculture & Environment* 11, 1295-1299.
35. Gomes, T.A., Elias, W.P., Scaletsky, I.C., Guth, B.E., Rodrigues, J.F., Piazza, R.M., Ferreira, L.C., Martinez, M.B., 2016. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *brazilian journal of microbiology* 47, 3-30.
36. Gupta, B., Ghatak, S., Gill, J., 2013. Incidence and virulence properties of *E. coli* isolated from fresh fish and ready-to-eat fish products. *Veterinary World* 6, 5-9.
37. Gyawali, R., Adkins, A., C. Minor, R., Ibrahim, S.A., 2014. Behavior and changes in cell morphology of *Escherichia coli* O157: H7 in liquid medium and skim milk in the presence of caffeine. *CyTA-Journal of Food* 12, 235-241.
38. Gyawali, R., Ibrahim, S.A., 2014. Natural products as antimicrobial agents. *Food Control* 46, 2e429.
39. Ha, D.-G., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., 2014a. Plate-based assay for swarming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas methods and protocols*, 67-72.
40. Ha, D.-G., Kuchma, S.L., O'Toole, G.A., 2014b. Plate-based assay for swimming motility in *Pseudomonas aeruginosa*. *Pseudomonas Methods and Protocols*, 59-65.
41. Hufnagel, D.A., Evans, M.L., Greene, S.E., Pinkner, J.S., Hultgren, S.J., Chapman, M.R., 2016. CRP-cAMP regulates *csgD* and biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, JB. 00652-00616.
42. Isenberg, D., 1999. Tests to assess bactericidal activity. *Antimicrobial Susceptibility Testing Clinical Microbiology Procedures Handbook*. ASM, Washington 5, 1-14.

43. Ito, A., May, T., Kawata, K., Okabe, S., 2008. Significance of *rpoS* during maturation of *Escherichia coli* biofilms. *Biotechnology and bioengineering* 99, 1462-1471.
44. Kaper, J.B., Nataro, J.P., Mobley, H.L., 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* 2, 123-140.
45. Kearns, D.B., 2010. A field guide to bacterial swarming motility. *Nature Reviews Microbiology* 8, 634-644.
46. Klančnik, A., Piskernik, S., Jeršek, B., Možina, S.S., 2010. Evaluation of diffusion and dilution methods to determine the antibacterial activity of plant extracts. *Journal of microbiological methods* 81, 121-126.
47. Kumar, C.G., Anand, S., 1998. Significance of microbial biofilms in food industry: a review. *International journal of food microbiology* 42, 9-27.
48. Lai, S., Tremblay, J., Déziel, E., 2009. Swarming motility: a multicellular behaviour conferring antimicrobial resistance. *Environmental microbiology* 11, 126-136.
49. Lee, J.-H., Cho, H.S., Joo, S.W., Chandra Regmi, S., Kim, J.-A., Ryu, C.-M., Ryu, S.Y., Cho, M.H., Lee, J., 2013. Diverse plant extracts and trans-resveratrol inhibit biofilm formation and swarming of *Escherichia coli* O157: H7. *Biofouling* 29, 1189-1203.
50. Lee, K.-M., Kim, W.-S., Lim, J., Nam, S., Youn, M., Nam, S.-W., Kim, Y., Kim, S.-H., Park, W., Park, S., 2009. Antipathogenic properties of green tea polyphenol epigallocatechin gallate at concentrations below the MIC against enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Journal of food protection* 72, 325-331.
51. Lucera, A., Costa, C., Conte, A., Del Nobile, M.A., 2012. Food applications of natural antimicrobial compounds.
52. Moreira, C.G., Palmer, K., Whiteley, M., Sircili, M.P., Trabulsi, L.R., Castro, A.F., Sperandio, V., 2006. Bundle-forming pili and EspA are involved in biofilm formation by enteropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology* 188, 3952-3961.
53. Nataro, J.P., Kaper, J.B., 1998. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clinical microbiology reviews* 11, 142-201.
54. Negi, P.S., 2012. Plant extracts for the control of bacterial growth: Efficacy, stability and safety issues for food application. *International Journal of Food Microbiology* 156, 7-17.
55. Niba, E.T.E., Naka, Y., Nagase, M., Mori, H., Kitakawa, M., 2007. A genome-wide approach to identify the genes involved in biofilm formation in *E. coli*. *DNA research* 14, 237-246.
56. Nicklasson, M., 2010. Enterotoxigenic *Escherichia coli* Multilocus Sequence Types in Guatemala and Mexico-Volume 16, Number 1—January 2010-Emerging Infectious Disease journal-CDC.
57. O'May, C., Tufenkji, N., 2011. The swarming motility of *Pseudomonas aeruginosa* is blocked by cranberry proanthocyanidins and other tannin-containing materials. *Applied and environmental microbiology* 77, 3061-3067.

58. Olaru, O., Șeremet, O.-C., Petrescu, M., Sălăgean, A., Velescu, B., Nițulescu, M., 2014. Toxicity evaluation and polyphenols assessment of some extracts from indigenous *Euphorbia* species. *Rom. J. Biopys* 24, 43-54.
59. OMS, 2016. *E. coli* O157:H7, Nota descriptiva.
60. Park, M.S., Cho, J.I., Lee, S.H., Bahk, G.J., 2014. The Analysis for Minimum Infective Dose of Foodborne Disease Pathogens by Meta-analysis. *Journal of Food Hygiene and Safety* 29, 305-311.
61. Patzi-Vargas, S., Zaidi, M.B., Perez-Martinez, I., León-Cen, M., Michel-Ayala, A., Chaussabel, D., Estrada-García, T., 2015. Diarrheagenic *Escherichia coli* carrying supplementary virulence genes are an important cause of moderate to severe diarrhoeal disease in Mexico. *PLoS Negl Trop Dis* 9, e0003510.
62. Pesavento, C., Becker, G., Sommerfeldt, N., Possling, A., Tschowri, N., Mehli, A., Hengge, R., 2008. Inverse regulatory coordination of motility and curli-mediated adhesion in *Escherichia coli*. *Genes & development* 22, 2434-2446.
63. Ramadan, H.H., Sanclement, J.A., Thomas, J.G., 2005. Chronic rhinosinusitis and biofilms. *Otolaryngology--Head and Neck Surgery* 132, 414-417.
64. Robles-García, M.A., Aguilar, A.J., Gutiérrez-Lomelí, M., Rodríguez-Félix, F., Morales-Del-Río, J.A., Guerrero-Medina, P.J., Madrigal-Pulido, J.A., Del-Toro-Sánchez, C.L., 2016. IDENTIFICACIÓN CUALITATIVA DE METABOLITOS SECUNDARIOS Y DETERMINACIÓN DE LA CITOTOXICIDAD DE EXTRACTOS DE TEMPISQUE (*Sideroxylum capiri* PITTIER)/QUALITATIVE IDENTIFICATION OF SECONDARY METABOLITES AND CYTOTOXICITY DETERMINATION OF TEMPISQUE EXTRACTS (*Sid. Biotecnia* 18, 3-8).
65. Rodríguez-Angeles, G., 2002. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* 44, 464-475.
66. Rossez, Y., Wolfson, E.B., Holmes, A., Gally, D.L., Holden, N.J., 2015. Bacterial flagella: twist and stick, or dodge across the kingdoms. *PLoS pathogens* 11, e1004483.
67. Roy, V., Adams, B.L., Bentley, W.E., 2011. Developing next generation antimicrobials by intercepting AI-2 mediated quorum sensing. *Enzyme and microbial technology* 49, 113-123.
68. Sabaté, M., Prats, G., Moreno, E., Ballesté, E., Blanch, A.R., Andreu, A., 2008. Virulence and antimicrobial resistance profiles among *Escherichia coli* strains isolated from human and animal wastewater. *Research in Microbiology* 159, 288-293.
69. Sheikh, A.F., Rostami, S., Amin, M., Abbaspour, A., Goudarzi, H., Hashemzadeh, M., 2013. Isolation and identification of *Escherichia coli* O157: H7 from ground beef hamburgers in Khuzestan Province, Iran. *African Journal of Microbiology Research* 7, 413-417.
70. Shi, C., Sun, Y., Liu, Z., Guo, D., Sun, H., Sun, Z., Chen, S., Zhang, W., Wen, Q., Peng, X., 2017. Inhibition of *Cronobacter sakazakii* Virulence Factors by Citral. *Scientific Reports* 7, 43243.

71. Silva, L.N., Zimmer, K.R., Macedo, A.J., Trentin, D.S., 2016. Plant natural products targeting bacterial virulence factors. *Chemical Reviews* 116, 9162-9236.
72. Simões, M., Simões, L.C., Vieira, M.J., 2010. A review of current and emergent biofilm control strategies. *LWT-Food Science and Technology* 43, 573-583.
73. Slobodníková, L., Fialová, S., Rendeková, K., Kováč, J., Mučaji, P., 2016. Antibiofilm Activity of Plant Polyphenols. *Molecules* 21, 1717.
74. Srey, S., Jahid, I.K., Ha, S.-D., 2013. Biofilm formation in food industries: a food safety concern. *Food Control* 31, 572-585.
75. Swiecicki, J.-M., Sliusarenko, O., Weibel, D.B., 2013. From swimming to swarming: *Escherichia coli* cell motility in two-dimensions. *Integrative Biology* 5, 1490-1494.
76. Taguri, T., Tanaka, T., Kouno, I., 2004. Antimicrobial activity of 10 different plant polyphenols against bacteria causing food-borne disease. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 27, 1965-1969.
77. Uhlich, G.A., Gunther, N.W., Bayles, D.O., Mosier, D.A., 2009. The CsgA and Lpp proteins of an *Escherichia coli* O157: H7 strain affect HEp-2 cell invasion, motility, and biofilm formation. *Infection and immunity* 77, 1543-1552.
78. Vidal, J.E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., Navarro-García, F., 2007. Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de *Escherichia coli* enteropatógena. *salud pública de méxico* 49, 376-386.
79. Vidal Roberto M., Chamorro Nayaret L., A., G.J., 2016. Enterotoxigenic *Escherichia coli*. In: Torres, A.G. (Ed.), *Escherichia coli* in the Americas, Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston , TX , USA
80. Welch, R.A., 2006. The genus *Escherichia*. *The prokaryotes*. Springer, pp. 60-71.
81. WHO, 2015. Estimates of the Global Burden of Foodborne Disease. *FOODBORNE DISEASE BURDEN EPIDEMIOLOGY REFERENCE GROUP 2015-2017*, p. 255.
82. Widsten, P., Cruz, C.D., Fletcher, G.C., Pajak, M.A., McGhie, T.K., 2014. Tannins and extracts of fruit byproducts: antibacterial activity against foodborne bacteria and antioxidant capacity. *Journal of agricultural and food chemistry* 62, 11146-11156.
83. Witkowska, A.M., Hickey, D.K., Alonso-Gomez, M., Wilkinson, M., 2013. Evaluation of antimicrobial activities of commercial herb and spice extracts against selected food-borne bacteria. *Journal of Food Research* 2, 37.
84. Yanagawa, Y., Yamamoto, Y., Hara, Y., Shimamura, T., 2003. A combination effect of epigallocatechin gallate, a major compound of green tea catechins, with antibiotics on *Helicobacter pylori* growth in vitro. *Current microbiology* 47, 0244-0249.
85. Yang, Q., Wang, L., Gao, J., Liu, X., Feng, Y., Wu, Q., Baloch, A.B., Cui, L., Xia, X., 2016. Tannin-rich fraction from pomegranate rind inhibits quorum sensing in *Chromobacterium violaceum* and biofilm formation in *Escherichia coli*. *Foodborne pathogens and disease* 13, 28-35.

86. Zahir, H., Fatima, H., Souad, L., El Mostafa, M., Mostafa, E., Hassan, L., 2015. Role of Cell Surface Structures in Biofilm Formation by *Escherichia coli*. Food and Nutrition Sciences 6, 1160.
87. Zhou, M., Yang, Y., Chen, P., Hu, H., Hardwidge, P.R., Zhu, G., 2015. More than a locomotive organelle: flagella in *Escherichia coli*. Applied microbiology and biotechnology 99, 8883-8890.