



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

INSTITUTO DE CIENCIAS

CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS MICROBIOLÓGICAS

POSGRADO EN MICROBIOLOGÍA



“Análisis de la virulencia de cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y determinación de patotipos”

PROTOCOLO DE TESIS

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)
CON OPCIÓN EN: MICROBIOLOGÍA MÉDICA.**

PRESENTA:

Q.C. MONSERRAT AGUIRRE LARA

DIRECTOR DE TESIS:

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

ASESORA DE TESIS:

D.C. ROSA DEL CARMEN ROCHA GRACIA

PUEBLA, PUE., MÉXICO.

JULIO 2023

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas, Posgrado en Microbiología de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, bajo la dirección de la D.C. Rosa del Carmen Rocha Gracia Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca de maestría con el número de becario 1065082.

Se reconoce el apoyo brindando para financiar la asistencia a congresos de la Coordinación del Posgrado en Microbiología, de la Dirección del Instituto de Ciencias (ICUAP), así como de la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado (VIEP) de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla.

AGRADECIMIENTOS ACADEMICOS

A la **D. C. Rosa del Carmen Rocha Gracia**, por su paciencia conmigo, por su enseñanza, que siempre esta al pendiente de que estemos actualizados, por su esfuerzo y dedicación conmigo por siempre darme un tiempo. No fui su alumna más fácil pero espero haber dejado un aporte aunque sea pequeño en LMHyC y con respecto al estudio de este patotipo de *E.coli*.

A la **D.C. Patricia Lozano Zarain**, por recibir con los abrazos abiertos a todos los estudiantes y hacer un excelente equipo con la Doctora Rosa del Carmen, logrando juntas un excelente ambiente en el LMHyC. Gracias por todas sus enseñanzas, por sus sugerencias, el tiempo y llevarnos a razonar más allá de lo que alguien nos pueda decir.

A la **D. C. Margarita María de la Paz Arenas**, gracias por siempre presionarme a hacerlo mejor, por su apoyo, por orientarme durante la formación en esta maestría y por la paciencia. Gracias por ayudarme en esta formación como investigador.

A la **D. C María Lilia Cedillo Ramírez**, gracias por su tiempo, sus consejos para mejorar en cada presentación y su enseñanza.

A la **M en C. María Guadalupe Balbuena Alonso**, gracias por orientarme en todo aquello que yo no podía darme ideas, gracias por enseñarme desde cómo utilizar las herramientas bioinformáticas hasta como busca mejor algún tema, gracias por su paciencia en el laboratorio y por quedarte más tiempo porque seguías trabajando conmigo. Gracias por enseñarme en este camino como investigador y espero algún día poder hacer lo mismo.

Al **D. C Gerardo Cortés Cortés**, por apoyarme, por enseñarme, por hacerme parte de su equipo, aunque nunca nos conocimos físicamente, gracias por siempre estar presente y por mostrarme en que puedo mejorar. Gracias por todo su tiempo, su apoyo y paciencia en este camino de investigador.

ABREVIATURAS

EII	Enfermedad Inflamatoria Intestinal
AIEC	<i>Escherichia coli</i> Adherente-Invasiva
5 ASA	5-Aminosalicilico
CEACAM6	Molécula de adhesión celular 6 relacionada con el antígeno carcinoembrionario
UFC	Unidad Formadora de Colonia
Ng	Nanogramo
μL	Microlitro
ST	Secuenciotipo
MLST	Tipificación multilocus de secuencias (Multilocus sequence typing)
Bp	Pares de bases
r.p.m	Revoluciones por minuto

INDICE

INTRODUCCIÓN	12
Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	12
Relación con el humano	12
Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)	14
Clínica de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal	16
Diagnóstico de Enfermedad Inflamatoria Intestinal	18
Tratamiento para la Enfermedad Inflamatoria Intestinal	19
Factores Predisponentes de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal	21
Disbiosis Intestinal	23
Adherencia de AIEC	27
Invasión de del intestino por AIEC	29
Supervivencia en Macrófago	30
Mecanismos de adherencia de <i>E. coli</i> Adherente/Invasiva a los enterocitos	32
Evasión del sistema inmune	33
ANTECEDENTES	34
ANTECEDENTE DIRECTO	37
JUSTIFICACION	37
OBJETIVO GENERAL BIOINFORMÁTICO	38
OBJETIVOS ESPECIFICOS BIOINFORMÁTICO	38
DIAGRAMA DE TRABAJO BIOINFORMATICO	38
OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	39
OBJETIVOS ESPECIFICOS DEL TRABAJO EXPERIMENTAL	39
DIAGRAMA DE TRABAJO EXPERIMENTAL	39
MATERIAL Y MÉTODOS	39
Metodología del estudio bioinformático	39
Búsqueda de genomas de <i>E. coli</i> Adherente/Invasiva (AIEC) en el GenBank	40
Busqueda de información sobre <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva (AIEC)	40
Identificación de genomas AIEC	40
Determinación de filogrupos	40
Determinación de secuenciotipo	40
Determinación de serotipo	40
Determinación de factores de virulencia	41
Identificación del gen fimH de los genomas AIEC	41
Comparación y modelado de la proteína FdeC	41
Busqueda de genes con RAST	41
Busqueda de genes con HMMER	41
Identificación de plásmidos	42
METODOLOGIA EXPERIMENTAL	42
Cepas de estudio	42
Extracción de ADN por el método de lisis por calor	43
Cuantificación de ADN	43
Amplificación de genes para identificación de <i>E.coli</i>	43
RESULTADOS	44
TRABAJO BIOINFORMÁTICO	44
Búsqueda de genomas AIEC	43
Determinación de filogrupos	47
Determinación de secuenciotipo	48
Determinación de serotipo	50

Determinación de factores de virulencia	51
Identificación del plásmido pO83	65
RESULTADO EXPERIMENTALES	67
Determinación del gen <i>ybbw</i>	67
Determinación del gen <i>uidA</i>	72
DISCUSIÓN	72
CONCLUSIÓN	77
PERSPECTIVAS	77
REFERENCIAS	79
Anexos	84

INDICE DE FIGURAS

Figura 1 Enfermedad Inflamatoria Intestinal	15
Figura 2 Representación de la condición de Eubiosis y Disbiosis.	24
Figura 3 Interacción de AIEC con la mucosa Intestinal.	27
Figura 4 Mecanismo de interacción de AIEC con la microbiota intestinal.	28
Figura 5. Invasión de AIEC en los enterocitos.	30
Figura 6 Supervivencia de AIEC dentro del macrófago.	31
Figura 7. Interacción de AIEC dentro del macrófago	33
Figura 8. Distribución de filogrupo de los genomas AIEC	48
Figura 9 Identificación de secuenciotipo de 30 genomas de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva	48
Figura 10 Distribución de secuenciotipo y filogrupo de 30 genomas de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva.	49
Figura 11. Serotipos de cepas de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva	50
Figura 12 Frecuencia de genes involucrados en la adherencia fimbrial y no fimbrial en genomas AIEC	54
Figura 13 Variantes alélicas de <i>fimH</i> en genomas de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva	55
Figura 14 Comparación por Clustal de la proteína FdeC e Intimina de AIEC, EHEC y EPEC	56
Figura 15 Modelado de la proteína FdeC de AIEC e Intimina de EPEC	56
Figura 16 Modelado de la proteína FdeC de UPEC y AIEC	57
Figura 17 Resultado del análisis comparativo de la proteína FdeC AIEC con los patotipos EPEC, EHEC y UPEC	58
Figura 18 Análisis comparativo de la proteína FdeC en los 30 genomas de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva	59
Figura 19 Genes implicados en autotransporte, invasión y metabolismo de hierro encontrados en genomas AIEC	60
Figura 20 Genes implicados en diversos sistemas de secreción y toxinas encontrados en genomas AIEC	61
Figura 21 Genes implicados en la acción de hemolisinas, misceláneos, supervivencia en macrófagos y formación de biopelículas analizados en los genomas AIEC	63
Figura 22 Identificación de los genes <i>arlA</i> y <i>arlC</i> en el plásmido pO83 de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva	65
Figura 23 Determinación de los grupos de incompatibilidad de los genomas de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva	67
Figura 24 Determinación del gen <i>ybbW</i> específico para <i>E. coli</i> en cepas aisladas de EII	70
Figura 25 Determinación del gen <i>ybbW</i> específico para <i>E. coli</i> en cepas aisladas de EII	71

Figura 26 Determinación del gen *uidA* para identificación de *E. coli* en cepa aislada de EII

72

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Genes de virulencia para cada patotipo de <i>Escherichia coli</i> .	13
Tabla 2. Clasificación de Montreal de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.	16
Tabla 3. Investigaciones que relacionan la presencia de AIEC con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.	34
Tabla 4. Cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal	42
Tabla 5. Oligonucleótidos utilizados en la identificación de <i>Escherichia coli</i>	44
Tabla 6 Oligonucleótidos utilizados en la identificación de <i>Escherichia coli</i>	45
Tabla 7. Genes buscados en los genomas de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasiva	51
Tabla 8. Genes más frecuentes encontrados en los genomas de <i>Escherichia coli</i> Adherente/Invasivas	64
Tabla 9. Cepas de <i>Escherichia coli</i> recuperadas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal	67

RESUMEN

La Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII) es un conjunto de enfermedades que afectan al tubo digestivo, provocando procesos inflamatorios que pueden ir desde la boca del estómago hasta el ano. Dentro de este padecimiento se incluyen la Colitis Ulcerosa Crónica Idiopática, la Enfermedad de Crohn y la Colitis Indeterminada o Inclasificable. Estos padecimientos pueden originarse por causas multifactoriales, dentro de las cuales destaca la presencia en la microbiota, de un patotipo de *E. coli* relativamente nuevo, *Escherichia coli* Adherente/Invasiva (AIEC). Hasta el momento la identificación de AIEC sólo puede llevarse a cabo de manera fenotípica por medio de ensayos de adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y formación de biopelícula y no existe un marcador bioquímico exclusivo y/o característico de este patotipo. Es por ello que en este trabajo se planteó realizar genómica comparativa de cepas de *E. coli* identificadas como AIEC, usando genomas depositados en bases de datos públicas, con la finalidad de identificar genes codificantes de factores involucrados en adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y/o formación de biopelícula. Para identificar a estos genes, se tomó como base la literatura de reportes de autores anteriores de genes involucrados en los mecanismos de adherencia, invasión, supervivencia en macrófago y formación de biopelícula, para posteriormente realizar una búsqueda dirigida de estos mismos en los genomas de AIEC mediante la plataforma Blast.

Se realizó la búsqueda de genomas AIEC utilizando diversas plataformas bioinformáticas como Patric 3.6.9 y Pathogens, con las cuales se descargaron las secuencias de 30 genomas depositados en el GenBank, con una fecha de corte del 31 de mayo de 2021. Además de los genes involucrados en la patogenicidad los genomas fueron analizados para conocer su filogrupa, secuenciotipo, y serotipo mediante el uso de herramientas bioinformáticas como ClermonTyping, PubMLST y Serotype Finder (v 2.0).

En los 30 genomas se identificó al serotipo O25:H4 como el más frecuente (16.6%), al igual que el filogrupa B2 (76.6%) y el secuenciotipo ST131 (16.6%). Se identificaron genes asociados a virulencia en la mayoría de los genomas analizados (96.6%), siendo *fimH*, *fdeC*, *ompC*, *chiA*, *yfgl*, *htrA*, *dsba*, *yjaA* y *ehaG*, los más prevalentes, los cuales están involucrados en la adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y formación de biopelícula. Por otra parte los genes *ipaH*, *ompT*, *arlA*, *hlyF*, *ibeA*, *lpf* se encontraron en menor frecuencia (13 – 46.7%).

Con la información obtenida mostramos que los genes encontrados con mayor frecuencia fueron los previamente descritos como asociados al reconocimiento fenotípico de AIEC los cuales son *fimH*, *fdeC*, *ompC*, *chiA*, *yfgl*, *htrA*, *dsba*, *yjaA* y *ehaG*. Con estos resultados se sugiere que primero se identifiquen estos genes en las cepas por medio de PCR (previa identificación de las cepas por los ensayos fenotípicos) y posteriormente el para ampliar la información de estos genes.

Palabras clave: AIEC, EII, EC, CUCI, Enfermedad Inflamatoria Intestinal

INTRODUCCIÓN

Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli reside en el colon humano como microbiota (Aguila *et al.*, 2020). Es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, tribu *Escherichia*, oxidasa negativa, indol positivo (De la fuente *et al.*, 2017), que coloniza el tracto gastrointestinal del ser humano y animales de sangre caliente. Kauffman desarrolló un esquema de serotipificación que continuamente varía y que actualmente tiene 188 antígenos somáticos (O), 56 flagelares (H) y 60 capsulares (K). El antígeno “O” es el responsable del serogrupo; la determinación del antígeno somático y flagelar (O:H) indica el serotipo, el cual en ocasiones se asocia con un cuadro clínico en particular (Rodriguez, 2002).

Relación con el humano

El hospedero humano es colonizado desde el nacimiento por *E. coli* que reside permanentemente en el intestino y establece una relación simbiótica con el individuo, toda la vida (Aguila *et al.*, 2020). Aunque esta bacteria forma parte de la flora normal intestinal de mamíferos, hay ciertas clonas que pueden causarle daño. Esta bacteria se clasifica en patotipos dependiendo de las características clínicas de la enfermedad que produce, sus factores de virulencia, interacción con la célula blanco y epidemiología.

De acuerdo con los factores de virulencia y patogenicidad el patotipo de *E. coli* Diarreogénicas (ECD) se clasifica en 7 categorías: *E. coli* enteropatógena (ECEP), enterotoxigénica (ECET), enteroinvasiva (ECEI), enterohemorrágica (ECEH) o productora de toxina Shiga (STEC), enteroagregativa (ECEAgg) y enteroadherente (ECEA) con dos variantes, de adherencia difusa (ECAD) y localizada (ECAL) (Tabla 2) (Águila *et al.*, 2020). Estas difieren en cuanto a los sitios preferenciales de colonización del hospedero, los mecanismos de virulencia y los síntomas clínicos y consecuencias subsiguientes (Gomes *et al.*, 2016). Existen otro patotipo que causa infecciones extraintestinales comúnmente en humanos, denominado *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC), que incluyen *E. coli* uropatógena (UPEC) y *E. coli*

asociada a meningitis (NMEC). También dentro de las cepas ExPEC se encuentran las cepas aisladas de aves (AvEC) (Liu, 2020).

Darfeuille-Michaud 1998, Francia, identificaron de la mucosa intestinal de pacientes con Enfermedad de Crohn, una categoría nueva al cual le dieron el nombre de *Escherichia coli* Adherente-Invasivo (AIEC). Esta es una *E. coli* genéticamente diversa con capacidades de adhesión e invasión y capacidad de supervivencia y replicación dentro del macrófago, genéticamente distinta de los patotipos conocidos de ECD y cercana a ExPEC (López *et al.*, 2022). Este nuevo patotipo AIEC se ha relacionado estrechamente con la Enfermedad de Crohn (Sevrin *et al.*, 2020).

AIEC ha desarrollado mecanismos que le permiten colonizar la mucosa; entre las características que este microorganismo presenta son: implantarse en la luz intestinal dentro de la microbiota residente, cruzar la capa de moco y resistir los péptidos antimicrobianos para acceder al epitelio, adherirse al epitelio y cruzarlo a través de células M, enterocitos u otros mecanismos y finalmente interactuar con los macrófagos que están en la lámina propia dentro del cual pueden sobrevivir y multiplicarse (Sevrin *et al.*, 2020).

Dicho microorganismo también cuenta con factores de virulencia los cuales le ayudan para llevar a cabo su patogenia. Diversos estudios han demostrado la alta resistencia a los péptidos antimicrobianos que actúan en la defensa de la microbiota intestinal, esto debido a genes como *arlA* codifica una proteína de la familia Mig-14 y *arlC* que codifica para una proteasa de membrana externa. los cuales están codificados en un plásmido en AIEC y le capacitan para sobreponerse a la actividad de los péptidos catiónicos de la mucosa intestinal y la proteasa Vat-AIEC que le ayuda a la degradación de mucinas (Sevrin *et al.*, 2020).

Tabla 1. Genes de virulencia presentes en los patotipos de *Escherichia coli*.

Patotipo de <i>E. coli</i>	Genes de Virulencia
ETEC	<i>lt</i> : Toxina termo labil <i>st1</i> : Enterotoxina 1 <i>st2</i> : Enterotoxina 2
EPEC	<i>bfpA</i> : Subunidad estructural mayor de unión-formación del pili. <i>Tir</i> : receptor traslocador de intimina <i>Eae</i> : Intimina

DAEC	<i>Afa</i> : adhesinas afimbriales <i>DraA</i> adhesinas fimbriales <i>daaD</i> :
EIEC	<i>Ipa</i> : Invasión <i>ipaH</i> : Invasión
STEC	<i>Stx</i> : toxinas Shiga <i>Eae</i> : Intimina <i>StcE</i> : metaloproteasa dependiente de zinc <i>Ehx</i> : entero hemolisina
EAEC	<i>AggR</i> : Activador transcripcional de proteína de adherencia. <i>aggA</i> : AAF/II subunidad fimbrial <i>AafA</i> : Subunidad fimbrial mayor de la fimbria II de agregación y adherencia. <i>east1</i> : Enterotoxina termo estable <i>astA</i> : Arginina succinil transferasa <i>Pic</i> : Proteasa envuelta en la colonización intestinal <i>Pet</i> : Toxina codificada en plasmido <i>Sat</i> : Toxina autotransportadora <i>SigA</i> : Shigella tipo IgA
AIEC	No existen marcadores de identificación para este patotipo. Identificación fenotípica con: Ensayos de adherencia e invasión Sobrevivencia en macrófagos Formación de biopelícula

Tomado de: Águila *et al.*, 2020

Enfermedad inflamatoria intestinal (EII)

La EII es un conjunto de enfermedades que afecta al tubo digestivo provocando procesos inflamatorios en alguna de sus partes (desde la boca hasta el ano) de forma crónica (Fig. 1) y comprende principalmente la colitis ulcerosa crónica idiopática (CUCI), la enfermedad de Crohn (EC) y la colitis indeterminada o inclasificable (CI) (Yamamoto *et al.*, 2016). Es un padecimiento crónico e incurable, y se presenta con periodos de recaída y remisión. Se desconoce su etiología, pero se ha postulado como una enfermedad multifactorial debido a factores genéticos, inmunológicos y ambientales involucrados en su desarrollo.

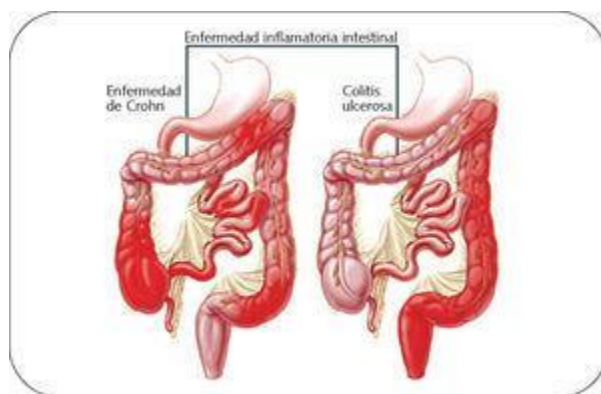


Figura 1. Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Se observan en rojo las regiones de afectación por la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Tomado de: Meligrana *et al.*, 2018.

Tanto la EC y CUCI pueden presentarse en distintos periodos de edad desde pediátricos hasta adultos y afectar a cualquier género por igual. A pesar de la similitud entre los síntomas de estas enfermedades hay algunos que pueden ayudar a diferenciarlas (Abdelhalim, 2020).

La clasificación de la EII puede hacerse en función de la extensión de la zona afectada, de su severidad y, en el caso de la EC, de su comportamiento (inflamatorio, estenosante o fistulizante); para esto se ha establecido una clasificación de consenso (Tabla 2) (Medina *et al.*, 2015). En Viena hacia 1998, se propuso una clasificación basada en varios elementos fenotípicos: edad, localización y comportamiento. La clasificación actualmente utilizada en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal es la de Montreal la cual incluye a EC tomando cuenta 3 categorías: edad al diagnóstico (A) que va a tomar un numero de A1 si el paciente tiene 16 años o menos, A2 de 17 a 40 años y A3 en más de 40 años, localización (L) el cual se le va a dar el primer número L1 para la localización en el íleon terminal, L2 localizado en el colon, L3 para el Íleo-colon, para todo lo anterior puede tener una modificación que va a agregar el tracto GI superior representado por L4 y patrón evolutivo (B) dando el numero 1 (B1) para la conducta no estenosante, no penetrante, el B2 estenosante, el B3 penetrante, con un modificador para la Enfermedad Perianal (p). Por su parte para la Colitis Ulcerosa va a ser representado por la letra E. Esta clasificación es la recomendada por la

Organización Mundial de Gastroenterología y la European Crohn's and Colitis Organisation (ECCO) (Monrroy *et al.*, 2013).

Tabla 2. Clasificación de Montreal de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Tomado de: Medina *et al.*, 2015.

Enfermedad de Crohn			
Edad al diagnóstico			
A1	16 años o menos		
A2	17-40 años		
A3	Más de 40 años		
Localización		Modificador	
		Tracto GI superior	
L1	Ileon terminal	L1+L4	Ileon terminal + GI superior
L2	Colon	L2+L4	Colon + GI superior
L3	Ileocolon	L3+L4	Ileocolon + GI superior
L4	Tracto GI superior		
Conducta		Modificador E. perianal	
B1	No estenosante, no penetrante	B1p	No estenosante, no penetrante + perianal
B2	Estenosante	B2p	Estenosante + perianal
B3	Penetrante	B3p	Penetrante + perianal
<i>B1: diagnostico provisional. En los estudios se da un plazo variable hasta considerarlo definitivo (se sugieren 5 – 10 años).</i>			
Colitis Ulcerosa			
E1	Proctitis ulcerosa		
E2	Colitis izquierda		
E3	Colitis extensa (La inflamación se extiende proximal al ángulo esplénico)		

Clínica de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

La EII no se puede suprimir fácilmente ya que genera la estimulación del sistema inmunitario y daña parte del intestino.

La enfermedad de Crohn se puede presentar en pacientes de 15 a 35 años. Provoca dolor, diarrea, fiebre y otros síntomas. La localización del daño puede ser en la parte inferior del intestino delgado, el intestino grueso, ano, el estómago, el esófago e incluso la boca. La desnutrición es muy común debido a que el intestino delgado es responsable de la absorción de nutrientes y esta daña el intestino delgado. Los

síntomas más frecuentes en la EC son: dolor abdominal (a menudo postprandial de tipo cólico, periumbilical o en cuadrante inferior derecho), diarrea y retraso del crecimiento y desarrollo (Seyedian, 2019). La palpación de efecto de masa abdominal inflamatoria en fosa iliaca derecha es característica. El comienzo de la EII es con frecuencia insidioso en forma de anorexia, astenia, fiebre intermitente, y manifestaciones articulares, orales o cutáneas. Esto condiciona en ocasiones un mayor retraso en el diagnóstico en la CU. En ocasiones se manifiesta como un cuadro agudo pseudoapendicular. La rectorragia es menos frecuente en la EC que en la CU excepto en las formas de afectación cólica. Existe lesión perianal en forma de fisura, fístula o absceso en un 25-50% de los pacientes. La pérdida de peso es más frecuente e intensa que en la CU. Las complicaciones intestinales más frecuentes son: estenosis, fístulas y abscesos. El megacolon tóxico y el cáncer son menos frecuentes que en la CU (Medina *et al.*, 2015).

La colitis ulcerosa afecta la capa mucosa del colon. Las lesiones ocurren en el recto y el intestino, los síntomas son de leves a graves y pueden amenazar la vida. Los síntomas más frecuentes de la colitis ulcerosa son: diarrea líquida y frecuentemente sanguinolenta o con moco asociada a urgencia, tenesmo, dolor abdominal cólico, fiebre y pérdida de peso (Medina *et al.*, 2015).

Se consideran signos graves: fiebre elevada, afectación del estado general, retraso del crecimiento, distensión abdominal, timpanismo y dolor a la palpación abdominal. Puede manifestarse como una colitis fulminante con más de 6 deposiciones al día, con sangre abundante, anemia, hipoalbuminemia, alteraciones hidroelectrolíticas, fiebre y taquicardia. El abdomen puede estar distendido y doloroso a la palpación. Estas formas pueden evolucionar a megacolon tóxico con dilatación colónica superior a 6 cm asociada a cuadro séptico, gran distensión y dolor abdominal. Puede producirse como complicación una colitis fulminante, tras una colonoscopia o enema de bario, o por uso de anticolinérgicos o por retirada rápida de corticoides (Medina *et al.*, 2015). Tanto la colitis grave como el megacolon tóxico presentan un alto riesgo de perforación, sepsis y hemorragia masiva. La complicación más grave y frecuente en la CU de larga evolución es el cáncer. Se recomienda cribado con colonoscopia en las CU de larga evolución.

Junto a estas manifestaciones, hay otras de carácter extraintestinal, debidas a la presencia de inmunocomplejos circulantes, lo que podría apoyar la teoría inmunológica descrita en la etiopatogenia de la enfermedad. Estas manifestaciones incluyen trastornos osteoarticulares (artritis, espondilitis, etc.), cutáneos (eritema nudoso), oculares (uveítis, conjuntivitis) o nefro urológicos (nefrolitiasis).

Diagnóstico de Enfermedad Inflamatoria Intestinal

El diagnóstico va a ser general para determinar Enfermedad Inflamatoria Intestinal una vez diagnosticada la EII el médico tiene que evaluar si es una Colitis Ulcerosa o si es Enfermedad de Crohn. El diagnóstico debe basarse en datos clínicos, endoscópicos, de laboratorio e imagenológicos. Actualmente, la evaluación endoscópica es la prueba de valor basal para detectar EII y medir la inflamación intestinal, pero es costosa, invasiva y molesta para el paciente.

Las siguientes pruebas de rutina son las recomendadas, de acuerdo con la necesidad/el sitio/las condiciones locales:

1. Exploración física.
2. Pruebas de laboratorio: biometría hemática, velocidad de sedimentación globular (VSG), proteína C reactiva (PCR), albúmina, hierro, ferritina, examen coprológico incluyendo la determinación de calprotectina fecal. Al menos uno de 3 pacientes presenta actividad clínica y endoscópica con niveles normales de PCR (Yamamoto *et al.*, 2016).
3. Realizar pruebas para la eliminación de la posibilidad de otras patologías como: Alergia alimentaria (Colitis Alérgica), Síndrome de Malabsorción, Enfermedad Celíaca, Virus de la Inmunodeficiencia Humana (sida), Tuberculosis, Citomegalovirus, Infecciones intestinales para este se debe hacer el diagnóstico diferencial con infecciones bacterianas (*E. coli* 0157:H7, *Salmonella enteritidis*, *Campilobacter jejuni*, *Yersinia enterocolítica*, *Clostridium difficile*, *Mycobacterium tuberculosis*), y parasitosis cuyo agente etiológico sea *Entamoeba histolítica*, *Giardia lamblia*, (Meligrana *et al.*, 2019.).
4. Íleo-colonoscopia, es el mejor procedimiento para el diagnóstico de la CU. Se debe practicar por lo menos una rectosigmoidoscopia rígida en caso de colitis severa con sangrado masivo, y colonoscopia total en casos de colitis moderada o

leve. Siempre se debe de tomar una biopsia para confirmar el diagnóstico endoscópico. Como la colitis ulcerativa tiene con frecuencia un comportamiento ascendente, el examen de recto y sigmoide basta para establecer el diagnóstico, pero la colonoscopia es decisiva para determinar su extensión. Los hallazgos endoscópicos ayudan a determinar la actividad de la enfermedad.

5. Ultrasonido (US) abdominal.

6. La imagen por Resonancia Magnética (IRM) es preferida sobre la Tomografía Computarizada (TC) debido a la exposición a radiación, y se realiza con un protocolo entero gráfico.

7. Exámenes radiológicos con contraste de bario (tránsito intestinal y colon por enema) (cuando no están disponibles la IRM o la TC).

8. Cápsula endoscópica (en casos donde no se ha establecido el diagnóstico, aun después de las pruebas anteriores) (Yamamoto *et al.*, 2016).

Tratamiento de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Ejercicio físico

La actividad física parece ser protectora para la EII al reducir la inflamación sistémica. Si bien los episodios de muy alta intensidad desencadenan la inflamación sistémica, el ejercicio regular tiene acciones antiinflamatorias. El estilo de vida sedentario conduce a la expresión reducida de PGC-1^a (coactivador del receptor gamma activador del proliferador de peroxisomas) que da como resultado un aumento de la respuesta inflamatoria sistémica. El PGC-1^a reduce la actividad del factor nuclear-κB (NF-κB), que conduce a la producción de citocinas proinflamatorias (Meligrana *et al.*, 2019).

Alimentación

Es indispensable complementar la dieta de los pacientes con EII que albergan bacterias AIEC con moléculas donantes de metilo entre ellos verduras de hoja verde y alimentos como el brócoli, granada y aguacate, para prevenir la expresión anormal de CEACAM6 y limitar la ingesta de serina y maltodextrina (carne, pescado, lácteos, huevos, pastas, cereales, entre otros.), para prevenir la proliferación y colonización intestinal de AIEC. También se recomienda ingerir prebióticos para favorecer el crecimiento y la actividad de bacterias protectoras que limitarían la implantación de

patobiontes como AIEC; esta opción terapéutica está respaldada por el hecho de que dos prebióticos, los arabinosilanos y la inulina, pueden reprimir la presencia de patobiontes como AIEC y otros, que comprende la mucosa (Meligrana *et al.*, 2019).

Probióticos

Los probióticos son microorganismos vivos que tienen un impacto beneficioso sobre la salud cuando se administran en cantidades adecuadas, mientras que los prebióticos son compuestos dietéticos que inducen el crecimiento o la actividad de microorganismos beneficiosos. Según el estudio de Van den Abbeele y col., en 2016, se ha observado una disminución en el desarrollo y crecimiento de bacterias como AIEC, cuando se pusieron a competir con *Lactobacillus rhamnosus* GG, *L. reuteri* 1063 y la inulina prebiótica, mientras que los arabinosilanos prebióticos redujeron la adhesión de AIEC a la mucina *in vitro*. Por lo cual los probióticos podría representar una buena opción terapéutica para los pacientes con EC positivos para AIEC (Meligrana *et al.*, 2019).

Aminosalicílicos

Para la EII, el tratamiento predilecto para comenzar con fármacos es 5-aminosalicilatos (5-ASA), en este caso la mejor opción es la mesalazina en diferentes formulaciones como oral (comprimidos, gránulos) que generalmente actúa en 2 – 4 semanas, tópico, supositorios, espuma o enema (Ordaz *et al.*, 2012.). La elección de una u otra formulación dependerá de la extensión de la enfermedad y de la aceptación por parte del paciente (Sicilia *et al.*, 2020.).

Esteroides

Los esteroides se pueden administrar por vía oral, por vía rectal o, en casos graves, por vía intravenosa. Son muy eficaces para cortar los síntomas del brote de Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Tanto la enfermedad de Crohn como la Colitis Ulcerosa de intensidad moderada o grave responden en más de un 80% de los casos a esteroides. Se utilizan, sobre todo en los momentos iniciales de la enfermedad. Los esteroides modernos (budesonida y beclometasona), se usan en casos de gravedad algo menor. El paciente que no responde a esteroides durante un brote se denomina córticorrefractario (Lopez *et al.*, 2015.).

Antibióticos

Los antibióticos aparecen como el primer enfoque lógico para manipular la microbiota de los pacientes con EC y eliminar patobiontes como AIEC, y se han probado varios antibióticos para tratar la EC, como la ciprofloxacina, los aminoglucósidos o la rifaximina. (Dogan *et al.*, 2018).

Factores Predisponentes de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal

Hasta el momento la etiología de la Enfermedad Inflamatoria Intestinal es desconocida, sin embargo, pueden existir factores predisponentes que generen el ambiente ideal para padecer EII. Los cuales son los siguientes:

Factores genéticos

Dentro de este apartado encontramos al gen *hla-DRB1*0103* el cual es un marcador predisponente para la población mexicana cuya presencia aumenta la susceptibilidad de padecer Colitis Ulcerosa (Yamamoto., 2010). Otro gen que podemos encontrar es el gen *NOD2* que es una proteína intracelular que se expresa en células del sistema inmune como macrófagos, monocitos y células epiteliales, sirve para la detección de productos bacterianos, regula la activación del factor nuclear NF-kB y tiene actividad bactericida. Cuando existe una mutación en dicho gen se crea un estado de respuesta anormal que influye aparentemente en la enfermedad (Yamamoto., 2010).

Factores inmunológicos

Estrés

El estrés, la ansiedad y la depresión se ha observado que podría empeorar el curso de la EII (Meligrana *et al.*, 2019). El estrés es la respuesta fisiológica coordinada del organismo frente dichos estímulos que amenazan la homeostasis (López-Calderón, 2010). El exceso de estrés altera y puede ocasionar el desarrollo de nuevas enfermedades o exacerbar las ya existentes (López-Calderón, 2010). La hormona liberadora de corticotropina (CRH) es el principal mediador de la respuesta al estrés. Se trata de un péptido activador de dos receptores específicos: CRH-R1 y CRH-R2

(Dedic et al., 2017). Los receptores CRH-R1 y CRH-R2 se localizan principalmente en el cerebro. Concretamente, la activación del receptor CRH-R2 inhibe la función gástrica mientras que la activación del receptor CRH-R1 estimula la función del colon y aumenta la hipersensibilidad visceral (Taché et al., 2017).

Obesidad

Se ha observado que la incidencia de EII aumenta de forma paralela con el sobrepeso y la obesidad. Se ha reportado que aproximadamente 15-40% de los pacientes con EII tiene sobrepeso (Meligrana *et al.*, 2019). La obesidad se reconoce como un estado perpetuo de inflamación crónica, a través de un aumento de citoquinas proinflamatorias producidas por los adipocitos y la conversión de preadipocitos a macrófagos. La obesidad en pacientes con EC mostró un aumento en la probabilidad de cirugía (Meligrana *et al.*, 2019).

Factores ambientales

Contaminación

La exposición del intestino a los contaminantes puede ocurrir por inhalación de gases, eliminación mucociliar de material particulado de los pulmones y contaminación de las fuentes de agua y alimentos. La exposición a partículas atmosféricas aumenta la permeabilidad intestinal, la respuesta inmune innata en el intestino, la expresión de citoquinas proinflamatorias y altera la microbiota. Un estudio demostró que individuos residentes en regiones con altas concentraciones de dióxido nitroso y dióxido de azufre tenían más probabilidades de desarrollar EII (Opstelten *et al.*, 2016).

Calidad del sueño

La modernización ha hecho que haya mayor cantidad de contaminación auditiva y visual, lo que a llevado a que existan trastornos del sueño y del ciclo circadiano, existen estudios que hablan sobre como estas alteraciones pueden afectar la permeabilidad intestinal, la translocación de endotoxinas bacterianas, la disbiosis intestinal y las citoquinas proinflamatorias (Swanson *et al.*, 2017).

Factores alterantes de la mucosa intestinal

Dieta

La ingesta dietética de ácido graso poliinsaturado como la grasa de vaca y la yema de huevo se asocia con un mayor riesgo de CU. En cuanto a los emulsionantes que se usan para estabilizar sustancias con alto contenido en grasas, como los helados de crema, se ha visto que actúan directamente sobre la microbiota, aumentando el potencial proinflamatorio con aumento de las sustancias bioactivas y el riesgo de colitis. El consumo de azúcares y productos con carbohidratos refinados y procesados puede ser un factor de riesgo para el desarrollo de EII (Meligrana *et al.*, 2019).

Antinflamatorios no esteroideos (AINES)

Este tipo de fármaco es el más utilizado ya que nos ayudan a controlar cierto tipo de dolores, sin embargo, los AINES alteran la composición del moco al inhibir la secreción de bicarbonato y prostaglandinas e inhiben la secreción de fosfolípidos, alterando la permeabilidad intestinal (Meligrana *et al.*, 2019).

Disbiosis Intestinal

La disbiosis es la pérdida del equilibrio entre las células de un organismo humano y las células bacterianas (microbianas, en general) que lo habitan (Sebastián *et al.*, 2018). Como se puede observar en la (Fig. 2) los cambios en la transmisión vertical del microbioma, el uso de antisépticos, antibióticos y los hábitos dietéticos de la sociedad industrializada parecen estar involucrados en el origen de la disbiosis (Álvarez *et al.*, 2021).

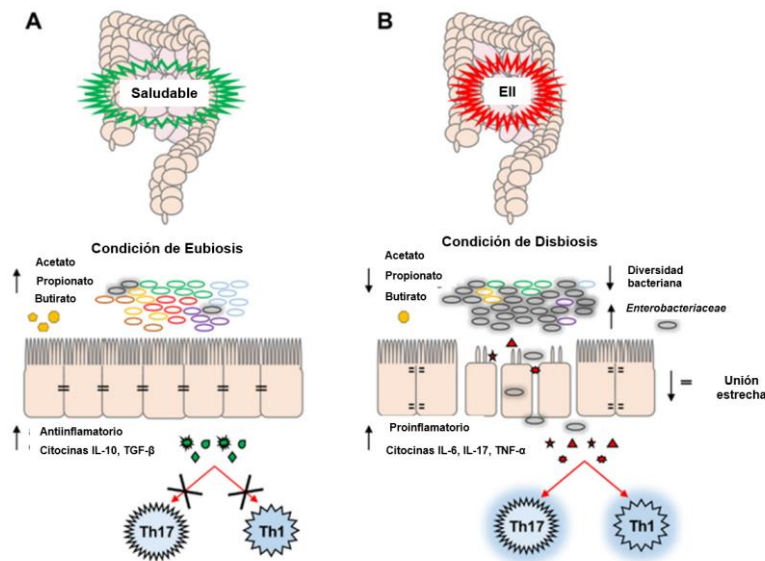


Figura 2 Representación de la condición de Eubiosis y Disbiosis. En la Eubiosis en condiciones normales el intestino es capaz de producir ácidos grasos de cadena corta para mantener el equilibrio como el acetato, propionato y butirato, previniendo así la invasión por patógenos y también regulando la respuesta inmunológica aumentando las citocinas antiinflamatorias como la IL-10 y TGF-β, lo que conlleva a la disminución de la activación de células como la Th17 y Th1. En cambio, en la Disbiosis las bacterias de la familia Enterobacteriaceae tienen un aumento en su crecimiento en contraste con la disminución de la diversidad bacteriana, provocando una disminución en la producción de ácidos grasos de cadenas cortas, lo cual va a aumentar la permeabilidad intestinal y al mismo tiempo aumentar la producción de citocinas proinflamatorias como IL-6, IL-17 y TNF-α, lo cual genera la activación de las células Th17 y Th1 implicadas en la respuesta inflamatoria. Modificado de Baldelli *et al.*, 2021.

Como muchas otras enfermedades, la EII es una enfermedad multifactorial que ocurre cuando factores ambientales desencadenan factores genéticos en una persona susceptible. Recientes estudios de asociación de la secuenciación del genoma completo humano identificaron 200 loci involucrados en la EII. Participan en gran medida en 3 áreas. La primera área está relacionada con la inmunidad innata y la autofagia (p. ej., NOD2, ATG161, IRGM, LRRK2). Es decir, reconocen y eliminan agentes microbianos. El segundo está relacionado con la inmunidad adaptativa de la señalización de la interleucina-23 y las células T-helper 17 (p. ej., IL23R, IL12B, STAT3, JAK2, TYK2) y la tercera, la señalización de la interleucina-10 (IL-10) (Larabi *et al.*, 2020).

Las bacterias de la microbiota intestinal pueden producir ácidos grasos de cadena corta (AGCC) mediante la degradación de polisacáridos no digeridos y almidones. Los principales AGCC producidos son butirato, acetato y propionato, son conocidos por sus efectos antiinflamatorios. Además, el ácido propiónico (PA) se usa comúnmente en la agricultura debido a sus propiedades antimicrobianas. Sin embargo, un estudio reciente demostró que la exposición de AIEC a PA *in vitro* e *in vivo* (a través de la suplementación con PA en el agua potable de ratones) exacerbó el fenotipo AIEC (mayor capacidad para adherirse, invadir IEC y formar biopelículas) y promovió a que AIEC tuviera mayor colonización y persistencia a largo plazo *in vivo*. El análisis de RNA-seq reveló que PA inducía un programa de transcriptómica específico, con la inducción de genes implicados en la formación de biopelículas, respuestas al estrés, metabolismo, integridad de la membrana y transporte de fuentes alternativas de carbono. Curiosamente, el fenotipo de virulencia inducido por PA se invirtió después de su eliminación. Estos resultados no solo resaltan los riesgos potenciales del uso de PA como antimicrobiano, especialmente en el contexto de la colonización de AIEC, sino que también muestran que AIEC evolucionó para aprovechar las moléculas que se encuentran en el tracto gastrointestinal para superar a los microorganismos de la microbiota (Chervy *et al.*, 2020).

De los factores genéticos implicados en la etiología de la EII, se han identificado variantes en los genes relacionados con la autofagia. La autofagia es un proceso conservado durante la evolución en eucariotas, por el cual los materiales citoplasmáticos se degradan dentro del lisosoma. Se han descrito tres formas distintas de autofagia, que incluyen micro autofagia, autofagia mediada por chaperonas y macro autofagia (Larabi *et al.*, 2020).

La autofagia juega un papel clave en el mantenimiento de la homeostasis intestinal, en la regulación de la interacción entre microbiota intestinal y la inmunidad innata y adaptativa, y en la defensa del hospedero contra los patógenos intestinales. Una disfunción de la autofagia se asocia con varias patologías humanas, incluida la EII (Larabi *et al.*, 2020).

Así, el moco actúa como una matriz cargada de péptidos antimicrobianos que son secretados por las células de Paneth, como las defensinas, la lisozima C, las fosfolipasas y la inmunoglobulina A secretada, y forma un gradiente antimicrobiano hacia la luz intestinal (Fig. 3). De esta forma, como se observa en la figura la mucosidad del intestino delgado dificulta la capacidad de las bacterias viables para llegar a las células epiteliales, protegiendo las criptas y las células madre (Sevrin *et al.*, 2020).

El ambiente intestinal también puede verse afectado por la dieta, especialmente en personas que viven en países desarrollados y tienen un estilo de vida occidental. La dieta occidental, enriquecida en grasas totales, proteínas animales, ácidos grasos poliinsaturados y azúcares refinados, se ha asociado con un alto riesgo de desarrollar EC. El objeto de varios estudios fue captar mejor los impactos de una dieta alta en grasas y alta en azúcares en la composición del microambiente intestinal y en la infección por AIEC. Con lo que se concluyó que la dieta alta en grasa y alta en azúcares indujo una inflamación de bajo grado y facilitó la colonización de la mucosa intestinal por AIEC de una manera dependiente de la microbiota (Chervy *et al.*, 2020).

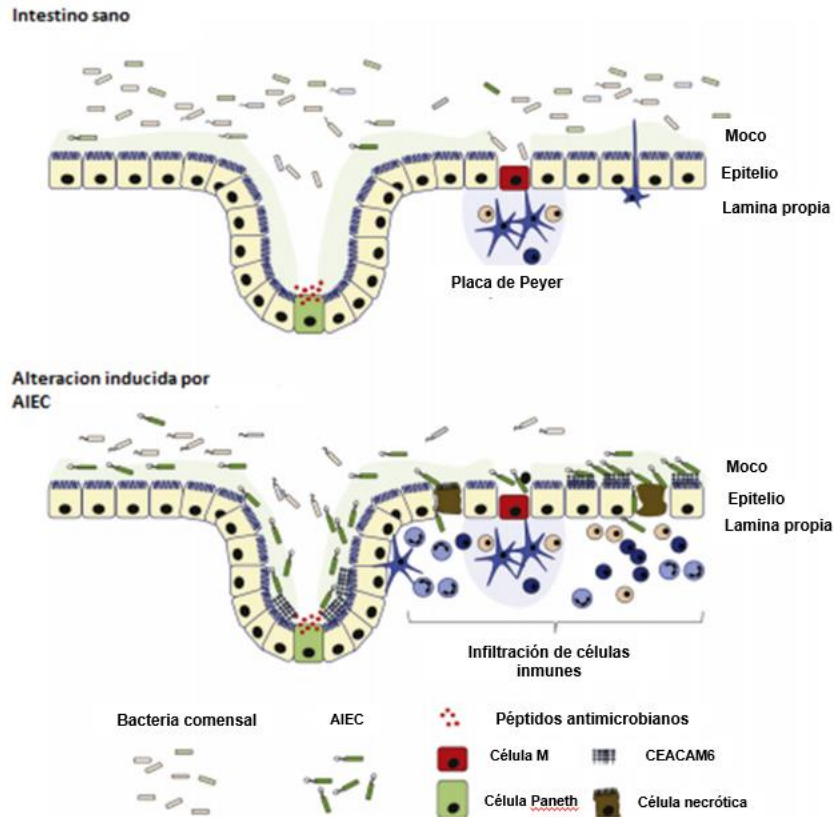


Figura 3. Interacción de AIEC con la mucosa Intestinal. En la parte superior de la imagen, en un intestino sano, podemos observar que se encuentran en simbiosis tanto las bacterias comensales como AIEC, en cambio en un intestino con alteración inducida por AIEC (imagen inferior) podemos observar cómo se comienza a producir la molécula CEACAM6 la cual es utilizada por la bacteria para unirse a ella y permear hasta la lámina propia, al mismo tiempo en las Placas de Peyer se va a estar produciendo una respuesta inmunológica exacerbada lo que va a generar los signos y síntomas del paciente. Modificado de Shaler *et al.*, 2019.

Adherencia de AIEC

Una vez que se establece en la luz intestinal y atraviesa la capa de moco, el proceso de adhesión bacteriana está mediado por flagelos, tanto por medio de la movilidad como indirectamente manteniendo la expresión de pili tipo 1. La expresión de flagelos depende de la expresión de 3 clases de genes pertenecientes al regulón flagelar (clase 1 o temprano, clase 2 o medio, clase 3 o tardío), el cual presenta más de 50 genes. La adherencia en AIEC este mediada por diversos genes como *fimH* del pili tipo1 que se une a la molécula de adhesión celular 6 relacionada con el antígeno carcinoembrionario (CEACAM6) con la cual va a generar una modificación en las uniones de Claudina2, Ocludina y E-cadherina, lo que va a aumentar la

permeabilidad entre las células intestinales y esto va a permitir el paso de AIEC entre los enterocitos. Otro gen involucrado es *chiA* que va a llevar a cabo su unión hacia receptores que se harán presentes en la disbiosis intestinal como el receptor CHI3L1 con el cual interactúa y lograr permear hasta la lámina propia del intestino; por otro lado, vesículas de membrana externa (OMV) por su parte llevarán a cabo su unión al receptor GP96 y la fimbria *lpf* le va a permitir llevar a cabo la unión hacia las células M (Fig. 4) (Chervy *et al.*, 2020).

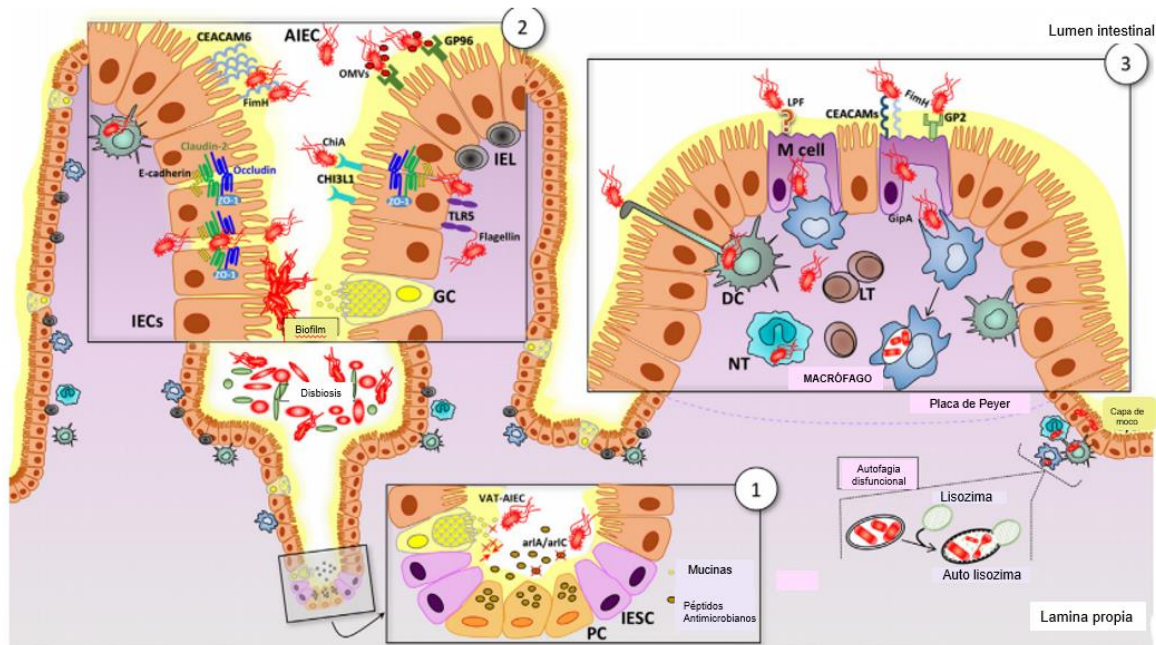


Figura 4 Mecanismo de interacción de AIEC con la microbiota intestinal. (1) AIEC resiste a los péptidos antimicrobianos y degrada mucinas. (2) El intestino bajo condiciones de disbiosis va a producir el receptor CEACAM6 hacia el cual AIEC va a lograr unirse por medio de su pili tipo1; una vez llevada a cabo esta unión se van a modificar las uniones de E-cadherina, claudina y ocludina lo que le va a permitir permear hasta la lámina propia. Otra manera de penetrar es por medio de sus vesículas de membrana externa las cuales se van a unir al receptor GP96; también lo hace por medio de la quitinasa expresada por el gen *chiA* la cual se va a unir al receptor CHI3L1 y de ambas maneras va a lograr permear hasta la lámina propia. (3) En las placas de Peyer también hay interacción de AIEC con las células M, donde una de las uniones va a estar mediada por la unión de su pili tipo1 y el receptor GP2 y de la fimbria polar larga que interactúa con las células M. Modificado de Palmela *et al.*, 2017.

Invasión del intestino por AIEC

La capacidad de adherencia e invasión de AIEC van de la mano, si la bacteria tiene algún defecto en su capacidad de adhesión entonces va a disminuir su invasión. Para llevar a cabo la invasión de las células lo primero que debe hacer AIEC es la degradación de mucinas y resistir a la actividad de péptidos antimicrobianos, los cuales son segregados por el intestino en forma de moco protector de las células; para realizar esta acción de degradación necesita proteínas degradadoras que son codificadas por los genes como *arlA*, *arlC* y *vat-AIEC*, los cuales le confieren la capacidad de disminuir la viscosidad del moco lo que ayuda a la adhesión del microorganismo a las células intestinales.

La invasión de AIEC a las células epiteliales intestinales se puede dar mediante el uso de microfilamentos y microtúbulos de actina de la célula hospedera, para posteriormente replicarse intracelularmente, así translocarse a través del intestino humano barrera, y poder moverse hacia tejidos más profundos (Fig. 5) (Mirsepasi *et al.*, 2019).

Como reporta Chervy *et al.*, en 2020, la motilidad le confiere la capacidad a AIEC de llevar a cabo una mejor invasión a las células intestinales. Los patobiontes AIEC deben modular finamente la expresión de flagelos durante el proceso de la infección, aprovechando su regulación génica de virulencia específica para mejorar su adaptabilidad y flexibilidad dentro del entorno intestinal. Un factor importante son las sales biliares las cuales se ha observado en diversos estudios como los citados en Camprubí *et al.*, 2020 que actúan como precursores de genes que podrían funcionar como factores de virulencia.

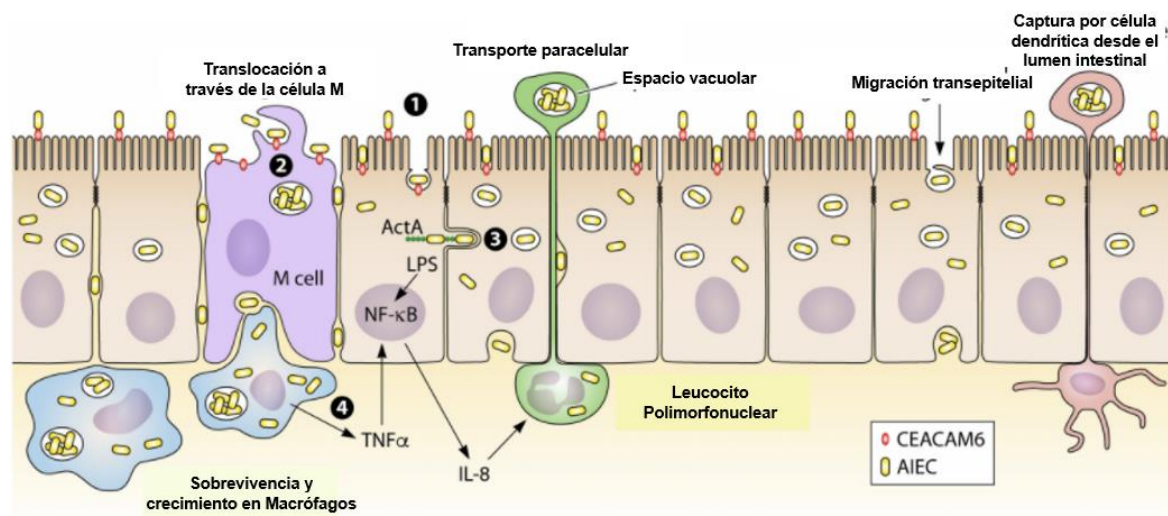


Figura 5. Invasión de AIEC en los enterocitos. La colonización anormal de la mucosa ileal se inicia por la interacción de AIEC con los enterocitos. (1) AIEC se une a CEACAM6, que está regulado positivamente en el íleon del paciente con CD. (2) Mediante el uso de un proceso similar a la macro pinocitosis, AIEC ingresa, sobrevive y se replica dentro del citoplasma de la célula huésped después de la lisis (3) Al utilizar su capacidad invasiva y los microfilamentos y microtúbulos de actina de la célula huésped, cruza la barrera intestinal a través de las células epiteliales intestinales o a través de las células M, invade las células huésped y se transloca a otras células.(4) AIEC es capaz de sobrevivir extensamente dentro de macrófagos residentes y células dendríticas e induce la secreción de grandes cantidades de TNF- α e inflamación granulomatosa. Modificado de: Mirsepasi *et al.*, 2019

Supervivencia en Macrófago

Los macrófagos son células clave del sistema inmunitario innato, pueden reconocer MAMP (LPS, flagelos y peptidoglicano) a través de receptores de reconocimiento de patrones (PRR) como los TLR. La interacción entre TLR y MAMP activa las vías NF- κ B, MAPK e IRF que conducen a la expresión de genes que codifican citoquinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6. Los macrófagos también limitan la diseminación bacteriana a través de la fagocitosis y a través de la presentación de antígenos para activar las células inmunitarias adaptativas. Los macrófagos se encuentran en mayor número en el tejido inflamado en pacientes con EC, como se mencionó anteriormente, las bacterias AIEC pueden sobrevivir y replicarse dentro de los macrófagos, en los fagolisosomas, sin inducir la muerte celular a través de la inducción del estrés (Fig. 6). Los genes participantes en estos son *htrA* que codifica para una oxidoreductasa y el gen *dsbA* que también codifica para una

oxidorreductasa. Curiosamente, la inducción de estos genes no se observa en una bacteria *E. coli* no patógena, lo que demuestra que el fondo genético AIEC LF82 es crucial para la inducción de la transcripción de estos genes durante la fagocitosis. Los macrófagos infectados con AIEC liberan una gran cantidad de TNF- α y no sufren muerte celular (Fig. 6). AIEC sobrevive y se replica dentro de los macrófagos porque desarrollan mecanismos para resistir las condiciones fagolisosomales y promover su propia replicación a través de la estimulación de la secreción de TNF- α por parte de los macrófagos (Chervy *et al.*, 2020).

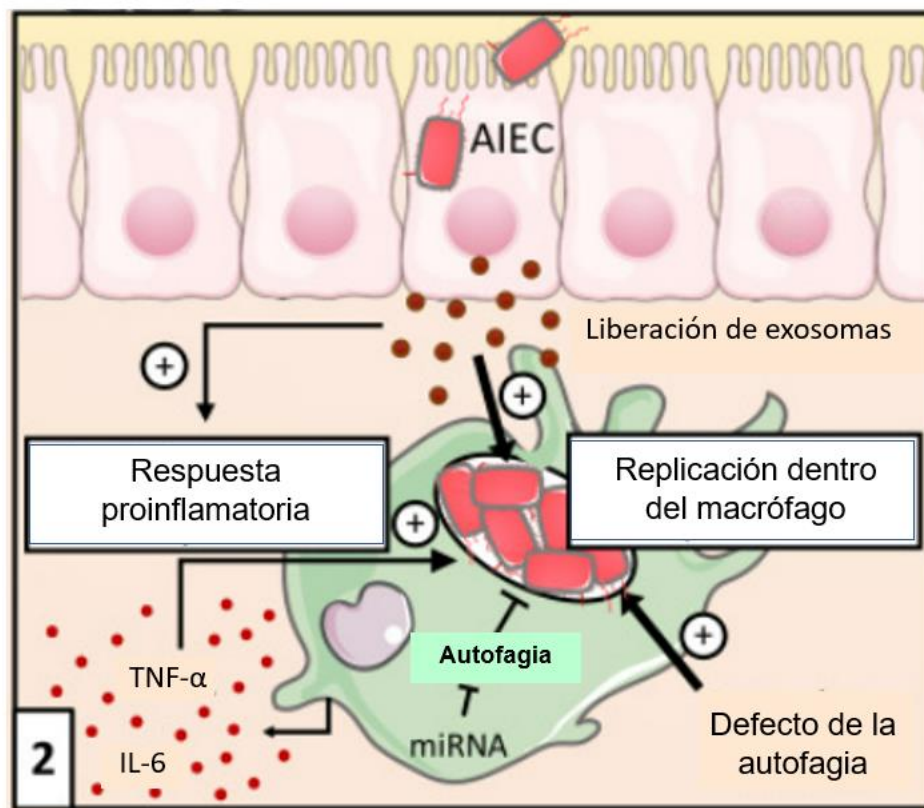


Figura 6 Supervivencia de AIEC dentro del macrófago. Después de que AIEC llega hasta la lámina propia las células de respuesta inmunológica como los macrófagos se hacen presentes, entonces AIEC va a aumentar la respuesta proinflamatoria, donde el macrófago va a presentar un defecto en la autofagia en donde AIEC lo va a utilizar para llevar a cabo su replicación dentro del macrófago, lo que va a aumentar las citocinas proinflamatorias como TNF- α e IL-6. Modificado de: Chervy *et al.*, 2020

Mecanismos de adherencia de *E. coli* Adherente/Invasiva a los enterocitos

Cada célula de *E. coli* Adherente/Invasiva tiene estructuras en su superficie, necesarias para la adhesión, denominados factores de colonización. Por medio del pili tipo 1 reconoce el receptor de la célula eucariote CEACAM6 e invade (Farfán *et al.*, 2016).

Dentro de las principales características de la patogenicidad están la adhesión epitelial, la invasión, la supervivencia dentro de los macrófagos y la formación de biopelículas.

Invasión: Esta bacteria posee dos mecanismos de invasión a la célula. *E. coli* adherente invasora se moviliza utilizando los flagelos, los que la acercan a la célula epitelial y, por medio de la adhesina FimH localizada en el pili tipo1, se une a los residuos oligomanósidos del receptor de superficie CEACAM6 de la célula hospedera. La invasión de los enterocitos intestinales conduce a un aumento de la estimulación de IFN- γ y FNT- α , lo que genera la sobre expresión de CEACAM6 (Farfán *et al.*, 2016).

El segundo mecanismo es mediante la invasión de las células M. *E. coli* adherente invasora posee una fimbria polar larga (*lpf*: long polar fimbriae) que permite la aproximación a las células M del intestino. Utiliza el mismo proceso de EIEC donde atraviesa la célula por medio de transcitosis. Es fagocitada por los macrófagos, donde se replica dentro de los fagosomas sin estimular la muerte celular e induce en el macrófago infectado la secreción de TNF- α , el cual causa la inflamación del íleon y conlleva la formación de granulomas.

Los pacientes que padecen EC también generan en las células epiteliales estrés del retículo endoplásmico. En respuesta a esto, el factor de transcripción XBP1 origina un aumento en la expresión de GP96 que sirve como receptor de la proteína transmembranal *OmpA*, generada por la formación de vesículas de membrana externa (OMV: outer membrane vesicles). *OmpA* promueve la virulencia del patotipo al intervenir en la adhesión, invasión y la permanencia de bacterias intracelulares (Farfán *et al.*, 2016).

Evasión del sistema inmune

La regulación inmunitaria del intestino será, por tanto, la interacción entre la célula epitelial que controla el acceso a los diferentes compartimentos de la mucosa y las células inmunológicas que median las respuestas inflamatorias o tolerantes (Borrueal *et al.*, 2013). La célula epitelial tiene no sólo la capacidad de procesar y transportar activamente los antígenos hacia la lámina propia sino, además, de actuar como presentadora de antígeno, aunque de una manera un tanto especial. Un estudio reciente demostró que linfocitos T antígeno-específicos se transformaban en no respondedores o anérgicos cuando era únicamente la célula epitelial la que presentaba el antígeno (Farfán *et al.*, 2016). Aunque se producía una importante proliferación del clon específico, no se desencadenaba una respuesta inflamatoria contra las células epiteliales (Fig. 7). Aparentemente, en condiciones normales, la presentación del antígeno luminal no patógeno por la célula epitelial conduciría a la inactivación o supresión de la respuesta inmunitaria. Sin embargo, en condiciones patológicas, como la EC, estos mecanismos reguladores probablemente fallan, conduciendo a una situación en la que la célula epitelial es obviada y los antígenos bacterianos contactan directamente con células presentadoras de antígeno que inducen una respuesta inflamatoria local, lo que genera cambios en el procesamiento y presentación de antígenos: inhibición de la expresión de moléculas MHC I y MHC II (Borrueal *et al.*, 2013).

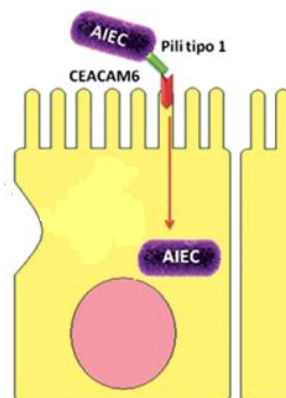


Figura 7. Interacción de AIEC con el enterocito. Por medio del pili tipo 1 reconoce el receptor de la célula e invade. Tomado de: Farfán *et al.*, 2016.

ANTECEDENTES

En la siguiente tabla se describen en orden histórico, los trabajos que han contribuido con investigaciones que relacionan la presencia de *E. coli* Adherente/Invasiva con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Tabla 3. Investigaciones que relacionan la presencia de AIEC con la Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

Año	país	Estudio	Hallazgo	Referencia
1998	Francia	Aislamiento de cepas de <i>E. coli</i> de la mucosa ileal de pacientes con EC	Se describen cepas adherentes, causantes de la destrucción de la barrera intestinal por medio de una alfa-hemolisina	Darfeuille <i>et al.</i> , 1998
1999	Francia	Comparación de la capacidad de invasión y marcadores genéticos de la cepa LF82 con los patotipos existentes de <i>E. coli</i>	La cepa LF82 tiene capacidad de invasión superior a los otros patotipos y sugieren la existencia de un nuevo grupo potencialmente patogénico AIEC	Boudeau <i>et al.</i> , 1999
2005	Francia	Crearon mutantes de la cepa LF82 suprimiendo el gen <i>yfgl</i>	La falta del gen <i>yfgl</i> disminuye la capacidad de invasión	Rolhion <i>et al.</i> , 2005
2007	Francia	<i>E. coli</i> adherente-invasiva (AIEC) se aísla de biopsias ileales del 36,4% de los pacientes con afectación ileal de la EC	Se demostró que AIEC, es predominante en las lesiones ileales tempranas como en las crónicas, esto dependiente de la capacidad de estas bacterias patógenas para colonizar el tracto gastrointestinal. Caracterizan la primera cepa AIEC LF82	Rolhion <i>et al.</i> , 2007
2008	Estados Unidos	Se examinaron varias cepas de <i>E. coli</i> aisladas de pacientes con EC por su capacidad de producir inflamación en las células intestinales.	AIEC puede contribuir con la inflamación en la Enfermedad de Crohn. Caracterizan la segunda cepa AIEC O83: H1, pero observan que no comparte determinantes	Tonyia <i>et al.</i> , 2008 McPhee <i>et al.</i> , 2001

		Se caracterizó <i>E. coli</i> O83: H1. Contiene un plásmido que acarrea los genes <i>arlA/arlC</i>	genéticos con la primera cepa	
2012	España	Enfermedad inflamatoria intestinal	La flora bacteriana endógena juega un papel primordial en la patogenia y los esfuerzos se centran en conocer su interacción con una respuesta inmune normal o desregulada	Medina B. Enrique <i>et al.</i> , 2012
2016	Brasil	Se estudio las características de las <i>E. coli</i> diarrogénicas.	El patotipo de <i>E. coli</i> invasivo adherente (AIEC), constituyen uno de los posibles agentes de la enfermedad de Crohn (EC)	T.A.T. Gomes <i>et al.</i> , 2016
2016	México	Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso Latinoamericano de la Pan American Crohn's and Colitis Organisation	El sobrecrecimiento bacteriano causa una predominancia de algunas bacterias anaeróbicas en el reservorio, lo cual provoca una respuesta inmunitaria con el desarrollo de la EII	Yamamoto F. J.K. <i>et al.</i> , 2016
2017	Estados Unidos	Exploración de datos existentes sobre la prevalencia de AIEC en los pacientes con EII, localización, prevalencia y recurrencia postoperatoria	AIEC está involucrada en la patogénesis de la EII, en particular la EC. Aunque la prevalencia de AIEC en la mucosa de los pacientes con EC varía ampliamente entre los estudios, varios grupos han reportado colonización de AIEC en >50% de los pacientes con EC	Palmela Carolina <i>et al.</i> , 2017
2017	Chile	Presencia de <i>E. coli</i> intracelular en mucosa intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y su asociación con características clínicas y el uso de corticosteroides	La EII se asocian con la presencia de <i>E. coli</i> intracelular en la mucosa intestinal, lo que sugiere una alteración de la microbiota o la pérdida de integridad de la barrera epitelial	De la Fuente Marjorie <i>et al.</i> , 2017
2017	España y Chile	Estudio de la diversidad genética y la virulencia de cepas de <i>E. coli</i> de	No encontraron un marcador genético único para AIEC entre las cepas de ambos lugares y tiene	Céspedes <i>et al.</i> , 2017.

		España y Chile aisladas de pacientes con Enfermedad de Crohn	una alta variabilidad de perfiles de virulencia. Los genes determinados en este estudio fueron: <i>cnf1</i> , <i>hlyA</i> , <i>cdtB</i> , <i>neuC</i> , <i>ibeA</i> , <i>papC</i> , <i>sfa/focDE</i> , <i>afa/draBC</i> , <i>fimH</i> , <i>fimAvMT78</i> , <i>aufA</i> , <i>ratA</i> , <i>cvaC</i> , <i>irp2</i> , <i>thuD</i> , <i>chuA</i> y <i>gipA</i> .	
2020	Francia	Actualización de <i>E. coli</i> Adherente-Invasiva en la Enfermedad de Crohn	Se necesitan estudios de detección de biomarcadores moleculares para AIEC en pacientes con EC. Para el gen <i>yfgI</i> se concluyó que su delección puede aminorar su capacidad de invasión, por lo cual la presencia de este puede darle a la bacteria mayor capacidad de invasión. Se observó que la expresión de las proteínas codificadas por los genes <i>arlA</i> y <i>arlC</i> le ayudan a la bacteria a la resistencia hacia defensinas para después esta se pueda adherir fácilmente.	Chervy et al., 2020 Francia
2021	Canadá	Prevalencia de <i>Escherichia coli</i> Adherente-Invasiva asociada a la Enfermedad Inflamatoria Intestinal: Una revisión sistemática y de meta análisis	Se realizó un estudio para determinar la presencia de <i>Escherichia coli</i> Adherente-Invasiva en la Enfermedad Inflamatoria Intestinal y comparar su similitud filogenética con las de las cepas control.	Kamali et al., 2021.
2022	Francia	Prevalencia, abundancia y virulencia de <i>Escherichia coli</i> Adherente-Invasiva en Colitis Ulcerosa, Cáncer colon rectal y Enfermedad Colédoca.	Se observó que, aunque en la Enfermedad de Crohn AIEC es aislada con más frecuencia también se puede encontrar en la Colitis Ulcerosa.	López-Siles et al., 2022

ANTECEDENTE DIRECTO

En el laboratorio de Microbiología Hospitalaria y de la Comunidad (LMHyC), en la Ciudad de Puebla, en 2019, Lara Flores aisló e identificó 66 cepas de *E. coli* de 3 pacientes con EII, a partir de biopsias de colon descendente, transverso, sigmoidees y ano descendente, los pacientes tenían un rango de edad entre 20 a 60 años. Estas cepas se encuentran conservadas en el cepario del LMHyC. A pesar de que no se realizó el fenotipo de sensibilidad a todas las cepas, alrededor de 32 de estas cepas presentaron alta resistencia a algunos antibióticos como Quinolonas, Tetraciclinas, Trimetoprim con Sulfametoxazol y Aminoglucósidos.

De las 66 cepas de *E.coli* solo se le realizó el ensayo de adherencia a 20 cepas de las cuales solo 15 cepas de *E. coli* fueron positivas a ensayos preliminares de adherencia en células HeLa, dato que sugirió que pueden ser del patotipo Adherente/Invasivo (Anexo 3). Sin embargo, no se realizaron pruebas de invasión, de sobrevivencia en macrófagos, ni producción de biopelícula.

JUSTIFICACION

Las causas de la EII son multifactoriales, lo que complica un diagnóstico asertivo y un tratamiento adecuado en etapas tempranas. Una de estas causas puede ser la invasión de la mucosa intestinal por ciertos patotipos de *E. coli*, que ocasionan en el hospedero una respuesta inflamatoria excesiva, mediada por distintos factores inmunológicos que serían responsables de desencadenar la cascada inflamatoria con lesión de la mucosa intestinal.

Por lo que este trabajo se enfocó a analizar los factores de virulencia presentes en cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con EII, con la finalidad de estudiar el papel de estas bacterias que pudieran participar en la etiopatogenia de este conjunto de enfermedades intestinales.

Debido a las condiciones de pandemia por SARS-CoV2 que vivimos durante marzo de 2020 a junio de 2022, no fue posible abordar este proyecto en su totalidad como fue planteado originalmente, por lo que este trabajo se dividió en dos partes: 1) trabajo bioinformático y 2) trabajo experimental.

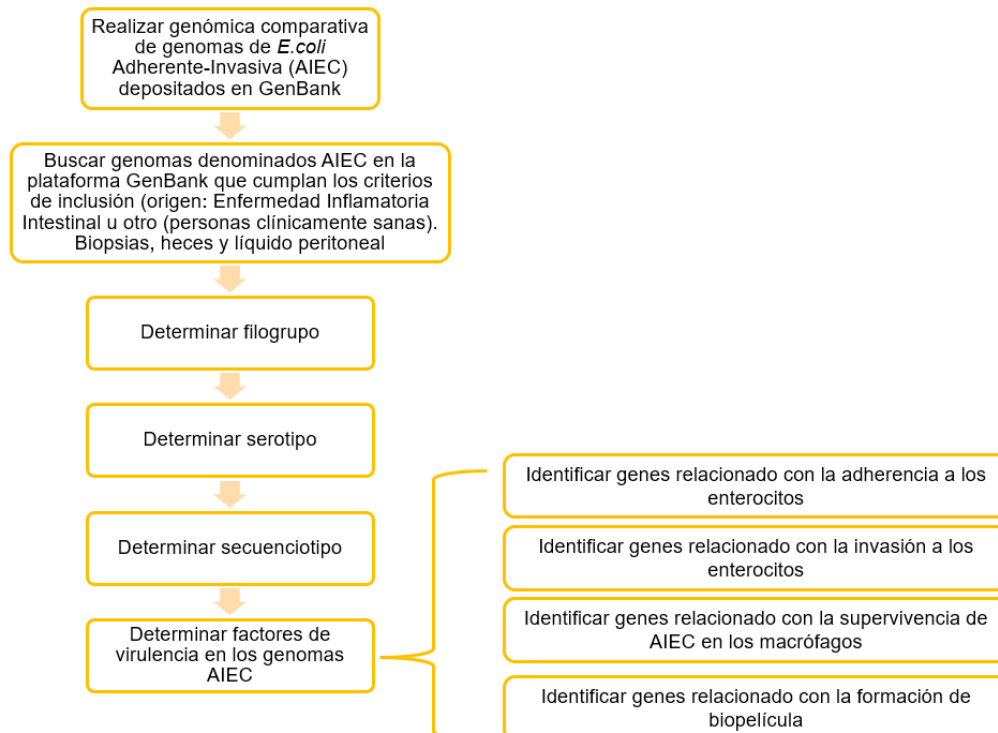
OBJETIVO GENERAL BIOINFORMÁTICO

Realizar genómica comparativa de genomas de *E. coli* Adherente-Invasiva (AIEC) depositados en el GenBank.

OBJETIVOS ESPECIFICOS BIOINFORMÁTICO

- Identificar genomas clasificados como *E. coli* adherente/invasiva (AIEC) en el GenBank.
- Determinar el filogrupo, serotipo y el secuenciotipo de los genomas AIEC.
- Determinar factores de virulencia en los genomas AIEC.
- Identificar genes relacionados con la adherencia a los enterocitos.
- Identificar genes relacionados con la invasión de enterocitos.
- Identificar genes relacionados con la supervivencia de AIEC dentro de macrófagos.
- Identificar genes que participen en la formación de biopelícula.
- Determinar la presencia del plásmido PO83 en cepas AIEC.

DIAGRAMA DE TRABAJO BIOINFORMATICO



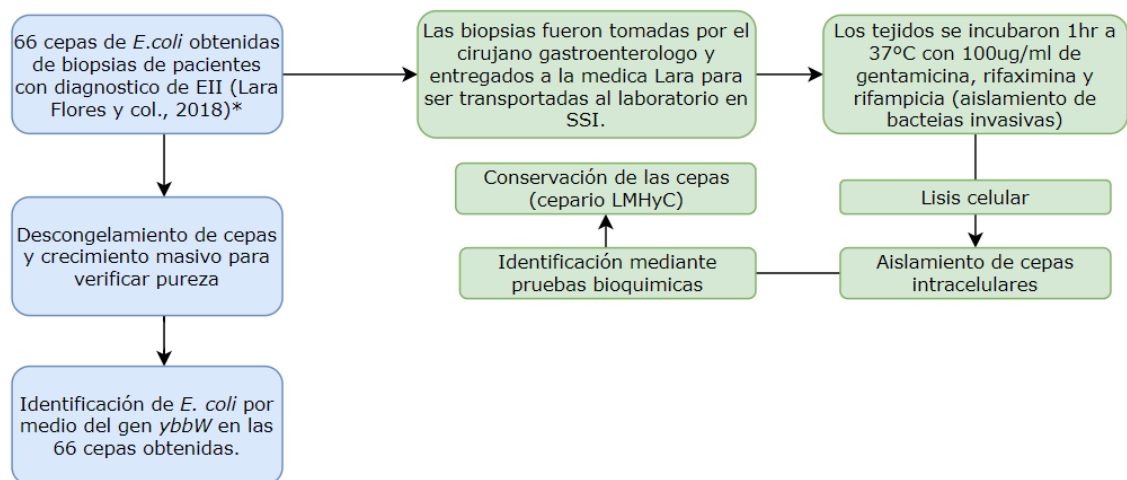
OBJETIVO GENERAL DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

Analizar las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

OBJETIVO ESPECIFICO DEL TRABAJO EXPERIMENTAL

- Determinación del gen *ybbW* en las cepas de *E. coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal

DIAGRAMA DEL TRABAJO EXPERIMENTAL



MATERIAL Y MÉTODOS

METODOLOGÍA DEL ESTUDIO BIOINFORMÁTICO

Búsqueda de genomas de AIEC en el GenBank

Se llevó a cabo una búsqueda de genomas denominados como *E. coli* Adherente/Invasiva en bases de datos libres, cumpliendo con los siguientes criterios de inclusión: que estuvieran en bases de datos como Patric 3.6.9 ahora llamado BV-

BRC 3.30.5g (<https://www.bv-brc.org/>), Pathogens (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pathogens/>) y GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>), clasificada fenotípicamente como AIEC, que fueran genomas cerrados o WGS, que fueran cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal obtenidas de biopsia de colon, ano, sigmoides, muestra de heces o liquido pleural. La búsqueda tuvo un punto de corte hasta mayo del año 2021.

Búsqueda de información sobre *Escherichia coli* Adherente/Invasiva (AIEC)

Se analizó la información reportada en PubMed de los últimos 10 años, sobre los factores genéticos asociados a la patogenicidad de *Escherichia coli* Adherente Invasiva (AIEC) y observamos que no existe un marcador específico para su identificación, como existe para los otros patotipos. Hasta el momento el método de identificación de AIEC es fenotípico, mediante ensayos de adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y formación de biopelícula.

Determinación de filogrupo

Los 30 genomas fueron sometidos a determinación de filogrupo por medio de la plataforma bioinformática Clermontyping (<http://clermontyping.iame-research.center/>), la cual utiliza la presencia o ausencia de amplicones *chuA*, *yjaA*, TspE4.C2 lo que va a construir un perfil para determinar si pertenecen a alguno de los ocho filogrupos A, B1, B2, C, D, E, F y G.

Determinación de secuenciotipo

Posteriormente, analizamos los genomas para determinar su secuenciotipo con la herramienta Bioinformática PubMLST (https://pubmlst.org/bigssdb?db=pubmlst_escherichia_segdef&page=sequenceQuer) y de la cual elegimos la clasificación por el esquema Achtman que utiliza 7 genes para determinar a que secuenciotipo pertenece.

Determinación de serotipo

La determinación del serotipo se realizó en la página del Center for Genomic Epidemiology con la herramienta bioinformática Serotype Finder (v 2.0)

(<https://cge.food.dtu.dk/services/SerotypeFinder/>) con la cual se determinó el lipopolisacárido o antígeno O y el antígeno flagelar o antígeno H. Contiene 188 grupos O designados (exceptuando O31, O47, O67, O72, O94 y O122), en cuanto al grupo H se cuenta con 53 antígenos (con la excepción de H13, H22 y H50, que han sido retiradas) (Joensen *et al.*, 2015).

Determinación de factores de virulencia

Se analizó la presencia de genes codificantes de factores de virulencia. Esto se realizó con la ayuda de la plataforma bioinformática Blast (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) basándonos en los genes que otros autores reportan su búsqueda y para lo cual realizaron la amplificación por PCR; también se analizó la presencia de genes reportados que juegan un papel importante en la parte fenotípica de la determinación de AIEC, como son los genes involucrados en la adherencia, invasión, sobrevivencia en macrófagos y formación de biopelícula.

Identificación del gen *fimH* de los genomas AIEC

Se observó la presencia del gen *fimH* por lo cual con la ayuda de la herramienta bioinformática FimTyper 1.0 (<https://cge.food.dtu.dk/services/FimTyper/>). FimTyper se construyó como una base de datos FASTA que contiene todos los alelos *fimH* actualmente conocidos y logra identificar el cambio en el gen.

Comparación y modelado de la proteína FdeC

Se observó que proteína FdeC está catalogada como una Intimina putativa y se comparó con la proteína Intimina de EPEC y EHEC por medio de la plataforma bioinformática Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) la cual se llevó a posterior modelado por homología de las proteínas con la ayuda de la herramienta del Instituto Suizo de Bioinformática (<https://swissmodel.expasy.org/interactive>).

Búsqueda de genes con RAST

Se analizaron los 30 genomas AIEC con la plataforma RAST (<https://rast.nmpdr.org/>), la cual se encarga de proporcionar anotaciones genómicas de alta calidad en otras palabras identifica los genes presentes en los genomas.

Búsqueda de genes con HMMER

A partir de los datos obtenidos obtenidos previamente en la identificación de genes de viulencia se hizo una identificación de los genes mas frecuentes en los genomas AIEC, los cuales se colocaron en el programa informatico HMMER el cual identifica si dicho gen esta presente en el genomas y la región en la que se encuentra.

Identificación de plásmidos

Se analizaron los genomas para determinar si podrían tener la presencia de algún plásmido esto con ayuda de la plataforma bioinformática PlasmidFinder 2.1 (<https://cge.food.dtu.dk/services/PlasmidFinder/>) la cual es utilizada para la detección y caracterización *in silico* de secuencias del plásmidicas.

METODOLOGIA EXPERIMENTAL

Cepas de estudio

Se trabajo con 66 cepas de *E. coli* obtenidas a partir de biopsias de tres pacientes diagnosticado con CUCI, Colitis Crónica y Diverticulitis (Tabla 4), las cuales fueron previamente verificadas para su pureza y almacenadas a -70°C.

Tabla 4. Cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

No. Paciente	Origen de la muestra	Edad	Sexo	Diagnóstico	No. de cepas <i>E. coli</i> obtenidas de cada muestra
1	Biopsia de colon descendente y transversal	23 años	Masculino	CUCI	37
2	Biopsia de sigmoides	61 años	Femenino	Colitis crónica y diverticulitis	22

3	Biopsia de colon descendente y ano	34 años	Masculino	CUCI	7
---	------------------------------------	---------	-----------	------	---

Extracción de ADN por el método de lisis por calor

Para la búsqueda de los genes de virulencia en las cepas de interés, se utilizó la técnica de PCR, para lo cual el templado de DNA se obtuvo mediante el método de lisis por calor. El método consiste en romper la célula bacteriana sometiéndola a ebullición permitiendo la salida del material genético al medio acuoso; para lo cual se sembró una colonia aislada de cada cepa de *E. coli* en placas de Soya Tripticaseina (BD Bioxon), estas fueron llevadas a incubación a 37°C durante toda la noche. Del cultivo previamente hecho se tomaron 2 asadas y se depositaron en un tubo eppendorf con 500 µl de agua destilada estéril, esto se mezcló en el vortex y se llevó a ebullición durante 15 minutos, posteriormente se llevó a centrifugación por 15 minutos a 13,000 r.p.m y el sobrenadante se separó en un tubo eppendorf estéril y se guardó en congelación hasta su uso

Cuantificación de ADN

A los lisados se les realizó la cuantificación de ADN utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific), para lo cual seleccionamos la opción de Ácidos Nucleicos. Inicialmente el equipo realiza una verificación automática; se limpió el lector del equipo con papel y se procedió a hacer un blanco con 2 µL de agua destilada estéril, una vez que se activó el lector del equipo, se procedió a la medición de la concentración de DNA en cada uno de los lisados, se fue limpiando el lector óptico entre muestras para evitar contaminaciones. Las muestras de templado fueron ajustadas a una concentración final de 200 ng/µL.

Amplificación de genes de identificación de *E.coli*

Para la identificación certera de *Escherichia coli* se realizó la amplificación de los genes *ybbW* y *uidA* (Tabla 5), los cuales codifican para un transportador de alantoína y para una Beta-glucuronidasa, respectivamente. La visualización de los amplificadores se realizó mediante una electroforesis en geles de agarosa al 1% a 85 V por 30min. Se utilizó un marcador de peso molecular GeneRuler 100bp Plus DNA

Ladder (Invitrogen). El gel se tiñó con BET (0.5 g/L) durante 10 segundos y lavados por 30 minutos en agua destilada, para posteriormente fotografiar los geles en un digitalizador MiniBis Pro, Bio Imagen System.

Tabla 5 Oligonucleótidos utilizados en la identificación de *Escherichia coli*

Nombre del primer	Tamaño del gen (pb)	Secuencia (5'-3')	Tamaño del amplificado (pb)	Condiciones de reacción
<i>ybbW</i> -F	1455	TGATTGGCAAATCTGGCCG	667	94°C 1 min. 1c 94°C 30 seg 58°C 30 seg 35c 71°C 1 min 72°C 5 min 1 c
<i>ybbW</i> -R		ATACTGGCAATCAGTACGCC		
<i>uidA</i> -F	1812	ATCACCGTGGTGACGCATGTCGC	556	94°C 5 min. 1c 94°C 30 seg 55°C 30 seg 30c 72°C 30 seg 72°C 7 min 1 c
<i>uidA</i> -R		CACCACGATGCCATGTTCATCTGC		

RESULTADOS

TRABAJO BIOINFORMÁTICO

Búsqueda de genomas AIEC

En la siguiente tabla presentamos los 30 genomas AIEC encontrados en las bases de datos Patric 3.6.9, Pathogens y Gen Bank, (Tabla 6), como se puede observar solo cuatro genomas tienen el estatus de genomas completos (complete). En los resultados podemos encontrar desde el genoma recolectado en el año 1998 el cual fue el primero en ser estudiado por su capacidad de adherencia e invasión al que denominaron LF82 hasta los recolectados en el año 2019 (según los datos obtenidos de NCBI). Con un punto de corte en la búsqueda hasta Mayo 2021.

Tabla 6. Genomas de *Escherichia coli* Adherente/Invasiva

Nombre del Genoma	Estatus del Genoma	Origen	Localización
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC07	WGS	Donador clínicamente sano	España
<i>Escherichia coli</i> strain ECG04	WGS	Donador clínicamente sano	España
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC01	WGS	Donador clínicamente sano	España
<i>Escherichia coli</i> strain ECG11	WGS	Donador clínicamente sano	España
<i>Escherichia coli</i> strain ECG28	WGS	Donador clínicamente sano	España
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC17	WGS	Donador clínicamente sano	España
<i>Escherichia coli</i> strain C4435	Complete	Liquido Peritoneal	México
<i>Escherichia coli</i> strain C7230	WGS	Donador clínicamente sano	México
<i>Escherichia coli</i> strain C7226	WGS	Donador clínicamente sano	México
<i>Escherichia coli</i> strain C7225	WGS	Donador clínicamente sano	México
<i>Escherichia coli</i> strain C7223	WGS	Donador clínicamente sano	México
<i>Escherichia coli</i> strain UM-146	WGS	Biopsia de colon	EU
<i>Escherichia coli</i> strain T75	WGS	Biopsia de colon	EU
<i>Escherichia coli</i> strain 13I	WGS	Biopsia de colon	EU
<i>Escherichia coli</i> strain HM488	WGS	Biopsia de colon	EU
<i>Escherichia coli</i> strain UM141	WGS	Biopsia de colon (UC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UM131	WGS	Biopsia de colon (UC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UM149	WGS	Biopsia de colon (EC)	Canadá

<i>Escherichia coli</i> strain CD121	WGS	Biopsia de colon (EC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain CD44	WGS	Biopsia de colon (EC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain CD3	WGS	Biopsia de colon (EC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UC5	WGS	Biopsia de colon (UC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain CD26	WGS	Biopsia de colon (EC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UM128	WGS	Biopsia de colon (UC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UC37	WGS	Biopsia de colon (UC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UM147	WGS	Biopsia de colon (UC)	Canadá
<i>Escherichia coli</i> LF82	Complete	Biopsia de colon (EC)	Francia
<i>Escherichia coli</i> O83:H1 str. NRG 857C	Complete	Biopsia de colon (EC)	EU
<i>Escherichia coli</i> HM605	WGS	Biopsia de colon (EC)	Inglaterra
<i>Escherichia coli</i> UM146	Complete	Biopsia de Ileo (EC)	Canadá

Utilizamos directamente la plataforma de Patric 3.6.9 ya que arrojaba los datos que necesitábamos para obtener los genomas denominados como AIEC, como lo es el número de ensamble que tienen los genomas para poder buscarlos en la plataforma bioinformática del Gen Bank, en donde encontramos información de los genomas como el lugar en donde fueron aisladas las cepas o el tipo de muestra de donde se obtuvo. En cuanto a localización geográfica, 12 de los 30 genomas tienen como localización geográfica Canadá, 6 cepas de España, 5 de México, 1 en E.E.U.U y otra en Francia. La mayoría de estas cepas fueron obtenidas de biopsias de Pacientes con EII.

Dentro de los genomas analizados se incluyeron el genoma de la primer cepa AIEC prototipo con la designación *Escherichia coli* LF82 que fue caracterizada y aislada en Francia y la segunda cepa prototipo denominada *Escherichia coli* O83:H1 str. NRG 857C que fue aislada y caracterizada en EE. UU.

En cuanto a los 5 genomas de cepas obtenidas en México, fueron aisladas de la ciudad de Puebla, los cuales son C7230, C7226, C7225, C7223 y C4435. Solo la secuencia de C4435 está completa y los cuatro genomas restantes fueron ensamblados. Se acordó utilizar estos genomas como cepas de referencia.

Determinación de filogrupos

El análisis de los 30 genomas para la determinación del filogrupo se realizó por medio de la herramienta Clermontyping (Figura 8).

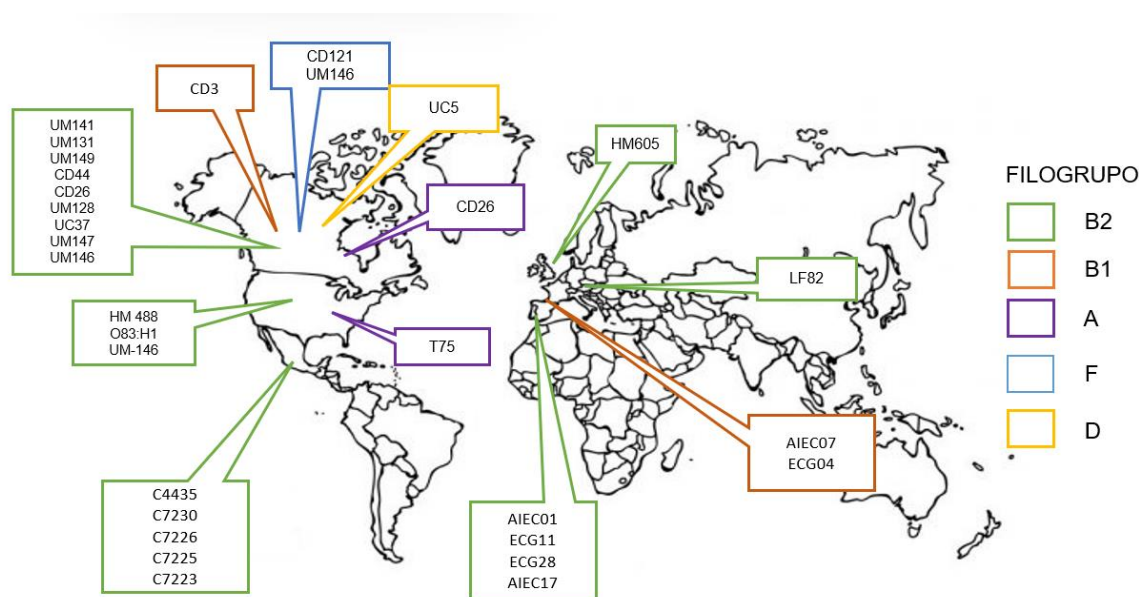


Figura 8. Distribución de filogrupo de los genomas AIEC. El filogrupo más frecuente es el filogrupo B2 (orilla verde) el cual no está presente en una sola distribución geográfica, pero se observa con predominancia en Canadá, el filogrupo B1 (orilla naranja) solo estuvo presente en cepas distribuidas en España, en España también encontramos a las cepas con filogrupo A (orilla morada), por su parte en Canadá también tenemos al filogrupo F (orilla azul) y por último el filogrupo D (orilla amarilla) presente en Inglaterra.

El filogrupo B2 fue el más frecuente con 23 genomas dentro de los cuales se incluye a los dos genomas prototipo el LF82 y el NRG 857C y también a las cepas de la ciudad de Puebla, México. En cuanto al filogrupo D solo encontramos un genoma, el UC5 y también solo un genoma del grupo F el CD121. Los genomas AIEC07, ECG04, CD3 pertenecen al filogrupo B1, que representa a las *E. coli* patógena intestinal. En cuanto al filogrupo A, el cual está asociado a las cepas comensales fecales, pertenecen dos genomas *E. coli* T75 y CD26.

Como se puede observar el filogrupo predominante fue el B2, con un 76.6%, lo cual sugiere que el patotipo AIEC esta mayormente asociado con *E. coli* extraintestinal como UPEC, MNEC, APEC asociadas también en mayor porcentaje a dicho filogrupo.

Determinación de secuenciotipo

Para determinar los secuenciotipos y saber si los genomas presentaban similitud en el mismo, se utilizó la plataforma bioinformática PubMLST basada en el esquema de Achtman, (Fig.9). Con los resultados obtenidos y los datos de origen que se tienen de los genomas, se colocó en un mapamundi el secuenciotipo y el filogrupo de los genomas con su localización geográfica (Fig. 10).

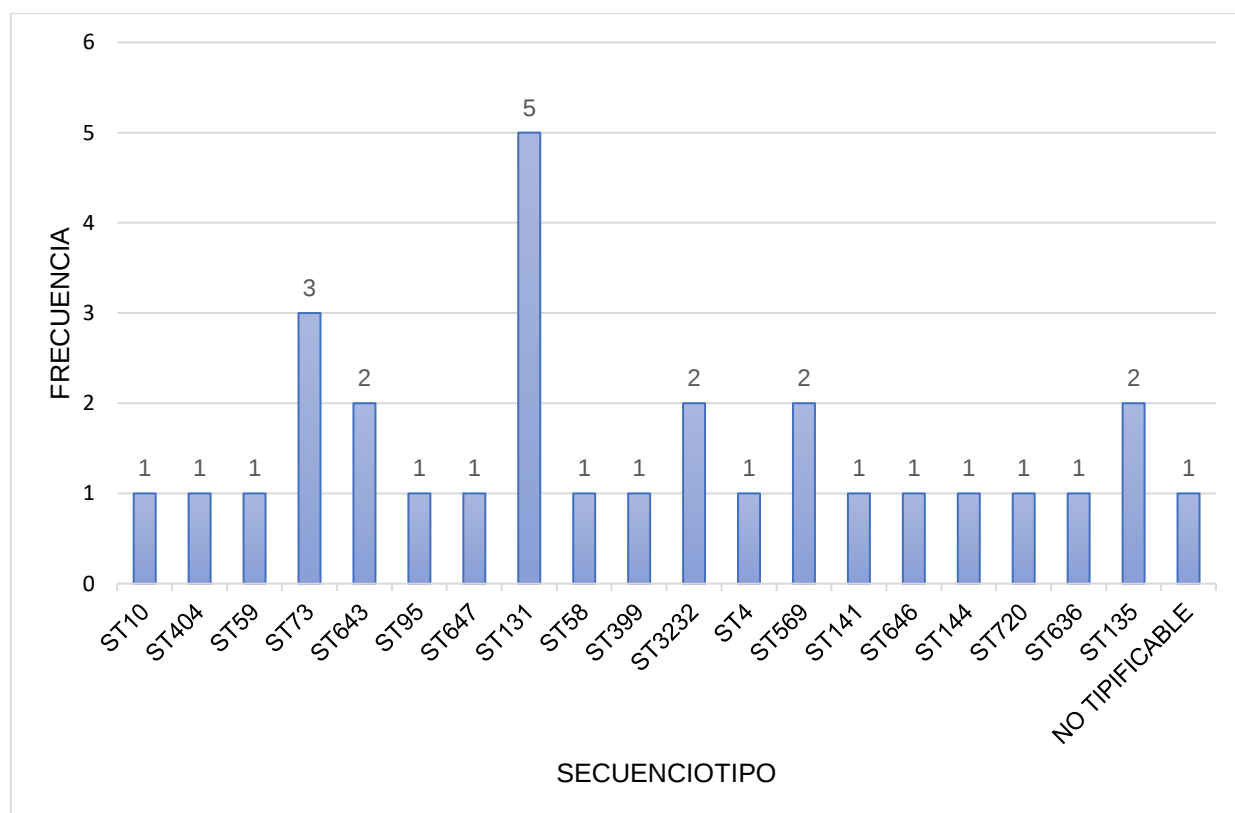


Figura 9. Identificación de secuenciotipo de 30 genomas de *Escherichia coli* Adherente/Invasiva. El análisis de los genomas por medios de la plataforma PubMLST se realizó para observar si tenían el mismo secuenciotipo.

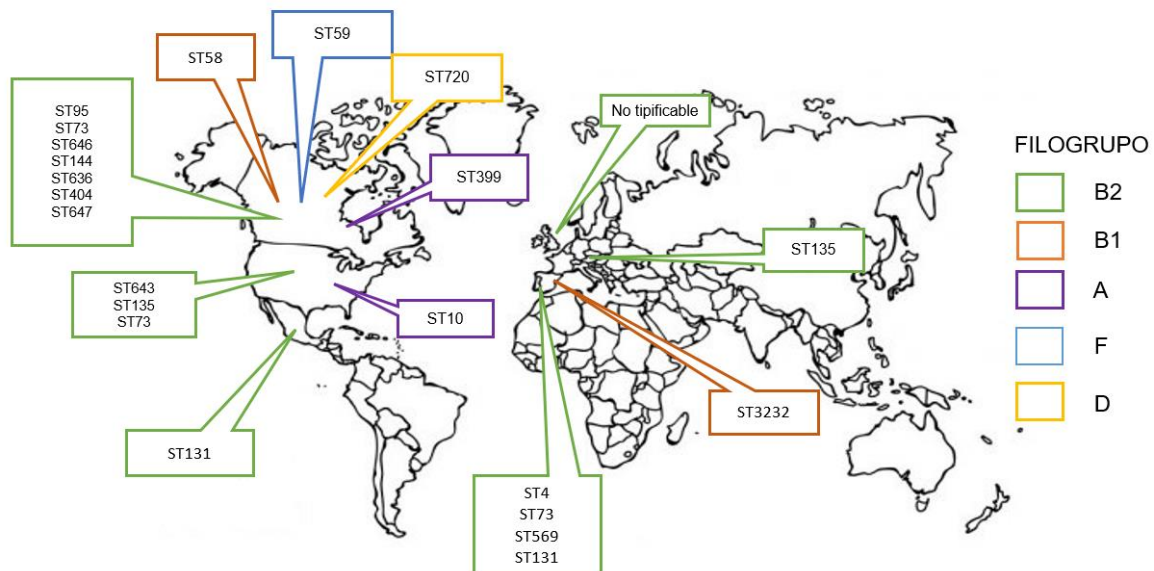


Figura 10. Distribución de secuenciotipo y filogrupos de 30 genomas de *Escherichia coli* Adherente/Invasiva, por Clermontyping y PubMLST (Enero 2020 a 21 mayo 2021). Combinación de filogrupos y secuenciotipos colocados por distribución geográfica, en donde podemos observar que el filogrupos que mas se distribuye es el B2 y como podemos observar no es un secuenciotipo específico el que se distribuye, así que con esto seguimos diciendo que el secuenciotipo y filogrupos para AIEC es diverso. Elaborado por: Aguirre, 2023

Como se puede observar en los resultados los genomas de AIEC se agrupan en 20 STs, el secuenciotipo es diverso. El más frecuente el ST131 con 5 genomas AIEC secuenciados en México, seguido por el ST73 con 3 cepas y los ST3232, ST569, ST135 y ST643 con 2 cepas cada uno. Respecto a los complejos clonales el CC131 con 5 cepas, CC95 con 4 cepas y CC73 con 3 cepas. Solo para 1 genoma el programa no pudo hacer la identificación del ST por ninguno de los métodos existentes (Achtman y Pasteur), y en 13 genomas no se pudo determinar el complejo clonal ya que no pertenece a ninguno de los que la plataforma tiene identificados. Para las 2 cepas prototipo el secuenciotipo identificado fue el ST135 lo que concuerda con lo reportado para dichas cepas.

Determinación de serotipo

Para determinar si los genomas denominados AIEC tenían el mismo serotipo, realizamos el análisis por medio de la plataforma Serotypefinder v2.0 (Fig. 11). El serotipo O25:H4 es el serotipo más frecuentemente encontrado en los 5 genomas que fueron aislados y secuenciados en Puebla, México (C4435, C7230, C7226, C7225, C7223). El siguiente serotipo es el O18:H7 encontrado en los genomas UM-146, UM141 y UM146, seguido por el serotipo O22:H7 en dos genomas (AIEC07 y ECG04), el O134:H31 (ECG28 y AIEC17), O6:H1 (AIEC01 y HM488), O1:H7 (CD121 HM605) y por último el serotipo O83:H1 el cual es al que pertenecen las cepas prototipo LF82 y NRG857C. Los resultados muestran que al igual que con el secuenciotipo y complejo clonal la diversidad en cuanto a serotipo se hace presente con 19 serotipos.

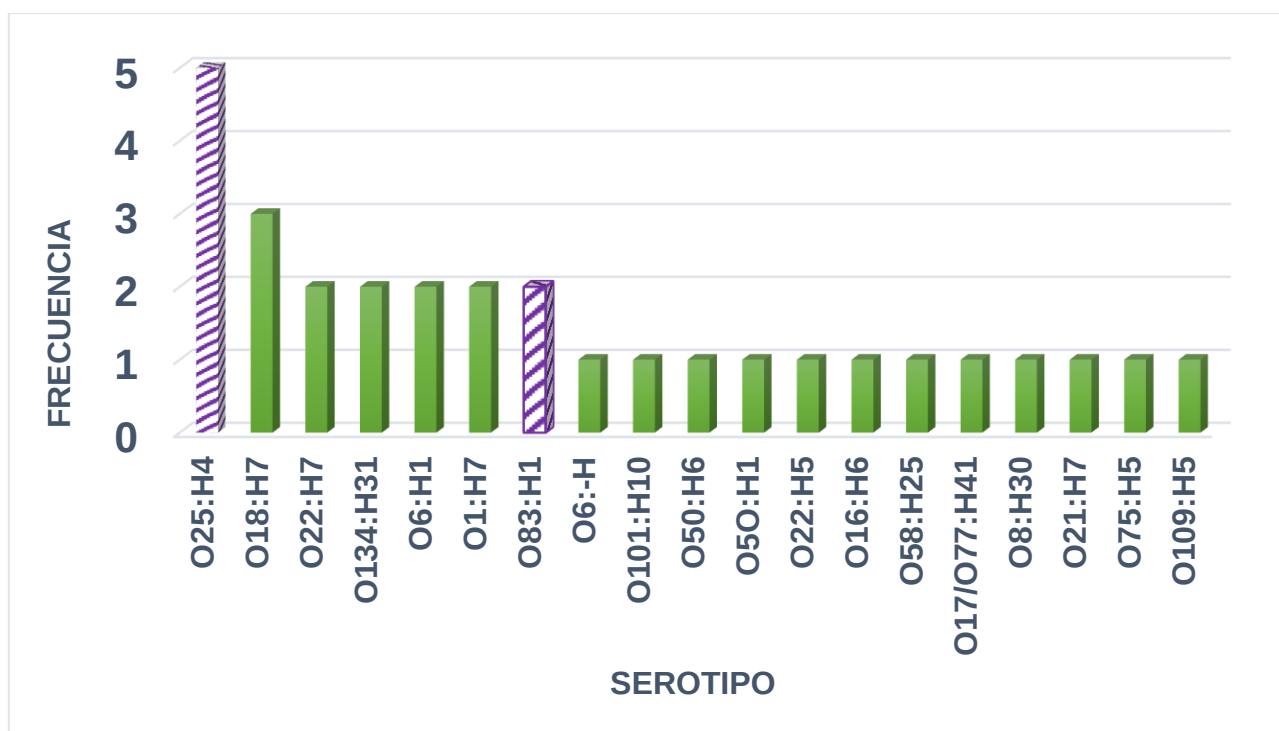


Figura 11 Serotipos de cepas de Escherichia coli Adherentes/Invasivas. Los genomas fueron obtenidos del Patric 3.6.9, Pathogens y Gen Bank (Enero 2020 a 21 mayo 2021). En un diseño de diagonales en morado identificamos a los serotipos a los que pertenecen las cepas prototipo (O83:H1) y las cepas encontradas en Puebla, México del LMHyC (O25:H4).

Determinación de factores de virulencia

Realizamos la búsqueda de cada uno de los genes en los 30 genomas AIEC (Tabla 7).

Tabla 7 Genes buscados en los genomas de *Escherichia coli* Adherentes/Invasivas

GEN	PROTEINA	GEN	PROTEINA	GEN	PROTEINA
bmaE	M-aglutinina	afaBC	Adhesión	afa-dra	Proteína reguladora del operón de adhesina
afaC	Ensamblaje de subunidades de adhesina afimbrial	Nfae	Adhesión no fimbrial	Pic	Serina Proteasa
csgA	Subunidad estructural de las fimbrias curli	focG	Adhesión celular	sat	Toxina auto transportadora
csgE	Ensamblaje de producción de curli	papA	subunidad fimbrial principal de pili Pap	hra	Adhesina
papC	Proteína Fimbrial	papE	Proteína Fimbrial	tsh	Hemoaglutinina sensible a la temperatura
papF	Proteína Fimbrial	papG II	Adhesina Fimbrial	ehaG	Autotransportador adhesina
papG III	Adhesina Fimbrial	papH	Proteína Fimbrial	vat	Toxina autotransportadora
sfaF	Proteína Fimbrial	aufa/fimA	Proteína Fimbrial tipo 1	ibeA	Invasión de la proteína A del endotelio cerebral
fimH	Proteína Fimbrial tipo 1	lpfA	Fimbria Polar Larga	htrA	Serina endoproteasa peri plasmática
lpfA141	Factores de Adherencia Putativos	lpfA154	Factores de Adherencia Putativos	yfgI	Factor de ensamblaje de proteínas de la membrana externa BamB
sfa-foc	Adhesina	eaeA	Intimina	ompC	Porina C de la membrana externa

<i>fdeC</i>	Intimina	<i>sinH</i>	Adhesión	<i>chiA</i>	Actividad lisozima/quitinasa
<i>ygi</i>	Fimbrial	<i>bfpA</i>	Subunidad estructural principal del pilus formador de haces	<i>dsba</i>	Proteína de intercambio disulfuro
<i>ydeQ</i>	Proteína Fimbrial	<i>yfcP</i>	Proteína Fimbrial	<i>ipaH</i>	Ubiquitina-proteína transferasa
<i>yehA</i>	Proteína Fimbrial	<i>yadC</i>	Adhesión	<i>ipaH</i>	
<i>traC</i>	ADN primasa (replicación)	<i>ppdD</i>	Proteína D dependiente de prepilina peptidasa	<i>ompA</i>	Proteína A de la membrana externa.
<i>fliC</i>	Flagelina	<i>iha</i>	Adhesina	<i>OmpT</i>	Proteasa
<i>arlA/NRG8 57_30278</i>	Proteína de la familia Mig-14	<i>ial</i>	locus de asociación de invasión	<i>gipA</i>	Factor de virulencia específico de Placa de Peyer
<i>tia</i>	invasión/adherencia	<i>iucA</i>	Sideróforo aerobactina	<i>iucD</i>	Sideróforo aerobactina
<i>iutA</i>	Sideróforo aerobactina	<i>feuC</i>	Proteína Hemo permeasa	<i>chuA</i>	Captación de hemo
<i>ireA</i>	Regulador de elementos metálicos	<i>sitA</i>	Transportador de hierro y manganeso	<i>sit D</i>	Transportador de hierro y manganeso
<i>iroE</i>	Sideróforo de Salmonella	<i>iroN</i>	Sideróforo Salmonella	<i>fyuA</i>	Sideróforo yersinobactina
<i>irp1</i>	Sideróforo yersinobactina	<i>irp2</i>	Sideróforo yersinobactina	<i>ybtP</i>	Sideróforo yersinobactina
<i>fepC</i>	Transporte de enterobactina férrica	<i>fhuA</i>	Transportador de membrana externa de ferricromo	<i>fhuD</i>	Proteína de unión a hidroxamato

<i>aggR</i>	Activador transcripcional	<i>gsp</i>	Glutatiónilperimidina sintetasa / amidasa	<i>espX1</i>	Ubiquitina ligasa
<i>eilA</i>	Regulador transcripcional	<i>kpsMT-1</i>	Proteína Transportadora de Ácido Salicílico	<i>kpsMT-2</i>	Proteína Transportadora de Ácido Salicílico
<i>vasG 1</i>	Sistema de Secreción	<i>vasG 2</i>	Sistema de Secreción	<i>impK 1</i>	Sistema de Secreción
<i>impK2</i>	Sistema de Secreción	<i>impL 1</i>	Sistema de Secreción	<i>impL 2</i>	Sistema de Secreción
<i>hcp</i>	Hidroxilamina reductasa	<i>hcp1</i>	Efector del sistema de secreción	<i>hcp2</i>	Efector del sistema de secreción
<i>hcp3</i>	Efector del sistema de secreción	<i>vgrG 1</i>	Sistema de Secreción	<i>vgrG 2</i>	Sistema de Secreción
<i>vasD 1</i>	Sistema de Secreción	<i>vasD 2</i>	Sistema de Secreción	<i>hlyA</i>	Hemolisina
<i>clyA/hlyE</i>	Hemolisina E	<i>cbtA</i>	Toxina de unión al citoesqueleto	<i>cdtB</i>	Toxina de distensión citoletal
<i>cnfl</i>	Factor necrotizante citotóxico	<i>cnf2</i>	Factor necrotizante citotóxico	<i>stxI</i>	Subunidad de toxina Shiga
<i>stxII</i>	Subunidad de Toxina Shiga	<i>ratA</i>	Toxina asociada a ribosomas	<i>senB</i>	Enterotoxina
<i>estB</i>	Serina tipo D-Ala-D-Ala carboxipeptidasa	<i>cvac</i>	Colicina V	<i>hlyF</i>	Hemolisina F
<i>intI</i>	Integrasa clase 1	<i>tsp</i>	Proteasa específica de la cola	<i>pmtI</i>	Proteína glicosilación
<i>vactox</i>	Toxina	<i>malX</i>	Componente específico de maltosa	<i>ssIE</i>	Factor accesorio de colonización
<i>iss</i>	Proteína	<i>pduC</i>	Propanodiol deshidratasa	<i>insA</i>	Proteína IS1

<i>insB</i>	Transposasa IS1	<i>capU</i>	Proteína de la familia glucosil transferasa	<i>sepA</i>	Autotransportador de serina proteasa
<i>mchb</i>	Secreción de microcin H47	<i>mchf</i>	Secreción de microcin H47	<i>neuC</i>	Proteína de biosíntesis de ácido polisálico P7
<i>nlpl</i>	Lipoproteína	<i>satA</i>	N-acetiltransferasa	<i>traT</i>	Proteína de resistencia al complemento
<i>estA</i>	Enterotoxina A termoestable	<i>yjaA</i>	Respuesta celular al peróxido de hidrógeno y al estrés ácido		

El resultado del análisis de los genes involucrados en adherencia en los genomas AIEC son presentados en la Fig. 12.

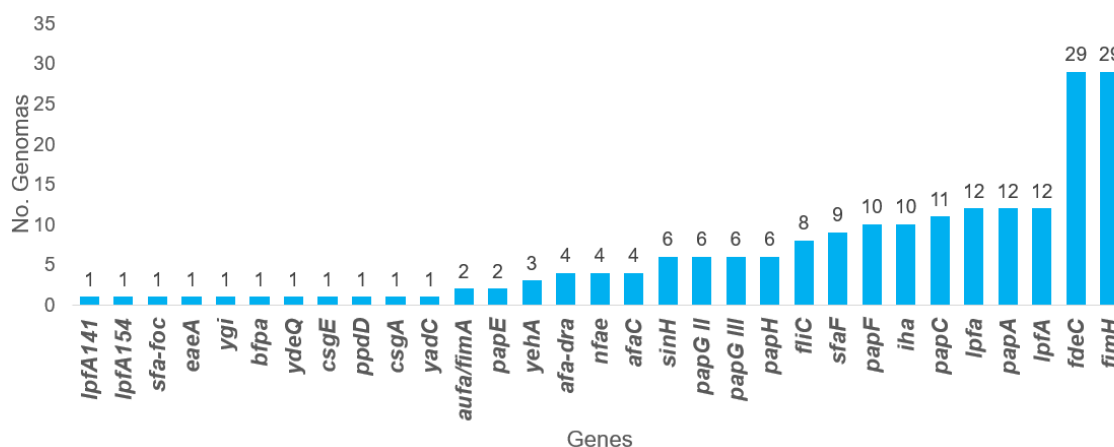


Figura 12 Frecuencia de genes involucrados en la adherencia fimbrial y no fimbrial, en genomas AIEC. Se graficaron los genes que participan en la adherencia fimbrial y afimbrial buscados en los genomas AIEC, esto con ayuda de la herramienta bioinformática Blast en los 30 genomas.

Como podemos observar, los genes *fimH* y *fdeC* que codifican para adhesinas fimbriales se presentan en 29 de 30 genomas los genes, otros genes que estuvieron

presentes y que se han reportado en AIEC son *lpfA* y *papA* (12 genomas de 30), *fliC* (8 de 30 genomas) y los genes como *bmaE*, *afaBC*, *afaC*, *nfae* que codifican para adhesinas no fimbriales se encontraron cada uno en 4 genomas de los 30, por lo que se infiere que su presencia en AIEC no es significativa.

Por otro lado, se determinaron las variantes para *fimH*, mediante la herramienta bioinformática FimTyper 1.0 (Fig. 13). Podemos observar que la variante *fimH30* estuvo presente en 8 de los 29 genomas (AIEC01, C4435, C7223, C7225, C7226, C7230, HM605, ECG11), la variante *fimH5* estuvo presente en 3 genomas (AIEC17, CD3, ECG28), *fimH18* estuvo presente en 3 genomas (UM141, UM146, UM-146) y la variante *fimH34* en dos genomas (CD26, CD121).

También encontramos un genoma de *E. coli*, perteneciente a cada una de las variantes siguientes: *fimH1359*, *fimH14*, *fimH176*, *fimH31*, *fimH103*, *fimH436*, *fimH2*, *fimH54*, *fimH65*, *fimH27*, *fimH10*, *fimH15* y *fimH205*

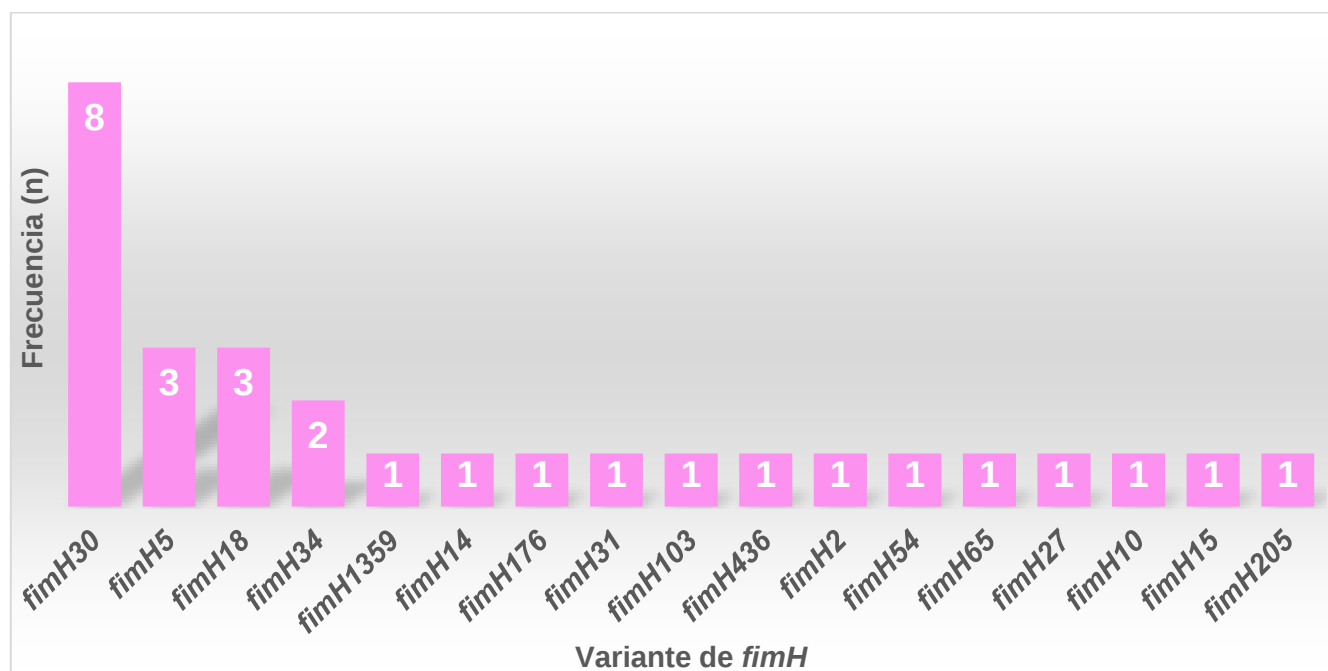


Figura 13. Variantes alélicas de *fimH* en genomas de *Eschericia coli* Adherente/Invasiva. Se analizaron los 29 genomas AIEC que tuvieron presente el gen *fimH* con la ayuda de la plataforma FimTyper.

Respecto al gen *fdeC*, encontrado en 29 de 30 genomas AIEC y que codifica para una intimina putativa, se realizó una comparación *in silico* con la intimina (Eae) encontrada en patotipos de *E. coli* diarreogénicos como EPEC y EHEC. Esto se llevo a cabo con la plataforma Clustal. Los resultados obtenidos muestran un porcentaje de identidad entre la intimina de AIEC, EPEC (Acceso: AAK26724.1) y EHEC (BBL43309.1) del 30.57% (Figura 14).

Percent Identity Matrix - created by Clustal2.1

1: AIEC_FDEC	100.00	30.57	31.64
2: EHEC_INTIMINA	30.57	100.00	83.14
3: EPEC_INTIMINA	31.64	83.14	100.00

Figura 14. Comparación por Clustal de la proteína FdeC e Intimina de AIEC, EHEC y EPEC. Se observa como la intimina entre EHEC y EPEC tienen una homología del 83.14%, mientras que estas tienen un promedio aproximado de 30.57%

Posteriormente dichas proteínas fueron llevadas a modelado con la ayuda de la plataforma Swiss Institute of Bioinformatics (Fig. 15).

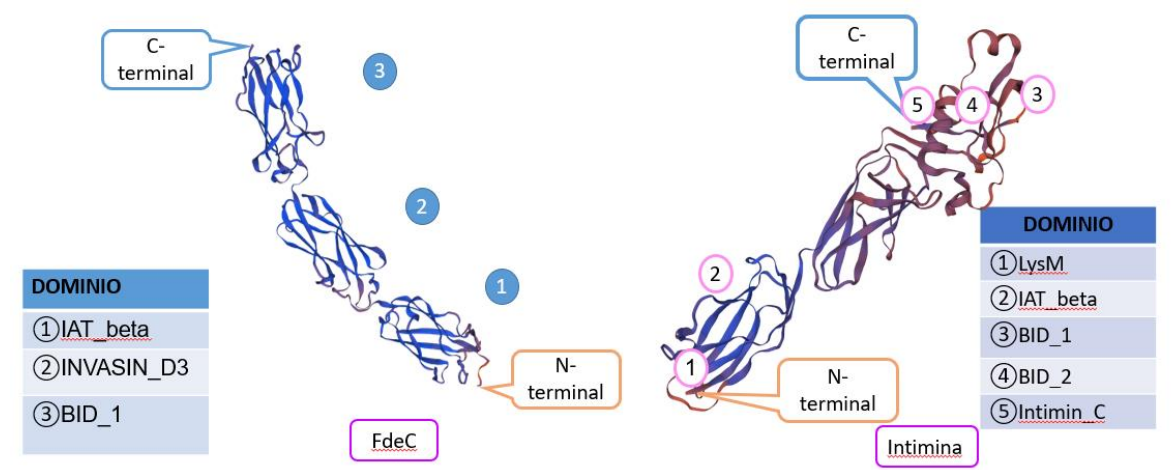


Figura 15. Modelado de las proteínas FdeC de AIEC e Intimina de EPEC. Lado izquierdo observamos el modelado de la proteína FdeC que contiene 3 dominios indicados con los números 1-3 encerrados en círculo azul, del lado derecho se observar el modelado de la proteína Intimina de EPEC (154 OEI57638.1) con cinco dominios indicados con número del 1 al 5 encerrados en círculo

rosa de los cuales solo IAT_Beta y BID_1 están presentes también en la proteína FdeC. Elaborado con: Swiss Model

El modelado de la proteína FdeC (Fig. 15) contiene 3 dominios los cuales son (1) IAT beta el cual representa el dominio similar a una porina en la membrana externa la cual es encontrada en intiminas, invasinas y autotransportadores, (2) INVASIN_D3 región extracelular de la proteína que se une a las integrinas y (3) BID_1 proteínas expresadas en la superficie las cuales median la invasión o unión a la célula hospedera; también podemos observar las regiones C-terminal y N-terminal. En cuanto al modelado de la proteína Intimina podemos observar que tiene 5 dominios, los cuales son (1) LysM que es un pequeño dominio globular de aproximadamente 40 aminoácidos involucrado en la unión del peptidoglicano (2) IAT_BETA representa el dominio similar a una porina en la membrana externa la cual es encontrada en intiminas, invasinas y autotransportadoras (3) BID_1 proteínas expresadas en la superficie las cuales median la invasión o unión a la célula hospedera, (4) BID_2 proteína de superficie bacteriana (5) Intimin_C, dominio encontrado en el carboxilo terminal de la intimina.

Se continuo comparando ahora solo la proteína de FdeC de AIEC con la *E. coli* Uropatogena donde el porcentaje de identidad fue del 99.8% al llevarlo a modelado con Swiss Institute of Bioinformatics (Fig. 16), las estructuras presentaban similitudes en el contenido de 3 dominios (1) IAT_BETA (2) INVASIN_D3 (3) BID_1 los cuales son los mismos para las dos estructuras.

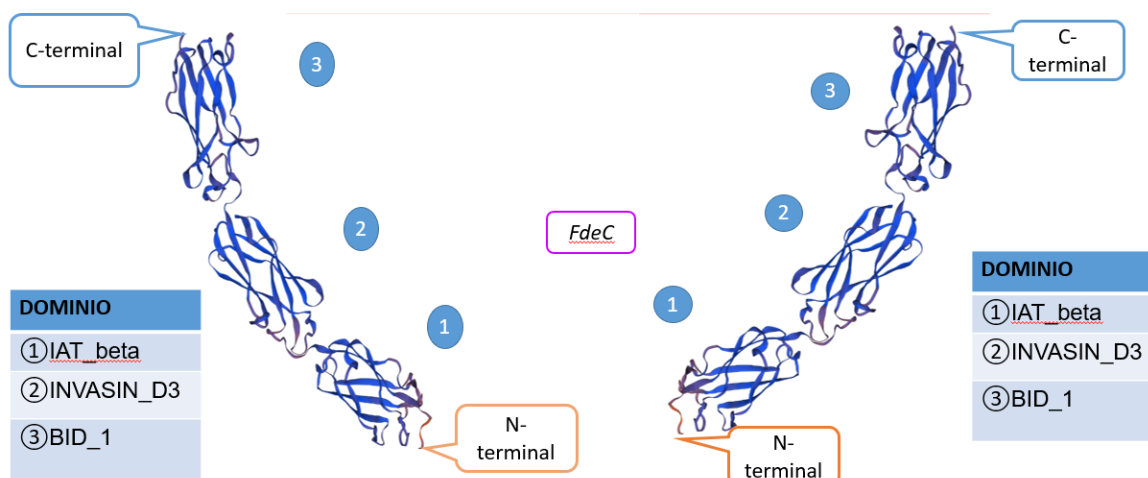


Figura 16 Modelado de la proteína FdeC de UPEC y de AIEC. La proteína FdeC encontrada en AIEC y en UPEC presenta un porcentaje de homología del 97%. Elaborado con: Swiss Model.

Posteriormente se realizó la comparación de la proteína FdeC de AIEC (UIM84823.1 LF82) con la de los patotipos EPEC (154 OEI57638.1), EHEC (*E.coli* O157:H7 UCP26292.1), UPEC (*E. coli* UTI89 ABE05822.1) y APEC(MS1170 QQH10648.1)

en donde se observó a diferencia de la intimina, con un promedio de porcentaje de identidad del 94.84%, lo que muestra la presencia de una proteína similar a la de AIEC en los demás patotipos extraintestinales de *E. coli* (Fig. 17).

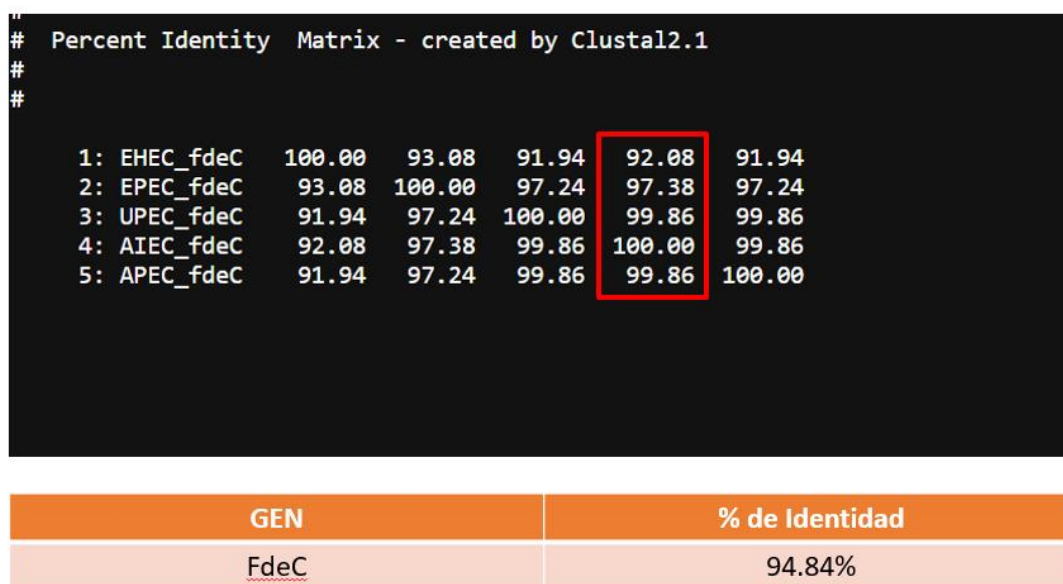


Figura 17. Resultado de análisis comparativo de la proteína FdeC de AIEC con los patotipos EPEC, EHEC y UPEC. Comparación de la proteína FdeC del patotipo AIEC (UIM84823.1 LF82), EPEC (154 OEI57638.1), EHEC (*E.coli* O157:H7 UCP26292.1), UPEC (*E. coli* UTI89 ABE05822.1) y APEC(MS1170 QQH10648.1) con la herramienta bioinformática Clustal Omega, donde se puede observar que UPEC y AIEC tiene un porcentaje de homología más alto.

Se continuó con el análisis de similitud entre la proteína FdeC de los 30 genomas de AIEC, observando tres grupos: el primer grupo compuesto por los genomas CD121, T75, CD3 y UC5 los cuales comparten un porcentaje de identidad entre ellas de 90.17%, el segundo grupo con 17 genomas entre los cuales se encuentran las cepas prototipo LF82, NRG857C y las cepas de referencia (ya que son las

descritas en México) C4435, C7223, C7225, C7226, C7230 entre los que comparten un 96.94% de identidad. El tercer grupo está conformado por 8 genomas entre los que se comparten un 97.64% de identidad. Este resultado muestra que, aunque es la misma proteína va a tener variaciones en su composición, lo cual sugiere la existencia de variantes (Fig. 18).

1: C0121_FdeC	100.00	80.59	83.50	86.83	16.46	16.46	15.12	15.12	15.12	15.12	15.12	15.18	15.18	15.18	15.18	15.18	15.18	15.18	15.18	17.05	17.05	17.16	17.05	17.05	17.05	16.83	Biopsia EC
2: T75_FdeC	80.59	100.00	87.99	86.84	4.89	14.89	13.55	13.55	13.55	13.55	13.55	13.69	13.69	13.59	13.59	13.59	13.59	13.59	13.59	17.51	17.51	17.62	17.51	17.51	17.51	17.73	Epi. colon
3: C03_FdeC	83.50	87.99	100.00	90.17	16.34	16.34	15.01	15.01	15.01	15.01	15.01	15.16	15.16	15.06	15.06	15.06	15.06	15.06	15.06	17.51	17.51	17.62	17.51	17.51	17.51	17.51	Biopsia EC
4: UC5_FdeC	86.83	86.84	90.17	100.00	16.94	16.94	15.61	15.61	15.61	15.61	15.61	15.77	15.77	15.66	15.66	15.66	15.66	15.66	15.66	17.49	17.49	17.60	17.49	17.49	17.49	17.38	Biopsia EC
5: EC604_FdeC	16.46	14.89	16.34	16.94	100.00	100.00	94.91	94.98	94.98	94.98	94.98	93.30	93.30	93.44	93.44	93.44	93.44	93.44	93.44	20.54	20.54	20.54	20.54	20.54	20.54	20.19	
6: A1E007_FdeC	16.46	14.89	16.34	16.94	100.00	100.00	94.91	94.98	94.98	94.98	94.98	93.30	93.30	93.44	93.44	93.44	93.44	93.44	93.44	20.54	20.54	20.54	20.54	20.54	20.54	20.19	
7: C7223_FdeC	15.12	13.55	15.01	15.61	94.91	94.91	100.00	99.93	99.93	99.93	99.93	96.72	96.72	96.79	96.79	96.79	96.79	96.79	96.79	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	19.65	Heces
8: C7225_FdeC	15.12	13.55	15.01	15.61	94.98	94.98	99.93	100.00	100.00	100.00	100.00	96.79	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	96.86	96.86	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	19.65	Heces
9: C7226_FdeC	15.12	13.55	15.01	15.61	94.98	94.98	99.93	100.00	100.00	100.00	100.00	96.79	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	96.86	96.86	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	19.65	Heces
10: C7230_FdeC	15.12	13.55	15.01	15.61	94.98	94.98	99.93	100.00	100.00	100.00	100.00	96.79	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	96.86	96.86	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	19.65	Heces
11: C4435_FdeC	15.12	13.55	15.01	15.61	94.98	94.98	99.93	100.00	100.00	100.00	100.00	96.79	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	96.86	96.86	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	19.65	Lig. Peritoneal
12: UM-146_FdeC	15.18	13.69	15.16	15.77	93.30	93.30	96.72	96.79	96.79	96.79	96.79	99.86	99.86	99.79	99.79	99.79	99.79	99.79	99.79	20.56	20.56	20.56	20.56	20.56	20.56	20.21	Epi. colon
13: C044_FdeC	15.18	13.69	15.16	15.77	93.30	93.30	96.72	96.79	96.79	96.79	96.79	99.86	99.86	99.79	99.79	99.79	99.79	99.79	99.79	20.56	20.56	20.56	20.56	20.56	20.56	20.21	Biopsia EC
14: EC011_FdeC	15.18	13.59	15.06	15.66	93.44	93.44	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	99.79	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.21	
15: MM488_FdeC	15.18	13.59	15.06	15.66	93.44	93.44	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	99.79	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.21	Epi. colon
16: UM131_FdeC	15.18	13.59	15.06	15.66	93.44	93.44	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	99.79	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.21	Biopsia UC
17: A1E001_FdeC	15.18	13.59	15.06	15.66	93.44	93.44	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	99.79	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.21	
18: EC628_FdeC	15.18	13.59	15.06	15.66	93.44	93.44	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	99.79	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.21	
19: MM657C_FdeC	15.18	13.59	15.06	15.66	93.44	93.44	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	99.79	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.21	Biopsia EC
20: LFR2_FdeC	15.18	13.59	15.06	15.66	93.44	93.44	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	99.79	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.21	Biopsia EC
21: A1E077_FdeC	15.18	13.59	15.06	15.66	93.44	93.44	96.79	96.86	96.86	96.86	96.86	99.79	99.79	100.00	100.00	100.00	100.00	100.00	99.93	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.21	
22: UC37_FdeC	17.05	17.51	17.51	17.49	20.54	20.54	20.19	20.09	20.09	20.09	20.09	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	99.34	99.41	99.48	99.56	99.56	99.56	97.1	Biopsia UC
23: UM138_FdeC	17.05	17.51	17.51	17.49	20.54	20.54	20.19	20.09	20.09	20.09	20.09	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	99.34	99.41	99.48	99.56	99.56	99.56	97.41	Biopsia UC
24: UM141_FdeC	17.16	17.62	17.62	17.60	20.54	20.54	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	99.41	99.63	99.93	99.93	99.93	99.93	97.49	Biopsia UC
25: UM146_FdeC	17.05	17.51	17.51	17.49	20.54	20.54	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	99.48	99.71	99.93	100.00	100.00	99.93	97.57	
26: MM605_FdeC	17.05	17.51	17.51	17.49	20.54	20.54	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	99.48	99.71	99.93	100.00	100.00	99.93	97.57	
27: A1E0131_FdeC	17.05	17.51	17.51	17.49	20.54	20.54	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	99.56	99.78	99.93	99.93	100.00	100.00	97.64	Epi. colon
28: UM147_FdeC	17.05	17.51	17.51	17.49	20.54	20.54	20.09	20.09	20.09	20.09	20.09	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	20.65	99.56	99.78	99.93	99.93	100.00	100.00	97.64	Biopsia UC
29: UM148_FdeC	16.83	17.73	17.51	17.38	20.19	20.19	19.65	19.65	19.65	19.65	19.65	20.21	20.21	20.21	20.21	20.21	20.21	20.21	20.21	97.20	97.42	97.48	97.57	97.57	97.64	100.00	Biopsia UC

Figura 18. Análisis comparativo de la proteína FdeC en los 30 genomas de *Escherichia coli* Adherente-Invasiva. Se compararon los fragmentos de la proteína FdeC de los 29 genomas AIEC en donde el gen estuvo presente. De arriba abajo y de izquierda a derecha resaltando porcentajes de homología del primer grupo (cuatro genomas) en el cuadro podemos observar que fue del 90.17% entre la proteína FdeC, en el segundo grupo (17 genomas) donde el recuadro esta resaltando el porcentaje de homología de 96.94% entre las cepas prototipo y en el ultimo grupo (8 genomas) tenemos resaltado por el cuadro hasta un 99.34% de homología entre la proteína.

A continuación, se muestra la frecuencia de aparición de genes involucrados en autotransporte, invasión y metabolismo de hierro en los 30 genomas AIEC (Fig. 19).

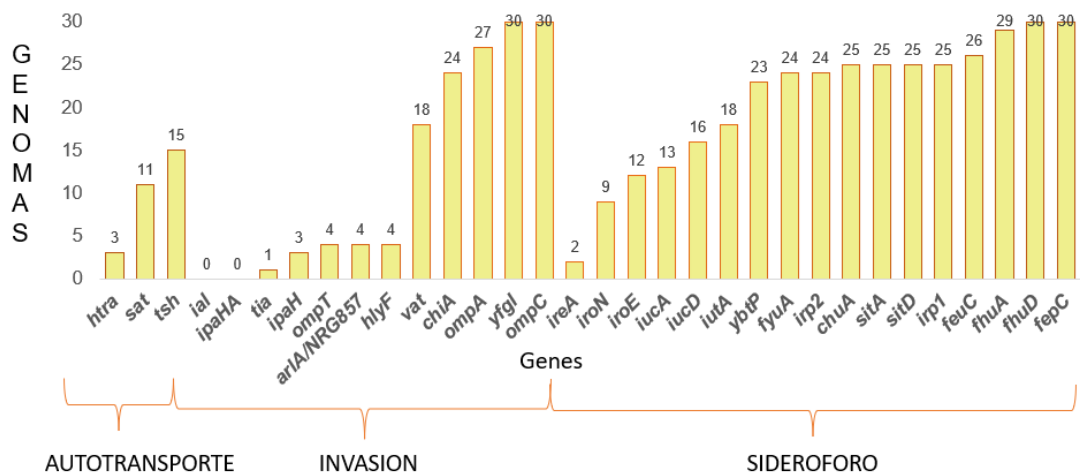


Figura 19. Genes implicados en autotransporte, invasión y metabolismo de hierro encontrados en los genomas AIEC. Se analizaron los genes mostrados donde los genes con mayor predominación que se cree que participan en la interacción de AIEC con el intestino fueron *ompA*, *yfgI*, *ompC* y *chiA*.

Los genes encontrados con más frecuencia en los 30 genomas fueron *fhuD* y *fepC*, ambos implicados en la captación de hierro; otro par de genes presentes en todos los genomas fue *yfgI* el cual codifica para el factor BamB, una proteína del ensamble que se ha observado estar implicada en aumentar la capacidad de invasión de AIEC, el gen *ompC* el cual codifica para la porina C de membrana externa. Siguiendo con el grafico podemos ver que el gen *fhuA* que codifica para un transportador externo de hierro se encontró en 29 de los 30 genomas. El gen *ompA* que codifica para la proteína A de membrana externa se encontró en 27 de 30 genomas. Solo en 26 genomas encontramos al gen *feuC* una Hemo permeasa y en 25 genomas encontramos varios genes como el gen *chuA* que codifica para la proteína ChuA receptora del grupo hemo, al gen *sitA* que codifica para la proteína unión al sustrato de hierro, el gen *sitD* que codifica para la proteína SitD participante en la captación de hierro, el gen *irp1* que codifica para una proteína yersinobactina biosintética, encontrándose en 24 genomas tenemos al gen *chiA* que codifica para una proteína de doble función de quitinasa y lizosima, por su parte el gen *fyuA* que

codifica para la proteína FyuA un receptor de sideroforo, el gen *irp2* que codifica para una proteína de alto peso molecular tipo 2, por su parte el gen *ybtP* que codifica para la yersinobactina YbtP presente en 23 genomas, los genes encontrados en 18 genomas fueron *iutA* que codifica para un receptor de hierro y el gen *vat* que codifica para la toxina Vat. Por su parte dentro de los genes menos frecuentes encontramos 15 genes dentro de los que se encuentran el gen *iucD*, *tsh*, *iucA*, *iroE*, *sat*, *iroN*, *ompT* que codifica para una proteasa, *arlA* que codifica para una proteína de la familia Mig-14, *hlyf* que codifica para la proteína HlyF, *ipaH*, *hra*, *ireA* y *tia*.

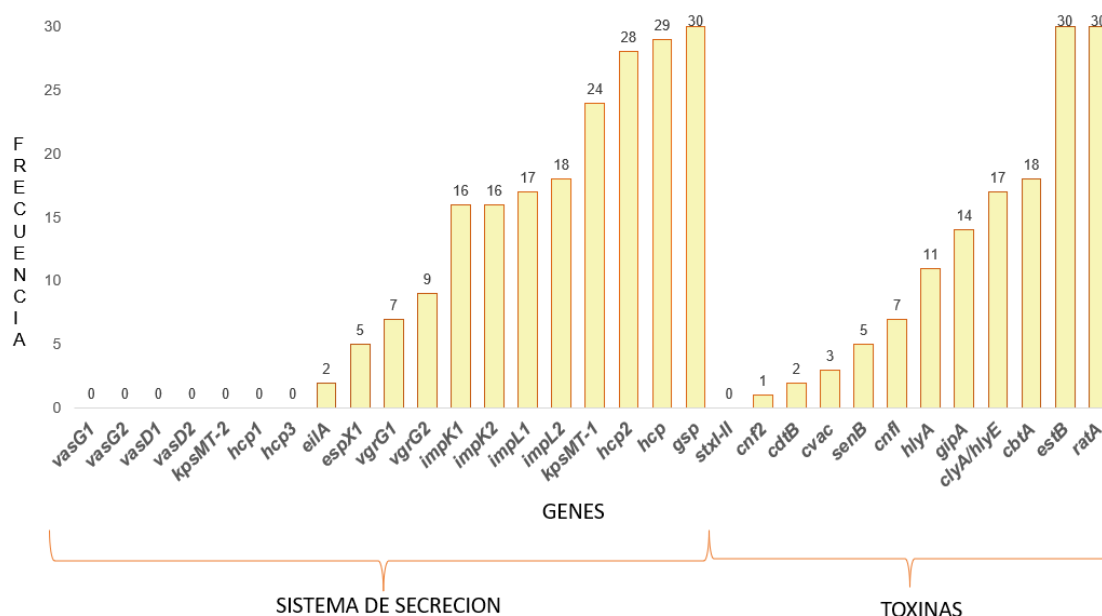


Figura 20. Genes implicados en diversos sistemas de secreción y toxinas encontrados en genomas AIEC. Se observa como hay genes ausentes en los 30 genomas AIEC y otros presentes en cada uno de los genomas.

Siguiendo con el análisis (Fig. 20) podemos observar genes como *gsp*, el gen *ratA* que codifican para proteínas asociadas a toxinas ribosomales y *estB* que codifica para una alanina-carboxipeptidasa, todos se encuentran en los 30 genomas; por otro lado observamos que en 29 genomas está el gen *hcp* que codifica para una hidroxilamina reductasa, *hcp2* que codifica para una hidroxilamina reductasa (ayuda a covertir amonio NH3 en agua) esta se encontró en 28 genomas, *kpsMT-1* es parte de la síntesis de capsula presente en 24 de los genomas analizados;

presente en 18 genomas se encontró al gen *impL2* que codifica para una proteína ImpL del sistema de secreción tipo 6 y al gen *cbtA* que codifica para la proteína CbtA que es una toxina de unión; por su parte *hlyE* que codifica para una hemolisina E se encuentran en 17 genomas y encontrados en menos de esta cantidad tenemos a los genes *impK1* e *impK2* (16 cada uno) que codifican ambas a la proteína ImpK perteneciente al sistema de secreción tipo 4, *gipA* que se encontró en 14 genomas y que codifica para la proteína GipA la cual ayuda a formar la unión en las placas de Peyer, *hlyA* que codifica para una hemolisina la cual ayuda a la bacteria a la formación de poros en la membrana celular, los genes *vgrG2* y *vgrG1* los cuales codifican para proteínas que participan en el sistema de secreción tipo 6, *cnf1* que codifica para un factor citotóxico necrotizante, *espX1* que codifica para la proteína EspX1 efector del sistema de secreción tipo 3, el gen *senB* que codifica para la proteína SenB, *cvaC* que codifica para la proteína Colicin-V, *cdtB* que codifica una toxina citolética B, *eilA* que codifica para la proteína EilA y *cnf2* que codifica para la proteína CNF2 Factor citotóxico necrotizante.

Los genes que no se encontraron en ningún genoma fueron *kpsMT2*, *vasG1*, *vasG2*, *hcp1*, *hcp3*, *vasD1*, *vasD2* que codifican para proteínas encontradas en el sistema de secreción tipo 6; *sxt1* que codifica para la toxina shiga de *E. coli* enterohemorrágica.

Dentro de los genes observados en los genomas analizados (Fig. 20), tenemos pertenecientes a distintos sistemas de secreción, pero el grupo más marcado fue el del sistema de secreción tipo 4 encontrados en 16 de los 30 genomas. En cuanto a los genes que se encargan de las toxinas tenemos entre los más frecuentes a *ratA* y *estB*, los cuales hasta el momento no se sabe su contribución en las cepas de AIEC, probablemente esto se pueda asociar con la presencia de plásmidos en los genomas, sin embargo al no estar completos no se pudo determinar esto.

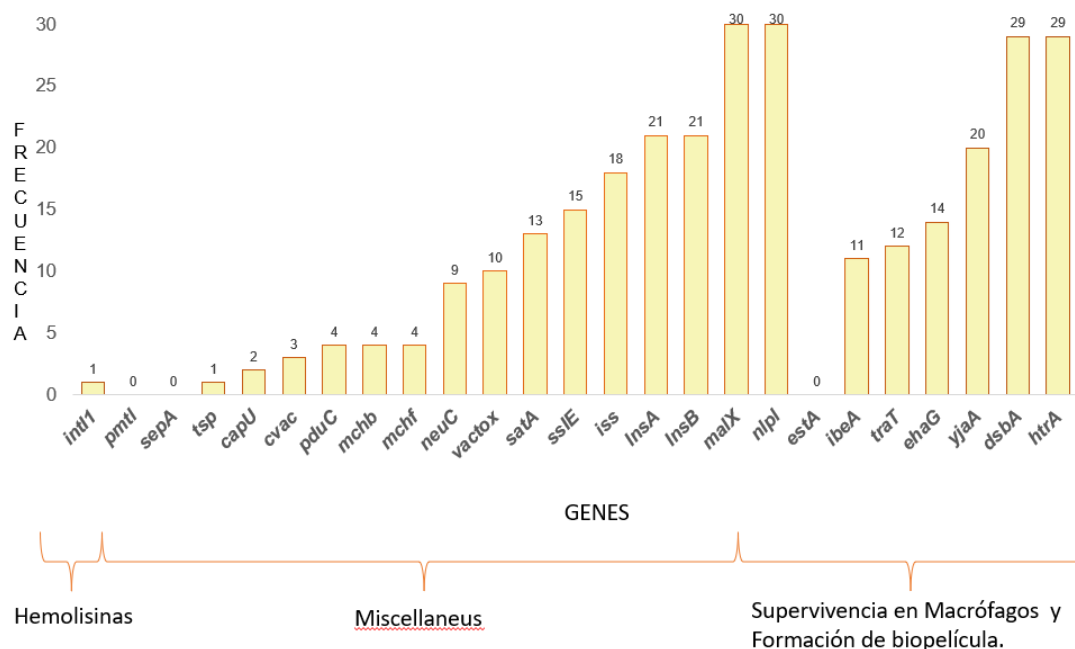


Figura 21. Genes implicados en la acción de hemolisinas, miscellaneus, supervivencia en macrófagos y formación de biopelículas analizados en los genomas AIEC. En este grafico podemos observar los genes que participan en el mecanismo de interacción con el intestino de AIEC como lo son *ibeA*, *ehaG*, *yjaA*, *dsbA*, *htrA* presentes en un rango de entre 11 a 30 genomas.

Continuando con la descripción de los genes encontrados en los genomas (Fig.21) se observó en todas las cepas al gen *malX* que codifica para un sistema específico de maltosa y a *n1pl* que codifica para un polipéptido; en 29 genomas se encontró el gen *dsbA* que codifica para la proteína DsbA que interviene en el intercambio de disulfuro, *htrA* que codifica para la proteína DegP una serina endoproteasa (ayudando a la bacteria a soportar los cambios de temperatura protegiéndola); los genes *insA* e *insB* que codifican para una transposasa IS1 se encontraron en 21 genomas, el gen *yjaA* que codifica para la proteína YjaA, el gen *iss* el cual codifica para la proteína IsS que incrementa la supervivencia de la bacteria en el suero se encontró en 18 genomas; en 15 genomas encontramos el gen *ssIE* que codifica para la proteína SsIE una lipoproteína metaloproteasa. En menos de 15 genomas tenemos a los genes *ehaG* que codifica para la proteína EhaG que tiene la función de formación de biofilm, *satA* que codifica para la proteína SatA, *traT* que codifica la proteína TraT, *ibeA* que codifica para la proteína de invasión IbeA, *vactox*, *neuC*

que codifica para la proteína P7, *pduC* que codifica para la proteína propaneidol dehidratasa, *mchB* que codifica para la proteína H47, *mchF* que codifica para la proteína MchF, *cvaC* que codifica para colicin-V, *capU* codificante para una hexosiltransferasa CapU, *int1* que codifica para una integrasa, *tsp* que codifica para una proteasa. Sin embargo, los genes que no se encontraron en ningún genoma fueron *pmt1*, *sepA*.

Analizando los resultados anteriores (Fig. 21) podemos observar en por lo menos 11 a 29 genomas AIEC, a los genes que se ha reportado tienen participación en la supervivencia en macrófagos y formación de la biopelícula como lo son *dsbA*, *htrA*, *ibeA*, *ehaG* e *yjaA*.

Posterior a este análisis, se trabajó en colaboración con el M.C. Israel Aguilar Ordoñez del Instituto Nacional de Medicina Genómica y la Ingeniero Química Dulce Santos López, con la finalidad de continuar con la búsqueda de genes que pudieran funcionar como biomarcadores en AIEC, para lo cual se sugirió la utilización de herramientas como RAST (que se encarga de proporcionar anotaciones genómicas de alta calidad) y HMMER (la cual identifica secuencias de nucleótidos o proteínas homologas) buscando los genes que estuvieron frecuentes en por lo menos en 16 genomas y que al mismo tiempo se haya sugerido que tienen una implicación en la interacción de AIEC con los enterocitos del paciente con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Ver Tabla 8, donde están contenidos los genes más frecuentes encontrados en los genomas AIEC y que le aportan características importantes para ser considerados en su identificación fenotípica.

Tabla 8 Genes más frecuentes encontrados en los genomas de *Escherichia coli* Adherente-Invasiva

GENES	PROTEINA CODIFICANTE	PORCENTAJE % (Aparición en los genomas)
<i>fimH</i>	Pili tipo 1	96.6%
<i>fdeC</i>	Intimina	96.6%
<i>yfgI</i>	Adherencia e Invasión	100%
<i>ompT</i>	Proteasa	13.3%
<i>ompC</i>	Proteína de membrana externa	100%
<i>chiA</i>	Adhesina/Invasina	80%
<i>ibeA</i>	Invasión de la proteína A del endotelio cerebral	36.7%

<i>dsbA</i>	Proteína de intercambio disulfuro	96.7%
<i>htrA</i>	Serina endoproteasa periplasmática	96.7%
<i>yjaA</i>	Respuesta celular al peróxido de hidrógeno y al estrés ácido	66.7%
<i>ehaG</i>	Autotransportador adhesina	46.7%

Identificación del plásmido pO83

Se realizó el análisis para determinar en los 30 genomas estudiados la presencia del plásmido pO83. El genoma NRG 857c tiene el plásmido pO83 descubierto por McPhee y col., en 2016 al cual se le otorgo este nombre por el antígeno somático identificado en este genoma. El plásmido pO83 está formado por 147,060 pb y pertenece a los grupos de incompatibilidad IncFIC e IncFIB. Además en dicho plásmido se encuentran los genes *arlA* y *arlC* que codifican para proteínas que le ayudan a la bacteria a degradar péptidos antimicrobianos. Por su parte el gen *arlB* o *hlyF* codifica para una hemolisina, como tal no se ha descrito una participación en AIEC, sin embargo, la falta de este hacen que *arlA* y *arlC* o tengan la capacidad de degradar péptidos antimicrobianos (McPhee et al., 2014) (Fig. 22).

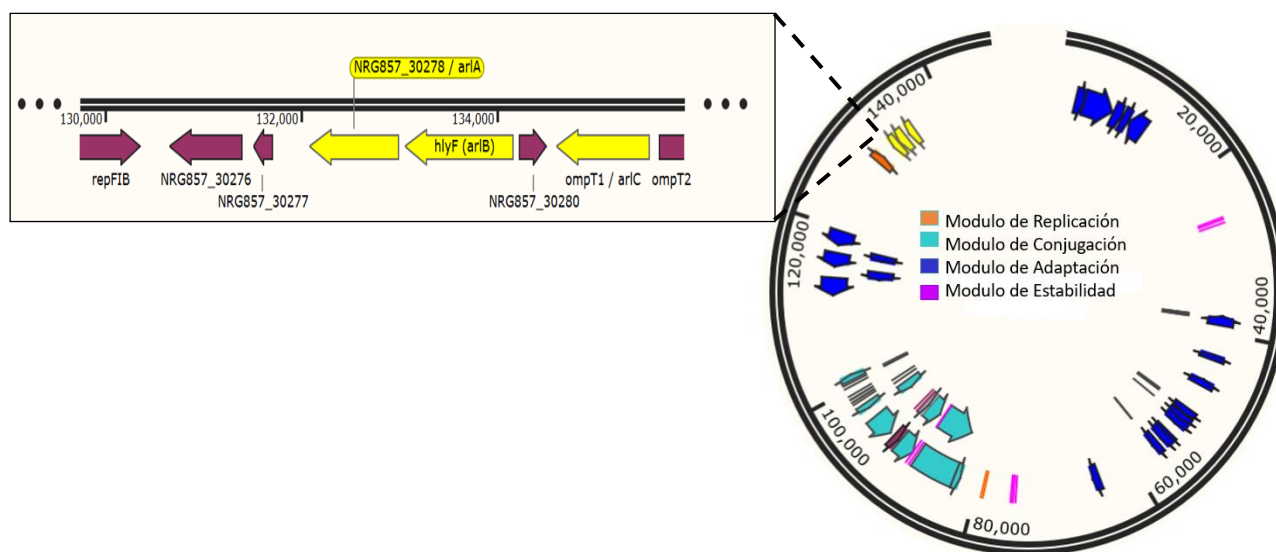


Figura 22. Identificación de los genes *arlA* y *arlC* en el plásmido pO83 de *Escherichia coli* Adherente-Invasiva. Probable visualización del plásmido con la ayuda de la herramienta Snapgen,

se amplificaron los genes *arlA* y *arlC* que participan en la degradación de péptidos antimicrobianos. Elaborado por: Aguirre Lara, 2021. Snapgen

Los genomas se analizaron en la plataforma PlasmidFinder 2.1 (Fig. 23) teniendo presente que un genoma puede tener más de un grupo de incompatibilidad. Se encontró que los genomas pertenecen a 18 grupos de incompatibilidad y para 6 genomas no pertenecen a ninguno. También pudimos observar que el grupo de incompatibilidad frecuente fue el IncFIB presente en 15 genomas, entre ellos el genoma de la cepa prototipo NRG857c, los siguientes fueron Col156 e IncFII presente en 6 genomas. También se pudo observar que los grupos que estuvieron presentes en tres genomas fueron IncFIA e IncX1, por su parte el grupo de incompatibilidad IncFIC estuvo presente en dos genomas entre ellos el genoma de la cepa prototipo NRG857c con el plásmido pO83 presente, el segundo grupo de incompatibilidad presente en dos genomas fue IncFII (Fig. 23). El resto de los grupos de incompatibilidad fueron IncI1, p0111, IncQ1, col440I, IncFIB(K), IncR, pESA2, ColpVC, Col, IncFII, los cuales solo estuvieron presentes en un genoma. Sin embargo, con este análisis no podemos determinar la presencia o ausencia de plásmidos en los genomas ya que recordemos que 26 genomas no están circularizados y debido a esto necesitaríamos someter a los genomas a otras plataformas bioinformáticas para intentar saber si tienen regiones pertenecientes a plásmidos y así identificar la presencia o ausencia de plásmidos en los genomas como el pO83.

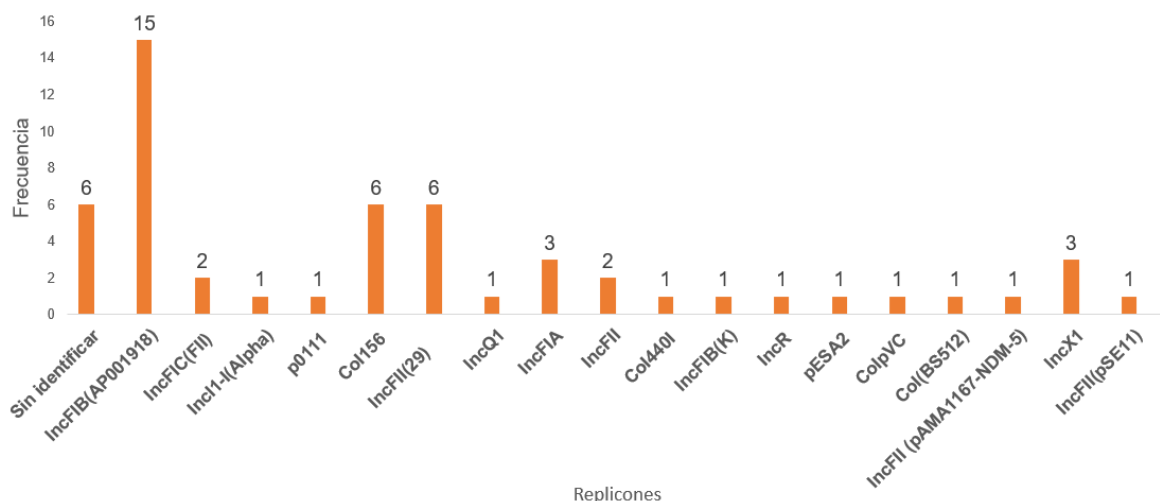


Figura 23. Determinación de los grupos de incompatibilidad de los genomas de *Escherichia coli* Adherente-Invasiva. Se analizaron los 30 genomas AIEC debido a la presencia del plásmido pO83 en una de los genomas. En el eje de las abscisas están colocados los replicones y en las ordenadas la frecuencia.

Los genomas que al análisis no dieron ningún grupos de incompatibilidad fueron AIEC07, ECG04, C7226, UM131 y LF82. Los 25 genomas restantes presentan de 1 hasta 4 grupos de incompatibilidad como es el caso del genoma CD26.

RESULTADO EXPERIMENTALES

Debido a la pandemia COVID 19, la entrada al laboratorio se permitió hasta marzo de 2022 y con las medidas sanitarias pertinentes, es por ello que los avances experimentales no se lograron en su totalidad ni se alcanzaron todos los objetivos como se plantearon al inicio del proyecto.

Determinación del gen *ybbw*

Con la finalidad de asegurarnos estar trabajando con *Escherichia coli* determinamos la presencia del gen *ybbW*, para las 66 cepas recuperados del trabajo de Lara y col 2019 (Tabla 9).

Tabla 9 Cepas de *Escherichia coli* recuperadas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal.

CEPAS	PACIENTE	DIAGNOSTICO	MODO DE OBTENCION
CUA1	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón
CUA2			
CUA3			

CUA4			
CUA5			
CUA6			
CUA7			
CUA9			
CUA10			
CUA11			
CUA12			
CUA13			
CUA14			
CUA15			
CUA16			
CUA17			
CUA18			
CUA19			
CUA20			
CUA21			
CUA22			
CUA23			
CUA24			
CUA25			
CUA27			
CUA28			
CUA29			
CUA30			
CUA31			
CUA32			
CUA33			
CUA34			
CUA35			
CUA36			
CUA37			
CUA38			
CUA39			
CCH1	Paciente 2 Femenino		Muestra: Copro (hisopo)
CCH4			Biopsia: Sigmoides
CCH5			
CCB1			
CCB2			
CCB3			
CCB4			
CCB5			
CCB6		Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	

CCB7			
CCB8			
CCB9			
CCB10			
CCB11			
CCB12			
CCB13			
CCB14			
CCB15			
CCB16			
CCB17			
CCB18			
CCB19			
CUA42	Paciente 3 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Ano y Colon descendente
CUA44			
CUA50			
CUA55			
CUA57			
CUA67			
CUA69			

La cepa utilizada para control positivo fue la cepa *E. coli* K12 J53 resistente a rifampicina (J53Rif^R).

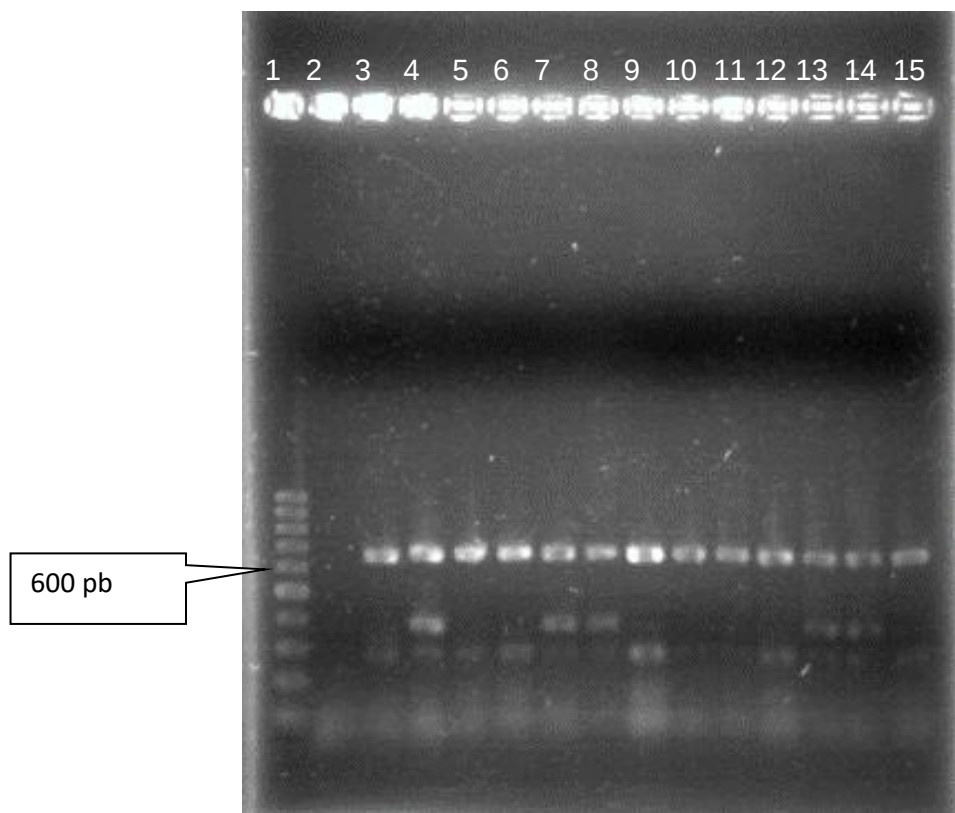


Figura 24. Determinación del gen *ybbW* específico para *E. coli* en cepas aisladas de EII. Electroforesis en gel de agarosa al 1% representativo de la amplificación por PCR del gen *ybbW* (667 pb) de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Carril 1: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder Carril 2: Control Negativo Carril 3: Control Positivo J53Rif^R Carril 4: cepa CUA30, carril 5: cepa CUA50, carril 6: cepa CCB18, carril 7: cepa CUA22, carril 8: cepa CUA28, carril 9: cepa CCB13, carril 10: cepa CUA42, carril 11: cepa CUA2, carril 12: cepa CCB15, carril 13: cepa CUA44, carril 14: cepa CUA6 y carril 15: cepa CCB16.

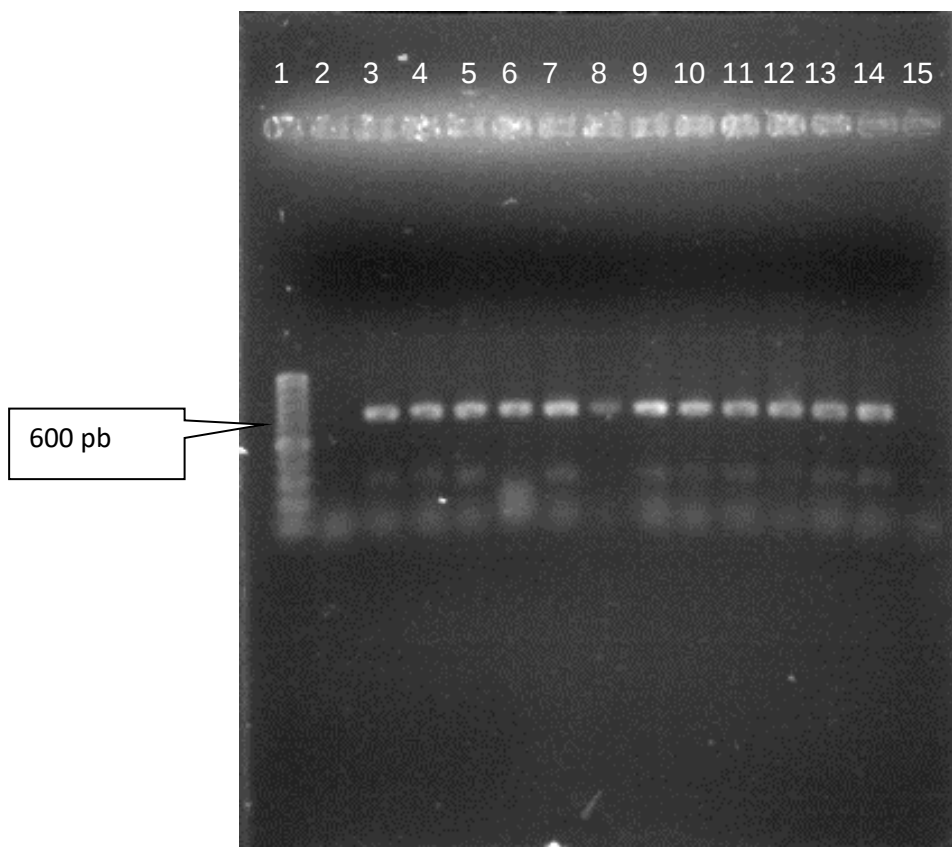


Figura 25. Determinación del gen *ybbW* específico para *E. coli* en cepas aisladas de EII. Electroforesis en gel de agarosa al 1% representativo de la amplificación por PCR del gen *ybbW* (667 pb) de las cepas de *Escherichia coli* aisladas de biopsias de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Carril 1: GeneRuler™ 100 bp Plus DNA Ladder Carril2: Control Negativo Carril3: Control Positivo J53Rif^R Carril 4: cepa CUA18, carril 5: cepa CCB10, carril 6: cepa CUA55, carril 7: cepa CUA 29, carril 8: cepa CUA 7, carril 9: cepa CCB 2, carril 10: cepa CUA 5, carril 11: cepa CUA 9, carril 12: cepa CCB 3, carril 13: cepa CCB12, carril 14: cepa CUA 57 y carril 15: cepa CCB8 (ausencia del gen *ybbW*)

En el corrimiento del gel (Fig.25) se puede observar que la cepa CCB8 fue la única que no amplificó el gen *ybbW*, que codifica para un transportador de alantoina por lo cual solo para esta cepa CCB8 se realizó amplificación de otro gen, el *uidA*, que codifica para una proteína beta-glucuronidasa y que también está presente en *E. coli* que se puede utilizar como marcador bioquímico de la especie.

Determinación del gen *uidA*

Se realizó la determinación del gen *uidA* (557 pb) para la cepa CCB8, obteniendo un resultado positivo observado en la Figura 26.

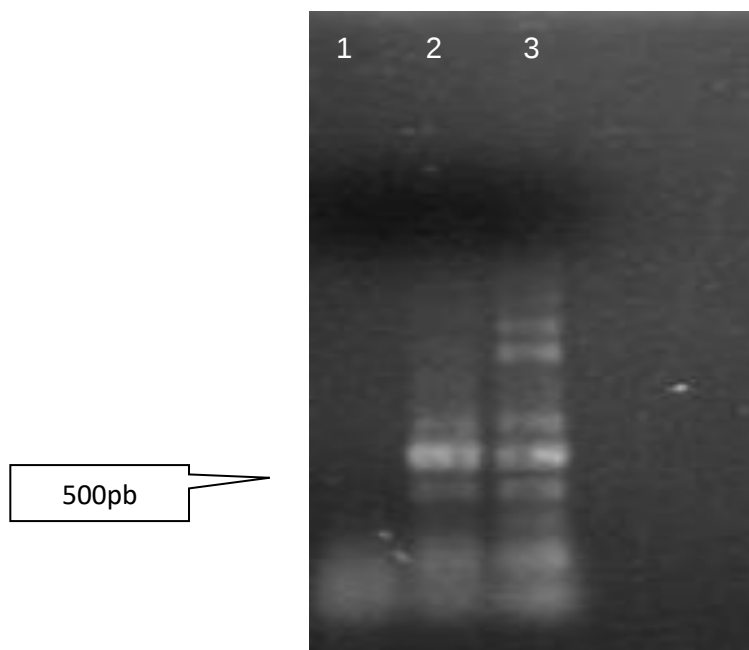


Figura 26. Determinación del gen *uidA* para identificación de *E. coli* en cepa aislada de EII. Electroforesis en gel de agarosa al 1% para la amplificación por PCR del gen *uidA* (557 pb) de la cepa de *Escherichia coli* aislada de biopsia de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal. Carril 1: Control negativo, carril 2: control positivo cepa J53R^R carril 3: cepa CCB8.

Con este segundo análisis experimental solo realizado para la cepa CCB8 podemos decir que las 66 cepas recuperadas son *Escherichia coli*.

DISCUSIÓN

La microbiota intestinal juega un papel clave en el inicio y mantenimiento de la inflamación, proceso medular que se desencadena en los tejidos intestinales de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal (EII), a través del suministro de antígenos u otros factores estimulantes que desencadenan la activación de la respuesta inflamatoria intestinal. Cambios en la composición de la microbiota intestinal en pacientes con EII en comparación con la de los controles sanos y una diversidad reducida de especies intestinales de microorganismos, están vinculados con la patogenia de la EII. La presencia de *E. coli* Adherente/Invasiva (AIEC) se ha

relacionado con pacientes con enfermedad de Crohn (CD) principalmente y en menor grado con CU (López et al., 2022).

El análisis bacteriológico de muestras de biopsias intestinales y muestras fecales de pacientes con EII muestra un mayor número de cepas de *E. coli* que pertenecen al grupo filogenético B2. Los resultados de estudios realizados con cultivos celulares y modelos animales revelan la presencia de cepas con características de este patobionte de *E. coli* Adherente/Invasivo, los cuales se vinculan a la patogénesis de la EII, lo cual sugiere que estas cepas de *E. coli* desempeñan un papel facilitador durante la EII (Lopez et al., 2022).

A diferencia de otros patotipos conocidos de *E. coli*, hasta la fecha, las cepas de AIEC no poseen un marcador bioquímico o molecular propio que sea característico de ellas y que no esté presente en otro patotipo, por lo que se ha reportado que la forma de identificarlo es a través del fenotipo de adherencia, invasión, sobrevivencia en macrófagos y en algunas cepas la formación de biopelícula (Chevy et al., 2020).

Debido a esto, este estudio se enfocó en realizar un análisis de la virulencia del genoma de 66 cepas aisladas de biopsias de pacientes de nuestra localidad con EII, con la finalidad de obtener información que contribuyera al hallazgo de algún marcador genético de virulencia propio de estas cepas; sin embargo, debido a las condiciones de la pandemia por SARS-CoV 2, se tuvo la necesidad de reestructurar el proyecto hacia un análisis bioinformático enfocado al análisis comparativo de genomas de cepas caracterizadas como AIEC depositados en banco de datos libres y tratar de identificar estos marcadores genéticos en un estudio “in silico”.

Con respecto al estudio del filogrupo, del secuenciotipo, complejo clonal y del serotipo, se observó que las cepas presentaron una alta diversidad. Con la información obtenida pudimos observar que posiblemente AIEC pueda clasificarse como *E. coli* extraintestinal ya que como recordamos el filogrupo predominante fue el B2 y el secuenciotipo predominante fue el ST131.

Debido a que no hay un biomarcador para AIEC hasta el momento, realizamos una búsqueda de genes, esto revisando artículos previos describiendo a este patotipo, primero que los genes participaran en el mecanismo de AIEC, es decir que le ayudaran a su adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y formación de biopelícula, en la revisión nos dimos cuenta que intentaban realizar una identificación por genes y cada artículo revisado utilizaba distintos genes para llevar a cabo esto, así que decidimos también buscar dichos genes para observar si nos podría dar más información acerca de AIEC.

El patotipo AIEC presenta un mecanismo de interacción con el intestino de adherencia, invasión, supervivencia en macrófago y formación de biopelícula, con esta información Primero nos enfocamos a observar los genes más frecuentes que tienen un papel descrito en el mecanismo de adherencia de AIEC como *fimH* el cual es una lectina de unión a manosa; *fimH* se encuentra en el pili tipo1 el cual va a llevar a cabo su unión al CEACAM6 producido por los enterocitos, lo cual le permite adherirse e invadir, al generar una modificación en la permeabilidad del intestino (Abdelhalim., 2020). Para este estudio observamos que la variante más frecuente de *fimH* en los genomas denominados AIEC fue el FimH30. Dreux y col. 2013, realizaron un estudio comprando la variante de *fimH* de 92 cepas (45 AIEC, 25 no AIEC y 22 control) entre las que se encontraba la cepa LF82, donde encontraron que hay 59 variantes de *fimH* de los cuales 29 de estas estaban presentes en las cepas AIEC, llegando a la conclusión que las mutaciones puntuales en *fimH*, algunas de naturaleza única asociadas con AIEC, confieren a este patotipo una capacidad significativamente mayor para adherirse a las células epiteliales intestinales que expresan CEACAM.

La adhesina *fimH* está presente con una frecuencia superior al 80% en las cepas de *Escherichia coli* causantes de ITU. Esta adhesina es la encargada de generar la adherencia de la bacteria al tejido urinario, favoreciendo de esta manera la colonización. Con la identificación de la variante de *fimH* se puede observar que la variante predominante es *fimH30* para UPEC, la cual le ayuda a tener mayor adherencia a las células uroteliales (Nesta et al., 2012). Por lo cual se puede inferir

que las variantes de *fimH* podrían aumentar o disminuir la adherencia a las células intestinales; sin embargo, solo con el estudio *in silico* esto no pudo evidenciarse. Para demostrar su participación haríamos un ensayo en cepas denominadas AIEC donde deletaria el gen *fimH* y la pondría con los enterocitos para observar si llevan acabo la adherencia a los enterocitos.

Por otro lado, en el análisis también pudimos observar la presencia en la mayoría de los genomas al gen *fdeC*, el cual codifica para una intimina putativa, la cual, al compararla con la secuencia aminoacídica de la Intimina de EPEC y EHEC, posee poca identidad con esta adhesina; sin embargo, al compararla con la *fdeC* descrita para UPEC se pudo encontrar que su identidad era del 99.8%. Se ha observado que *fdeC* de UPEC influye en la adherencia de la bacteria a las células epiteliales de la vejiga (Nesta *et al.*, 2012). El gen *lpfA* codificante para la fimbria polar larga codifica para una adhesina involucrada en la interacción de la bacteria con las células intestinales, en este caso la interacción se va a llevar a cabo por traslocación en las células M, sin embargo hasta el momento no hay un mecanismo de interacción descrito (Prorok *et al.*, 2014). Por otro lado, *fliC* es un gen que codifica a una flagelina, la cual puede participar en la motilidad y la adherencia. Cabe destacar que los genes que la ayudan a la adherencia también le ayudan a la invasión (Chervy *et al.*, 2020). Para los genes que participan en la invasión tenemos a *ompC* la cual codifica para una porina C de la membrana externa, la cual va a llevar a cabo la formación de poros en el enterocito y así promover que la bacteria pueda permear a la lámina propia; este gen fue encontrado en los 30 genomas analizados; para el gen *ompA* que codifica para la proteína A de la membrana externa, la cual también ayuda a la formación de poros y está unida al factor de ensamblaje de la proteína de membrana externa (*yfgI* que como su descripción lo dice) esta ayuda a ensamblar las proteínas para que se pueda llevar a cabo la formación de poros y en estudios anteriores se ha observado que su eliminación o delección ha disminuido la capacidad de AIEC para invadir y adherirse. El gen *chiA* codifica para una quitinasa con acción adhesina/invasina, estuvo presente en 24/30 genomas de AIEC, la cual interacciona con el receptor CHI3L1 que esta presente durante la inflamación intestinal (Low *et al.*, 2013). Los genes *arlA*, *arlB* y *arlC*

presentes en el plásmido, estuvieron en 4 de 30 genomas, uno de ellos, el genoma de donde fue aislado el plásmido, el NRG 857c; sin embargo, no pudimos saber si los tres genomas restantes contenían dicho plásmido ya que los genomas en donde se evidenciaron estos genes no están circularizados.

En cuanto a genes que participan en la supervivencia dentro del macrófago tenemos a *ibeA* que codifica para una oxidorreductasa, *htrA* que codifica para una serin endoproteasa y *dsbA* que codifica para una oxidorreductasa. Estos genes ayudan a la resistencia de la bacteria cuando hay degradación de esta por los macrófagos, por lo general estos macrófagos tienen un error en la autofagia, por lo cual no podrían cumplir su función (Chervy et al., 2020).

En cuanto a formación de biopelícula hay dos genes importantes: *yjaA* que codifica para una proteína de respuesta al estrés y *ehaG* que codifica para una adhesina autotransportadora la cual le ayuda a las cepas a la formación de biopelícula en respuesta al estrés. Los anteriores genes descritos podrían funcionar como un marcador para AIEC; sin embargo, no son exclusivos de este patotipo, lo que podría llevarnos a una identificación no precisa de AIEC.

Debemos resaltar que el entorno en el que se desarrolla AIEC tiene mucho que ver con la presencia o ausencia de dichos genes ya que algunos son mediados por los ácidos biliares, por lo tanto, aquí debemos contemplar aquellos factores como la alimentación alta en grasas y azúcares y la ingesta de los antibióticos, por lo cual no hay que dejar de lado que al momento de estudiar experimentalmente AIEC debemos recrear lo que sería su microambiente (Chervy et al., 2020).

En cuanto al trabajo realizado en el laboratorio solo pudimos comprobar a través de la amplificación del gen *iutA* que las cepas que seleccionamos pertenecen a *Escherichia coli*. Sin embargo, por falta de tiempo no pudimos llevar a cabo los demás ensayos necesarios para caracterizar a las cepas como AIEC.

CONCLUSIÓN

El estudio *in silico* de genomas AIEC, sugiere la presencia de algunos genes (*fimH*, *fdeC*, *ompA*, *ompC*, *yfgl*, *chiA*, *ibeA*, *dsbA*, *htrA*, *yjaA* y *ehaG*) que pueden ser usados como biomarcadores, para una rápida y eficaz identificación de AIEC a partir de muestras de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal, sin olvidar que no son específicos para AIEC, ya que como pudimos observar *fdeC* también se encuentra en otros patotipos de *E.coli*, y *fimH* en el patotipo UPEC, por lo que se recomienda seguir buscando otros genes más específicos. continuar con la identificación fenotípica establecida hasta ahora que es la adherencia, invasión, supervivencia en macrófagos y formación de biopelícula. Someter a los genomas a mas análisis ya que aun nos falta determinar si tienen la presencia de plásmidos ya que esto podría contribuir a su capacidad de virulencia.

En cuanto a la fase experimental comprobamos que las cepas son *Escherichia coli* y al realizar estudios experimentales deberíamos darle a la bacteria un entorno lo más similar al que tendrían en la microbiota intestinal, con las sales biliares para si poder darnos cuenta que si alguna modificación hace que se activen genes que le permitan aumentar su virulencia y su resistencia a antibióticos.

PERSPECTIVAS

- Realizar los ensayos de Adherencia en las cepas obtenidas por Lara y col 2019
- Realizar los ensayos de Invasión en las cepas obtenidas por Lara y col 2019
- Realizar los ensayos de Supervivencia en macrófagos en las cepas obtenidas por Lara y col 2019
- Realizar los ensayos de Formación de biopelícula en las cepas obtenidas por Lara y col 2019.
- Realizar la amplificación por PCR de los genes que podrían funcionar como biomarcador para AIEC, en las 66 cepas obtenidas por Lara y col 2019.

- Realizar el perfil de susceptibilidad antibiótica y determinación de marcadores de resistencia antibiótica de las cepas obtenidas por Lara y col 2019.

REFERENCIAS

- Abdelhalim KA, Uzel A, Ünal NG. The role of major virulence factors and pathogenicity of adherent-invasive *Escherichia coli* in patients with Crohn's disease. *Prz Gastroenterol.* 2020;15(4):279-288. Doi: 10.5114/pg.2020.93235. Epub 2020 Dec 10. PMID: 33777266; PMCID: PMC7988836.
- Águila S. Adalberto, Rodríguez Ariadna, Fernández A. Anabel., et al. *Escherichia coli* diarrogénicos, identificación de patotipos y fenotipos de resistencia antimicrobiana en aislados cubanos. *Revista Cubana de Medicina Tropical* (2020).
- Agus, A., Massier, S., Darfeuille-Michaud, A., Billard, E. & Barnich, N. Understanding host-adherent-invasive *Escherichia coli* interaction in Crohn's disease: Opening up new therapeutic strategies. *BioMed Research International* (2014). doi:10.1155/2014/567929
- Aranda, K. R. S., Fagundes-Neto & Scaletsky, I. C. A. Evaluation of Multiplex PCRs for Diagnosis of Infection with. *J. Clin. Microbiol.* 42, 5849–5853 (2004).
- Barnich, N. & Darfeuille-Michaud, A. Role of bacteria in the etiopathogenesis of inflammatory bowel disease. *World J. Gastroenterol.* (2007). doi:10.3748/wjg.v13.i42.5571
- Bassa, A. et al. Virulence factors and resistance profile of *Shigella* isolated during infectious diarrhea in Abidjan, Côte d'Ivoire. *J. Appl. Sci. Res.* 6, (2010).
- Borrue, N., Interacciones bacterianas con el sistema inmunológico intestinal: inmunomodulación. Elsevier. Hospital General Universitari Vall d'Hebron. Barcelona. (2013)
- Cáceres E, Maria., Etcheverría I, Analía., Padola L, Nora. Efectos del medio de cultivo y de la metodología aplicada sobre la formación de biopelículas de dos cepas de *Escherichia coli* diarreagénicas. Laboratorio de Inmunoquímica y Biotecnología-CIVETAN, CONICET, CICPBA, Facultad de Ciencias, Veterinarias (2018). <https://doi.org/10.1016/j.ram.2018.04.007>
- Carvalho, F. A. et al. Crohn's disease adherent-invasive *Escherichia coli* colonize and induce strong gut inflammation in transgenic mice expressing human CEACAM. *J. Exp. Med.* (2009). doi:10.1084/jem.20090741
- Chervy, Mélissa et al. "Adherent-Invasive *E. coli*: Update on the Lifestyle of a Troublemaker in Crohn's Disease." *International journal of molecular sciences* vol. 21,10 3734. 25 May. 2020, doi:10.3390/ijms21103734
- Darfeuille-Michaud, A. & Colombel, J. F. Pathogenic *Escherichia coli* in inflammatory bowel diseases. Proceedings of the 1st International Meeting on *E. coli* and IBD, June 2007, Lille, France. *J. Crohn's Colitis* (2008). doi:10.1016/j.crohns.2008.02.003
- De la Fuente Marjorie, Chahuan Isidora, Gutierrez Rocio, et al. Presencia de *Escherichia coli* intracelular en mucosa intestinal de pacientes con Enfermedad Inflamatoria Intestinal y su asociación con características clínicas y el uso de corticosteroides. *Revista Médica Chilena* (2017). <http://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872017000901129>

- Dreux N, Denizot J, Martinez-Medina M, Mellmann A, Billig M, Kisiela D, Chattopadhyay S, Sokurenko E, Neut C, Gower-Rousseau C, Colombel JF, Bonnet R, Darfeuille-Michaud A, Barnich N. Point mutations in FimH adhesin of Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli* enhance intestinal inflammatory response. *PLoS Pathog.* 2013 Jan;9(1): e1003141. doi: 10.1371/journal.ppat.1003141. Epub 2013 Jan 24. PMID: 23358328; PMCID: PMC3554634.
- Dogan, B., Fu, J., Zhang, S., Scherl, E. J., & Simpson, K. W. (2018). Rifaximin decreases virulence of Crohn's disease-associated *Escherichia coli* and epithelial inflammatory responses. *The Journal of Antibiotics*, 71(5), 485–494. doi:10.1038/s41429-017-0022-y
- Eaves-Pyles, T. et al. *Escherichia coli* isolated from a Crohn's disease patient adheres, invades, and induces inflammatory responses in polarized intestinal epithelial cells. *Int. J. Med. Microbiol.* (2008). doi: 10.1016/j.ijmm.2007.05.011
- Farfán G, Ana., Ariza R, Sandra., Vargas C, Fabiola., et al Mecanismos de virulencia de *Escherichia coli* enteropatógena, Universidad de Santander UDES, Bucaramanga, Santander. (2016) <http://dx.doi.org/10.4067/S0716-10182016000400009>.
- Franke, J. et al. Nucleotide sequence analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) adherence factor probe and development of PCR for rapid detection of EPEC harboring virulence plasmids. *J. Clin. Microbiol.* 32, 2460–2463 (1994).
- Fratamico, P. M., Sackitey, S. K., Wiedmann, M., Deng, M. Y. & Deng, M. Y. I. Detection of *Escherichia coli* O157: H7 by multiplex PCR . *J. Clin. Microbiol.* 33, 2188–2191 (1995).
- Gannon, V. P. J., Rashed, M., King, R. K. & Thomas, E. J. G. Detection and characterization of the eae gene of Shiga-like toxin- producing *Escherichia coli* using polymerase chain reaction. *J. Clin. Microbiol.* 31, 1268–1274 (1993).
- Gibold, L. et al. The Vat-AIEC protease promotes crossing of the intestinal mucus layer by Crohn's disease-associated *Escherichia coli*. *Cell. Microbiol.* (2016). doi:10.1111/cmi.12539
- Gil S, Carolina. Antimicrobianos naturales sobre la viabilidad, movilidad tipo swarming y formación de biopelículas en patotipos de *E. coli*. Tesis. Facultad de ciencias biológicas. (2018)
- Gomes a T.A.T., Elias W.P. et al Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Brazilian Journal of Microbiology.* (2016) <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjm.2016.10.015>.
- Gunzburg, S. T., Tornieporth, N. G. & Riley, L. W. Identification of enteropathogenic *Escherichia coli* by PCR-based detection of the bundle-forming pilus gene. *J. Clin. Microbiol.* 33, 1375–1377 (1995).
- Joensen, K. G., A. M. Tetzschner, A. Iguchi, F. M. Aarestrup, and F. Scheutz. 2015. Rapid and easy in silico serotyping of *Escherichia coli* using whole genome sequencing (WGS) data. *J.Clin.Microbiol.* 53(8):2410-2426. doi: JCM.00008-15 [pii];10.1128/JCM.00008-15 [doi]
- Johnson, J. R. & Stell, A. L. Extended Virulence Genotypes of *Escherichia coli* Strains from Patients with Urosepsis in Relation to Phylogeny and Host Compromise. *J. Infect. Dis.* 181, 261–272 (2000).

- Landraud, L., Gibert, M., Popoff, M. R., Boquet, P. & Gauthier, M. Expression of *cnf1* by *Escherichia coli* J96 involves a large upstream DNA region including the *hlyCABD* operon, and is regulated by the RfaH protein. *Mol. Microbiol.* 47, 1653–1667 (2003).
- Larabi A, Barnich N, Nguyen HTT. New insights into the interplay between autophagy, gut microbiota and inflammatory responses in IBD. *Autophagy*. 2020 Jan;16(1):38-51. Doi: 10.1080/15548627.2019.1635384. Epub 2019 Jul 9. PMID: 31286804; PMCID: PMC6984609.
- López San Román, Antonio, & Garrido, Elena. (2015). Esteroides en enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 107(9), 573. Recuperado en 28 de marzo de 2023, de http://scielo.isciii.es/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1130-01082015000900011&lng=es&tlng=es.
- López-Siles M, Camprubí-Font C, Gómez Del Pulgar EM, Sabat Mir M, Busquets D, Sanz Y, Martínez-Medina M. Prevalence, Abundance, and Virulence of Adherent-Invasive *Escherichia coli* in Ulcerative Colitis, Colorectal Cancer, and Coeliac Disease. *Front Immunol.* 2022 Mar 10; 13:748839. Doi: 10.3389/fimmu.2022.748839. PMID: 35359974; PMCID: PMC8960851.
- Low D, Tran HT, Lee IA, Dreux N, Kamba A, Reinecker HC, Darfeuille-Michaud A, Barnich N, Mizoguchi E. Chitin-binding domains of *Escherichia coli* ChiA mediate interactions with intestinal epithelial cells in mice with colitis. *Gastroenterology*. 2013 Sep;145(3):602-12.e9. doi: 10.1053/j.gastro.2013.05.017. Epub 2013 May 16. PMID: 23684751; PMCID: PMC3755095.
- Mansan-Almeida, R., Pereira, A. L. & Giugliano, L. G. Diffusely adherent *Escherichia coli* strains isolated from children and adults constitute two different populations. *BMC Microbiol.* 13, (2013).
- McPhee, Joseph B et al. "Host defense peptide resistance contributes to colonization and maximal intestinal pathology by Crohn's disease-associated adherent-invasive *Escherichia coli*." *Infection and immunity* vol. 82,8 (2014): 3383-93. doi:10.1128/IAI.01888-14
- Medina B., Enrique, Fuentes L., Daniel, Suárez C.Lucrecia et al. *Enfermedad inflamatoria intestinal* Vol.18 (2015).
- Meligrana, Noelia E., Quera, Rodrigo, Figueroa, Carolina, Ibáñez, Patricio, Lubascher, Jaime, Kronberg, Udo, Flores, Lilian, & Simian, Daniela. (2019). Factores ambientales en el desarrollo y evolución de la enfermedad inflamatoria intestinal. *Revista médica de Chile*, 147(2), 212-220. <https://dx.doi.org/10.4067/s0034-98872019000200212>
- Mirsepasi-Lauridsen HC, Vallance BA, Krogfelt KA, Petersen AM. *Escherichia coli* Pathobionts Associated with Inflammatory Bowel Disease. *Clin Microbiol Rev.* 2019 Jan 30;32(2):e00060-18. doi: 10.1128/CMR.00060-18. PMID: 30700431; PMCID: PMC6431131.
- Monrroy B., Hugo, Ibáñez L., Patricio Clasificación de la gravedad de la enfermedad inflamatoria intestinal *Gastroenterol. Latinoam.* Vol 24, Nº 2: 85-90 (2013)
- Nesta B, Spraggon G, Alteri C, Moriel DG, Rosini R, Veggi D, Smith S, Bertoldi I, Pastorello I, Ferlenghi I, Fontana MR, Frankel G, Mobley HL, Rappuoli R, Pizza M, Serino L, Soriani M. FdeC, a novel broadly conserved *Escherichia*

- coli adhesin eliciting protection against urinary tract infections. *mBio*. 2012 Apr 10;3(2):e00010-12. doi: 10.1128/mBio.00010-12. PMID: 22496310; PMCID: PMC3324786.
- Opstelten JL, Beelen RMJ, Leenders M, Hoek G, Brunekreef B, van Schaik FDM, Siersema PD, Eriksen KT, Raaschou-Nielsen O, Tjønneland A, Overvad K, Boutron-Ruault MC, Carbonnel F, de Hoogh K, Key TJ, Luben R, Chan SSM, Hart AR, Bueno-de-Mesquita HB, Oldenburg B. Exposure to Ambient Air Pollution and the Risk of Inflammatory Bowel Disease: A European Nested Case-Control Study. *Dig Dis Sci*. 2016 Oct;61(10):2963-2971. doi: 10.1007/s10620-016-4249-4. Epub 2016 Jul 26. PMID: 27461060; PMCID: PMC5020109.
- Ordás I, Eckmann L, Talamini M, Baumgart DC, Sandborn WJ. Ulcerative colitis. *The Lancet*. 2012;1606-19. doi: 10.1016/S0140-6736(12)60150-0.
- Prorok-Hamon M, Friswell MK, Alswied A, Roberts CL, Song F, Flanagan PK, Knight P, Codling C, Marchesi JR, Winstanley C, Hall N, Rhodes JM, Campbell BJ. Colonic mucosa-associated diffusely adherent afaC+ *Escherichia coli* expressing lpfA and pks are increased in inflammatory bowel disease and colon cancer. *Gut*. 2014 May;63(5):761-70. doi: 10.1136/gutjnl-2013-304739. Epub 2013 Jul 11. PMID: 23846483; PMCID: PMC3995253.
- Rodríguez-Angeles Guadalupe. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Salud Pública de México* vol.44, no.5. (2002)
- Sabaté, M., Moreno, E., Pérez, T., Andreu, A. & Prats, G. Pathogenicity island markers in commensal and uropathogenic *Escherichia coli* isolates. *Clin. Microbiol. Infect.* 12, 880–886 (2006).
- Saiz-Gonzalo G, Hanrahan N, Rossini V, Singh R, Ahern M, Kelleher M, Hill S, O'Sullivan R, Fanning A, Walsh PT, Hussey S, Shanahan F, Nally K, O'Driscoll CM and Melgar S (2021) Regulation of CEACAM Family Members by IBD-Associated Triggers in Intestinal Epithelial Cells, Their Correlation to Inflammation and Relevance to IBD Pathogenesis. *Front. Immunol.* 12:655960. Doi: 10.3389/fimmu.2021.655960
- Schmidt, H., Knop, C., Franke, S., Aleksic, S. & Karch, H. Development of PCR for Screening of Enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiology* 33, 701–705 (1995).
- Sebastián-Domingo, Juan-J., & Sánchez-Sánchez, Clara. (2018). De la flora intestinal al microbioma. *Revista Española de Enfermedades Digestivas*, 110(1), 51-56. <https://dx.doi.org/10.17235/reed.2017.4947/2017>
- Sevrin G, Massier S, Chassaing B, Agus A, Delmas J, Denizot J, Billard E, Barnich N. Adaptation of adherent-invasive *E. coli* to gut environment: 82xpression flagellum 82xpression and bacterial colonization ability. *Gut Microbes*. 2020 May 3;11(3):364-380. Doi: 10.1080/19490976.2017.1421886. Epub 2018 Mar 1. PMID: 29494278; PMCID: PMC7524368.
- Seyedian SS, Nokhostin F, Malamir MD. A review of the diagnosis, prevention, and treatment methods of inflammatory bowel disease. *J Med Life*. 2019 Apr-Jun;12(2):113-122. Doi: 10.25122/jml-2018-0075. PMID: 31406511; PMCID: PMC6685307.

- Sicilia B, García-López S, González-Lama Y, Zabana Y, Hinojosa J, Gomollón F. Guía GETECCU 2020 para el tratamiento de la colitis ulcerosa. Elaborada con metodología GRADE. *Gastroenterología y Hepatología*. 2020;43:1-57.
- Swanson, Garth R, and Helen J Burgess. "Sleep and Circadian Hygiene and Inflammatory Bowel Disease." *Gastroenterology clinics of North America* vol. 46,4 (2017): 881-893. doi: 10.1016/j.gtc.2017.08.014
- Van den Abbeele P, Marzorati M, Derde M, De Weirtdt R, Joan V, Possemiers S, Van de Wiele T. Arabinoxylans, inulin and *Lactobacillus reuteri* 1063 repress the adherent-invasive *Escherichia coli* from mucus in a mucosa-comprising gut model. *NPJ Biofilms Microbiomes*. 2016 Jul 27; 2:16016. Doi: 10.1038/npjbiofilms.2016.16. PMID: 28721250; PMCID: PMC5515265.
- Vargas, M., Gascón, J., Gallardo, F., Jimenez De Anta, M. T. & Vila, J. Prevalence of diarrheagenic *Escherichia coli* strains detected by PCR in patients with travelers' diarrhea. *Clin. Microbiol. Infect.* 4, 682–688 (1998).
- Yamamoto-Furusho J. Enfermedad Inflamatoria Intestinal: bases moleculares y clínicas. *Rev. Gastroenterológica de México* (2010).
- Yamamoto-Furusho J., Bosques-Padilla F., de-Paula J. Diagnóstico y tratamiento de la enfermedad inflamatoria intestinal: Primer Consenso. *Rev. Gastroenterológica de México* (2016). <http://dx.doi.org/10.1016/j.rgmex.2016.07.003>.

ANEXO 1

Nombre del Genoma	Estatus del Genoma	Origen	Año	Localización
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC07	WGS	Donador sano	2009	España
<i>Escherichia coli</i> strain ECG04	WGS	Donador sano	2018	España
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC01	WGS	Donador sano	2009	España
<i>Escherichia coli</i> strain ECG11	WGS	Donador sano	2018	España
<i>Escherichia coli</i> strain ECG28	WGS	Donador sano	2018	España
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC17	WGS	Donador sano	2009	España
<i>Escherichia coli</i> strain C4435	Complete	Liquido Peritoneal	2010	México
<i>Escherichia coli</i> strain C7230	WGS	Donador sano	2012	México
<i>Escherichia coli</i> strain C7226	WGS	Donador sano	2012	México
<i>Escherichia coli</i> strain C7225	WGS	Donador sano	2012	México
<i>Escherichia coli</i> strain C7223	WGS	Donador sano	2012	México
<i>Escherichia coli</i> strain UM-146	WGS	Biopsia de colon	2019	EU
<i>Escherichia coli</i> strain T75	WGS	Biopsia de colon	2019	EU
<i>Escherichia coli</i> strain 13I	WGS	Biopsia de colon	2019	EU
<i>Escherichia coli</i> strain HM488	WGS	Biopsia de colon	2019	EU
<i>Escherichia coli</i> strain UM141	WGS	Biopsia de colon (UC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UM131	WGS	Biopsia de colon (UC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UM149	WGS	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain CD121	WGS	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain CD44	WGS	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain CD3	WGS	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UC5	WGS	Biopsia de colon (UC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain CD26	WGS	Biopsia de colon (EC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UM128	WGS	Biopsia de colon (UC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> strain UC37	WGS	Biopsia de colon (UC)	2006	Canadá

<i>Escherichia coli</i> strain UM147	WGS	Biopsia de colon (UC)	2006	Canadá
<i>Escherichia coli</i> LF82	Complete	Biopsia de colon (EC)	1998	Francia
<i>Escherichia coli</i> O83:H1 str. NRG 857C	Complete	Biopsia de colon (EC)	2007	EU
<i>Escherichia coli</i> HM605	WGS	Biopsia de colon (EC)	2011	Inglaterra
<i>Escherichia coli</i> UM146	Complete	Biopsia de Ileo (EC)	2010	Canadá

ANEXO 2

Nombre del Genoma	Filogrupo	Secuenciotipo (ST)	CC	Serotipo
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC07	B1	3232	Sin complejo	O22:H7
<i>Escherichia coli</i> strain ECG04	B1	3232	Sin complejo	O22:H7
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC01	B2	4	Sin complejo	O6:H1
<i>Escherichia coli</i> strain ECG11	B2	73	ST73	O6
<i>Escherichia coli</i> strain ECG28	B2	569	Sin complejo	O134:H31
<i>Escherichia coli</i> strain AIEC17	B2	131	Sin complejo	O134:H31
<i>Escherichia coli</i> strain C4435	B2	131	ST131	O25:H4
<i>Escherichia coli</i> strain C7230	B2	131	ST131	O25:H4
<i>Escherichia coli</i> strain C7226	B2	131	ST131	O25:H4
<i>Escherichia coli</i> strain C7225	B2	131	ST131	O25:H4
<i>Escherichia coli</i> strain C7223	B2	131	ST131	O25:H4
<i>Escherichia coli</i> strain UM-146	B2	643	ST95	O18:H7
<i>Escherichia coli</i> strain T75	A	10	ST10	O101:H10
<i>Escherichia coli</i> strain 13I	B2	141	Sin complejo	O50:H6
<i>Escherichia coli</i> strain HM488	B2	73	ST73	O6:H1
<i>Escherichia coli</i> strain UM141	B2	95	ST95	O18:H7
<i>Escherichia coli</i> strain UM131	B2	73	ST73	O50:H1
<i>Escherichia coli</i> strain UM149	B2	646	Sin complejo	O22:H5
<i>Escherichia coli</i> strain CD121	F	59	ST59	O1:H7
<i>Escherichia coli</i> strain CD44	B2	144	Sin complejo	O16:H6
<i>Escherichia coli</i> strain CD3	B1	58	ST155	O58:H25
<i>Escherichia coli</i> strain UC5	D	720	Sin complejo	O17/O77:H41
<i>Escherichia coli</i> strain CD26	A	399	ST399	O8:H30
<i>Escherichia coli</i> strain UM128	B2	636	Sin complejo	O21:H7
<i>Escherichia coli</i> strain UC37	B2	404	ST14	O75:H5

<i>Escherichia coli</i> strain UM147	B2	647	ST95	O109:H5
<i>Escherichia coli</i> LF82	B2	135	Sin complejo	O83:H1
<i>Escherichia coli</i> O83:H1 str. NRG 857C	B2	135	Sin complejo	O83:H1
<i>Escherichia coli</i> HM605	B2	No tipificable	Sin complejo	O1:H7
<i>Escherichia coli</i> UM146	B2	643	ST95	O18:H7

ANEXO 3

CEPAS	PACIENTE	DIAGNOSTICO	MODO DE OBTENCION	AMP	AMC	FOX	CAZ	CTX	FEP	ATM	IPM	MEM	CIP	NA	S	GM	AN	NN	TE	SXT	C	BLEE	ADHERENCIA	INVASION
CUA1	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA2	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA3	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA4	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA5	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA6	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA7	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA9	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA10	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA11	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

CUA12	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA13	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA14	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA15	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA16	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA17	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA18	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	R	S	S	I	R	SSD	I	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	+	-	ND
CUA19	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA20	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	R	S	S	I	R	SSD	I	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	+	-	ND
CUA21	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	R	S	S	S	R	S	S	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S	-	+	ND
CUA22	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	R	I	I	S	I	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	-	+	ND
CUA23	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA24	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

CUA25	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	I	R	R	S	-	+	-
CUA27	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA28	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	R	S	S	I	R	SSD	I	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	+	+	ND
CUA29	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	R	S	S	I	R	SSD	I	S	S	R	R	I	R	S	R	R	S	S	+	+	-
CUA30	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	R	I	S	S	S	S	S	I	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	-	+	-
CUA31	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA32	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA33	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA34	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA35	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA36	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA37	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA38	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

CUA39	Paciente 1 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Colón	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCH1	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Muestra: Copro (hisopo)	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	ND	ND
CCH4	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Muestra: Copro (hisopo)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCH5	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Muestra: Copro (hisopo)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB1	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB2	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB3	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB4	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB5	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB6	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB7	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB8	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB9	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND

CCB10	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB11	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	+	-
CCB12	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB13	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	+	+
CCB14	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CCB15	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	+	+
CCB16	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	-	ND
CCB17	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	R	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	-	-	ND
CCB18	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	R	S	S	S	S	S	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	+	+	-
CCB19	Paciente 2 Femenino	Dx: Colitis crónica y Diverticulitis	Biopsia: Sigmoides	S	S	S	S	S	S	S	S	S	R	R	I	S	S	S	R	R	R	-	-	ND
CUA42	Paciente 3 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Ano y Colon descendente	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA44	Paciente 3 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Ano y Colon descendente	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
CUA50	Paciente 3 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia: Ano y Colon descendente	R	R	R	I	R	S	S	S	ND	R	R	R	S	ND	ND	R	R	R	-		-

CUA55	Paciente 3 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia:Ano y Colon descendente	R	R	R	I	R	S	S	S	ND	R	R	R	S	ND	ND	S	S	S	-	+	-
CUA57	Paciente 3 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia:Ano y Colon descendente	I	R	R	S	I	S	S	S	ND	R	R	I	S	ND	ND	S	S	S	+	+	-
CUA67	Paciente 3 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia:Ano y Colon descendente	R	S	S	S	S	S	S	S	ND	R	R	I	S	ND	ND	R	R	R	-	+	-
CUA69	Paciente 3 Masculino	Dx: CUCI	Biopsia:Ano y Colon descendente	R	R	R	I	S	S	S	S	ND	R	R	R	S	ND	ND	S	S	S	-	+	-

* ^R Resistente ^I Intermedio ^S Sensible + Positivo -Negativo ND No Determinado