



**BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA**



**ICUAP**

**CENTRO DE INVESTIGACIONES EN CIENCIAS  
MICROBIOLÓGICAS**

**“ESTUDIO COMPARATIVO DE LA ACTIVIDAD PROTEOLÍTICA SECRETABLE  
MAYOR A 160 kDa EN DOS GRUPOS DE *Escherichia coli*”**

**TESIS QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRA EN CIENCIAS (MICROBIOLOGÍA)  
CON OPCIÓN EN: BIOQUÍMICA Y GENÉTICA MICROBIANA**

**PRESENTA:**

**Q.C.B. MARYCRUZ TRUJILLO MURILLO**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**D.C. CANDELARIO VÁZQUEZ CRUZ**

**PUEBLA, PUE.**

**MARZO, 2015**

## ÍNDICE TEMÁTICO

## PÁGINA

<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Clasificación de <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> uropatogénica (UPEC).....	3
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> responsable de meningitis neonatal.....	3
1.2. Factores de virulencia de ExPEC.....	4
2. Proteasas como factor de virulencia.....	6
2.1. Clasificación de proteasas y mecanismos de acción.....	6
2.1.1. Clanes y familias de peptidasas.....	6
2.1.2. Peptidasas serínicas y treonínicas.....	7
2.1.3. Peptidasas cisteínicas.....	8
2.1.4. Peptidasas aspárticas.....	8
2.1.5. Metalopeptidasas.....	9
2.1.6. Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido.....	9
2.2. Inhibidores de peptidasas.....	10
2.2.1. Peptidasas serínicas.....	10
2.2.2. Peptidasas cisteínicas.....	10
2.2.3. Peptidasas aspárticas.....	11
2.2.4. Metalopeptidasas.....	11
2.3. Familias de peptidasas que degradan Inmunoglobulinas.....	12
2.4. Autotransportadores del tipo serina proteasas en enterobacterias (SPATEs).....	15
2.4.1. SPATEs de alto peso molecular en la patogénesis.....	16
3. Inmunoglobulinas: un factor antimicrobiano del huésped.....	19
3.1. Estructura de las inmunoglobulinas.....	19
3.2. Clasificación de las inmunoglobulinas.....	21
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	<b>22</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>

<b>7. MATERIAL Y METODOLOGÍA.....</b>	<b>25</b>
<b>8. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO.....</b>	<b>35</b>
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
9.1. Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas no ExPEC a través de Zimogramas.....	36
9.2. PCR para la amplificación de los genes <i>pic</i> , <i>pet</i> y <i>tsh</i> .....	40
9.3. Identificación de secuencias de nucleótidos de los amplificados <i>tsh</i> y <i>pet</i> .....	47
9.4. Zimograma y electroforesis en SDS-PAGE de proteínas en ExPEC 137-SN y cepas no ExPEC.....	52
9.5. Análisis del complejo de la proteasa S6 like de <i>E.coli</i> mediante Espectrometría de Masas (EM) .....	55
<b>10.DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
10.1. Estudios de degradación del sustrato IgG en cepas no-ExPEC...	57
10.2. Detección por PCR del gen <i>tsh</i> en cepas no ExPEC.....	59
10.3. Detección por PCR del gen <i>pet</i> en cepas no ExPEC.....	59
10.4. Detección por PCR del gen <i>pic</i> en cepas no ExPEC.....	60
10.5. Análisis del complejo de proteínas S6 like de <i>E.coli</i> mediante Espectrometría de Masas (EM).....	61
<b>11.CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>12.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>14.APÉNDICE.....</b>	<b>71</b>

## ÍNDICE TEMÁTICO

## PÁGINA

<b>1. MARCO TEÓRICO</b> .....	<b>1</b>
1.1. Clasificación de <i>Escherichia coli</i> .....	1
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> uropatogénica (UPEC).....	3
1.1.2. <i>Escherichia coli</i> responsable de meningitis neonatal.....	3
1.2. Factores de virulencia de ExPEC.....	4
2. Proteasas como factor de virulencia.....	6
2.1. Clasificación de proteasas y mecanismos de acción.....	6
2.1.1. Clanes y familias de peptidasas.....	6
2.1.2. Peptidasas serínicas y treonínicas.....	7
2.1.3. Peptidasas cisteínicas.....	8
2.1.4. Peptidasas aspárticas.....	8
2.1.5. Metalopeptidasas.....	9
2.1.6. Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido.....	9
2.2. Inhibidores de peptidasas.....	10
2.2.1. Peptidasas serínicas.....	10
2.2.2. Peptidasas cisteínicas.....	10
2.2.3. Peptidasas aspárticas.....	11
2.2.4. Metalopeptidasas.....	11
2.3. Familias de peptidasas que degradan Inmunoglobulinas.....	12
2.4. Autotransportadores del tipo serina proteasas en enterobacterias (SPATEs).....	15
2.4.1. SPATEs de alto peso molecular en la patogénesis.....	16
3. Inmunoglobulinas: un factor antimicrobiano del huésped.....	19
3.1. Estructura de las inmunoglobulinas.....	19
3.2. Clasificación de las inmunoglobulinas.....	21
<b>4. ANTECEDENTES</b> .....	<b>22</b>
<b>5. HIPÓTESIS</b> .....	<b>24</b>
<b>6. OBJETIVOS</b> .....	<b>24</b>

<b>7. MATERIAL Y METODOLOGÍA.....</b>	<b>25</b>
<b>8. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO.....</b>	<b>35</b>
<b>9. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
9.1. Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas no ExPEC a través de Zimogramas.....	36
9.2. PCR para la amplificación de los genes <i>pic</i> , <i>pet</i> y <i>tsh</i> .....	40
9.3. Identificación de secuencias de nucleótidos de los amplificados <i>tsh</i> y <i>pet</i> .....	47
9.4. Zimograma y electroforesis en SDS-PAGE de proteínas en ExPEC 137-SN y cepas no ExPEC.....	52
9.5. Análisis del complejo de la proteasa S6 like de <i>E.coli</i> mediante Espectrometría de Masas (EM) .....	55
<b>10.DISCUSIÓN.....</b>	<b>57</b>
10.1. Estudios de degradación del sustrato IgG en cepas no-ExPEC...	57
10.2. Detección por PCR del gen <i>tsh</i> en cepas no ExPEC.....	59
10.3. Detección por PCR del gen <i>pet</i> en cepas no ExPEC.....	59
10.4. Detección por PCR del gen <i>pic</i> en cepas no ExPEC.....	60
10.5. Análisis del complejo de proteínas S6 like de <i>E.coli</i> mediante Espectrometría de Masas (EM).....	61
<b>11.CONCLUSIONES.....</b>	<b>63</b>
<b>12.PERSPECTIVAS.....</b>	<b>63</b>
<b>13.REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>64</b>
<b>14.APÉNDICE.....</b>	<b>71</b>

<b>ÍNDICE DE FIGURAS</b>	<b>PÁGINA</b>
<b>Figura 1.</b> Factores de virulencia de ExPEC.....	<b>4</b>
<b>Figura 2.</b> Dominios de un SPATE tipo Va.....	<b>15</b>
<b>Figura 3.</b> Estructura de los dominios de las inmunoglobulinas.....	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b> Esquema de trabajo para la concentración de proteínas extracelulares de cepas no ExPEC y su evaluación enzimática a través de Zimogramas.....	<b>30</b>
<b>Figura 5.</b> Esquema de trabajo para la concentración de proteasas de <i>E.coli</i> y su análisis en electroforesis SDS-PAGE y Zimograma.....	<b>33</b>
<b>Figura 6.</b> Estrategia general planteada para la caracterización parcial del complejo de la proteasa S6 like de <i>E.coli</i> y su comparación con dos grupos de <i>E.coli</i> no ExPEC.....	<b>35</b>
<b>Figura 7.</b> Evaluación de la actividad enzimática en cepas de <i>E.coli</i> aisladas de alimentos.....	<b>37</b>
<b>Figura 8.</b> Evaluación de la actividad enzimática en cepas de <i>E.coli</i> aisladas de alimentos.....	<b>39</b>
<b>Figura 9.</b> Evaluación de la actividad enzimática en cepas de <i>E.coli</i> aisladas de muestras intestinales.....	<b>39</b>
<b>Figura 10.</b> Evaluación de la actividad enzimática en cepas de <i>E.coli</i> aisladas de muestras intestinales.....	<b>39</b>
<b>Figura 11.</b> Detección por PCR del gen <i>tsh</i> en cepas no ExPEC aisladas de alimentos.....	<b>40</b>
<b>Figura 12.</b> Detección por PCR del gen <i>tsh</i> en cepas no ExPEC aisladas de alimentos.....	<b>41</b>
<b>Figura 13.</b> Detección por PCR del gen <i>tsh</i> en cepas no ExPEC aisladas de muestras intestinales.....	<b>41</b>

<b>Figura 14.</b> Reacción en Cadena de la Polimerasa con DNA de cepas no ExPEC aisladas de alimentos positivas y negativas en Zimograma co-polimerizado con IgG .....	<b>42</b>
<b>Figura 15.</b> Detección por PCR del gen <i>pet</i> en cepas no ExPEC aisladas de muestras intestinales.....	<b>43</b>
<b>Figura 16.</b> Detección por PCR del gen <i>pic</i> en cepas no ExPEC aisladas de muestras intestinales.....	<b>44</b>
<b>Figura 17.</b> Alineamiento del gen <i>tsh</i> para la búsqueda de identidad por medio de BLAST.....	<b>48</b>
<b>Figura 18.</b> Alineamiento múltiple del gen <i>pet</i> para la búsqueda de identidad por medio de CLUSTALW.....	<b>49</b>
<b>Figura 19.</b> Actividad proteolítica y contenido peptídico de las cepas 137-SN, ETM 8 y ETM 9.....	<b>53</b>
<b>Figura 20.</b> Actividad proteolítica y contenido peptídico de las cepas ETM 20 y ETM 35.....	<b>54</b>
<b>Figura 21.</b> Gel preparativo SDS-PAGE 10% para la separación y estudio molecular de péptidos de <i>E.coli</i> 137-SN.....	<b>55</b>
<b>Figura 22.</b> Asignación de proteasa 137-SN a la familia S6.....	<b>74</b>
<b>Figura 23.</b> Determinación de tiempo de máxima acumulación y condiciones de incubación de la proteasa 137-SN.....	<b>75</b>
<b>Figura 24.</b> Modelo empleado y secuencias conservadas para diseño de oligos <i>pet</i> .....	<b>76</b>
<b>Figura 25.</b> Modelo empleado y secuencias conservadas para diseño de oligos <i>pic</i> .....	<b>77</b>
<b>Figura 26.</b> Modelo empleado y secuencias conservadas para diseño de oligos <i>tsh</i> .....	<b>78</b>

<b>Figura 27.</b> Reporte de resultados para el análisis de banda 1 por Espectrometría de masas (EM).....	<b>79</b>
<b>Figura 28.</b> Reporte de resultados para el análisis de banda 2 por Espectrometría de masas (EM).....	<b>79</b>
<b>Figura 29.</b> Reporte de resultados para el análisis de banda 3 por Espectrometría de masas (EM).....	<b>80</b>
<b>Figura 30.</b> Reporte de resultados para el análisis de banda 4 por Espectrometría de masas (EM).....	<b>80</b>
<b>Figura 31.</b> Reporte de resultados para el análisis de banda 5 por Espectrometría de masas (EM).....	<b>81</b>
<b>Figura 32.</b> Reporte de resultados para el análisis de banda 6 por Espectrometría de masas (EM).....	<b>81</b>
<b>Figura 33.</b> Reporte de resultados para el análisis de banda 7 por Espectrometría de masas (EM).....	<b>82</b>

## 1. MARCO TEÓRICO

*Escherichia coli* (*E. coli*) es la bacteria anaerobia facultativa más abundante en el intestino grueso del ser humano. La mayoría de las cepas actúan como comensales que nos protege frente a la infección, al competir con patógenos intestinales como *Shigella sp.* y *Salmonella sp.* Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* son patógenas intestinales y constituyen la principal causa de diarrea infantil en países en vías de desarrollo, provocando la muerte a un número significativo de niños. También se han producido brotes epidémicos de diarrea por *E. coli* en los Estados Unidos, debido a la ingestión de alimentos y aguas contaminadas (79,420 casos en una población de 320 millones de personas). Además, es un patógeno importante de vías urinarias. (John L. Ingraham y Catherine A. Ingraham, 2004). De manera general, *E. coli* es un bacilo corto; posee un diámetro de 0.5  $\mu\text{m}$  y una longitud de 1.0–3.0  $\mu\text{m}$ , es no esporulado, es un microorganismo Gram negativo, posee un contenido de GC de 50% y es móvil por flagelos peritricos. Al tratarse de una enterobacteria se puede encontrar en aguas negras y se le clasifica como un organismo ubicuo (Holt, 1994; Welch, 2006).

### 1.1. Clasificación de *E. coli*:

En 1990, Herzer y colaboradores desarrollaron un sistema de clasificación basado en el análisis de patrones de movilidad electroforética de 38 enzimas relacionadas con el metabolismo, a partir de una colección de 72 cepas de *E. coli* de diversos orígenes, el análisis de este estudio reveló cuatro grupos filogenéticos principales, denominados A, B1, B2 y D. Basándose en criterios genéticos y clínicos, las cepas de *E. coli* se pueden diferenciar en las que habitan de manera natural el intestino o también llamadas comensales, cepas relacionadas con infecciones intestinales o InPEC y cepas patógenas extraintestinales o ExPEC. Estas últimas pertenecen en su mayoría al grupo B2 y en menor proporción al D de la clasificación de Herzer; estos grupos poseen mayor cantidad de genes de virulencia comparados con los grupos A y B1, a los que pertenecen las cepas comensales.

Se conoce que las cepas de *E. coli* comensales, constituyen la mayor parte de la flora fecal en la mayoría de los seres humanos sanos, mamíferos y aves. Estas cepas se encuentran adaptadas para la coexistencia pacífica con el hospedero, sin provocar enfermedades en el tracto intestinal. En los seres humanos, por lo general no produce enfermedades fuera del tracto intestinal, excepto cuando se encuentra inmunocomprometido (Russo y Johnson, 2000). Por otro lado se sabe que InPEC, raramente se encuentra en la flora fecal de personas sanas, se le considera un patógeno obligado porque cuando se ingiere es causante de gastroenteritis o colitis en el hospedero, las dosis infectivas en modelos de laboratorio dependen del patotipo que se trate. Actualmente, se conocen 8 diferentes patotipos de *E. coli*: la clase enterotoxigénica (ETEC), la productora de la toxina shiga (STEC), enterohemorrágica (EHEC), enteropatógena (EPEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), difusamente adherente (DAEC) y la más reciente que es un híbrido de *E. coli* (EAEC/STEC) también conocida como la cepa enteroagregativa O104:H4 Stx2a. Aunque existe solapamiento entre algunos patotipos diarreogénicos, cada patotipo posee una combinación única de rasgos de virulencia que se traduce en un mecanismo patogénico distintivo (Rasko *et al.* 2011; Russo y Johnson, 2000). Existe una última clasificación de *E. coli* conocida como extraintestinal, propuesta por Johnson y Russo en el año 2000, y designada con el acrónimo "ExPEC" para referirse a las *E. coli* patógenas fuera del tracto gastrointestinal. Estas bacterias son epidemiológica y filogenéticamente distintas a las comensales o a las patógenas intestinales, se sabe que son incapaces de causar enfermedades entéricas, pero pueden colonizar el tracto intestinal del hospedero, siendo predominante en un 20% de humanos sanos (Russo y Johnson, 2000). ExPEC posee 3 variantes: *E. coli* patógena aviar (APEC), *E. coli* uropatógena (UPEC) y las responsables de la meningitis neonatal (NMEC) (Pitout, 2012). ExPEC también ha sido aislada de infecciones intraabdominales y neumonía nosocomial, y ocasionalmente ha estado implicada en osteomielitis. Estas enfermedades son de alto impacto en salud pública, por su alta incidencia, morbi-mortalidad y altos costos de tratamiento.

### **1.1.1. *Escherichia coli* uropatogénica:**

UPEC es la causa más común de infecciones urinarias no adquiridas en el hospital, responsable de 70 – 90% de los 7 millones de casos de cistitis aguda y 250,000 casos de pielonefritis registrados anualmente en Estados Unidos (Bien *et al.* 2012). El tracto urinario es un ambiente que se caracteriza por ser estéril, es mantenido así por una gran variedad de mecanismos de defensa del hospedero. Muchas de las bacterias patógenas que causan infecciones del tracto urinario (ITU) se encuentran en la propia flora del hospedero (Bien *et al.* 2012). *E. coli*, tiene la capacidad de expresar factores de virulencia que tienen el objetivo de asegurar la supervivencia y colonización en el tracto urinario de mamíferos, tales como; adhesinas (tipo 1 y fimbria P), toxinas como la  $\alpha$ -hemolisina y Sat (toxina secretada autotransportadora), sistemas de adquisición de hierro (enterobactina y aerobactina) (Totsika *et al.* 2012). Varios estudios muestran que UPEC posee flagelos implicados en la virulencia para producir ITU, que contribuyen a la adherencia, este es un paso crítico para el inicio de una enfermedad, ya que permite a UPEC resistir las fuerzas hidrodinámicas del flujo de la orina y activa rutas de señalización entre el hospedero y la bacteria, que resultan en el proceso de inflamación y colonización, respectivamente (Totsika *et al.* 2012). Las infecciones sintomáticas provocan molestia en pacientes, cuyos resultados son la pérdida de productividad, predisposición a nuevas infecciones y necesidad de terapia con antibióticos (Sivick y Mobley, 2009).

### **1.1.2. *Escherichia coli* responsable de meningitis neonatal:**

Entre las meningitis, la bacteriana es la segunda enfermedad más importante y es causada por *E. coli* y otros bacilos Gram negativos; especialmente *E. coli* capsulada K1 es responsable del 40% de las septicemias neonatales y del 75% de meningitis por *E. coli* (Wubbel y Mc Cracken, 1998). La meningitis bacteriana es aún una de las patologías infecciosas más graves en pediatría (Wubbel y Mc Cracken, 1998). Las meninges (duramadre, aracnoides y piamadre), que envuelven el tejido encefálico y la médula espinal, son infectadas con

microorganismos por vía hemática, reaccionando con inflamación, induciendo cambios en la morfología celular y en las características químicas del líquido cefalorraquídeo, lo que se traduce en alteraciones clínicas como irritabilidad y rigidez de nuca.

## 1.2. Factores de virulencia de ExPEC:

Las cepas patógenas de *E. coli* extraintestinales poseen rasgos específicos de virulencia que le permiten únicamente causar la infección en un sitio determinado. Los mecanismos de invasión usados por ExPEC son dirigidos hacia la defensa del huésped (Inmunoglobulinas), a la adquisición de nutrientes por medio de peptidasas, sideróforos y toxinas (hemolisina), la adherencia (fimbrias tipo 1 y P), la evasión de la respuesta inmune como cápsulas y lipopolisacáridos (Russo y Johnson, 2003; Johnson *et al.* 2005; Soto, 2006); y sobre todo peptidasas secretadas que degradan inmunoglobulinas (Kornfeld y Plaut, 1991, Pouedras *et al.* 1992, Miyoshi y Shinoda, 2000) (Figura 1). Algunos factores de virulencia de ExPEC se resumen en la tabla 1.

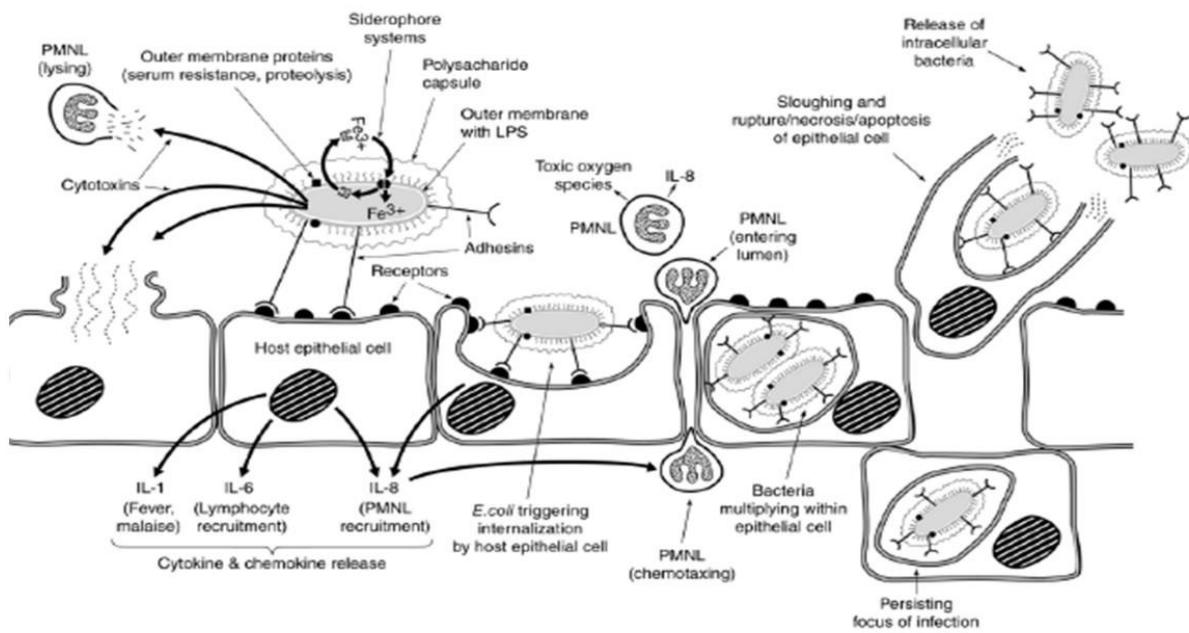


Figura 1. Factores de virulencia de ExPEC (Tomado de Johnson JR, 2003).

**Tabla 1. Factores de virulencia de ExPEC.**

<b>Factor de virulencia</b>	<b>Función en ExPEC</b>
<b><i>papG III</i></b>	Adhesina
<b><i>fimH</i></b>	Adhesina del tipo I
<b><i>gafD</i></b>	Fimbria G
<b><i>bmaE</i></b>	Subunidad de la M-aglutinina
<b><i>sfaS</i></b>	Lectina fimbrial
<b><i>lha</i></b>	Adhesina regulada por hierro
<b><i>ireA</i></b>	Receptor de sideróforo
<b><i>Iron</i></b>	Receptor de sideróforo
<b><i>kpsMTH</i></b>	Subunidad de polisacárido capsular
<b><i>ibeA</i></b>	Invasión del endotelio del cerebro
<b><i>traT</i></b>	Resistencia al suero
<b><i>iss</i></b>	Supervivencia al suero
<b><i>ompT</i></b>	Proteasa de membrana externa
<b><i>cvaC</i></b>	Colicina V
<b><i>malX</i></b>	Isla asociada a la patogenicidad
<b><i>hlyA</i></b>	Hemolisina
<b>CNF1</b>	Factor 1 de necrosis citotóxica

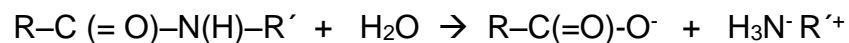
(Adaptado de Marrs *et al.* 2005; Smith *et al.* 2007).

La diversidad de clonas patógenas de *E. coli* es el resultado de la adquisición constante de genes que codifican diferentes factores de virulencia, estos genes pueden estar presentes en plásmidos, islas de patogenicidad y fagos; estos elementos genéticos extracromosomales son intercambiados con alta frecuencia

entre diferentes cepas de bacterias, en un proceso conocido como transferencia horizontal de genes (Biran *et al.* 2011).

## 2. **Proteasas como Factor de virulencia:**

La proteólisis juega un rol importante en muchos procesos biológicos tales como la digestión, el recambio de proteínas y la defensa de patógenos (Runeberg-Roos *et al.* 1994). Las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos pueden ser designadas como proteasas, proteinasas, peptidasas o enzimas proteolíticas. La Enzyme Commission (EC) del Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB, 1992) recomienda el término general peptidasas para todas las enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos. La reacción catalizada por todas las proteasas es el rompimiento del enlace peptídico por acción de una molécula de agua, para obtener un ácido y una amina, donde ambos productos se encuentran en forma ionizada a pH neutro (Perona y Craik, 1995). La reacción general se observa a continuación:



### 2.1. **Clasificación de proteasas y mecanismos de acción:**

La EC (NC-IUBMB, 1992) divide las peptidasas en exo y endopeptidasas. Las exopeptidasas pueden, a su vez, ser amino o carboxipeptidasas. Las endopeptidasas son clasificadas por dicha comisión en base al mecanismo catalítico en serinicas, cisteinicas, aspárticas y metaloendopeptidasas. Barrett *et al.* (1998) utilizan una clasificación diferente de la EC, pues consideran que las peptidasas son listadas allí en forma arbitraria. Estos autores agrupan las peptidasas en familias y clanes, con base en su estructura primaria y terciaria.

### **2.1.1. Clanes y familias de las peptidasas:**

Una familia reúne las peptidasas que muestran una relación estadísticamente significativa entre las secuencias de aminoácidos de la parte de la molécula responsable de la actividad proteolítica. Un clan es un grupo de familias cuyos miembros han evolucionado a partir de la misma proteína ancestral pero que han divergido lo suficiente como para que sus estructuras primarias no sean comparables. Además Barrett *et al.* (1998) agrupan las peptidasas en tipos catalíticos de acuerdo a la naturaleza de los grupos responsables de la catálisis. En ese sentido reconocen cinco clases: serínicas, treonínicas, cisteínicas, aspárticas y metalopeptidasas. Cada familia de peptidasas es nombrada con una letra que denota el tipo catalítico (S, T, C, A y M) seguida de un número arbitrario; las peptidasas cuyo mecanismo catalítico se desconoce se agrupan en la familia U.

#### **Peptidasas serínicas y treonínicas**

Las peptidasas en las cuales el mecanismo catalítico depende del hidroxilo de un residuo de serina que actúa como nucleófilo sobre el enlace peptídico son llamadas peptidasas serínicas. Barrett *et al.* (1998) distinguen siete clanes de peptidasas serínicas al comparar las estructuras terciarias y el orden de los residuos catalíticos en las secuencias. Pertenecen a este grupo las familias de la tripsina y de la subtilisina. Las enzimas que integran la familia de la tripsina son todas endopeptidasas y están presentes tanto en microorganismos procarióticos como eucarióticos, así como en plantas, invertebrados, vertebrados y en virus a ARN (Caffini *et al.* 1988; Barrett *et al.* 1998). La actividad de las peptidasas serínicas suele ser máxima a valores de pH alcalinos, no requiriendo en general activadores, aunque los iones calcio activan algunas proenzimas y podrían estabilizar determinadas enzimas (López, 1995). Por razones prácticas, las poco conocidas familias de peptidasas dependientes de treonina son incluidas por Barrett *et al.* (1998) dentro del séptimo clan (TA) de las serínpeptidasas, que son todas endopeptidasas en las que el nucleófilo puede ser serina, treonina o cisteína y que incluye enzimas en las que la única actividad es activarse a sí mismas.

### **Peptidasas cisteínicas:**

Las peptidasas cisteínicas presentan gran analogía en el mecanismo catalítico con las serínicas, en razón de que en ambos grupos la enzima y el sustrato forman un complejo covalente debido a que el nucleófilo es parte de un aminoácido. El dador de protones en todas las peptidasas cisteínicas identificadas es un residuo de histidina (al igual que en la mayoría de las peptidasas serínicas) y el nucleófilo es el grupo sulfhidrilo de un residuo de cisteína (Barrett *et al.* 1998). Son peptidasas cisteínicas la papaína, la quimopapaína, la bromelina, la cruzipaina, las caspasas, las catepsinas lisosomales de mamíferos, las calpaínas citosólicas y varias endopeptidasas virales. Este tipo de enzimas manifiestan su actividad a pH variable según el tipo de enzima y de sustrato. Así, las ubicadas en los lisosomas actúan generalmente a pH ácido, en tanto que la papaína tiene actividad en un amplio rango de pH y las calpaínas son activas a pH superiores a 7.5 (López, 1995). Dado que el mecanismo catalítico de estas enzimas utiliza a la cisteína como donador de protones, se pueden activar con tioles de bajo peso molecular como tioglicolato, ditiotreitól, 2-mercaptoetanol o cisteína (Storey y Wagner, 1986).

### **Peptidasas aspárticas:**

Las peptidasas aspárticas (APs) están ampliamente distribuidas, encontrándose en vertebrados, hongos, plantas, protozoos y retrovirus. Todas son endopeptidasas y se caracterizan por presentar un pH óptimo en el rango ácido y por ser específicamente inhibidas por pepstatina A. Todos los miembros de la familia A1 de la pepsina han sido hallados en eucariotas. Esta familia incluye a enzimas del tracto digestivo animal, como la pepsina, gastricsina y quimosina, enzimas lisosomales como la catepsina D y E y enzimas involucradas en procesos postraduccionales, como la renina producida en el riñón, que procesa angiotensinógeno en el plasma (Caffini *et al.* 1988). El mecanismo catalítico involucra residuos de ácido aspártico en el sitio activo de la cadena peptídica, unidos a una molécula de agua que es la que actúa como nucleófilo (Barrett *et al.* 1998). No existen grupos funcionales de estas enzimas que provoquen un ataque

nucleofílico sobre el carbonilo de la unión peptídica a escindir y por lo tanto no hay intermediario covalente entre la enzima y el sustrato (Hofmann *et al.* 1984). En general, las peptidasas aspárticas actúan mejor sobre uniones peptídicas de aminoácidos con cadenas laterales hidrofóbicas (Leu-Tyr, Phe-Phe, Phe-Tyr, etc.) pero la afinidad por el sustrato varía grandemente: la pepsina degrada la mayor parte de las proteínas hasta pequeños péptidos, pero las enzimas utilizadas en la fabricación de quesos coagulan la leche por medio de la escisión selectiva de la unión peptídica Phe105-Met106 de la  $\kappa$ -caseína (Asakura *et al.* 1997).

### **Metalopeptidasas:**

Las familias de las metalopeptidasas se pueden reunir en dos grupos: las peptidasas que sólo requieren iones zinc para la catálisis y las que necesitan dos iones metálicos que actúen co-catalíticamente, como es el caso de las peptidasas en las que el cobalto y el manganeso son esenciales para su actividad (Barrett *et al.* 1998). El ataque nucleofílico sobre el enlace peptídico es mediado, al igual que en las peptidasas aspárticas, por una molécula de agua (Barrett *et al.* 1998). La más estudiada de las metalopeptidasas es la termolisina de *Bacillus thermoproteolyticus*, cuyo sitio activo contiene un átomo de zinc unido a cadenas laterales de histidina y de ácidos glutámico (Caffini *et al.* 1988).

### **Peptidasas de mecanismo catalítico desconocido:**

En este grupo se incluyen todas aquellas peptidasas a las que, con la información disponible al momento, no es posible ubicarlas en ninguna de las cinco categorías anteriores. Incluyen di-, endo-, carboxi- y omega- peptidasas que participan en el metabolismo de la pared bacteriana; hidrolizan diversas proteínas de bacterias y virus o están involucradas en la esporulación de algunas especies de *Bacillus sp.* (Barrett *et al.* 1998).

### **Inhibidores de peptidasas:**

El efecto de los inhibidores permite tener información acerca del tipo catalítico de una peptidasa, aunque pocos de los inhibidores disponibles son reactivos perfectos de diagnóstico, dado que pueden ocurrir falsos positivos y falsos negativos. Cuando se detecta una inhibición parcial, el efecto del tiempo de exposición de la enzima al inhibidor sobre el grado de inhibición, puede ser informativo (Barrett, 1994).

### **Peptidasas serínicas:**

La 3,4-dicloro-isocumarina (3,4-DCI) es el reactivo de elección para reconocer las peptidasas serínicas, pues reacciona rápida e irreversiblemente con la mayoría de ellas. Otros reactivos que son útiles para la identificación de este tipo de peptidasas son: el DFP (**diisopropilfluorofosfato**) y el PMSF (**fenilmetilsulfonil fluoruro**). Ambos pueden también inhibir peptidasas cisteínicas, pero su efecto es reversible por el agregado de compuestos tiólicos. La desventaja del DFP es su neurotoxicidad (inhibe la acetil colinesterasa), la que se ve incrementada por su volatilidad (Barrett, 1994). Otras herramientas útiles para identificar peptidasas serínicas son los inhibidores naturales reversibles: aprotinina y el inhibidor de tripsina de soja (Storey y Wagner, 1986).

### **Peptidasas cisteínicas:**

Las peptidasas cisteínicas del grupo de la papaína y la calpaína son susceptibles a la rápida, específica e irreversible inactivación por el compuesto E-64 (L-transepoxisuccinil-leucilamida-(4-guanidino)-butano). Una característica importante del E-64 y otros inhibidores epóxidos es que no reaccionan con tioles de bajo peso molecular, como cisteína y ditiotreitól. Otras peptidasas cisteínicas (clostripaina, estreptopaína) son pobremente inhibidas por el E-64 y se deben usar reactivos generales para grupos tioles para reconocerlas (iodoacetato, iodoacetamida); estos últimos presentan el inconveniente de reaccionar también con los

activadores de las peptidasas cisteínicas (Barrett, 1994). Algunos de los inhibidores usados para peptidasas cisteínicas no son específicos. Así, los aldehídos y clorometanos peptidílicos como quimostatina y leupeptina pueden reaccionar con peptidasas cisteínicas y serínicas (Storey y Wagner, 1986).

### **Peptidasas aspárticas:**

Relativamente pocos inhibidores actúan sobre las peptidasas aspárticas (APs). El complejo de la diazoacetil-DL-norleucina metil éster (DAN) con iones cobre y el EPNP (1, 2-epoxy-3-(p-nitrofenoxi) inactivan a la mayoría de ellas. El más efectivo de los inhibidores de estas peptidasas es la pepstatina A, un isovaleril-pentapéptido aislado de cultivos de varias especies de *Streptomyces*, que en una concentración final de 1-5  $\mu\text{M}$  inhibe reversiblemente la mayoría de las APs y no afecta otro tipo de peptidasas (Barrett, 1994).

### **Metalopeptidasas:**

La mayoría de los inhibidores de las metalopeptidasas actúan como quelantes del átomo de zinc catalítico. La 1,10-fenantrolina es el más usado de estos inhibidores.

## **Familias de peptidasas bacterianas que rompen o degradan inmunoglobulinas:**

Un factor de virulencia que comparten muchos de los patógenos y que son altamente intercambiables entre las cepas bacterianas a través de la transferencia horizontal son las enzimas proteolíticas (Hacker y Kaper, 2000). Estas peptidasas tienen un amplio rango de funciones celulares como la adquisición de nutrientes para el crecimiento y proliferación a través de la degradación de tejido del hospedero y la desregulación de procesos críticos del hospedero, incluyendo la interrupción de rutas de cascada de citocinas, corte de receptores de superficie e inactivación de inhibidores de peptidasa del hospedero (Rao *et al.* 1998; Travis y Potempa, 2000) y sobre todo le permiten evadir el sistema inmune por la degradación de inmunoglobulinas (Mushin *et al.* 1980; Molla *et al.* 1986; Maeda y Molla, 1989; Parmely *et al.* 1990; Kornfeld y Plaut, 1991), y también de esta manera obtienen una fuente de aminoácidos (Jansen *et al.* 1995). A la fecha se tienen algunos reportes de proteasas que rompen Igs, como es el caso de las metalopeptidasas reportadas por Miyoshi y Shinoda (2000) en *Legionella pneumophila* y *Vibrio cholerae* y la elastasa de *Pseudomona aeruginosa*; capaces de degradar IgA e IgG de porcinos, de la misma manera, se ha reportado que varias cepas de *Pasteurella multocida* tienen la habilidad de producir enzimas extracelulares que cortan moléculas de IgA e IgG de porcinos, así como IgG de diferentes especies (Negrete-Abascal *et al.* 1994, 1998, 1999). También se conoce la familia de metaloproteasas M4, de 54 kDa, de tipo extracelular y que poseen dominios de peptidasas que degradan IgG en *Pseudomona sp.* (Andrejko *et al.* 2013). Por otro lado se tienen algunas metaloproteasas que poseen dominios peptidasa que escinden IgA (familia M26 y M64). Cabe mencionar que la familia M26 sólo se encuentra en las bacterias Gram positivas, poseen un motivo LPXTG. Esta familia también incluye a la metalopeptidasas ZmpB y ZmpC de *Streptococcus pneumoniae*, su función celular se refiere a que posee actividad metaloproteasa de unión a zinc (Protein sequence analysis y classification, 2013). En *Neisseria gonorrhoeae* y *Haemophilus influenzae* está ampliamente demostrado la existencia de una proteasa degradadora de inmunoglobulina IgA,

está enzima realiza el corte en la región bisagra de la inmunoglobulina, pertenece a la familia S6; una familia de proteínas autotransportadoras. La actividad biológica de esta familia es la proteólisis y su función molecular es del tipo serina proteasa con actividad de endopeptidasa. Sin embargo, no todos los miembros de la familia rompen Igs, como el caso de la proteasa EspP de *E. coli* O157:H7 que corta el factor V de la coagulación en los humanos y hemoglobina (Protein sequence analysis y classification, 2013).

En la tabla 2, se comparan las peptidasas bacterianas que rompen Igs de varias familias (Sandt y Hill, 2001; Dautin, 2010; Leo y Goldman, 2010; Ruiz y Nataro, 2013; Pastorello *et al.* 2013, Protein sequence analysis y classification, 2013; Uniprot, 2013).

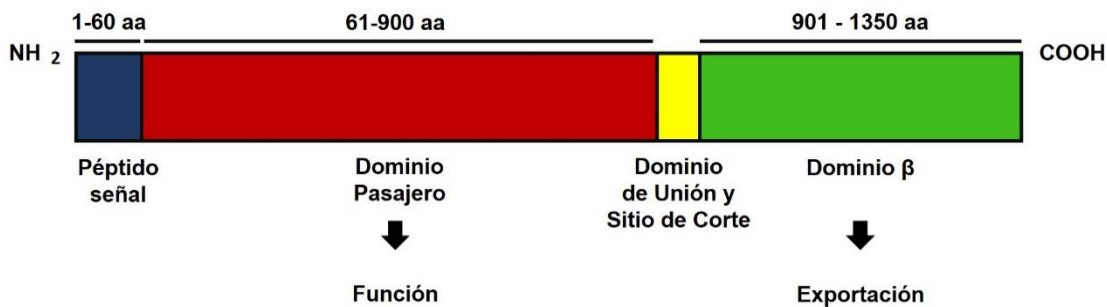
**Tabla 2. Distribución de proteasas en microorganismos que poseen dominios peptidasa y que escinden Igs como sustrato.**

	Proteasa	Dominio catalítico	Microorganismo	Función	Sustrato/ Interacción	Familia	Tamaño (kDa)
SPATE-AT (Trimérica)	EibA, C, D, F y G	-	<i>E.coli</i>	Inmunomodulador	Unión a inmunoglobulina región Fc	En estudio	200
En estudio	EsiB	En estudio	ExPEC	Escinde Inmunglobulina	sIgA	En estudio	En estudio
Proteasas de IgA	Iga	HEXXH	<i>Clostridium ramosum</i>	Metaloproteasa que escinde inmunoglobulina	IgA	M64	137
	Peptidasa de IgA	GDSGS	<i>Haemophilus influenzae</i>	Proteasa de serina que escinde inmunoglobulina	IgA	S6	169
	Peptidasa de IgA	GDSGS	<i>Neisseria gonorrhoeae</i>	Proteasa de serina que escinde inmunoglobulina	IgA	S6	169
	Peptidasa	LPXTG	<i>Streptococcus suis</i>	Metaloproteasa que escinde inmunoglobulina	IgA	M26	215
Proteasas de IgG	LasB	Zinc-HEXXH	<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	Metaloproteasa que escinde inmunoglobulina	IgG	M4	54
	Peptidasa	Zinc-HEXXH	<i>Proteus mirabilis</i>	Metaloproteasa que escinde inmunoglobulina	IgG	M10	54
	SspA	-	<i>Staphylococcus aureus</i>	Endopeptidasa glutámica que escinde inmunoglobulina	IgG	S1B	36
	Mac	-	<i>Streptococcus pyogenes</i>	Cisteína proteasa que escinde inmunoglobulina	IgG	C10	38

(Adaptado de Sandt y Hill, 2001; Dautin, 2010; Leo y Goldman, 2010; Ruiz y Nataro, 2013; Pastorello *et al.* 2013, Protein sequence analysis y classification, 2013; Uniprot, 2013).

## 2.4. Autotransportadores del tipo serina proteasas en enterobacterias (SPATEs):

SPATEs (**S**erin **P**rotease **A**utotransporters of **E**nterobacteriaceae) es una familia de proteasas extracelulares producidos por Enterobacterias. Estas proteínas son autotransportadores (ATs), lo que significa que son secretadas por el sistema de secreción tipo Va de bacterias Gram negativas. Los ATs son muy diversos en su función (adhesina, proteasa, esterasa, lipasa, etc.) pero comparten el mismo mecanismo de exportación. Son reconocidos por su organización estructural (Figura 2), están constituidos por un dominio N-terminal, sec-dependiente, o péptido señal que abarca los aminoácidos 1- 60, que contiene el sitio (secuencia de aminoácidos) de reconocimiento de la proteína a transportar, donde se genera un corte en un enlace peptídico que libera a la proteasa al medio extracelular, seguido de un dominio pasajero (S6) en el cual se encuentra el sitio catalítico de la serina proteasa (secuencia GDSGS) que es común en las proteasas Va de los SPATE, y un extremo C- terminal o dominio  $\beta$  también llamado dominio autotransportador, el cual participa en el transporte del dominio pasajero al



ambiente extracelular (Dautin, 2010).

**Figura 2. Dominios de un SPATE tipo Va** (Adaptado de Dautin, 2010).

Las proteasas son muy diversas y participan en una gran variedad de procesos biológicos, uno de ellos relacionado con los mecanismos de virulencia de las bacterias que llegan a poseerlos. La familia de las proteasas tipo Va de los SPATEs posee el dominio S6, que se ha identificado en la proteasa de IgA, esta

proteasa se ha localizado en bacterias de las familias *Neisseriaceae*, *Enterobacteriaceae*, *Campylobacteraceae* y *Pasteurellaceae* (Pfam domain proteins, 2013).

### **SPATEs de alto peso molecular en la Patogénesis:**

SPATEs se ha dividido en dos subgrupos basados en criterios filogenéticos. Un grupo incluye SPATEs que muestran la actividad citotóxica (Pet, EspC, EspP, SigA) y que probablemente tienen blancos intracelulares. El otro grupo incluye SPATEs que no han demostrado actividad citopática en las células, pero que podría ser importante en la patogénesis porque afectan a un blanco extracelular (Yen *et al.* 2008).

**Pet:** es el primer autotransportador con actividad enterotóxica estudiado. Se encuentra en el plásmido AA de *E. coli* (InPEC) y no corta inmunoglobulinas (Johnson y Nolan, 2009; Dautin, 2010; Uniprot, 2013). Su peso molecular es de 110 kDa. Específicamente, Pet muestra actividad enterotóxica en tejido yeyunal de rata, también causa efectos citotóxicos sobre estas mismas células, provocando daño tisular, inflamación y mucosidad e induce efectos citopáticos en las líneas celulares de HEP-2 y HT29 C1 (Navarro *et al.* 2007). Pet posee efectos tóxicos que requieren la internalización de la proteína en las células huésped. La internalización ocurre por endocitosis dependiente de clatrina, posteriormente a la endocitosis, Pet va hacia el retículo endoplásmico, donde es modificada con una señal que le permite ser transportada al citoplasma. Una vez en el citoplasma Pet corta el sustrato fodrina. Esta escisión induce una redistribución de la fodrina y se observan efectos citopáticos (Navarro *et al.* 2007). Otros sustratos que degrada Pet son caseína, gelatina, pepsina, factor V de la coagulación humana y espectrina (Ruiz y Nataro, 2013).

**Pic:** es producida por *Shigella flexneri*, EAEC y UPEC. Su peso molecular es de 110 kDa. Se demostró que Pic media la resistencia a suero por un mecanismo dependiente de su actividad proteolítica. Aunque se desconoce el mecanismo exacto de esta resistencia a suero, es probable que Pic degrade uno de los

componentes de activación de la vía clásica del complemento (Henderson *et al.* 1999). Pic también media la hemaglutinación específica de la especie (hemaglutinación débil se observó para la rata, cerdo, conejo, caballo, y glóbulos rojos de oveja, pero ninguno se observó con las células rojas de la sangre humanas o de pollo) (Henderson *et al.* 1999). Ningún efecto citotóxico fue detectado, sin embargo, fue demostrado que también puede unirse a fodrina, el blanco intracelular de las citotoxinas EspC y Pet. (Dautin, 2010; Uniprot, 2013).

**Tsh:** el gen tsh inicialmente fue identificado como un gen del patógeno aviar *E. coli* (APEC) cepa X7122. El gen confiere propiedades de hemaglutinación para *E.coli* K12 y posee un peso molecular de 110 kDa. Tsh se une a la hemoglobina, colágeno IV y fibronectina, lo que sugiere que podría actuar como una adhesina. Tsh, en contraste con Pic, no media la resistencia al suero, pero se ha propuesto que es importante para la colonización del saco de aire en aves (Dautin, 2010).

A la fecha, algunos SPATEs continúan en estudio, en la tabla 3, se resumen los sustratos específicos de los ATs pertenecientes a esta familia (Dautin, 2010).

**Tabla 3. Especificidad de sustrato de SPATEs**

	<b>Digiere</b>	<b>No digiere</b>
<i>EatA</i>	AAPM-pNA, AAPL-pNA	-----
<i>EpeA</i>	Pepsina A, Gelatina, Mucina	-----
<i>EspC</i>	Fodrina, Hemoglobina, Pepsina, Factor V, Espectrina	IgA1 Humana, Mucina, Lisozima
<i>EspI</i>	Pepsina A, Apolipoproteína A1	IgA1, Hemoglobina, HSA, $\alpha$ 2-Macroglobulina, Haptoglobina, Trombina, Colágeno tipo III, Tripsina, Lipoproteína de baja densidad, Lipoproteína de alta densidad, Lipoproteína de muy baja densidad, Transferrina, Lactoferrina, Pepsinógeno, Gelatina, Caseína.
<i>EspP</i>	Pepsina A, Factor V de la coagulación humana, Caseína, Apolipoproteína A1, AAPL- Pna.	IgA1 Humana, HSA, $\alpha$ 2-Macroglobulina, Transferrina, Lactoferrina, Pepsinógeno, Mucina, Espectrina.
<i>Hbp</i>	Hemoglobina	Albumina, Lactoferrina humana, IgA1 Humana.
<i>Pet</i>	Caseína, Gelatina, Pepsina, Factor V de la coagulación Humana, Espectrina.	Actina, Mucina, Inmunoglobulinas Humanas.
<i>Pic</i>	Gelatina, Ovomucina, Murina, Fodrina, Mucina Bovina, Pepsina A, Factor V de la coagulación.	Caseína, IgA, IgM, IgG, Mucina gástrica de cerdo, Espectrina de Ovino.
<i>Sat</i>	Caseína, Factor V, Espectrina.	IgA1, Hemoglobina, Mucina, Pepsina.
<i>SepA</i>	FLF-Pna, VPF-Pna, AAPF-Pna, AAPM-Pna.	IgA1, Gelatina, Angiotensina, Lisozima de huevo, Fibronectina, Mucina, Pepsina, Factor V, Espectrina.
<i>SigA</i>	Caseína, Fodrina	-----
<i>Tsh</i>	Mucina, Factor V	IgA de Pollo y Humano, Caseína, Pepsina A, Espectrina.
<i>Vat</i>	-----	Caseína

(Tomado de Dautin, 2010). \*AAPM-pNA, AAPL-pNA (Oligopéptidos conjugados con paranitroalanina) \*\*FLF-pNA, VPF-pNA, AAPF-pNA, AAPM-pNA (Oligopéptidos conjugados con paranitroalanina).

### **Inmunoglobulinas; un factor antimicrobiano del huésped:**

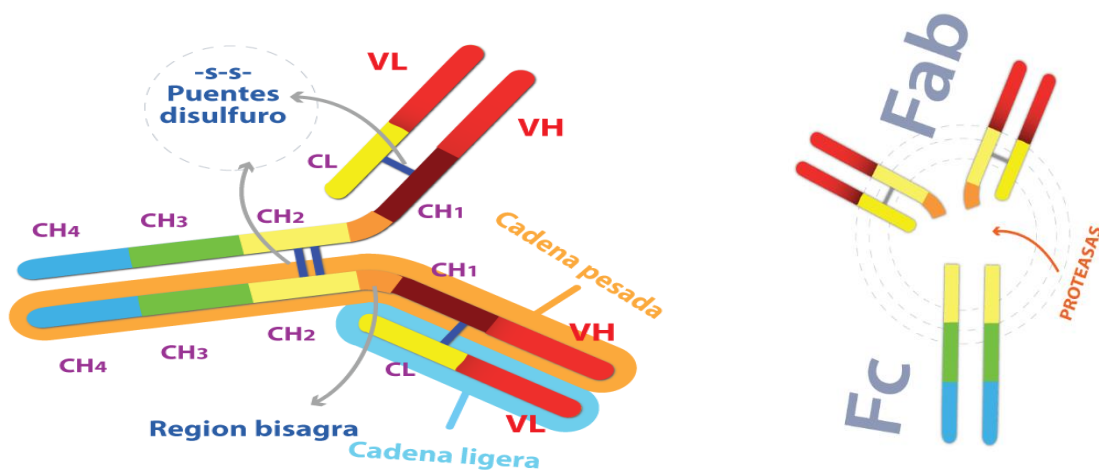
La respuesta efectora humoral ante una invasión microbiana está a cargo de las inmunoglobulinas también llamadas anticuerpos, que son glicoproteínas secretadas por células plasmáticas blancas. Se encuentran entre los componentes proteicos más abundantes de la sangre, constituyendo aproximadamente un 20 % en peso del total de proteínas plasmáticas (Alberts *et al.* 2005). En el humano existen cinco grandes grupos de inmunoglobulina, siendo la IgA e IgG los factores antimicrobianos del huésped, sin embargo uno de los mecanismos bacterianos de evasión de defensa es la degradación de las Igs por medio de las proteasas bacterianas. Las Igs actúan como sustrato de las proteasas bacterianas. La región bisagra de la IgA1 es uno de esos sustratos; es una región grande que separa a las fracciones Fab e incorpora la duplicación de 8 aminoácidos, secuencias ricas en prolina, serina y treonina, que son el sitio donde todas las proteasas de IgA1 escinden. Por otro lado las proteasas de IgA2 pierden la especificidad por la región bisagra y son resistentes a la acción de la proteasa de IgA1. Cada una de las proteasas de Igs rompe enlaces peptídicos específicos: las enzimas de tipo 1 rompen el enlace Pro-Ser y las enzimas tipo 2 rompen Pro-Thr. El corte por la proteasa en IgA1 trae como consecuencia la generación de fragmentos Fab y Fc y por lo tanto el desacoplamiento del reconocimiento de las Igs por parte de los mecanismos moleculares-celulares destinados para la eliminación de los antígenos. Por otra parte la región Fab formada puede enmascarar epítomos relevantes del sistema inmune (Senior y Woof, 2005).

### **Estructura de las Inmunoglobulinas:**

Se distinguen diversos tipos de inmunoglobulinas: IgG, IgM, IgA, IgD e IgE. Desde el punto de vista estructural, todas ellas tienen en común que su unidad básica está formada por dos pares de cadenas peptídicas: un par de cadenas ligeras (cadenas L) con 220 aminoácidos cada una y un par de cadenas pesadas (cadenas H) formadas por 440 aminoácidos cada una. Estas cuatro cadenas están ligadas por enlaces disulfuro entre residuos de cisteínas que forman parte de las

cadena peptídica. Cada cadena L está enlazada por este tipo de enlaces a una cadena H y cada cadena H está ligada por ellos a una cadena L y a la otra cadena H.

En la figura 3, (Schroeder *et al.* 2010) pueden distinguirse dos regiones o dominios diferentes en las cadenas L: VL y CL, mientras en las cadenas H pueden encontrarse 4 regiones: VH, CH1, CH2 y CH3. Cada una de esas regiones está compuesta por 70 a 110 aminoácidos. Las regiones o dominios V se denominan Variables: la secuencia de aminoácidos en esas regiones (las porciones amino terminales de las cadenas L y H) es altamente variable, y dentro de ellas, tanto en la cadena L como en la H, hay regiones hipervariables, los CDRs o regiones determinantes de complementariedad (Complementarity-determining regions) que forman los sitios de enlace con el antígeno, estos son complementarios a la topología del antígeno específico. Hay dos sitios de enlace para antígenos en cada unidad  $(LH)_2$ . Cuando una unidad  $(LH)_2$  es hidrolizada con papaína, se liberan tres fragmentos: dos denominados Fab y uno llamado Fc. Los fragmentos Fab (Fragment antigen-binding), contienen la estructura que es capaz de enlazarse al antígeno mientras el fragmento Fc (c significa cristizable) no puede unirse al antígeno, pero contiene un sitio (o sitios) que se enlaza(n) a proteínas del complemento y que es expuesto cuando ocurre la interacción entre el anticuerpo y el antígeno.



**Figura 3. Estructura de los dominios de las Inmunoglobulinas** (Tomado de Schroeder *et al.* 2010).

### 3.1. Clasificación de las inmunoglobulinas:

Hay cinco clases de cadenas pesadas:  $\alpha$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ ,  $\gamma$  y  $\mu$ . Estas cadenas difieren en el tipo de regiones constantes que cada una tiene. Las inmunoglobulinas que contienen cadenas gamma se denominan **IgG**. Las moléculas de IgG están formadas por una unidad  $(LH)_2$ . Las Inmunoglobulinas G son las inmunoglobulinas más abundantes en el suero (600-1800 mg/dL). Estas inmunoglobulinas promueven la fagocitosis en el plasma y activan al sistema del complemento. Las IgG son el único tipo de anticuerpos que puede cruzar la placenta (Schroeder *et al.* 2010).

Las inmunoglobulinas que contienen cadenas alfa se denominan **IgA**. Las IgA se encuentran principalmente en las secreciones mucosas, en las lágrimas, el calostro y la leche materna. Estas inmunoglobulinas son la defensa inicial de las mucosas contra los agentes patógenos. Ellas aparecen usualmente como dímeros de unidades  $(LH)_2$  (Alberts *et al.* 2005).

Las **IgM** contienen cadenas pesadas  $\mu$ . Los anticuerpos tipo IgM se expresan en la superficie de los linfocitos B y se encuentran fundamentalmente en el plasma. Estos son los primeros anticuerpos producidos en cantidades significativas contra un antígeno. Las IgM promueven la fagocitosis y activan al sistema del complemento. Aparecen usualmente como pentámeros de unidades  $(LH)_2$  con sus cadenas pesadas unidas por un pequeño péptido (Alberts *et al.* 2005).

Las **IgE** contienen cadenas pesadas tipo épsilon. La IgE, un monómero  $(LH)_2$ , juega un importante papel en las reacciones alérgicas y posiblemente en la defensa contra infestaciones por algunos parásitos intestinales, ya que se encuentra aumentada en esas situaciones (Alberts *et al.* 2005).

El papel fisiológico de las **IgD** (inmunoglobulinas con cadena pesada) se desconoce. Reconoce a los antígenos en los linfocitos B que no han sido expuestos. La estructura de las IgD corresponde también a un monómero  $(LH)_2$  (Alberts *et al.* 2005).

#### 4. ANTECEDENTES

Actualmente está bien establecido que los modelos bacterianos de *Clostridium ramosum*, *Haemophilus influenzae*, *Neisseria gonorrhoeae* y *Pseudomonas aeruginosa* producen enzimas que cortan inmunoglobulinas humanas (Rawlings y Barrett, 1997; Uniprot, 2013). En trabajos anteriores se ha sugerido que cepas de *Escherichia coli* podrían contener como factor de virulencia a una proteasa de este tipo. (Milazzo y Delisle, 1984), demostraron que ExPEC aisladas de pacientes con infecciones en vías urinarias fueron capaces de hidrolizar IgA de mieloma, mientras que IgG, IgM e IgA secretora (SIgA) no fueron degradados por estos organismos. Eslava *et al.* 1998 y Heimer *et al.* 2003, determinaron que una serie de proteínas autotransportadoras, de masas moleculares entre 100 – 140 kDa, producidas por *Escherichia coli*; Pet, Pic y Tsh, poseen actividad de serina proteasa relacionada con la degradación de mucoproteínas. Russo y Carlino-MacDonald (2008), encontraron el 15 % de cepas de ExPEC con actividad proteolítica con IgA sin mostrar que tipo de enzima está presente en ExPEC ni su peso molecular. Más tarde, Leo y Goldman (2010), reportaron la capacidad de la proteína multimérica EibACDEFG de *E. coli* de unirse a la región Fc de la IgG, su peso molecular aproximado es de 200 kDa. En el mismo año, Dautin (2010) mostró evidencia que la cepa comensal de *E. coli* ECOR-9, produce las proteínas EaaA (142 kDa) y EaaC (142 kDa), las cuales tienen la capacidad de unirse a una región hasta ahora desconocida de la inmunoglobulina. Recientemente, Pastorello *et al.* en el 2013 encontraron en ExPEC, una nueva proteína llamada EsiB que se une a la inmunoglobulina secretoria de la IgA, sin embargo los autores no reportan el peso molecular y tampoco su capacidad de actuar como proteasa. Como se puede apreciar, existen variaciones en la actividad proteolítica, las cuales pueden estar relacionadas con el grupo filogenético de las cepas estudiadas, al silenciamiento o inestabilidad de la información genética o a diferencias metodológicas para poner de manifiesto la actividad proteolítica en ExPEC (Nájera Hernández *et al.* 2012). Los precedentes mostrados indican que *E. coli* posee

proteínas específicas que pueden interactuar con las inmunoglobulinas y evadir las defensas del huésped, sin embargo aún no está comprendida la interacción y si esta es asistida por alguna función proteolítica accesoria. Es decir, no existen reportes, respecto a la caracterización de una proteasa extracelular de ExPEC con la capacidad de escindir inmunoglobulinas como lo hizo Nájera Hernández *et al.* 2012, en un estudio realizado en nuestro laboratorio, donde puso de manifiesto una importante degradación de IgA, IgG y HSA, con Zimogramas *in situ* (Negrete Abascal *et al.* 1994, 1998, 1999, 2004) en bacterias ExPEC con diferentes niveles de resistencia a antimicrobianos, y sin que hubiera exclusividad al ambiente hospitalario (Nájera Hernández *et al.* 2012). La enzima degradadora de Igs a diferencia de otras proteasas, tiene un tamaño que varía de 160 a 200 kDa, se produce en diferente cantidad entre las cepas estudiadas y se acumula en el medio externo principalmente en la fase estacionaria del cultivo. El tamaño molecular y el tipo de degradación del sustrato indican que se trata de una clase de enzimas diferentes a la descrita para las bacterias patógenas de epitelios analizadas hasta el día de hoy (Nájera Hernández *et al.* 2012). Tomando en cuenta los antecedentes mencionados respecto a la investigación de Nájera Hernández *et al.* 2012, el equipo de trabajo se interesó en continuar con el estudio de la proteasa putativa 137-SN tipo S6; teniendo el conocimiento que las proteasas que degradan IgA pertenecen a esta familia, ya que resultaba interesante ampliar el estudio por representar a un grupo aún no caracterizado de proteasas con actividad proteolítica en sustratos IgA, IgG y ASH. Los datos experimentales mostrados por Escobar Muciño *et al.* 2014, concluyen que ExPEC cepa 137-SN no posee las proteasas Pic, Pet y Tsh; candidatos probables a proteasa en *E. coli*, por lo que podría tratarse de una proteasa aún no caracterizada y no reportada con la capacidad de degradar IgG como sustrato, sin embargo hasta el momento no se tienen evidencias completas para tener la certeza que se trate de un tipo diferente de enzima. De esta forma se pretende continuar con la caracterización de la proteasa implicada en la degradación de inmunoglobulinas y albúmina sérica.

## 5. HIPÓTESIS

*Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) podrían contener como factor de virulencia a una proteasa degradadora de inmunoglobulina IgG y de albúmina sérica humana. Debido al tamaño molecular y a las evidencias bioquímicas, esta enzima podría pertenecer a una nueva clase de enzimas en las bacterias del tipo ExPEC reportadas.

## 6. OBJETIVOS

### Objetivo General:

Investigar la posible participación de la proteasa S6 en *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y compararla con dos grupos control de *E.coli* no ExPEC.

### Objetivos Específicos:

1. Recolectar 60 cepas de *E. coli* a partir de alimentos crudos y muestras intestinales.
2. Comparar la actividad proteolítica entre las cepas de *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) y las obtenidas en este estudio.
3. Realizar la detección molecular de *pic*, *pet* y *tsh*.
4. Caracterización parcial del complejo de la proteasa S6 like de *E. coli*.
5. Estudio de la distribución del complejo de la proteasa S6 like de *E. coli*.

## 7. MATERIAL Y METODOLOGÍA

### **Material biológico:**

Se trabajó con la cepa de *Escherichia coli* ExPEC 137-SN, obtenida de hemocultivo y que forma parte de la colección del laboratorio de Microbiología Molecular y Celular del grupo de Bioquímica y Genética Microbiana, CICM-ICUAP.

### **Obtención de Cepas no ExPEC, medio de cultivo y condiciones de cultivo celular bacteriano:**

Se colectaron 60 muestras bacterianas de *E. coli* a partir de dos orígenes; alimentos crudos y muestras intestinales, estas últimas provenientes de pacientes ambulatorios no hospitalizados, sin restricción de edad y sin distinción de sexo, donadas por uno de los laboratorios de referencia en la ciudad de Puebla, de una cadena de farmacias y consultorios médicos de reconocido nombre en el país.

Las cepas aisladas de alimentos crudos se obtuvieron de dos grupos; productos cárnicos y vegetales, para el primer grupo las muestras analizadas fueron; carne de cerdo, res y pollo, entretanto que para el segundo fueron; espinaca, cebolla cambray y cilantro, el muestreo se realizó en 4 diferentes mercados ubicados en la zona centro y norte de la ciudad de Puebla y en diferentes tiempos. Realizado el muestreo, se pesaron 50 g del alimento y se trituró en un mortero de porcelana (excepto la muestra de pollo), la muestra triturada se colocó en un tubo Falcon de 50 mL conteniendo 15 mL de agua destilada estéril y se dejó reposar 15–20 minutos, posteriormente se realizó un hisopado y se sembró en Agar McConckey para la identificación de bacterias fermentadoras de lactosa, las placas se dejaron incubando a 37°C durante 24 horas. Se seleccionaron las colonias que resultaron positivas a la prueba (colonias rosas) y se resembraron en Agar EMB (**E**osin **M**ethylene **B**lue) seleccionando las colonias con centro oscuro y brillo verde metálico; comportamiento característico de *E. coli*. Finalmente, cada uno de los

aislados se resembró en Agar LB (**L**uria **B**ertani), se purificaron y se conservaron en glicerol a -70°C hasta su posterior uso.

Las cepas de *E. coli* no patógenas extraintestinales aisladas y utilizadas en el presente estudio se enlistan en las tablas 4 y 5.

**Tabla 4. Cepas no ExPEC aisladas de alimentos.**

Cepa	Característica / Origen	Referencia
<i>E. coli</i> ETM-1	Aislado de carne de Res	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-2	Aislado de carne de Res	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-3	Aislado de carne de Res	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-4	Aislado de carne de Res	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-5	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-6	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-7	Aislado de carne de Cerdo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-8	Aislado de Cilantro	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-9	Aislado de Cebolla	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-10	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-11	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-12	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-13	Aislado de carne de Cerdo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-14	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-15	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo

Cepa	Característica / Origen	Referencia
<i>E. coli</i> ETM-16	Aislado de Espinaca	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-17	Aislado de carne de Cerdo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-18	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-19	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-20	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-21	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-22	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-23	Aislado de carne de Pollo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-24	Aislado de carne de Res	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-25	Aislado de carne de Res	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-26	Aislado de carne de Cerdo	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-27	Aislado de Cebolla	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-28	Aislado de Cebolla	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-29	Aislado de Cilantro	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-30	Aislado de Espinaca	El presente trabajo

**Tabla 5. Cepas no ExPEC aisladas de muestras intestinales.**

Cepa	Característica / Origen	Referencia
<i>E. coli</i> ETM-31	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-32	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-33	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-34	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-35	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-36	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-37	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-38	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-39	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-40	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-41	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-42	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-43	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-44	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-45	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo

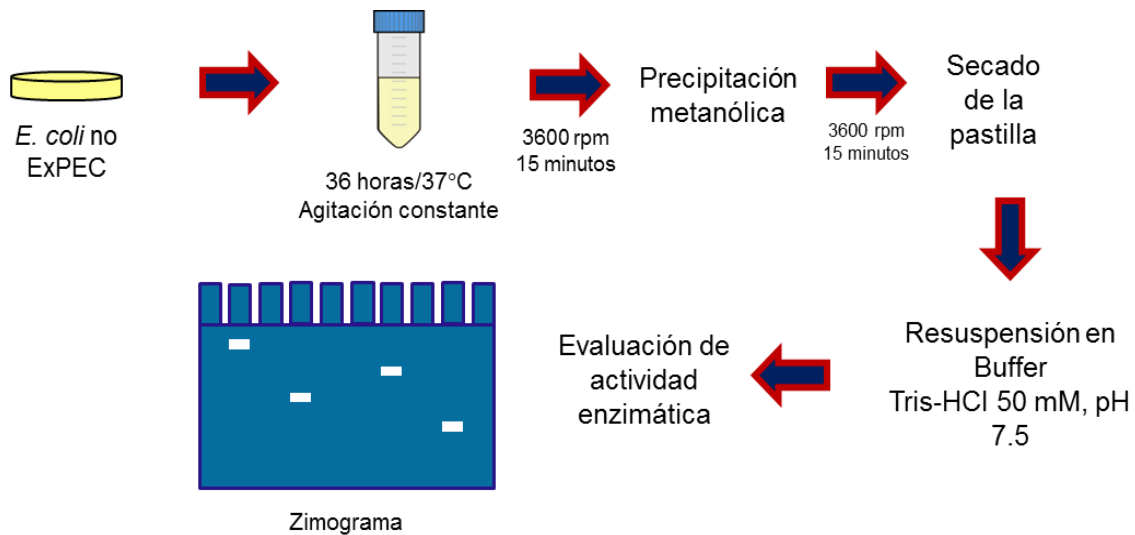
Cepa	Característica / Origen	Referencia
<i>E. coli</i> ETM-46	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-47	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-48	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-49	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-50	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-51	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-52	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-53	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-54	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-55	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-56	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-57	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-58	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-59	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo
<i>E. coli</i> ETM-60	Aislado de Muestra Intestinal	El presente trabajo

### **Concentración de proteínas extracelulares y precipitación metanólica:**

Las proteínas extracelulares de *E.coli* fueron concentradas a partir de 10 mL de cultivo con 36 horas de crecimiento celular en medio LB a 37°C, (Nájera Hernández, 2012), libre de células por centrifugación a 3600 rpm, el sobrenadante se mezcló con metanol frío (-20°C) en una proporción 1:2 y se dejó precipitar por una noche a 4°C, nuevamente se centrifugó a 3600 rpm, se retiró el sobrenadante y se dejó secar la pastilla para posteriormente ser resuspendida en 100 µL de buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5, el concentrado proteico se congeló a -20°C hasta la realización del Zimograma.

### **Evaluación de la actividad proteolítica a través de Zimogramas:**

La capacidad de degradación de las proteínas del sobrenadante se llevó a cabo a través de Zimogramas utilizando IgG como sustrato. Para ello se utilizó un SDS-PAGE al 10% copolimerizado con 50 µL de IgG (2 µg/µL), se cargaron 10 µL de muestra en cada carril y se realizó el corrimiento electroforético a 90 V. Posteriormente, el gel se trató con Tritón-X100 por 2 horas, seguido por una incubación con buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5 a 37°C durante 24 horas. Finalmente el Zimograma fue teñido con azul de Coomassie R-250 por 2 horas y se evaluó la capacidad proteolítica de las muestras estudiadas, las áreas de digestión enzimática fueron distinguidas como halos, bandas o barridos blancos contra un fondo azul, en cada uno de los carriles.



**Figura 4. Esquema de trabajo para la concentración de proteínas extracelulares de cepas no ExPEC y su evaluación enzimática a través de Zimogramas.**

### **Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) para la amplificación de los genes *pic*, *pet* y *tsh*:**

Para la búsqueda de los genes *pic*, *pet* y *tsh* se extrajo DNA total de las cepas no ExPEC de *E.coli*, los ácidos nucleicos fueron analizados en gel de agarosa al 0.8% para verificar la calidad y concentración del mismo, posteriormente las muestras se diluyeron en proporción 1:20 para realizar las reacciones de amplificación. La PCR se realizó empleando oligonucleótidos específicos que permitieron amplificar un fragmento de cada gen, las condiciones de termociclado, así como los tamaños esperados para cada uno de los genes se resume en las tablas 5, 6 y 7. Los amplicones obtenidos fueron sometidos a electroforesis en gel de agarosa al 0.8%, el cual se tiñó con bromuro de etidio 1µg/mL durante 10 minutos para su posterior visualización en un transiluminador de luz UV.

**Tabla 6. Condiciones de termociclado para la amplificación del gen *tsh*.**

Gen	Primer	Desnaturalización inicial		Ciclos		Extensión final	Conservación final
<i>tsh</i> 1,157 pb	tsh4F1D tsh4R1D	94°C / 5 min	32 ciclos	Desnaturalización	94°C/30''	72°C / 8'	4°C
				Alineamiento	55°C/30''		
				Extensión	72°C/1.20'		

**Tabla 7. Condiciones de termociclado para la amplificación del gen *pic*.**

Gen	Primer	Desnaturalización inicial		Ciclos		Extensión final	Conservación final
<i>pic</i> 1,277 pb	pic27F1D pic27R1D	94°C / 5 min	32 ciclos	Desnaturalización	94°C/30''	72°C / 8'	4°C
				Alineamiento	55°C/30''		
				Extensión	72°C/1.30'		

**Tabla 8. Condiciones de termociclado para la amplificación del gen *pet*.**

Gen	Primer	Desnaturalización inicial		Ciclos		Extensión final	Conservación final
<i>pet</i> 1,338 pb	pet5F1D pet5R1D	94°C / 5 min	32 ciclos	Desnaturalización	94°C/30''	72°C / 8'	4°C
				Alineamiento	55°C/30''		
				Extensión	72°C/1.40'		

### **Identificación de secuencias por medio de secuenciación:**

Algunas de las cepas que resultaron positivas para la amplificación de los genes *pic*, *pet* y *tsh*, y que además mostraron resultados positivos para la actividad proteolítica, fueron concentrados siguiendo el protocolo del kit Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System de Promega. Los productos de PCR concentrados y purificados fueron secuenciados con la finalidad de corroborar la identidad de las secuencias amplificadas.

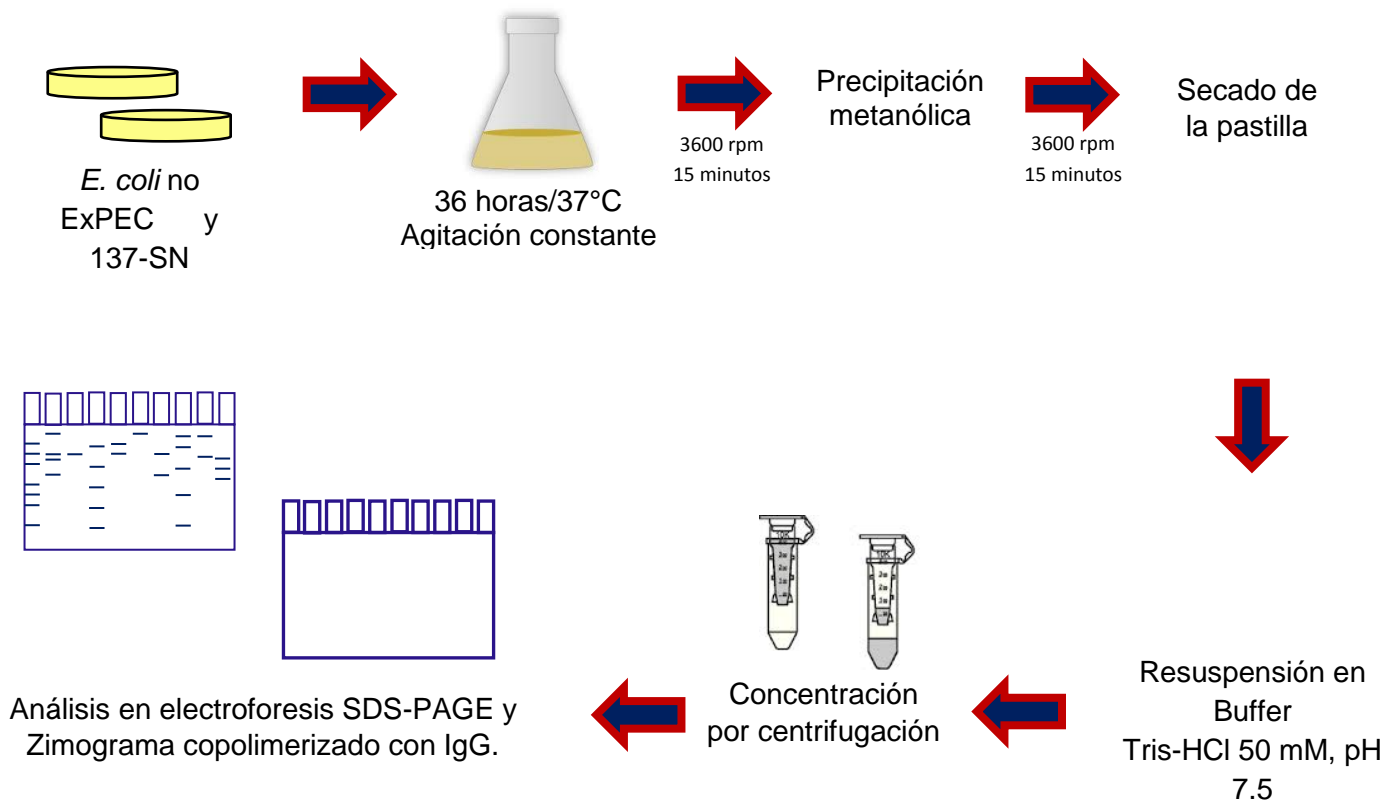
### **Concentración de proteasas; 137-SN y cepas no ExPEC:**

Se realizó un escrutinio de las cepas no ExPEC que mostraron capacidad de degradación proteolítica, así como aquellas que resultaron positivas para la amplificación de los genes *pic*, *pet* y *tsh*, seleccionando únicamente cuatro cepas no ExPEC (ETM 8, ETM 9, ETM 20 Y ETM 35) las cuales se siguieron analizando mediante electroforesis en gel SDS-PAGE. Para ello las proteasas de cada una de las cepas seleccionadas; incluida la cepa ExPEC 137-SN, fueron concentradas a partir de cultivos bacterianos (200 mL) de 36 horas en medio líquido LB, a 37°C y agitación constante. Los cultivos fueron centrifugados a 3600 rpm durante 15 minutos y se llevó a cabo la precipitación de proteínas del sobrenadante con dos volúmenes de metanol frío, durante 5 días a 4°C. Posteriormente se volvió a centrifugar el sobrenadante bajo las mismas condiciones y se dejó secar la pastilla para luego ser resuspendida en buffer Tris-HCl 50 mM, pH 7.5. Finalmente, las proteasas fueron concentradas por centrifugación en tubos Amicon Ultra de MILLIPORE de 50 kDa para las cepas 137-SN y ETM 35, y de 10 kDa para las cepas ETM 8, ETM 9 Y ETM 20, teniendo 15 mL como volumen inicial y 0.25 mL de volumen final. Las muestras concentradas fueron analizadas por electroforesis en SDS-PAGE y Zimograma copolimerizado con IgG.

## Electroforesis en SDS- PAGE para análisis de proteínas:

Las proteasas concentradas se analizaron en un gel SDS-PAGE al 10% tomando alícuotas de 10  $\mu$ L por muestra. El corrimiento electroforético se realizó a 90 V y el gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 durante 10 minutos para posteriormente ser estudiado.

En la figura 5, se ilustra el protocolo realizado para la concentración de proteínas del sobrenadante y su análisis en electroforesis SDS-PAGE y Zimograma.



**Figura 5. Esquema de trabajo para la concentración de proteasas de *E. coli* y su análisis en electroforesis SDS-PAGE y Zimograma.**

## **Análisis del complejo de la proteasa S6 like de *E. coli* mediante Espectrometría de Masas (EM):**

Las proteínas del sobrenadante de la cepa 137-SN fueron concentradas siguiendo el mismo protocolo. La muestra concentrada se analizó por electroforesis en SDS-PAGE, colocándose 10  $\mu$ L de la misma muestra en cada carril del gel. El corrimiento electroforético se realizó a 90 V y el gel fue teñido con azul de Coomassie R-250 durante 10 minutos. Las bandas fueron cortadas manualmente y se conservaron en ácido acético al 10% hasta su análisis. El procesamiento realizado a la muestra para analizarse por espectrometría de masas fue el que se describe a continuación:

Las bandas fueron reducidas con DTT 10 mM, alquiladas con Iodoacetamida 100 mM y desteñidas con ACN:  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50mM (50:50 v/v). La digestión proteica se llevó a cabo durante 18 horas a 37°C con tripsina grado masas (Promega V528A). Se extrajeron los péptidos obtenidos de la digestión (ACN:  $\text{H}_2\text{O}$ : ácido fórmico 50:45:5 v/v), se disminuyó el volumen de la muestra en un concentrador (Eppendorf 5301) y se desaló la muestra utilizando columna C18 (ZipTipC18). La muestra se colocó por sextuplicado en la placa utilizando como matriz  $\alpha$ -ciano, y se analizaron en un MALDI TOF/TOF 4800. Con los espectros MS/MS obtenidos se realizó una búsqueda con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66%. Utilizando las señales peptídicas obtenidas de la espectrometría de masas se realizó una búsqueda en el genoma secuenciado de la cepa 137-SN con el programa RAST, de la misma manera haciendo uso de los números de acceso y secuencias proporcionadas se realizó el análisis de la información utilizando la base de datos del NCBI.

## 8. ESTRATEGIA GENERAL DE TRABAJO

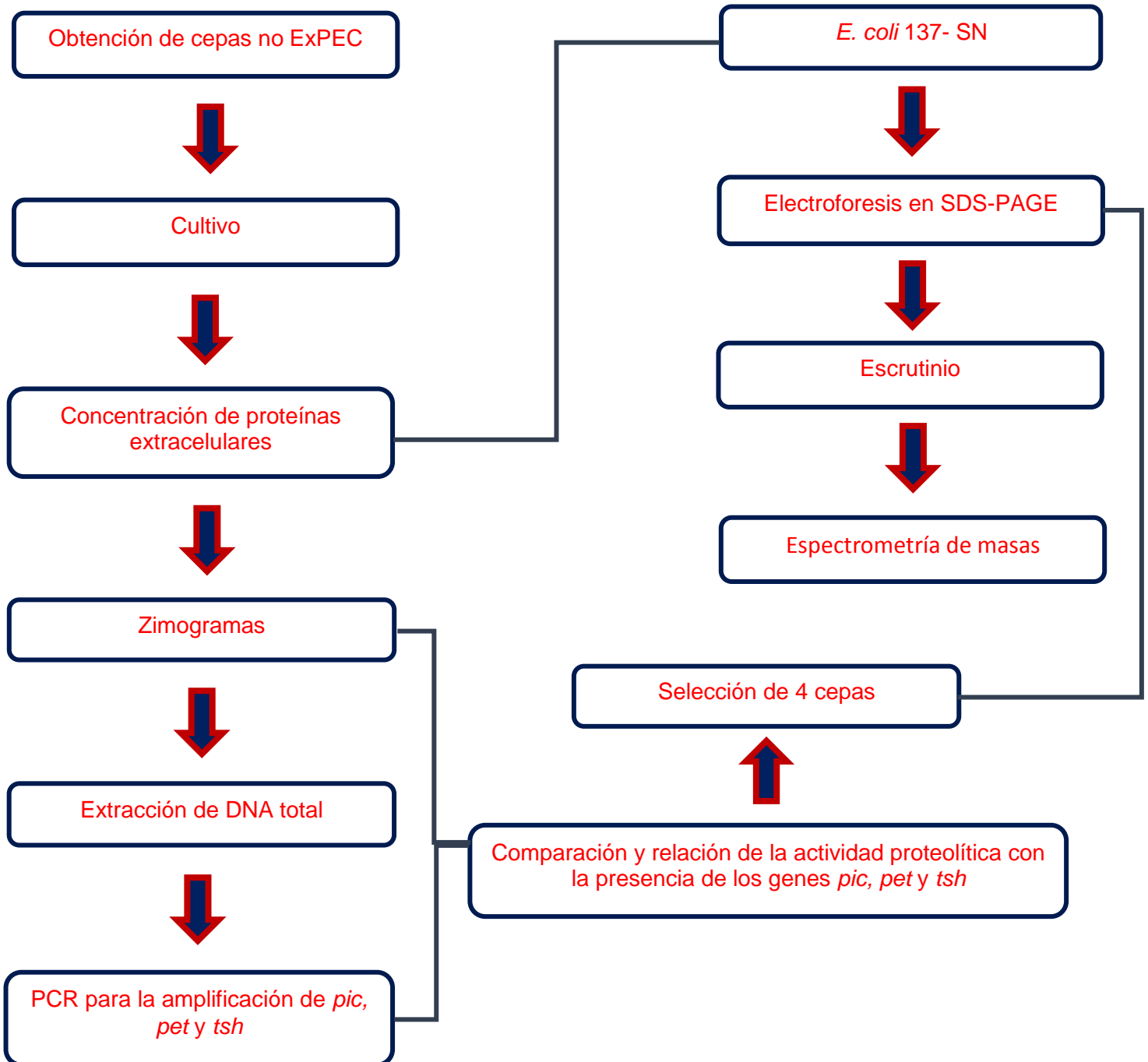


Figura 6. Estrategia general planteada para la caracterización parcial del complejo de la proteasa S6 like de *E. coli* y su comparación con dos grupos de *E. coli* no ExPEC.

## 9. RESULTADOS

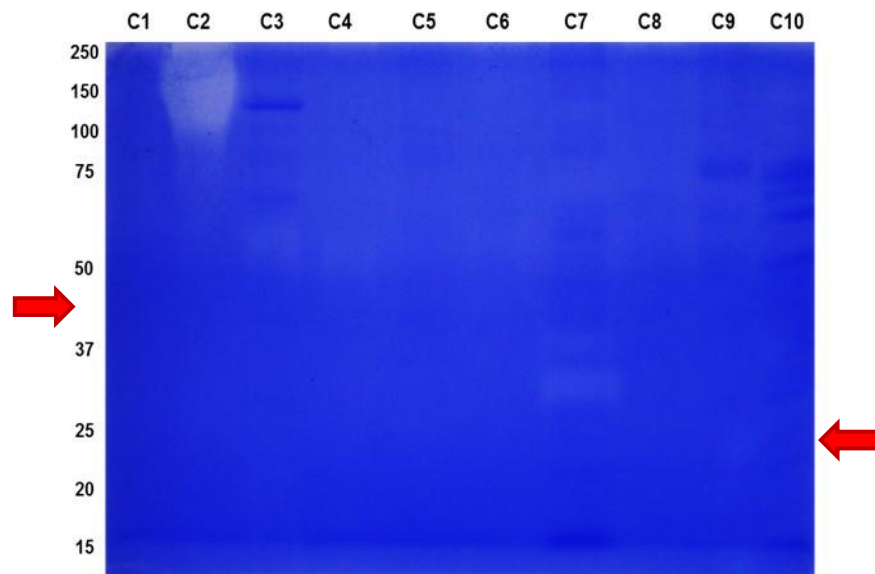
Para investigar la relevancia epidemiológica de la proteasa S6, de 160 kDa, secretada y liberada al medio, en *Escherichia coli* patógena extraintestinal (ExPEC) se propuso comparar la distribución de producción de la actividad proteolítica en este grupo respecto a dos grupos de *E. coli* no ExPEC. Se estudiaron los extractos de 30 cepas de *E. coli* obtenidas a partir de alimentos crudos y 30 de muestras intestinales, mediante la prueba en Zimograma copolimerizado con IgG y reacción en cadena de la polimerasa (PCR), para la amplificación de los genes *pic*, *pet* y *tsh*, con DNA de las cepas de los tres grupos de estudio, con la hipótesis de correlacionar la presencia de actividad enzimática tipo S6 previamente evidenciada con la presencia de un potencial autotransportador del tipo Pic, Pet o Tsh.

### 9.1 Evaluación de la actividad proteolítica de las cepas no ExPEC a través de Zimogramas:

El antecedente de Nájera Hernández *et al.* 2012, mostró una población de cepas de ExPEC con 60% de positividad a la actividad proteolítica S6 sobre el sustrato IgG. Escobar en 2014, encontró 60% de cepas ExPEC provenientes de distintos orígenes extraintestinales, positivas a la presencia de actividad proteolítica y sólo 11% con esta probable actividad en cepas no ExPEC. En el trabajo de Escobar se observó diversidad en los pesos moleculares de las proteasas que degradan IgG en las cepas no ExPEC; de alto, mediano y bajo peso molecular. Debido a que la degradación proteolítica y el tamaño molecular no coincidieron en ambos estudios, se realizó el presente estudio de detección de actividad proteolítica de cepas no ExPEC sobre IgG en zimogramas, en un grupo estadísticamente significativo para conocer la distribución de esta clase de proteasas S6. Con las cepas de origen alimentario se observó que, sólo 4 de las 30 cepas (13%) degradaron IgG. En las cepas de origen intestinal, se observó que sólo 5 de las 30 (17%) degradaron IgG.

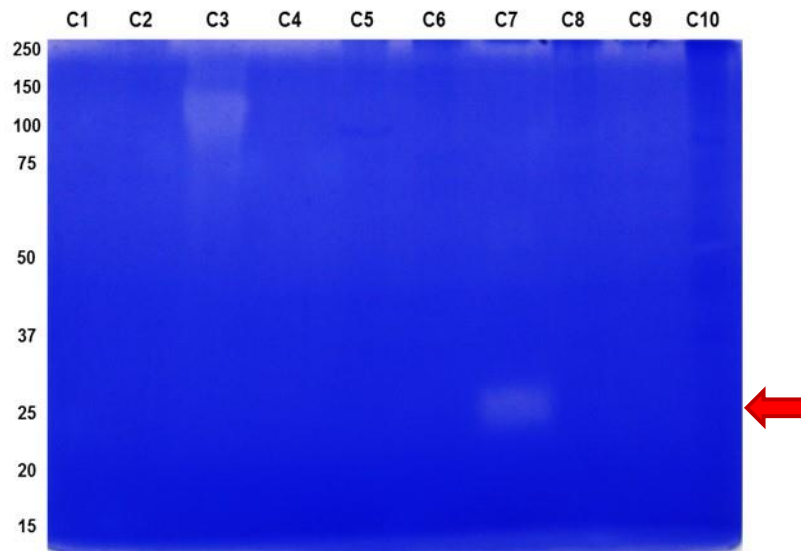
En las siguientes imágenes, se muestran algunos de los geles con cepas positivas a la prueba de Zimograma con IgG, revelado como zonas blancas de hidrólisis enzimática en forma de bandas en un fondo azul, las cuales se observan con pesos moleculares diversos y con intensidad tenue o intensa en función de la cantidad de la actividad en los extractos.

Como se puede apreciar en la figura 7, en C3 y C4 que corresponden a las muestras ETM 16 y ETM 13, se observan zonas de digestión enzimática tenues en forma de bandas difusas y con pesos moleculares alrededor de 60 kDa. La muestra ETM 9 situada en el C7, presenta una actividad proteolítica más fuerte en forma de banda bien definida, pero con un peso molecular más bajo (30 kDa aproximadamente).



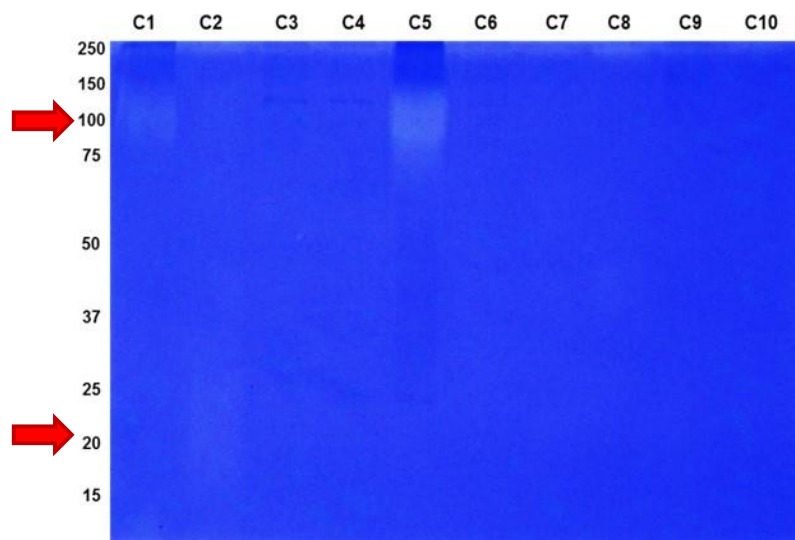
**Figura 7. Evaluación de la actividad enzimática en cepas de *E. coli* aisladas de alimentos.** Zimograma. SDS-PAGE al 10 %, co-polimerizado con IgG al 0.02%. C1: control negativo (*E. coli* DH5-alpha), C2: control positivo (137-SN), C3: ETM 16, C4: ETM 13, C5: ETM 11, C6: ETM 10, C7: ETM 9, C8: ETM 2, C9: ETM 5, C10: ETM 1.

Las muestra ETM 8 ubicada en C7 de la figura 8, presenta actividad proteolítica fuerte en forma de banda definida, con un peso molecular de aproximadamente 25 kDa, la cepa control de actividad proteolítica se encuentra en C3, el resto del gel se observa negativo.

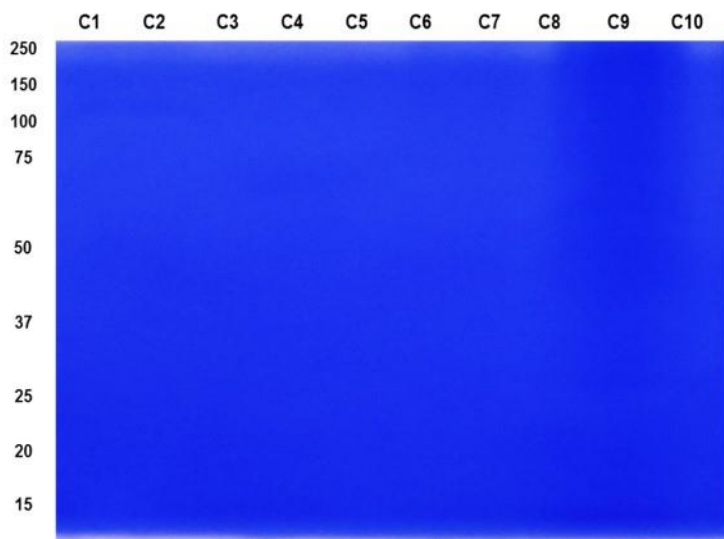


**Figura 8. Evaluación de la actividad enzimática en cepas de *E. coli* aisladas de alimentos.** Zimograma. SDS-PAGE al 10 %, co-polimerizado con IgG al 0.02%. C1: control negativo (*E. coli* DH5-alpha), C2: ETM 4, C3: control positivo (137-SN), C4: ETM 3, C5: ETM 6, C6: ETM 7, C7: ETM 8, C8: ETM 12, C9: ETM 14, C10: ETM 15.

En la figura 9, se observa una degradación difusa en C1 de la cepa ETM 31, como una banda de peso molecular entre 100-150 kDa, en C2 se observa una banda de peso molecular entre 20 – 25 kDa para la cepa ETM 32. En C5 la cepa ETM 35 tiene una digestión enzimática intensa que forma una banda de peso molecular similar al de la cepa ETM 31 (> 100 kDa). Por último la figura 10, representa un ejemplo de actividades enzimáticas negativas, con un aspecto de Zimograma teñido homogéneamente sin zonas claras en ninguno de los carriles cargados con proteínas de sobrenadante de *E. coli*.



**Figura 9. Evaluación de la actividad enzimática en cepas de *E. coli* aisladas de muestras intestinales.** Zimograma. SDS-PAGE al 10 %, co-polimerizado con IgG al 0.02%. C1: ETM 31, C2: ETM 32, C3: ETM 33, C4: ETM 34, C5: ETM 35, C6: ETM 36, C7: ETM 37, C8: ETM 38, C9: ETM 39, C10: ETM 40.



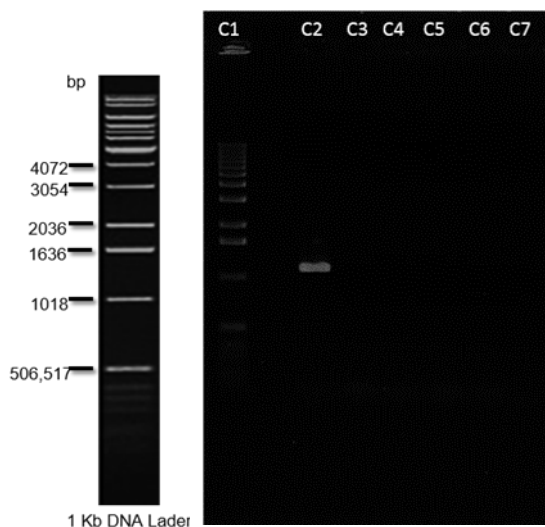
**Figura 10. Evaluación de la actividad enzimática en cepas de *E. coli* aisladas de muestras intestinales.** Zimograma. SDS-PAGE al 10 %, co-polimerizado con IgG al 0.02%. C1: ETM 51, C2: ETM 52, C3: ETM 53, C4: ETM 54, C5: ETM 55, C6: ETM 56, C7: ETM 57, C8: ETM 58, C9: ETM 59, C10: ETM 60. El Zimograma se muestra completamente negativo para la degradación del sustrato IgG.

## 9.2. PCR para la amplificación de los genes *pic*, *pet* y *tsh*:

Escobar Muciño en 2014, sugirió que la proteasa putativa de la cepa 137-SN de *E. coli* era tipo desconocido en la clase extraintestinal, porque preliminarmente fue negativa la amplificación de secuencias de genes *pic*, *pet* y *tsh*. En el presente estudio, se propuso investigar en forma amplia si en el genoma de las 60 cepas de *E. coli* aisladas (Tabla 4) existían los genes *pic*, *pet* y *tsh* y si había correlación con la capacidad de producción de proteasas degradantes de IgG. Para el gen *tsh* se analizaron las 60 cepas, mientras que para *pic* y *pet* se hizo una selección aleatoria de cepas positivas y negativas en la prueba del Zimograma con IgG como sustrato.

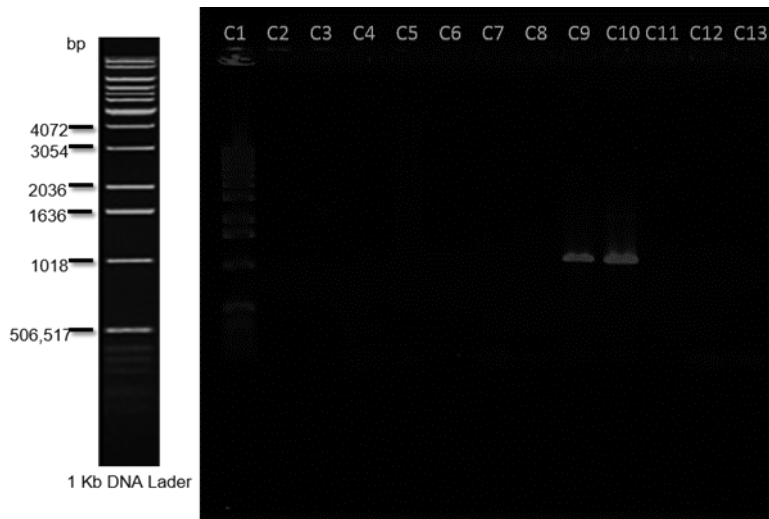
En las figuras 11, 12 y 13 se muestran algunos de los resultados obtenidos para la amplificación de *tsh* en los dos grupos de cepas de *E. coli* provenientes de alimentos crudos y de muestras clínicas intestinales. La presencia de una banda de 1059 pb, por arriba de la banda de 1018 pb del marcador, sugiere que el producto amplificado corresponde al gen *tsh* en estudio.

En la figura 11, se observa una banda intensa en el C2, que corresponde a la cepa control para la amplificación de *tsh*, mientras que el resto de las cepas analizadas en este gel fueron negativas.

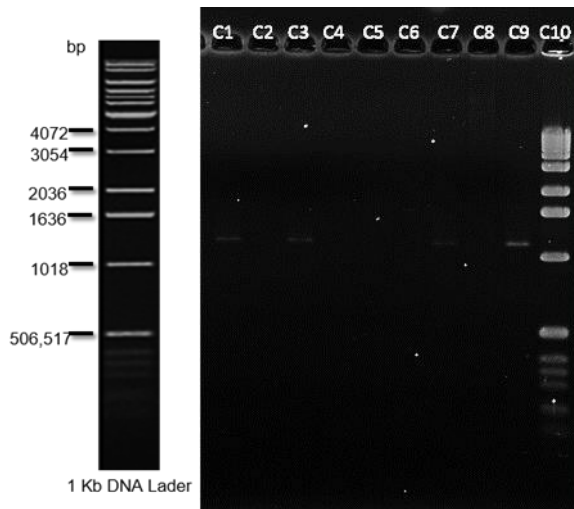


**Figura 11. Detección por PCR del gen *tsh* en cepas no ExPEC aisladas de alimentos.** C1: Marcador, C2: Control positivo (ETM 16), C3: ETM 1, C4: ETM 2, C5: ETM 3, C6: ETM 4, C7: ETM 5.

En la figura 12, las cepas ETM 16, ETM 17 fueron positivas para *tsh* (C9 y C10). La figura 13, muestra la prueba positiva para el grupo de muestras intestinales; con amplificados tenues y definidos en las cepas ETM 35, ETM 37, ETM 41 y ETM 43 (C1, C3, C7 y C9).

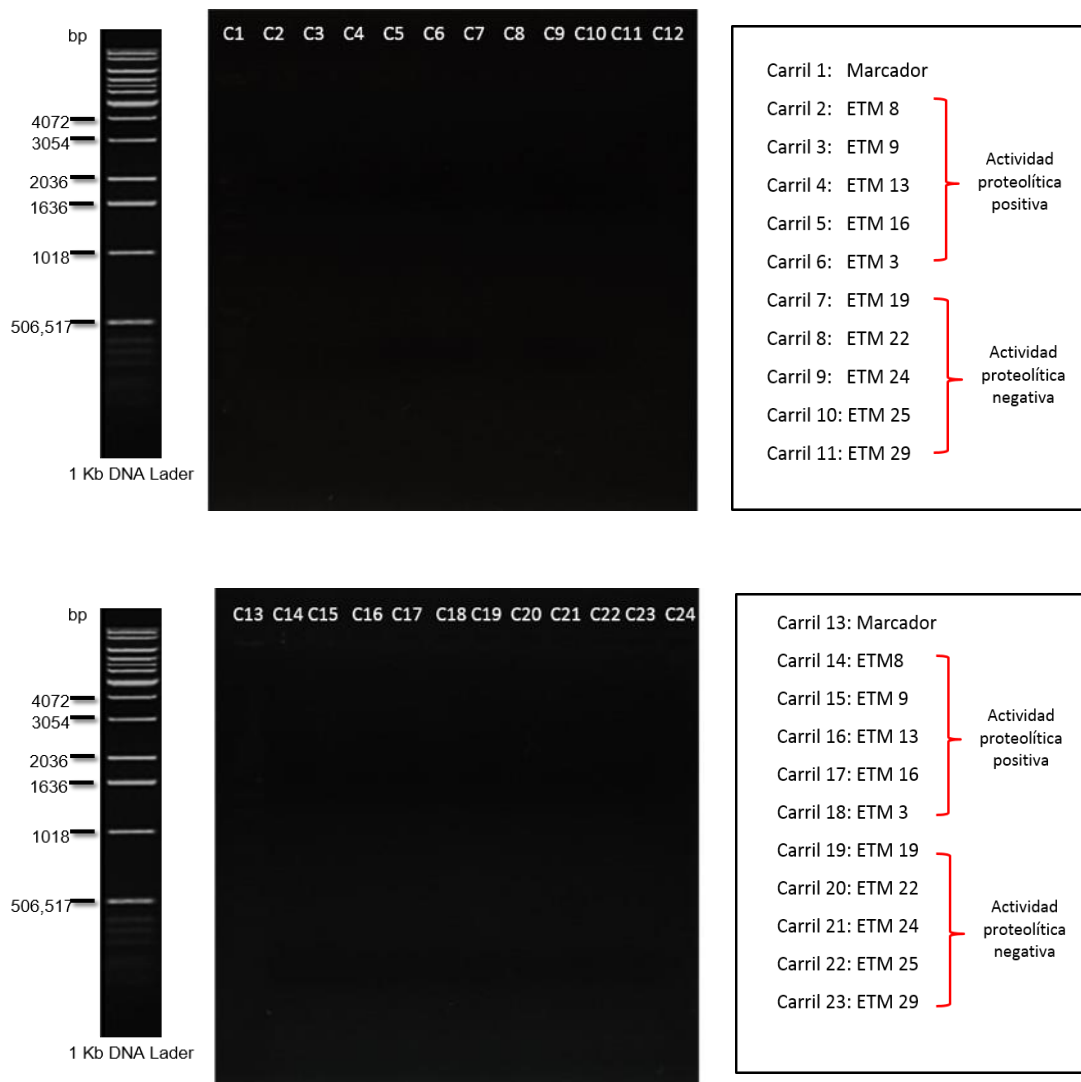


**Figura 12. Detección por PCR del gen *tsh* en cepas en cepas no ExPEC aisladas de alimentos. C1: Marcador, C2:-, C3:-, C4: ETM 11, C5: ETM 12, C6: ETM 13, C7: ETM 14, C8: ETM 15, C9: ETM 16, C10: ETM 17, C11: ETM 18, C12: ETM 19, C13: ETM 20.**



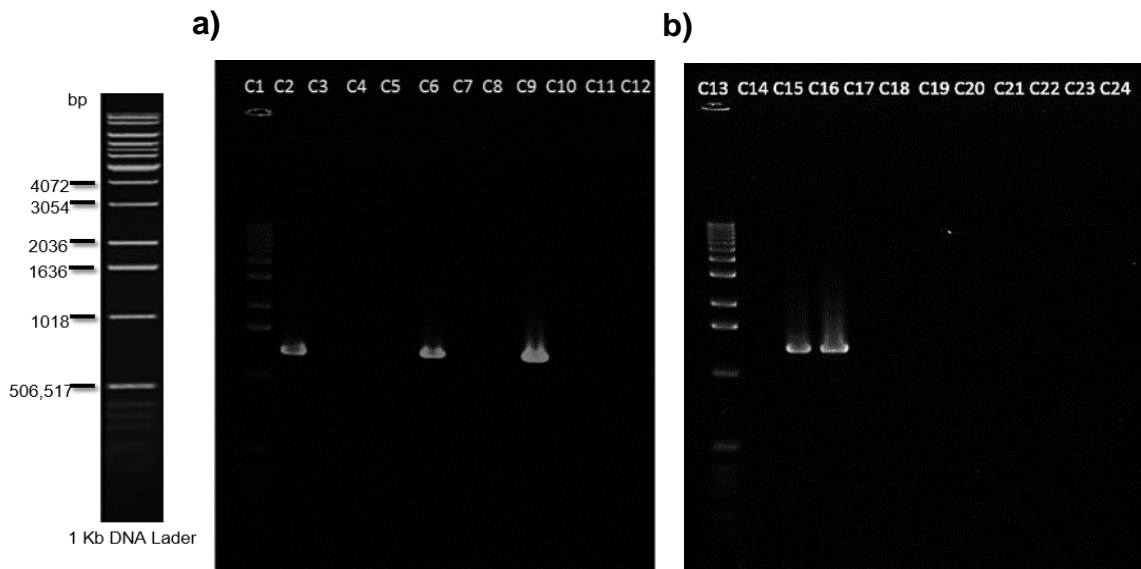
**Figura 13. Detección por PCR del gen *tsh* en cepas en cepas no ExPEC aisladas de muestras intestinales. C1: ETM 35, C2: ETM 36, C3: ETM 37, C4: ETM 38, C5: ETM 39, C6: ETM 40, C7: ETM 41, C8: 42, C9: ETM 43, C10: Marcador.**

Para el análisis molecular de los genes *pic* y *pet* en las cepas de *E. coli* de origen alimentario, se seleccionaron las 5 cepas con actividad proteolítica en el Zimograma con IgG, y el mismo número de cepas negativas elegidas al azar. La síntesis por PCR de amplicones de 1300 pb sugeriría un resultado positivo para la identificación de los genes. Sin embargo, con las cepas de origen alimentario, no se obtuvieron amplicones de ambos genes, figura 14.



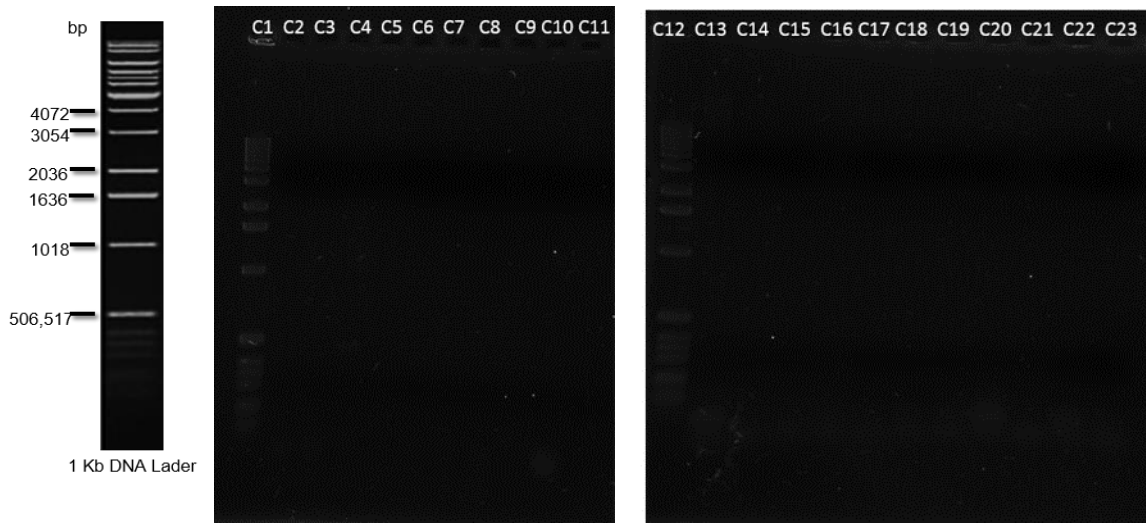
**Figura 14. Reacción en Cadena de la Polimerasa con DNA de cepas no ExPEC aisladas de alimentos positivas y negativas en Zimograma copolimerizado con IgG. a) Prueba de PCR para la amplificación de *pet*. b) Prueba de PCR para la amplificación de *pic*.**

Para el análisis molecular del gen *pet* en el grupo de *E. coli* intestinales se seleccionaron 20 cepas, entre éstas se incluyeron 3 positivas a las pruebas de Zimograma con IgG y amplificación del gen *tsh*, 2 positivas a Zimograma con IgG y 10 positivas a la amplificación del gen *tsh*. También se incluyeron al azar 5 cepas negativas en ambas pruebas. El tamaño esperado para el amplificado del gen *pet* era de 1338 pb, en la figura 15, se muestran 5 resultados positivos para este gen: cepas ETM 31, ETM 35, ETM 38 (figura 15a, C2, C6 y C9) y ETM42 y ETM43, (figura 15b, C15 y C16). Las restantes 15 cepas fueron negativas en la identificación del gen *pet* por PCR.



**Figura 15. Detección por PCR del gen *pet* en cepas no ExPEC aisladas de muestras intestinales.** C1: Marcador, C2: ETM 31, C3: ETM 32, C4: ETM 33, C5: ETM 34, C6: ETM 35, C7: ETM 36, C8: ETM 37, C9: ETM 38, C10: ETM 39, C11: ETM 40, C12: ETM 41, C13: Marcador, C14: Control negativo, C15: ETM 42, C16: ETM 53, C17: ETM 46, C18: ETM 47, C19: ETM 51, C20: ETM 52, C21: ETM 53, C22: ETM 54, C23: ETM 59, C24: ETM 60.

La búsqueda del gen *pic*, se hizo en 24 cepas intestinales; 5 positivas y 19 negativas en prueba de Zimograma. En este grupo de aislados, tampoco se encontró el gen que codifica para la proteasa Pic, en la figura 16, se muestra la ausencia de productos de amplificación.



**Figura 16. Detección por PCR del gen *pic* en cepas no ExPEC aisladas de muestras intestinales.** C1: Marcador, C2: ETM 31, C3: ETM 32, C4: ETM 33, C5: ETM 34, C6: ETM 35, C7: ETM 36, C8: 37, C9: ETM 38, C10: ETM 39, C11: ETM 40, C12: Marcador, C13: ETM 42, C14: ETM 43, C15: ETM 44, C16: ETM 45, C17: ETM 46, C18: ETM 47, C19: ETM 48, C20: ETM 49, C21: ETM 51, C22: ETM 52, C23: ETM 54.







En las tablas 9 y 10, se resumen los resultados obtenidos para las pruebas de amplificación de segmentos de los genes *tsh*, *pic* y *pet* en los dos grupos de aislados de *E. coli*. Las casillas sombreadas señalan que a la cepa se le realizó el estudio según el color asignado y las cruces indican que la cepa resultó positiva en el estudio. Las casillas sin sombrear (en colores claros) indican que las cepas no fueron analizadas.

**Tabla 9. Resumen de la actividad proteolítica y detección molecular de *tsh*, *pic* y *pet* en cepas aisladas de alimentos.**

Cepa	Proteasa	<i>tsh</i>	<i>pic</i>	<i>pet</i>
ETM 1	+			
ETM 2	+			
ETM 3	+		+	+
ETM 4	+			
ETM 5	+			
ETM 6	+	+		
ETM 7	+			
ETM 8	+		+	+
ETM 9	+		+	+
ETM 10	+			
ETM 11	+			
ETM 12	+			
ETM 13	+		+	+
ETM 14	+			
ETM 15	+			

Cepa	Proteasa	<i>tsh</i>	<i>pic</i>	<i>pet</i>
ETM 16	+	+	+	+
ETM 17	+	+		
ETM 18	+			
ETM 19	+		+	+
ETM 20	+			
ETM 21	+			
ETM 22	+		+	+
ETM 23	+	+		
ETM 24	+		+	+
ETM 25	+		+	+
ETM 26	+			
ETM 27	+			
ETM 28	+			
ETM 29	+		+	+
ETM 30	+			

**Cepas de Alimentos:**

-  Zimograma
-  Detección molecular de *tsh*
-  Detección molecular de *pic*
-  Detección molecular de *pet*
-  Actividad proteolítica
-  Gen amplificado

**Tabla 10. Resumen de la Actividad proteolítica y detección molecular de *tsh*, *pic* y *pet* en cepas aisladas de muestras intestinales.**

Cepa	Proteasa	Tsh	Pic	Pet
ETM 31	+	+		+
ETM 32	+			
ETM 33		+		
ETM 34				
ETM 35	+	+		+
ETM 36				
ETM 37		+		
ETM 38				+
ETM 39				
ETM 40				
ETM 41		+		
ETM 42	+			+
ETM 43		+		
ETM 44				
ETM 45		+		

Cepa	Proteasa	Tsh	Pic	Pet
ETM 46		+		
ETM 47	+	+		
ETM 48		+		
ETM 49		+		
ETM 50		+		
ETM 51		+		
ETM 52				
ETM 53				+
ETM 54				
ETM 55				
ETM 56				
ETM 57				
ETM 58				
ETM 59				
ETM 60				

**Cepas Intestinales:**

-  Zimograma
-  Detección molecular de *tsh*
-  Detección molecular de *pic*
-  Detección molecular de *pet*
-  Actividad proteolítica
-  Gen amplificado

### 9.3. Identificación de secuencias de nucleótidos de los amplificadas *tsh* y *pet*:

Los amplificadas positivos del gen *pet* de las cepas: intestinales; ETM 31, ETM 35, ETM 38, ETM 42 y ETM 53 y *tsh* de la cepa ETM 16 de origen alimentario, que correspondieron a una mayoría de cepas con actividad proteolítica en Zimograma, fueron analizadas mediante secuenciación con la finalidad de conocer la identidad de las secuencias amplificadas. A las secuencias obtenidas se les realizó un análisis de búsqueda de identidad por medio de BLAST, blastn y blastx, con secuencias depositadas en la base de datos del GenBank. La información producida por la plataforma indicó que, la cepa ETM 16 posee 99 % de identidad con el gen de la hemaglutinina sensible a temperatura “Tsh” de *Escherichia coli* (NG\_035300.1). Con las secuencias de las cepas intestinales se esperaba obtener identidad con el gen de la Toxina Autotransportadora “Pet”, sin embargo, las cinco secuencias analizadas tienen alta identidad (entre 95 y 97%) con el gen de la Toxina Autotransportadora “Sat”.

Los resultados arrojados por el programa blastn para las secuencias del gen *pet* se resumen en la tabla 11. En las figuras 17 y 18, se muestran los alineamientos realizados para los genes *tsh* y *pet* respectivamente. En cada una de las figuras se observa una alta identidad entre las secuencias analizadas.

**Tabla 11. Análisis en blastn del gen *pet*.**

<b>Cepa</b>	<b>Descripción</b>	<b>Cobertura</b>	<b>Identidad</b>	<b>No. Acceso</b>
ETM 31	<i>E. coli</i>	92%	97%	JX050263.1
ETM 35	secreted	83%	95%	JX050263.1
ETM 38	autotransporter	98%	97%	JX050263.1
ETM 42	toxin (sat)	98%	95%	JX050263.1
ETM 53	gene	95%	96%	JX050263.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand	
1945 bits(1053)	0.0	1085/1098(99%)	11/1098(1%)	Plus/Minus	
Query	13	CCACGATATACCCCATGAGACGGTATCCGGATTTACCTGCCGCTCATCAGTCAGTACCAC			72
Sbjct	5607	CCACGATAT-CCCCATGAGACGGTATCCGGATTTACCTGCCGCTCATCAGTCAGTACCAC			5549
Query	73	GGTCGGCCGGCCACTGGCAATATTAACACTGCTGAACGCCTGCACCTGTCTTTATTGTC			132
Sbjct	5548	GGTCGGCCGGCCACTGGCAATATTAACACTGCTGAACGCCTGCACCTGTCTTTATTGTC			5489
Query	133	CGCCTGCTGGTTCAGTACAACCTTTCCGTCCCCGACCTTCAGGCCACCTTCATTAATACC			192
Sbjct	5488	CGCCTGCTGGTTCAGTACAACCTTTCCGTCCCCGACCTTCAGGCCACCTTCATTAATACC			5429
Query	193	TGTACCCTGTACCCTCAGCGTACCTTCACCAATTTTATGCAGGTTATCGCCCTTAACACC			252
Sbjct	5428	TGTACCCTGTACCCTCAGCGTACCTTCACCAATTTTATGCAGGTTATCGCCCTTAACACC			5369
Query	253	ATTAACCTGCCAGTTTACGGACACCCCGTTGTCCACAACAATACCGGCACCGGTCCAGGT			312
Sbjct	5368	ATTAACCTGCCAGTTTACGGACACCCCGTTGTCCACAACAATACCGGCACCGGTCCAGGT			5309
Query	313	ACTTCCGTTAGAGGTTGTTACTGTGTAATTATCACGGAACGTACAGGAACCCGCCCCCTG			372
Sbjct	5308	ACTTCCGTTAGAGGTTGTTACTGTGTAATTATCACGGAACGTACAGGAACCCGCCCCCTG			5249
Query	373	AGAAACCGAATCCTTAAGGTTAATCTGACCATTCTGCCCTGAAATATCAGGTTCTTACC			432
Sbjct	5248	AGAAACCGAATCCTTAAGGTTAATCTGACCATTCTGCCCTGAAATATCAGGTTCTTACC			5189
Query	433	AGCATTACAGGTCATTTCCCTGCTGCCCGTGCATGGCATATGTGGTGGTTCCTGTGTACG			492
Sbjct	5188	AGCATTACAGGTCATTTCCCTGCTGCCCGTGCATGGCATATGTGGTGGTTCCTGTGTACG			5129
Query	613	AACAGCCAGTTATTTCCCTGCCCCCGCGCCATTCCCGCAGTAAGAACCACCGACCAG			672
Sbjct	5008	AACAGCCAGTTATTTCCCTGCCCCCGCGCCATTCCCGCAGTAAGAACCACCGACCAG			4949
Query	673	CACCCATTTATTCTGAACAGTATCAAAGCAAATAAAGGCGAACCGCTGTCACCGGCCCTC			732
Sbjct	4948	CACCCATTTATTCTGAACAGTATCAAAGCAAATAAAGGCGAACCGCTGTCACCGGCCCTC			4889
Query	733	GCCATAAATGGGCATTGCACCATTAAGTTTGTAAATCAAAAACCAGACCTGAACTGGTGCT			792
Sbjct	4888	GCCATAAATGGGCATTGCACCATTAAGTTTGTAAATCAAAAACCAGACCTGAACTGGTGCT			4829
Query	793	AATCATTTCTCCATTCTGATAGGATGACAGGCTACCGACAGTCCCGCCGGTCAGCCAGGA			852
Sbjct	4828	AATCATTTCTCCATTCTGATAGGATGACAGGCTACCGACAGTCCCGCCGGTCAGCCAGGA			4769
Query	853	ATATGCACCTCCATTTTGTGTCAGCTGTCCGTTACTGTCTTAATATACTGAGTACCAGA			912
Sbjct	4768	ATATGCACCTCCATTTTGTGTCAGCTGTCCGTTACTGTCTTAATATACTGAGTACCAGA			4709
Query	913	CCCCAGACGATaaaaaaaaCAGGATAGCGCTCCTTATCCAGATATGCGCCAGCCACTGCC			972
Sbjct	4708	CCCCAGACGATAAAAAA-CAGGATAGCGCTCCTTATCCAGATATGCGCCAGCCACTGCC			4650
Query	973	CCTGCGCCGTCACCGCAGTAGGGGCAACCTCTGTACCAGTTTACCCAGC-GGGGGGCAT			1031
Sbjct	4649	CCTGCGCCGTCACCGCAGTAGGGGCAACCTCTGTACCAGTTTATCCAGCCGGGGGCAT			4590
Query	1032	GAAA-T-CAGTGACGGCGCATTATTC--GTCCACGATATTGTA-C-GTTTTACCATCAC			1085
Sbjct	4589	GAAAATCCAGTGACGGCGCATTATTCGGTCCACGATATTGTAACGGTTTTACCATCAC			4530
Query	1086	CAA-GCTA-CGTTTGTAT	1101		
Sbjct	4529	CAAAGCTAACGTTTGTAT	4512		

Figura 17. Alineamiento del gen *tsh* para la búsqueda de identidad por medio de BLAST.

```

ETM38pPet5F1D      -TGCATAC-TATTTT-CAGCCGGAGCACAGTACAGCTAACATTACACTTT 47
ETM42pPet5F1D      TAGCATACGTATTTT-CAGCCGGA-CACAATACA-CTAACTACACACTTT 48
ETM53pPet5F1D      AGGCATGCGTATTTT-CAGCCGGA---CACAAATAACTA-CACTTT 46
ETM31pPet5F1D      TAGCATAG-TATTTT-CAGCCCGG-ACAACAATAACTA-CACTTT 57
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      -TGCATACGTATTTT-CAGCCGGA----CACATAACTAACA-TACACACT 43
      . *: . ***** ***** * . * * *****: .** : *

ETM38pPet5F1D      AAAAAACGGAGATAAAATCTCTTTCCATAA TCTCTCAATTCCGGATTTTT 97
ETM42pPet5F1D      AAAAAACGGAGATAAAATCTCTTTCCATAA TCTCTCAATTCCGGATTTTT 98
ETM53pPet5F1D      AAAAAACGGAGATAAAATCTCTTTCCATAA TCTCTCAATTCCGGATTTTT 96
ETM31pPet5F1D      AAAAAACGGAGATAAAATCTCTTTCCATAA TCTCTCAATTCCGGATTTTT 107
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      TTA AAAACGGAGATAAAATCTCTTTCCATAA TCTCTCAATTCCGGATTTTT 93
      : : *****

ETM38pPet5F1D      CTGGTGCAGCAGCGAGTGGCGCAGCTACCGCAATAGGAGGTTCTTATAGT 147
ETM42pPet5F1D      CTGGTGCAGCAGCGAGTGGCGCAGCTACCGCAATAGGAGGTTCTTATAGT 148
ETM53pPet5F1D      CTGGTGCAGCAGCGAGTGGCGCAGCTACCGCAATAGGAGGTTCTTATAGT 146
ETM31pPet5F1D      CTGGTGCAGCAGCGAGTGGCGCAGCTACCGCAATAGGAGGTTCTTATAGT 157
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      CTGGTGCAGCAGCGAGTGGCGCAGCTACCGCAATAGGAGGTTCTTATAGT 143
      *****

ETM38pPet5F1D      GTTACTGTTGCACATAACAAAAAGAACCCCTCAGGCCGAGAACTCAGGT 197
ETM42pPet5F1D      GTTACTGTTGCACATAACAAAAAGAACCCCTCAGGCCGAGAACTCAGGT 198
ETM53pPet5F1D      GTTACTGTTGCACATAACAAAAAGAACCCCTCAGGCCGAGAACTCAGGT 196
ETM31pPet5F1D      GTTACTGTTGCACATAACAAAAAGAACCCCTCAGGCCGAGAACTCAGGT 207
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      GTTACTGTTGCACATAACAAAAAGAACCCCTCAGGCCGAGAACTCAGGT 193
      *****

ETM38pPet5F1D      TTACGCTCAGTCTTCTTACAAGGTTGTTGACAGAAGAAATCCAAATGATT 247
ETM42pPet5F1D      TTACGCTCAGTCTTCTTACAAGGTTGTTGACAGAAGAAATCCAAATGATT 248
ETM53pPet5F1D      TTACGCTCAGTCTTCTTACAAGGTTGTTGACAGAAGAAATCCAAATGATT 246
ETM31pPet5F1D      TTACGCTCAGTCTTCTTACAAGGTTGTTGACAGAAGAAATCCAAATGATT 257
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      TTACGCTCAGTCTTCTTACAAGGTTGTTGACAGAAGAAATCCAAATGATT 243
      *****

ETM38pPet5F1D      TTGAGATTGAGGTTAAATAAAATTTGTTGTGGAAACAGTAGGTGCCACC 297
ETM42pPet5F1D      TTGAGATTGAGGTTAAATAAAATTTGTTGTGGAAACAGTAGGTGCCACC 298
ETM53pPet5F1D      TTGAGATTGAGGTTAAATAAAATTTGTTGTGGAAACAGTAGGTGCCACC 296
ETM31pPet5F1D      TTGAGATTGAGGTTAAATAAAATTTGTTGTGGAAACAGTAGGTGCCACC 307
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      TTGAGATTGAGGTTAAATAAAATTTGTTGTGGAAACAGTAGGTGCCACC 293
      *****

ETM38pPet5F1D      CCGGCAGAGACCAACCCTACAACATATTCTGATGCATTAGAACGCTACGG 347
ETM42pPet5F1D      CCGGCAGAGACCAACCCTACAACATATTCTGATGCATTAGAACGCTACGG 348
ETM53pPet5F1D      CCGGCAGAGACCAACCCTACAACATATTCTGATGCATTAGAACGCTACGG 346
ETM31pPet5F1D      CCGGCAGAGACCAACCCTACAACATATTCTGATGCATTAGAACGCTACGG 357
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      CCGGCAGAGACCAACCCTACAACATATTCTGATGCATTAGAACGCTACGG 343
      *****

ETM38pPet5F1D      TATAGTCACTTCTGACGGTTCAAAAAAAATCATAGGTTTTCTGCTGGCT 397
ETM42pPet5F1D      TATAGTCACTTCTGACGGTTCAAAAAAAATCATAGGTTTTCTGCTGGCT 398
ETM53pPet5F1D      TATAGTCACTTCTGACGGTTCAAAAAAAATCATAGGTTTTCTGCTGGCT 396
ETM31pPet5F1D      TATAGTCACTTCTGACGGTTCAAAAAAAATCATAGGTTTTCTGCTGGCT 407
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      TATAGTCACTTCTGACGGTTCAAAAAAAATCATAGGTTTTCTGCTGGCT 393
      *****

```

**Figura 18.** Alineamiento múltiple del gen *pet* para la búsqueda de identidad por medio de CLUSTALW.

```

ETM38pPet5F1D      CTGGAGGAACATCATTATTAATGGTGAATCCAAAATCTCAACAAATTCA 447
ETM42pPet5F1D      CTGGAGGAACATCATTATTAATGGTGAATCCAAAATCTCAACAAATTCA 448
ETM53pPet5F1D      CTGGAGGAACATCATTATTAATGGTGAATCCAAAATCTCAACAAATTCA 446
ETM31pPet5F1D      CTGGAGGAACATCATTATTAATGGTGAATCCAAAATCTCAACAAATTCA 457
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      CTGGAGGAACATCATTATTAATGGTGAATCCAAAATCTCAACAAATTCA 443
*****

ETM38pPet5F1D      GCATATAGCCATGATCTGTTAAGTGCTAGTCTATTTGAGGTCACCCAAATG 497
ETM42pPet5F1D      GCATATAGCCATGATCTGTTAAGTGCTAGTCTATTTGAGGTCACCCAAATG 498
ETM53pPet5F1D      GCATATAGCCATGATCTGTTAAGTGCTAGTCTATTTGAGGTCACCCAAATG 496
ETM31pPet5F1D      GCATATAGCCATGATCTGTTAAGTGCTAGTCTATTTGAGGTCACCCAAATG 507
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      GCATATAGCCATGATCTGTTAAGTGCTAGTCTATTTGAGGTCACCCAAATG 493
*****

ETM38pPet5F1D      GGACTCATACGGCATGATGATTTATAAAAATGATAAAAACATTTTCGTAATC 547
ETM42pPet5F1D      GGACTCATACGGCATGATGATTTATAAAAATGATAAAAACATTTTCGTAATC 548
ETM53pPet5F1D      GGACTCATACGGCATGATGATTTATAAAAATGATAAAAACATTTTCGTAATC 546
ETM31pPet5F1D      GGACTCATACGGCATGATGATTTATAAAAATGATAAAAACATTTTCGTAATC 557
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      GGACTCATACGGCATGATGATTTATAAAAATGATAAAAACATTTTCGTAATC 543
*****

ETM38pPet5F1D      TTGAAATATTCGGAGACAGCGGCTCTGGAGCATACTTATATGATAACAAA 597
ETM42pPet5F1D      TTGAAATATTCGGAGACAGCGGCTCTGGAGCATACTTATATGATAACAAA 598
ETM53pPet5F1D      TTGAAATATTCGGAGACAGCGGCTCTGGAGCATACTTATATGATAACAAA 596
ETM31pPet5F1D      TTGAAATATTCGGAGACAGCGGCTCTGGAGCATACTTATATGATAACAAA 607
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      TTGAAATATTCGGAGACAGCGGCTCTGGAGCATACTTATATGATAACAAA 593
*****

ETM38pPet5F1D      CTAGAAAAATGGGTATTAGTCGGAACAACCCATGGTATTGCCAGCGTTAA 647
ETM42pPet5F1D      CTAGAAAAATGGGTATTAGTCGGAACAACCCATGGTATTGCCAGCGTTAA 648
ETM53pPet5F1D      CTAGAAAAATGGGTATTAGTCGGAACAACCCATGGTATTGCCAGCGTTAA 646
ETM31pPet5F1D      CTAGAAAAATGGGTATTAGTCGGAACAACCCATGGTATTGCCAGCGTTAA 657
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      CTAGAAAAATGGGTATTAGTCGGAACAACCCATGGTATTGCCAGCGTTAA 643
*****

ETM38pPet5F1D      TGGTGACCAACTGACATGGATAACAAAATACAATGATAAACTGGTTAGTA 697
ETM42pPet5F1D      TGGTGACCAACTGACATGGATAACAAAATACAATGATAAACTGGTTAGTG 698
ETM53pPet5F1D      TGGTGACCAACTGACATGGATAACAAAATACAATGATAAACTGGTTAGTG 696
ETM31pPet5F1D      TGGTGACCAACTGACATGGATAACAAAATACAATGATAAACTGGTTAGTG 707
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      TGGTGACCAACTGACATGGATAACAAAATACAATGATAAACTGGTTAGTG 693
*****

ETM38pPet5F1D      AGTAAAAAGATACCTATAGCCATAAAAATAAATCTGAATGGCAATAATGTA 747
ETM42pPet5F1D      AGTAAAAAGATACCTATAGTCATAAAAATAAATCTGAATGGCAATAATGTA 748
ETM53pPet5F1D      AGTAAAAAGATACCTATAGTCATAAAAATAAATCTGAATGGCAATAATGTA 746
ETM31pPet5F1D      AGTAAAAAGATACCTATAGTCATAAAAATAAATCTGAATGGCAATAATGTA 757
gi | 389595512 | gb | JX050263.1 |
ETM35pPet5F1D      AGTAAAAAGATACCTATAGTCATAAAAATAAATCTGAATGGCAATAATGTA 743
*****

```

Continuación de la Figura 18. Alineamiento múltiple del gen *pet* para la búsqueda de identidad por medio de CLUSTALW.



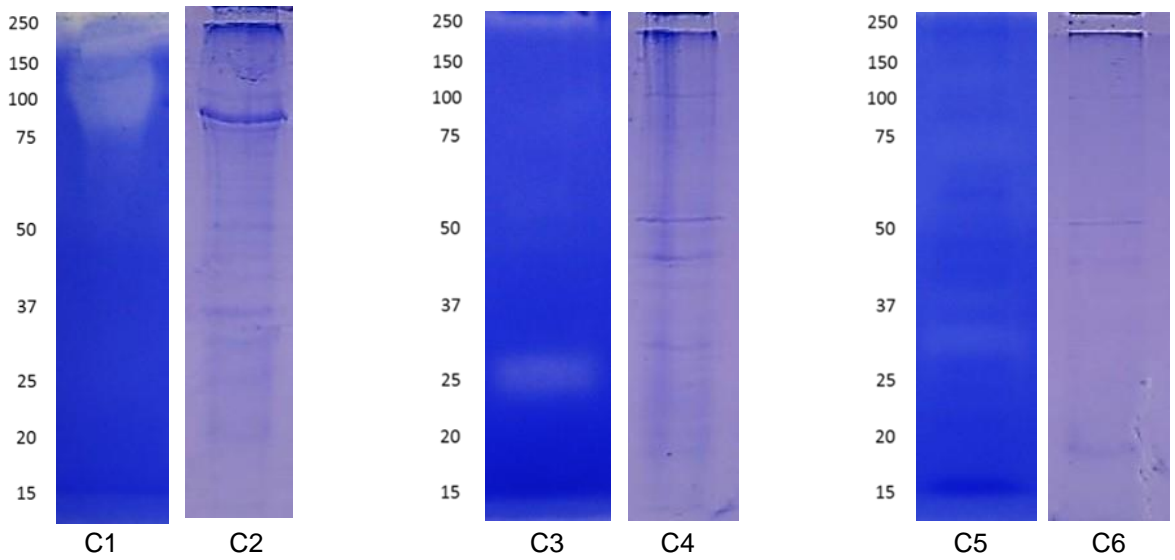
#### **9.4. Zimograma y electroforesis en SDS- PAGE para análisis de proteínas en ExPEC 137-SN y cepas no ExPEC:**

Tomando en cuenta los antecedentes del equipo de trabajo en el laboratorio de Microbiología Molecular y Celular y los resultados obtenidos en el presente trabajo, se realizó un escrutinio de las cepas no ExPEC con base en su actividad proteolítica, seleccionando cuatro de ellas: ETM 8 (actividad en 25 kDa), ETM 9 (25-37 kDa), ETM 20 (sin actividad) y ETM 35 (100 kDa). Las cepas no ExPEC junto con la cepa ExPEC 137-SN (160 kDa) se analizaron por electroforesis en SDS – PAGE y de manera simultánea por medio de un Zimograma-IgG, con el objetivo de comparar las zonas de actividad proteolítica con la presencia de bandas en gel SDS-PAGE. En la figura 19, la cepa 137–SN, obtenida de hemocultivo, muestra en Zimograma-IgG una zona de digestión enzimática fuerte en forma de zona clara aproximadamente en los 160 kDa, mientras que en el SDS-PAGE se observan diversas bandas de pesos moleculares variados, siendo las de mayor intensidad las de 75 y 160 kDa. La cepa ETM 8, de origen alimentario, muestra en Zimograma una banda clara e intensa alrededor de los 25 kDa, por su parte en el perfil electroforético se observan bandas de 30, 40, 50, 100 y 160 kDa, siendo esta última la de mayor intensidad. La cepa ETM 9, de origen alimentario, muestra en Zimograma una banda tenue alrededor de los 30 kDa, y en el gel SDS-PAGE únicamente se aprecian 5 bandas de pesos moleculares de 20, 40, 50, 100 y 160 kDa.

Cepa 137-SN

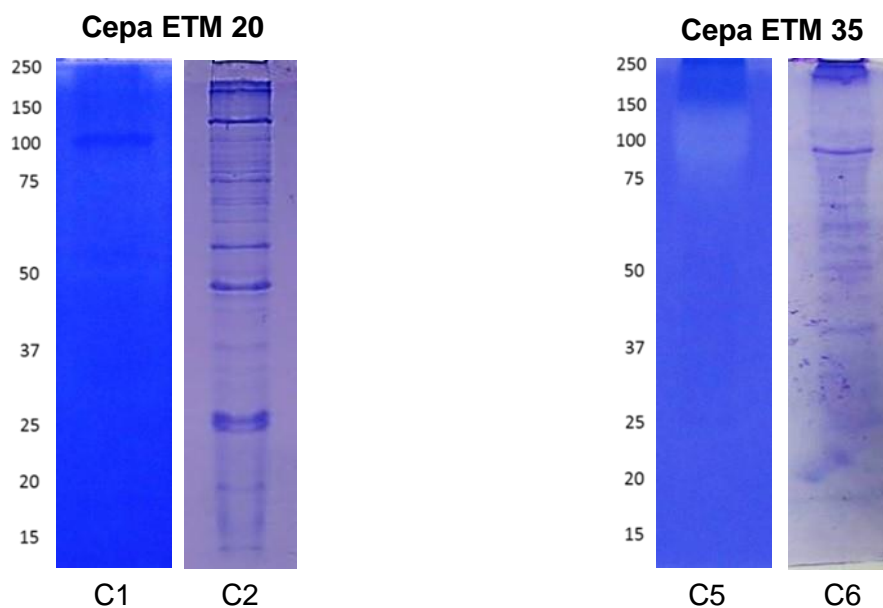
Cepa ETM 8

Cepa ETM 9



**Figura 19. Actividad proteolítica y contenido peptídico de las cepas 137-SN, ETM 8 y ETM 9. SDS-PAGE 10% y Zimograma.** SDS-PAGE al 10 %, copolimerizado con IgG al 0.02%. C1 y C2, cepa 137, obtenida de hemocultivo, C3 y C4, cepa ETM 8, de origen alimentario, C5 y C6, cepa ETM 9, de origen alimentario.

En la figura 20, la cepa ETM 20 de origen alimentario, en Zimograma no presenta zona de actividad proteolítica, pero si una intensa banda de proteína azul en el Zimograma alrededor de los 100 kDa, adicionalmente en el perfil electroforético (SDS-PAGE) se observan varias bandas, siendo las más intensas las de 25, 45, 60, 75, 140, 160 kDa. Por último, la cepa ETM 35, aislada de una muestra intestinal, presenta en Zimograma una banda intensa en forma de banda de 140 kDa, mientras que su perfil de proteínas, presenta bandas de diversos pesos moleculares, donde las más intensas se observan alrededor de los 40, 50, 60, 70, 100 y 200 kDa.

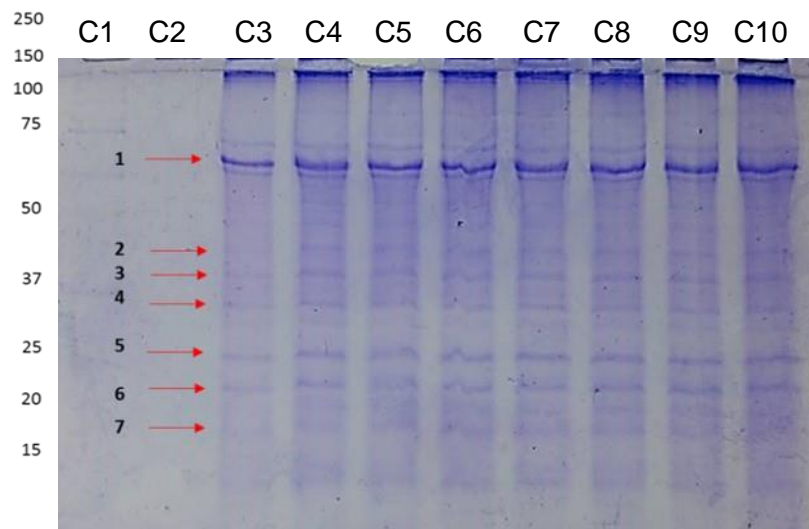


**Figura 20. Actividad proteolítica y contenido peptídico de las cepas ETM 20 y ETM 35. SDS-PAGE 10% y Zimograma.** SDS-PAGE al 10 %, co-polimerizado con IgG al 0.02%. C1 y C2, cepa ETM 20, de origen alimentario, C3 y C4, cepa ETM 35, obtenida de muestra intestinal.

Como se puede apreciar en las figuras 19 y 20, cada cepa seleccionada presenta un patrón de bandas y este no es producto de alguna digestión enzimática exógena particular. Por consiguiente, se eligió a la cepa 137-SN para continuar con el análisis de las proteínas de sobrenadante, por presentar una actividad proteolítica intensa, de peso molecular alto y ser de origen ExPEC.

### 9.5. Análisis del complejo de la proteasa S6 like de *E. coli* mediante Espectrometría de Masas (EM):

Las proteínas del sobrenadante de la cepa 137-SN fueron concentradas a partir de un cultivo (200 mL) de 36 horas en medio líquido LB, a 37°C con agitación constante. La cepa concentrada se analizó por electroforesis en SDS-PAGE, colocándose 10 µL de muestra en cada uno de los carriles del gel, el cual fue teñido con azul de Coomassie R-250. En la figura 21, se aprecia el patrón de bandas de la cepa 137- SN en cada uno de los carriles. Se seleccionaron 7 bandas representativas que pudieran ser producto de la degradación de la proteasa de alto peso molecular o el potencial inhibidor sugerido por Nájera-Hernández, 2012. Las bandas se cortaron longitudinalmente y se conservaron en ácido acético al 10% hasta ser analizadas por Espectrometría de masas en un MALDI TOF/TOF 4800.



**Figura 21. Gel preparativo SDS-PAGE 10% para la separación y estudio molecular de péptidos de *E. coli* 137-SN.** Carril 1, Marcador, Carril 3 a 7, proteínas secretadas al sobrenadante (proteasa) de *E. coli* cepa 137- SN. Con flechas en color rojo se señalan las bandas que fueron seleccionadas para ser analizadas.

Con los espectros MS/MS obtenidos (ver apéndice) se realizó una búsqueda con el algoritmo de búsqueda Paragon del software ProteinPilot, con un porcentaje de confianza del 66 %. Utilizando las señales peptídicas obtenidas de la espectrometría de masas se realizó una búsqueda de identidad con las proteasas codificadas en el genoma secuenciado de la cepa 137-SN con el programa RAST. Con los números de acceso y secuencias recuperadas se realizó el análisis de la información utilizando la base de datos del NCBI. Las secuencias de proteasas obtenidas por búsquedas al comparar BLAST con los resultados de Espectrometría de masas, dieron resultados de proteínas que pertenecen a las familias o grupos de proteínas que se enlistan en la tabla 12.

<b>Familia</b>	<b>% de Identidad</b>	<b>No. Acceso</b>
Aminopeptidasa N ( <i>Escherichia coli</i> )	100	WP-000193811.1
D-Alanil –D-Alanina Carboxipeptidasa ( <i>Escherichia coli</i> )	100	WP-000830161.1
Dipeptidil-carboxipeptidasa II ( <i>Escherichia coli</i> )	100	WP_001469151.1
Proteína HtpX (Enterobacterias)	100	WP_000964517.1
Represor LexA ( <i>Escherichia coli</i> )	99	WP_001487727.1
Inhibidor YbbK	99	WP_000904487.1

**Tabla 12. Análisis de identidad de la secuencia proteica obtenida por Espectrometría de masas utilizando BLASTP.**

## 10. DISCUSIÓN

*E. coli* es una de las especies bacterianas más conocidas y uno de los organismos más frecuentemente aislados de muestras clínicas. A pesar de esto, existe una infravaloración por parte de profesionales médicos con respecto a *E. coli* como patógeno extraintestinal y el papel de sus proteasas extracelulares como factores de virulencia ha sido considerado poco relevante, respecto a otros factores de virulencia tales como las toxinas (Russo & Johnson, 2003). Para hallar evidencia de una posible participación de una proteasa del tipo S6 como factor de virulencia en cepas del tipo EXPEC, se comparó la actividad proteolítica entre cepas ExPEC y no ExPEC. Los resultados de este trabajo indican que las cepas EXPEC poseen una actividad proteolítica diferente que se distingue de las no EXPEC y la caracterización por espectrometría de proteínas producidas por la cepa 137-SN mostró la biosíntesis de proteasas e inhibidores que sugieren un proceso complejo de regulación metabólico del comportamiento proteolítico en *E. coli*, lo cual es analizado y expuesto a continuación.

### 10.1. Estudios de degradación del sustrato IgG en cepas no ExPEC:

Para conocer el comportamiento proteolítico de cepas del tipo no ExPEC y compararlo con el grupo de ExPEC que produce proteasas de alto peso molecular (160 kDa aproximadamente) en la prueba de zimogramas de poliacrilamida, representado por la proteasa de la cepa 137-SN como modelo de estudio (Nájera Hernández, *et al.* 2012; Escobar Muciño, 2014). Se investigó la posibilidad de encontrar proteasas similares en comportamiento para degradar IgG y tamaño a la proteasa 137-SN en 60 aislados no EXPEC. Las 60 cepas no ExPEC correspondieron a dos grupos, el primero de 30 provenientes de alimentos crudos, destacando con el 43% las *E.coli* aisladas de cebolla y con un 28.5% para cada uno de los aislados de cilantro y espinacas y el segundo de 30 provenientes de muestras intestinales de pacientes ambulatorios, no hospitalizados y sin distinción de sexo (Tabla 9 y 10).

De los aislados obtenidos, 9 de ellos (15%) fueron positivos a la actividad proteolítica, de los cuales el 7% (4) pertenecen a las cepas de origen alimentario, y el resto 8% (5) a las aisladas de origen intestinal.

Las zonas de digestión enzimática presentaron variación en ambos grupos, predominando las bandas definidas y de pesos moleculares bajos (30 – 60 kDa) en las cepas aisladas a partir de alimentos crudos, mientras en el grupo de los aislados intestinales, predominaron los halos tenues aunque de pesos moleculares altos (100 – 150 kDa), con excepción de la cepa ETM 35, que presentó un halo intenso y de peso molecular alto (150 kDa), similar al de la cepa 137-SN modelo de estudio. El predominio de pesos moleculares altos en las cepas de origen intestinal, quizá pueda explicarse porque las cepas ExPEC a menudo se encuentran en la flora intestinal de individuos sanos, pero sólo causan la enfermedad cuando entran en un sitio extraintestinal estéril (tracto urinario, cavidad peritoneal o pulmones) (Tenailon *et al.* 2010). En cuanto a las proteasas de mediano peso molecular que se observaron, el único reporte que auxilia para la comprensión de este tipo de proteasa se refiere a *Pseudomonas aeruginosa*, que tiene la capacidad para producir una metaloproteasa conocida como M4 con un peso molecular de 54 kDa (Andrejko *et al.* 2013), lo cual coincide únicamente para los aislados ETM 13 y ETM 16 que presentaron una banda de actividad proteolítica en aproximadamente 60 kDa. En el caso de la cepa ETM 16, puede observarse una banda intensa alrededor de los 60 kDa, pero se observa una más alrededor de los 70 kDa (Figura 7), lo cual se puede adjudicar a que esta cepa posea dos proteasas de diferente peso molecular que digieren IgG o que se trate de una proteasa que se puede encontrar de forma multimérica (alto peso molecular) y de forma monomérica (bajo peso molecular) y como última explicación que la enzima se está degradando así misma. Debido a que no se tienen reportes de la formación de multímeros por parte de la metaloproteasa M4, se descarta que la muestra ETM 16 y por lo tanto el resto de las enzimas pertenezca a la misma familia de proteasas.

### **10.2. Detección por PCR del gen *tsh* en cepas no ExPEC:**

Para poder obtener una posible correlación entre la presencia de los genes *pic*, *pet* y *tsh* y la capacidad de producir proteasas en las bacterias no ExPEC, se investigó molecularmente la presencia de estos genes. En las 60 cepas analizadas, se encontró la presencia del gen *tsh* en un 28% (17), del cual el 7% (4) corresponden a cepas aisladas de origen alimentario, y el 21% (13) a las aisladas de origen intestinal (Tablas 9 y 10). La identidad de estos amplicones fue determinada mediante secuenciación de los productos amplificados. Se sabe que la fuente principal de *tsh* es el patogrupo APEC 078:K80 cepa chi7122 de ExPEC, del cual es aislado en muy alta frecuencia (Dautin, 2010). Sin embargo en estudios de Johnson *et al.* 2003, lograron aislar 150 (88.8%) *E. coli* de productos alimenticios, de las cuales 23 cepas fueron identificadas como ExPEC por medio de marcadores de virulencia, sugiriendo que estos representan una nueva clase de agentes patógenos transmitidos por alimentos. Por otro lado se tiene que la presencia del gen *tsh* es identificable por PCR en cepas provenientes de cultivo fecal y en menor proporción en pacientes con pielonefritis, poniendo de manifiesto su asociación a enfermedades del tracto urinario por encontrarse en el patogrupo UPEC de ExPEC (Heimer *et al.* 2003), sin embargo su identificación no resulta sencilla debido a su baja frecuencia. De manera que, podemos sugerir, que las cepas que poseen *tsh* en su genoma podrían pertenecer a la clase ExPEC o bien, que en las cepas de *E. coli* intestinal esté ocurriendo una transferencia horizontal de genes con cepas del tipo ExPEC.

### **10.3. Detección por PCR del gen *pet* en cepas no ExPEC:**

Para la detección molecular de *pet*, de un total de 30 cepas que fueron estudiadas por PCR, sólo en 5 cepas aisladas de intestino se observó la amplificación del gen, que corresponde a un 17% de la población. Los productos amplificados *pet* fueron secuenciados para corroborar su identidad. Sin embargo, los resultados del estudio BLAST produjeron porcentajes altos de identidad con *sat*, un gen que codifica un autotransportador de tipo V, con actividad de serina proteasa,

perteneciente a la subfamilia SPATE. Este resultado posiblemente sea adjudicado al diseño de primers, ya que cuando se realizó su síntesis en el GenBank no se contaba con un número amplio de secuencias de *pet*. Esto no representa mayor problema por tratarse de una proteasa de la misma familia S6 a la que pertenecen *pic* y *pet*. Se sabe que esta familia de autotransportadores del tipo serina proteasa son producidos por *E. coli* enteroagregativa (EAEC), de esta manera infecta el intestino humano y produce diarrea. Biran *et al.* 2011, reportó que ExPEC es capaz de sobrevivir en ambientes intraintraestinales, donde puede tener contacto con cepas InPEC y obtener genes de virulencia por transferencia horizontal de genes. Sin embargo, esta información no está reportada en cepas *E. coli* comensales, por lo tanto podemos sugerir, que las cepas que poseen *sat* en su genoma podrían pertenecer a la clase ExPEC o bien, que en las cepas de *E. coli* comensales está ocurriendo una transferencia horizontal de genes con cepas del tipo InPEC. Para llevar a cabo una mejor discriminación de cepas de *E. coli* hace falta un estudio complementario, pues ExPEC se puede diferenciar de otras cepas mediante análisis multilocus, con esta estrategia a la fecha se conocen 5 grupos filogenéticos (A, B1, B2, D y E), de los cuales el grupo B2 y D son los que contienen a ExPEC (Tenailon *et al.* 2010).

#### **10.4. Detección por PCR del gen *pic* en cepas no ExPEC:**

La evaluación del gen *pic* se realizó en un total de 34 cepas, ninguna produjo un producto de amplificación. Este resultado se justifica con lo reportado en la literatura hasta el día de hoy; Pic es un autotransportador que se encuentra con altas frecuencias en cepas de *E. coli* InPEC, relacionadas con la colonización intestinal, el gen *pic* como tal se encuentra en el cromosoma de EAEC (042) y *Shigella flexneri* 2457T (Dautin, 2010). Aunque el gen no haya sido identificado en cepas no ExPEC y no existan reportes de su identificación en este grupo de cepas, cabe mencionar lo recientemente demostrado por algunos autores, como en el caso de Abreu en el 2013, quien identificó a *pic* en otros patogrupos de InPEC, logrando aislar cepas ECEP provenientes de niños que han padecido

alguna infección intestinal. También se ha reportado una variante del gen conocido como *picU*, el cual se encuentra asociado al filogrupo B2, al que pertenece el patogrupo de ExPEC (Zude *et al.* 2013). Lo anterior ayuda a la comprensión del porque el gen *pic* no se logró amplificar en el presente estudio, aunque no se puede descartar que se encuentre en una cepa del tipo ExPEC.

Correlacionando la presencia de proteasas que mostraron degradación en Zimograma con sustrato IgG con la identificación de genes, se puede observar que la actividad proteolítica no se correlaciona con la presencia de alguno de los genes propuestos como potenciales candidatos. De esta manera, los resultados de este trabajo muestran evidencia que sugiere que ExPEC podría contener un factor de virulencia aún no descrito, una proteasa (160 kDa) degradadora de HSA, IgG e IgA, diferente a los autotransportadores Pic, Pet y Tsh (> 100 kDa).

#### **10.5. Análisis del complejo de proteínas S6 like de *E. coli* mediante Espectrometría de Masas (EM):**

En un estudio previo se obtuvo poca información al hacer un estudio de espectrometría de masas de los péptidos residuales de las zonas claras de los geles de Zimograma con sustrato proteico, debido a la alta concentración de péptidos de la proteína sustrato, y posiblemente también el enmascaramiento de la proteasa degradadora al ser poco abundante. Por lo tanto una estrategia alternativa para conocer a la proteasa S6-like de *E. coli* consistía en buscar los productos de degradación de la proteasa que fueran inactivos y que se acumularan como bandas discretas en un gel SDS-PAGE. Los resultados obtenidos por espectrometría de masas de las bandas recuperadas de un gel desnaturizante de proteínas concentradas de sobrenadante del tiempo de máxima acumulación de la proteasa (Nájera Hernández, 2012; Escobar Muciño, 2014), proporcionaron información que indica que las proteínas analizadas pertenecen a grupos de peptidasas, la mayoría de ellas proteínas de membrana.

Haciendo una revisión de la literatura se encontró que, las bacterias Gram negativas secretan proteínas al sobrenadante pero también tienen la capacidad de producir vesículas de membrana externa (OMVs), que sirven como vehículo de transporte y tráfico en la célula huésped. Las OMVs liberadas por las bacterias Gram negativas consisten en lípidos, proteínas, lipopolisacáridos, enzimas que incluyen proteasas, peptidasas, nucleasas y  $\beta$ -lactamasas, entre otras moléculas. (Zushang, LI *et al.* 1998) (Nicole y Meta, 2004). Un ejemplo relevante, es el reportado por Embaye y colaboradores (1992), quienes examinaron los efectos de *E. coli* enteropatógena en proteínas de membrana durante el cultivo de órganos de conejos, donde el 50% de los enterocitos mostraban alteración del borde de cepillo cuando *E. coli* se encontraba estrechamente adherida a su superficie y al parecer el transporte lo hacía en forma de vesículas, reportando que enzimas de membrana como; fosfatasa alcalina, aminopeptidasa -N y alfa-glucosidasa eran liberadas al medio de cultivo, lo cual fue confirmado mediante centrifugación en gradiente de densidad de sacarosa del medio de cultivo. Estos hallazgos sugieren que *E. coli* acelera la liberación de enzimas de membrana microvillar como vesículas, como resultado de una pérdida de actividad de las enzimas de la membrana microvillar. Este sistema ha sido comparado con la producción de exosomas producidos por eucariotas, aunque se sabe que utiliza un sistema de secreción diferente, aún se encuentra en debate el mecanismo exacto de como este proceso se lleva a cabo, y si es el resultado de un fenómeno natural se realiza en todas las bacterias o si la presencia de estrés aumenta la producción de OMV (Heramb y Medicharla, 2014). Por otro lado también se observó que en una solución que contenía inmunoglobulinas, la degradación de proteínas era bastante escasa, mas no así cuando se sometían las proteínas a electroforesis desnaturizantes. Situación que sugería la presencia de un posible inhibidor en solución con la proteasa y que era separado de la proteasa por electroforesis, lo que sugería que también se podría conocer la clase de inhibidor de *E. coli* que disminuye a la actividad de la proteasa de 160 kDa. La estrategia de estudio con espectrometría de masas puso de manifiesto un inhibidor proteico codificado por el genoma de *E. coli* 137-SN.

## 11. CONCLUSIONES

- En la colección de cepas no ExPEC se encontró que sólo un 15% produjo proteasa al degradar el sustrato IgG, predominando proteasas de mediano y bajo peso molecular.
- Las actividades proteolíticas tipo S6 en cepas no ExPEC, semejantes a proteasas con pesos moleculares aproximados a 160 kDa, fue de 6%.
- La identificación molecular del gen *tsh* resultó con una frecuencia de 28% en cepas no ExPEC.
- La capacidad para producir proteasas degradadoras de IgG es un fenómeno independiente de la presencia de *pic*, *pet* y *tsh* en el genoma de las cepas no ExPEC. De esta manera, las enzimas detectadas podrían pertenecer a una familia de proteasas aún no estudiadas.
- El complejo de proteína–DNA 137-SN, posee proteasas de membrana que podrían ser las responsables de su actividad proteolítica cuando son liberadas al medio a través de vesículas de membrana externa (OMVs).
- Existe un inhibidor proteico que se puede resolver en geles de SDS-PAGE, haciendo compleja la determinación de actividad proteolítica en proteínas secretadas al medio.

## 12. PERSPECTIVAS

- Estudiar las cepas que generaron actividad proteolítica con el sustrato IgG, y tratar de caracterizar nuevas proteasas.
- Investigar las proteasas de membrana del complejo 137-SN y su posible participación en la actividad proteolítica de la misma.

### ▪ 13. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

- **Abreu AG, Buerisa V, Porangaba TM, Sircilia MP, Navarrete F.** 2013. Autotransporter Protein-Encoding Genes of Diarrheagenic *Escherichia coli* Are Found in both Typical and Atypical Enteropathogenic *E. coli* Strains. *Appl. Environ. Microbiol.* 79: 411-414.
- **Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P.** 2004. *Biología molecular de la célula.* 4ta Ed. Editorial Omega. 1078-1080.
- **Andrejko M, Zdybicka BA, Janczarek M, Cytryńska M.** 2013. *Three Pseudomonas aeruginosa* strains with different protease profiles. *Acta bioquímica de polonia.* 60: 83– 9.
- **Arenas J, Nijland R, Rodríguez FJ, Bosma T, Tommassen J.** 2013. Involvement of three meningococcal surface-exposed proteins, the heparin-binding protein NhbA, the a-peptide of IgA protease and the autotransporter protease NalP, in initiation of biofilm formation. *Molecular Microbiology.* 87: 254–268.
- **Banu A, Kabbin J.S. and Anand M.** 2011. Extraintestinal Infections due to *Escherichia coli* and emerging issue. *JCDR.* 5: 486-490.
- **Benjelloun TZ, Tahar MS, Montecucco C, Sansonetti PJ, Parsot C.** 1998. SepA, the 110 kDa protein secreted by *Shigella flexneri*: two-domain structure and proteolytic activity. *Microbiology.* 144: 1815-1822.
- **Bernard WS, Jenny MW.** 2006. Sites in the CH3 Domain of Human IgA1 That Influence Sensitivity to Bacterial IgA1 Proteases. *J. Immunol.* 177: 3913-3919. Beynon R J, Oliver S. 2004. *Protein Purification Protocols.* Ed. Human press. 2°Ed. 244: 1- 89.
- **Beveridge Terry J.** 1999. Structures of Gram-Negative Cell Walls and Their Derived Membrane Vesicles. *Journal of Bacteriology.* 181: 4725-4733.
- **Bien J, Sokolova O, Przemyslaw B.** 2012. Review Article Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *International Journal of Nephrology.* 1-15.
- **Biran D, Parket A, Ron EZ.** 2011. Commensalism Versus Virulence. *Beneficial Microorganisms in Multicellular Life Forms.* 19: 253-264.
- 
- 
- **Brunder W, Schmidt H, Karch H.** 1997. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. EspP, a novel extracellular serine protease of enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7 cleaves human coagulation factor V. *Molecular microbiology.* 24: 767-778.

- **Croxen MA, Finlay BB.** 2010. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*. 8: 26-38.
- **Dautin N.** 2010. Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae (SPATEs): Biogenesis and Function. *Toxins*. 2: 1179-1206.
- **Diebel, L.N., D. M. Liberati, A. E. Baylor, W. J. Brown and J. Devlin.** 2004. Immunoglobulin A protease is a virulence factor for gramnegative pneumonia. *Surgery*. 136:937–943.
- **Escobar Muciño, E.** 2014. Diseño de un sistema de estudio de proteasas S6 en bacterias Gram negativas patógenas. Tesis de maestría. Instituto de ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla.
- **Eslava, C., F. Navarro-García, J. R. Czeczulin, I. R. Henderson, A. Cravioto.** 1998. Pet, an autotransporter enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. 66:3155-3163.
- **Embaye H, Hart CA, Getty B, Fletcher JN, Saunders JR, Batt RM.** 1992. Effect of enteropathogenic *Escherichia coli* on microvillar membrane protein during organ culture of rabbit intestinal mucosa. *Gut*. 33: 1184-1189.
- **Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of Enterobacteriaceae.** *Infection and immunity*. 70: 7105–7113.
- **George DB, Manges AR.** 2010. A systematic review of outbreak and non-outbreak studies of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* causing community-acquired infections. *Epidemiology and infection*. 138: 1679-1690.
- **Hacker J y Kaper JB.** 2000. Pathogenicity islands and the evolution of microbes. *Rev Microbiol*. 54:641-79
- **Heimer RS, Rasko DA, Lockett CV, Johnson DE, Mobley HL.** 2004. Autotransporter Genes pic and tsh Are Associated with *Escherichia coli* Strains That Cause Acute Pyelonephritis and Are Expressed during Urinary Tract Infection. *Infection and immunity*. 72: 593–597.
- **Heramb M. Kulkarni and Medicharla V. Jagannadham.** 2014. Biogenesis and multifaceted roles of outer membrane vesicles from Gram-negative bacteria. *Microbiology*. 160: 2109–2121.
- **Henderson, I.R.; Czeczulin, J.; Eslava, C.; Noriega, F.; Nataro, J.P.** 1999. Characterization of Pic, a secreted protease of *Shigella flexneri* and enteroaggregative *Escherichia coli*. *Infect. Immun*. 67, 5587–5596.
- **Hoge R, Pelzer A, Rosenau F, Wilhelm S.** 2010. Weapons of a pathogen: Proteases and their role in virulence of *Pseudomonas aeruginosa*. *Current Research, Technology and Education. Topics in Applied Microbiology and. Microbial Biotechnology*. 383395.
- **Holt JG.** 1994. *Bergey's Manual of Determinative Bacteriology*. Williams y Wilkings. USA. 9°. Edition. P.p. 180-181.

- **Ingraham, J.L, Ingraham, C.A. 2004.** Introducción a la Microbiología II. Editorial Reverté. Pp: 562-563.
- **Jansen, H.J., Grenier, D. & Van der Hoeven, J.S.** 1995. Characterization of immunoglobulin G-degrading proteases of *Prevotella intermedia* and *Prevotella nigrescens*. Oral Microbiology & Immunology, 10, 138/145.
- **Johnson, J. R., T. A. Russo.** 2002. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*: “The other bad *E. coli*.” J. Lab. Clin. Med. 139:155-162.
- 
- **Johnson, J. R., A. Gajewski, A. J. Lesse and T. A. Russo.** 2003. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive non-urinary infections. J. Clin. Microbiol. 41:5798–802.
- 
- **Johnson JR.** 2003. Microbial virulence determinants and pathogenesis of urinary tract infection. Infect Dis Clin North Am. 17: 261-278.
- 
- **Johnson, J. R., A. Gajewski, A. J. Lesse and T. A. Russo.** 2003. Extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* as a cause of invasive non-urinary infections. J. Clin. Microbiol.41:5798–802.
- 
- **Johnson TJ, Nolan LK.** 2009. Pathogenomics of the Virulence Plasmids of *Escherichia coli*. Microbiology and molecular biology reviews. 73: 750–774.
- **Kemmett KM, Humphrey T, Rushton S, Close A, Wigley P, Williams NJ.** 2013. A Longitudinal Study Simultaneously Exploring the Carriage of APEC Virulence Associated Genes and the Molecular Epidemiology of Faecal and Systemic *E. coli* in Commercial Broiler Chickens. PLoS ONE. 8: 1-10.
- **KM Matti, CJ Savanurmath, SB Hinchigeri.** 2010. SDS-induced Serine Protease Activity of an Antiviral Red Fluorescent Protein World Academy of Science, Engineering and Technology. P.p 1053-1058.
- **Kostakioti M y Stathopoulos C.** 2004. Pathogenic *Escherichia coli* Strain. Functional Analysis of the Tsh Autotransporter from an Avian. Infection and immunity. 72: 5548– 555.
- **Kornfeld, S.J. y Plaut, A.G.** 1991. Secretory immunity and the bacterial IgA proteases. Review of Infection Diseases, 3, 521/534.
- **Leo JC, Goldman A.** 2010. Discussion: Jacks of all trades?—Probably not. *The E. coli* Eib proteins bind IgG Fc. Molecular Immunology. 47: 1870–1872.
- **Li Zusheng, Clarke A.J and Beveridge T.J.** 1998. Gram-Negative Bacteria Produce Membrane Vesicles Which Are Capable of Killing Other Bacteria. Journal of Bacteriology. 180: 5478–5483.

- **Marrs CF, Zhang L y Foxman B.** 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? FEMS Microbiology Letters. 252: 183–190.
- **MEROPS.** The peptidase database. <http://merops.sanger.ac.uk/>. Revisado en 2013.
- **Milazzo FH, Delisle GJ.** 1984 Immunoglobulin A proteases in Gram-negative bacteria isolated from human urinary tract infections. Infect Immun. 43: 11-13.
- **Miyoshi, S. & Shinoda, S.** 2000. Microbial metalloproteases and pathogenesis. Microbes & Infection, 2, 91/98.
- **Mushin, R., Weisman, Y. & Singer, N.** 1980. *Pasteurella haemolytica* found in respiratory tract of fowl. Avian Diseases, 24, 162/168.
- **Nájera Hernández, S.** 2012. Aislados de *Escherichia coli*, Extraintestinales, multirresistentes y con actividad proteolítica contra inmunoglobulina G y albúmina sérica humana. Tesis de doctorado. Instituto de ciencias de la Universidad Autónoma de Puebla.
- **Navarro-García F., Eslava C., Villaseca J.M., López-Revilla R., Czczulin J.R., Srinivas S., Nataro J.P., Cravioto A.** 1998. In vitro effects of a high-molecular-weight heat-labile enterotoxin from enteroaggregative *Escherichia coli*. Infect. Immun. 1998, 66, 3149–3154.
- **Navarro-García, F., Canizalez-Roman, J.E., Vidal, M.I., Salazar, M.I.** 2007. Intoxication of epithelial cells by plasmid-encoded toxin requires clathrin-mediated endocytosis. Microbiology. 153, 2828–2838.
- **Navarro-García, F.; Canizalez-Roman, A.; Burlingame, K.E.; Teter, K.; Vidal, J.E.** 2007. Pet, a non-AB toxin, is retrograde transported and translocated into epithelial cells. Infect. Immun. 75, 2101.
- **Negrete-Abascal, E., V. R. Tenorio, J. J. Serrano, C. García and M. de la Garza.** 1994. Secreted Proteases from *Actinobacillus pleuropneumoniae* Serotype 1 Degrade Porcine Gelatin, Hemoglobin and Immunoglobulin A. Can. J. Vet. Res., 58:83-86.
- **Negrete-Abascal, E., Tenorio, R.V., Guerrero, A.L., García, R.M., Reyes, M.E. & de la Garza, M.** 1998. Purification of a protease from *Actinobacillus pleuropneumoniae* serotype 1, an antigen common to all the serotypes. Canadian Journal of Veterinary Research, 62, 183/190.
- **Negrete-Abascal, E., Tenorio, R.V. & de la Garza, M.** 1999. Secretion of proteases from *Pasteurella multocida* isolates. Current Microbiology, 38, 64/67.
- **Negrete-Abascal, E., Vaca, P.S., Paniagua, G., Pérez Méndez, A., Ibarra Caballero, J., Pérez Márquez, V. & Tenorio, V.R.** 2004. Metalloproteases secreted by *Actinobacillus suis*. Current Microbiology, 49, 55/58.

- **Nicole C. Kesty and Meta J. Kuehn.** 2004. Incorporation of Heterologous Outer Membrane and Periplasmic Proteins into *Escherichia coli* Outer Membrane Vesicles. *J Biol Chem.* 16; 279(3): 2069–2076.
- **Parham NJ, Srinivasan U, Desvaux M, Foxman B, Marrs CF, Henderson IR.** 2005. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol. Lett.* 230: 73–83.
- **Pastorello I, Rossi PS, Rosini R, Mattera R, Ferrer NM, Urosev D, Nesta B, Lo SP, Del Vecchio M, Rippa V, Bertoldi I, Gomes MD, Laarman A, van Strijp Jos AG, Daura X, Pizza M, Serino L, Soriani M.** 2013. EsiB, a Novel Pathogenic *Escherichia coli* Secretory Immunoglobulin A-Binding Protein Impairing Neutrophil Activation. *J. ASM.* 4: 1-11.
- **Perona JJ, Craik CS.** 1995. Review: Structural basis of substrate specificity in the serine proteases. *Protein Science.* 4: 337-360.
- **Pitout JD.** 2012. Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*: A Combination of Virulence with Antibiotic Resistance. *Front Microbiol.* 3: 1-9. Protein sequence analysis y classification. <http://www.uniprot.org/>. Revisado en 2013.
- **Rasko DA, Webster DR, Sahl JW, Bashir A, Boisen N, Scheutz F, Paxinos EE, Sebra R, Chin CS, Iliopoulos D, Klammer A, Peluso P, Lee L, Kislyuk AO, Bullard J, Kasarskis A, Wang S, Eid J, Rank D, Redman JC, Steyert SR, Frimodt MJ, Eng MS, Struve C, Petersen AM, Krogfelt KA, Nataro JP, Schadt EE, Waldor MK.** 2011. Origins of the *E. coli* Strain Causing an Outbreak of Hemolytic–Uremic Syndrome in Germany. *N Engl J Med.* 365: 709–717
- **Rawlings ND, Barrett AJ.** 1993. Evolutionary families of peptidases *J Biochem.* 290: 205-218.
- **Rendón AM, Alagón A.** 2008. Mecanismos moleculares de diversificación de inmunoglobulinas. *Revista de Educación Bioquímica.* 27: 19-29.
- **Ruiz PF, Nataro J.** 2013. Bacterial serine proteases secreted by the autotransporter pathway: classification, specificity, and role in virulence. *J. Cellular and Molecular Life Sciences.* 1-26.
- **Russo TA, Johnson JR.** 2000. Proposal for a New Inclusive Designation for Extraintestinal Pathogenic Isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of Infectious Diseases.* 181: 1753–4.
- **Russo TA, Johnson JR.** 2003. Review: Medical and economic impact of extraintestinal infections due to *Escherichia coli*: focus on an increasingly important endemic problem. *Microbes and Infection.* 5: 449–456.
- **Russo TA, MacDonald U C.** 2008. Extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli* do not possess active IgA1, IgA2, sIgA or IgG proteases. *FEMS Immunology & Medical Microbiology.* 53: 65–71.

- **Sambrook J, Russell DW.** 2001. Molecular cloning: a laboratory manual. 3°. Ed. Cold Spring Harbor Laboratory. 1 (32).
- **Sandt CH, Hill CW.** 2001. Nonimmune Binding of Human Immunoglobulin A (IgA) and IgG Fc by Distinct Sequence Segments of the EibF Cell Surface Protein of *Escherichia coli*. *infection and Immunity*. 69: 7293–7303.
- **Schroeder HW y Cavacini L.** 2010. Structure and Function of Immunoglobulins. *Allergy Clin Immunol*. 125: S41–S52.
- **Senior BW, Woof JM.** 2005. Effect of mutations in the human immunoglobulin A1 (IgA1) hinge on its susceptibility to cleavage by diverse bacterial IgA1 proteases. *Infect. Immun*. 73: 1515-1522.
- **Sivick KE, Mobley HLT.** 2009. An “omics” approach to uropathogenic *Escherichia coli* vaccinology. *Trends Microbiol*. 17: 431–432.
- **Smith J, Fratamico PM, Gunther NW.** 2007. Review Extraintestinal Pathogenic *Escherichia coli*. *Foodborne pathogens and disease*. 4: 134-163.
- **Travis J, Potempa J, Banbula A.** 2000. Role of bacterial proteinases in matrix destruction and modulation of host responses. *Periodontol 2000*. Oct; 24:153-92
- **Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E.** 2010. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 8: 207-17.
- **Totsika M, Gomes MD, Idris A, Rogers BA, Wurpel DJ, Minh DP, Paterson DL, Schembri MA.** 2012. Uropathogenic *Escherichia coli* Mediated Urinary Tract Infection. *Current Drug Targets*. 13: 1386-1399.
- **Tripathi LP, Sowdhamini R.** 2008. Genome-wide survey of prokaryotic serine proteases: Analysis of distribution and domain architectures of five serine protease families in prokaryotes. *BMC Genomics*. 9: 549.
- **Villaseca JM, Hernández U, Sainz-Espuñes TR, Rosario C, Eslava C.** 2005. Enteroaggregative *Escherichia coli* an emergent pathogen with different virulence properties. *Revista latinoamericana de microbiología*. 47: 140-159.
- **Welch RA.** 2006. The Genus *Escherichia*. *The Prokaryotes*. 6: 60-71.
- **Wubbel L, Mc Cracken G.** 1998. Management of Bacterial Meningitis. *Pediatrics in Review*. Vol 19, 3, 78- 82.
- **Yen Y.T, Kostakioti, M, Henderson I.R, Stathopoulos C.** 2008. Common themes and variations in serine protease autotransporters. *Trends Microbiol*. 16, 370–379.
- **Zude I, Leimbach A, Dobrindt U.** 2014. Prevalence of autotransporters in *Escherichia coli*: what is the impact of phylogeny and pathotype? *International Journal of Medical Microbiology*. 304:243-56.

## 14. APÉNDICES

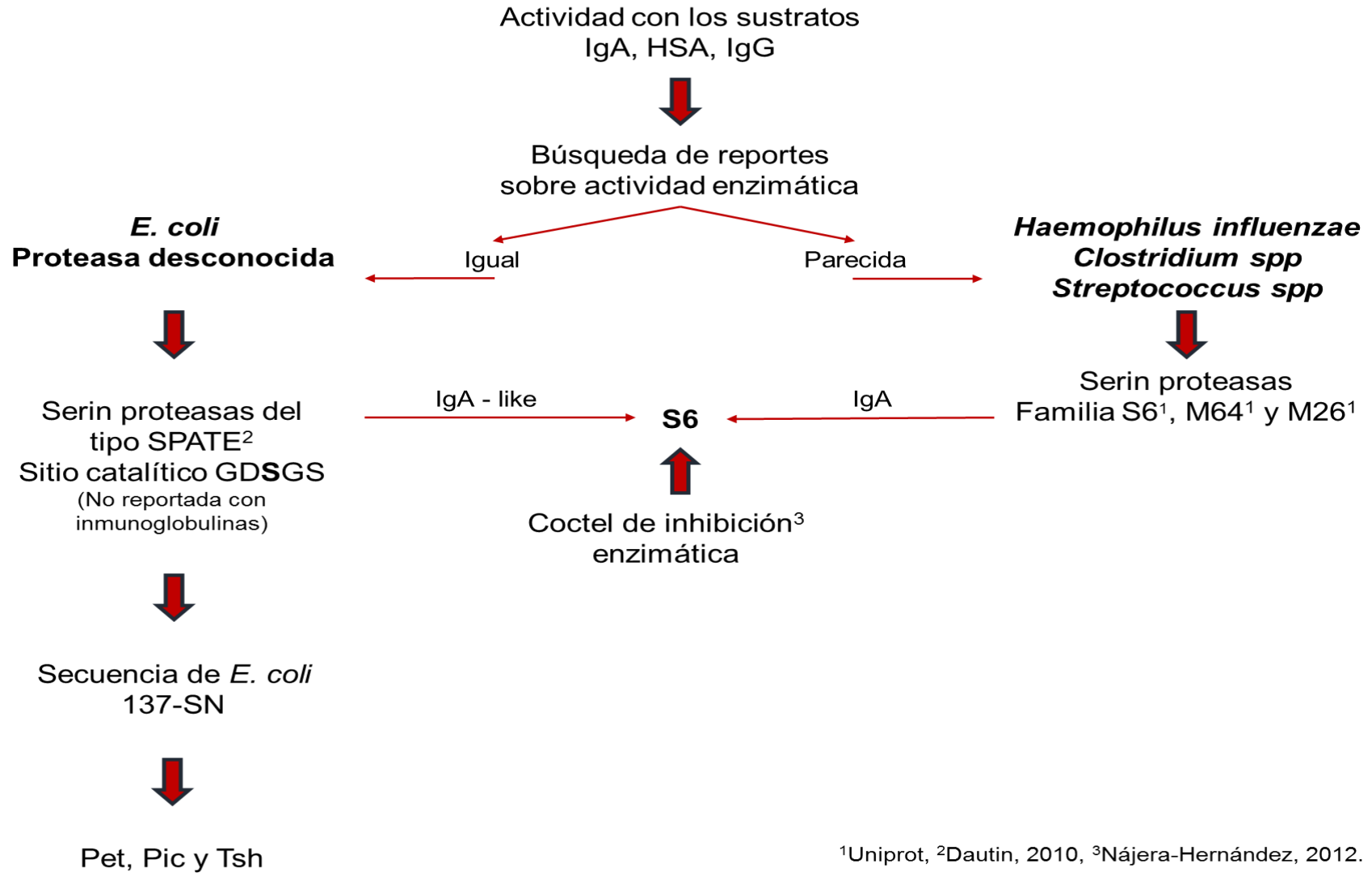
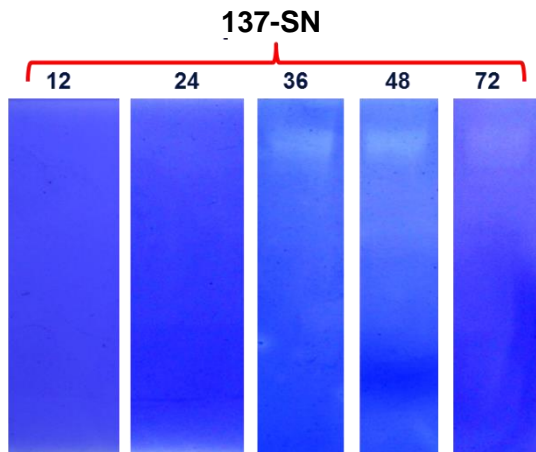
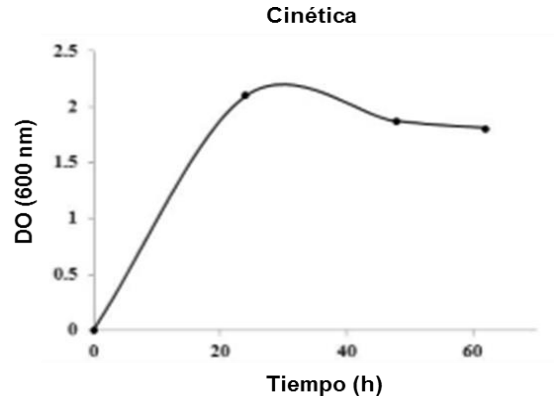


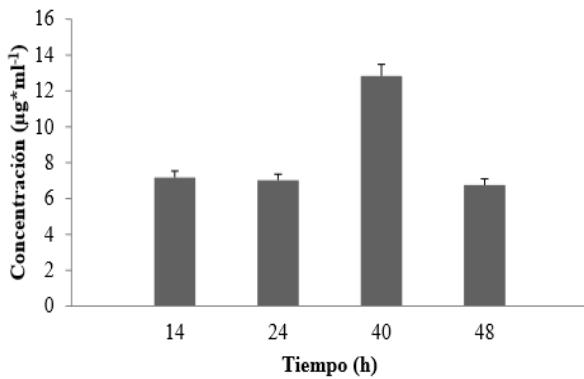
Figura 22. Asignación de proteasa 137-SN a la familia S6 (Nájera-Hernández, 2012).



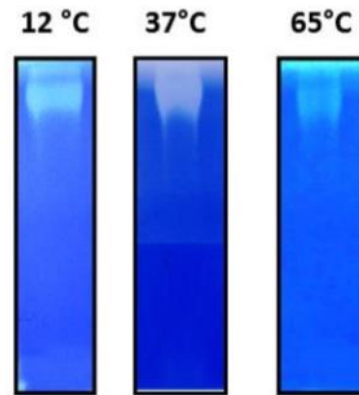
Cinética de actividad proteolítica de la proteasa putativa 137-SN en Zimograma copolimerizado con IgG.



Curva de crecimiento de ExPEC cepa 137-SN.

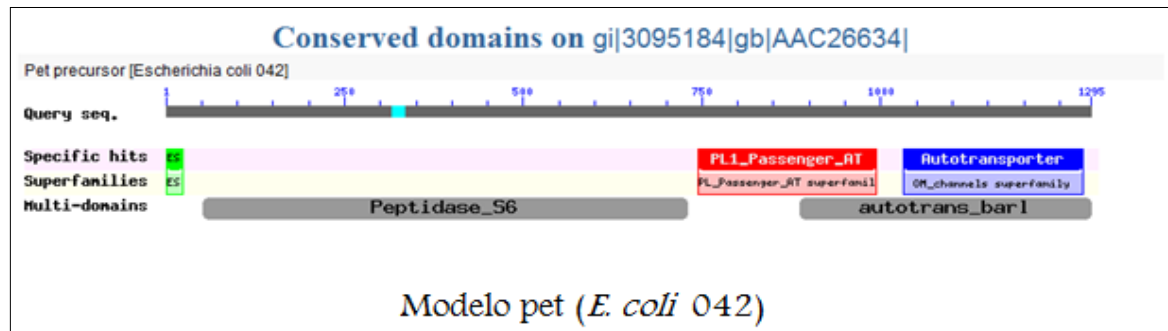


Cuantificación de proteínas del sobrenadante de la cepa ExPEC 137 (14 a 48 h).



Estabilidad de la proteasa 137-SN a diferentes temperaturas (12, 37 y 65 °C).

**Figura 23. Determinación del tiempo de máxima acumulación y condiciones de incubación de la proteasa 137-SN** (Nájera Hernández, 2012; Escobar Muciño, 2014).



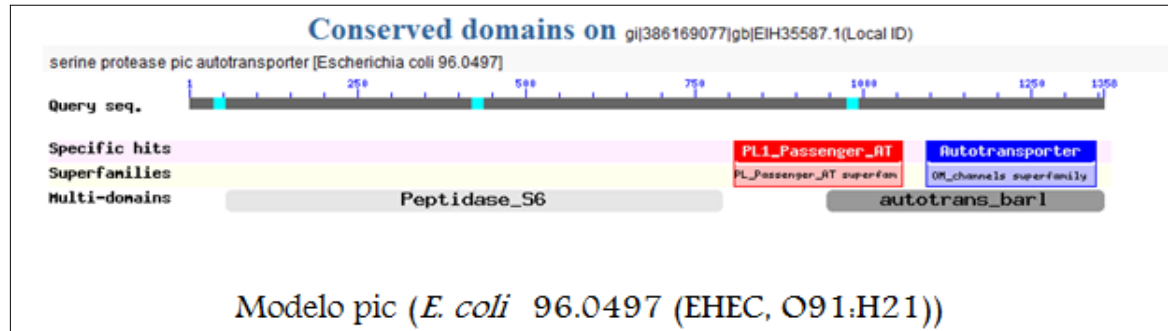
Consensus	MNKI YSLK YSAATGG LI AVSELAKRVSGKTNRK -- LVATMLSLAVAG -- -- TYNAANI DI SNVWARDYL DL AQNKGI FQPGATDVTI TLKNGDKFSFHNL SI PDFSGAAAASGAATAI GGSY
PET_AA_10.pf	MNKI YSI K YSAATGG LI AVSELAKKVI OKTNRK -- I SAALLSLAVI SYTNI I YAANVDI SKAWARDYL DL AQNKQV FQPGSTHVKI KLKDDTDF SFPALVPYPDFSSATANGAAT SI GGAY
PET_AA_01.pf	MNKI YSI K YSAATGG LI AVSELAKKVI OKTNRK -- I SAALLSLAVI SYTNI I YAANVDI SKAWARDYL DL AQNKQV FQPGSTHVKI KLKDDTDF SFPALVPYPDFSSATANGAAT SI GGAY
PET_AA_02.pf	MNKI YSI K YSAATGG LI AVSELAKKVI OKTNRK -- I SAALLSLAVI SYTNI I YAANVDI SKAWARDYL DL AQNKQV FQPGSTHVKI KLKDDTDF SFPALVPYPDFSSATANGAAT SI GGAY
PET_AA_03.pf	MNKI YSL K YSAATGG LI AVSELAKRVSGKTNRK -- LVATMLSLAVAG -- -- TYNAANI DI SNVWARDYL DL AQNKGI FQPGATDVTI TLKNGDKFSFHNL SI PDFSGAAAASGAATAI GGSY
PET_AA_04.pf	MNKI YSL K YSAATGG LI AVSELAKRVSGKTNRK -- LVATMLSLAVAG -- -- TYNAANI DI SNVWARDYL DL AQNKGI FQPGATDVTI TLKNGDKFSFHNL SI PDFSGAAAASGAATAI GGSY
PET_AA_05.pf	MNKI YSL K YSAATGG LI AVSELAKRVSGKTNRK -- LVATMLSLAVAG -- -- TYNAANI DI SNVWARDYL DL AQNKGI FQPGATDVTI TLKNGDKFSFHNL SI PDFSGAAAASGAATAI GGSY
PET_AA_06.pf	MNKI YSL K YSAATGG LI AVSELAKRVSGKTNRK -- LVATMLSLAVAG -- -- TYNAANI DI SNVWARDYL DL AQNKGI FQPGATDVTI TLKNGDKFSFHNL SI PDFSGAAAASGAATAI GGSY
PET_AA_08.pf	MNKI YSL K YSAATGG LI AVSELAKRVSGKTNRK -- LVATMLSLAVAG -- -- TYNAANI DI SNVWARDYL DL AQNKGI FQPGATDVTI TLKNGDKFSFHNL SI PDFSGAAAASGAATAI GGSY

Secuencia de aminoácidos K YSAATGG, para la proteína Pet, que corresponden del 8-15 aa, que se utilizó para generar el primer forward, denominado pet5F1DPS (AAATATAGCGCTGCCACTGGCGGA).

Consensus	GKKQGANI KI GEGNVI LNEEDTFNNI YLASGNKVI LNKDNLGNDQYAGI FFTKRGGT LI NGHNGT FTRI AATDGGTTI TNSDITKEAVL AI MNEDSYI YHNI NNI KLTHNI NSQD
PET_AA_10.pf	I QAGTNLK TGNQTVI L GAKTFNNI YVAGGPGT VQLNAENALGEGDYAGI FFTENGGK DLNGHNGT FKKI AATDGGTTI TNSNTTKESVL SVMNQNVI YHGNVGNVRL EHLDT --
PET_AA_01.pf	I QAGTNLK TGNQTVI L GAKTFNNI YVAGGPGT VQLNAENALGEGDYAGI FFTENGGK DLNGHNGT FKKI AATDGGTTI TNSNTTKESVL SVMNQNVI YHGNVGNVRL EHLDT --
PET_AA_02.pf	I QAGTNLK TGNQTVI L GAKTFNNI YVAGGPGT VQLNAENALGEGDYAGI FFTENGGK DLNGHNGT FKKI AATDGGTTI TNSNTTKESVL SVMNQNVI YHGNVGNVRL EHLDT --
PET_AA_03.pf	GKKQGANI KI GEGNVI LNEEDTFNNI YLASGNKVI LNKDNLGNDQYAGI FFTKRGGT DLNGHNGT FTRI AATDGGTTI TNSDITKEAVL AI MNEDSYI YHNI NNI KLTHNI NSQD
PET_AA_04.pf	GKKQGANI KI GEGNVI LNEEDTFNNI YLASGNKVI LNKDNLGNDQYAGI FFTKRGGT DLNGHNGT FTRI AATDGGTTI TNSDITKEAVL AI MNEDSYI YHNI NNI KLTHNI NSQD
PET_AA_05.pf	GKKQGANI KI GEGNVI LNEEDTFNNI YLASGNKVI LNKDNLGNDQYAGI FFTKRGGT DLNGHNGT FTRI AATDGGTTI TNSDITKEAVL AI MNEDSYI YHNI NNI KLTHNI NSQD
PET_AA_06.pf	GKKQGANI KI GEGNVI LNEEDTFNNI YLASGNKVI LNKDNLGNDQYAGI FFTKRGGT DLNGHNGT FTRI AATDGGTTI TNSDITKEAVL AI MNEDSYI YHNI NNI KLTHNI NSQD
PET_AA_08.pf	GKKQGANI KI GEGNVI LNEEDTFNNI YLASGNKVI LNKDNLGNDQYAGI FFTKRGGT DLNGHNGT FTRI AATDGGTTI TNSDITKEAVL AI MNEDSYI YHNI NNI KLTHNI NSQD

Secuencia de aminoácidos LDLNGHNG, para la proteína Pet, que corresponden del 483-490 aa, que se utilizó para generar el primer reverse, denominado pet5R1DPS (CTGATTGTGTCCATTTAAATCTAG), esperando un amplificado: 1433 nt.

**Figura 24. Modelo empleado y secuencias conservadas para diseño de oligos pet (Escobar-Muciño, 2014).**

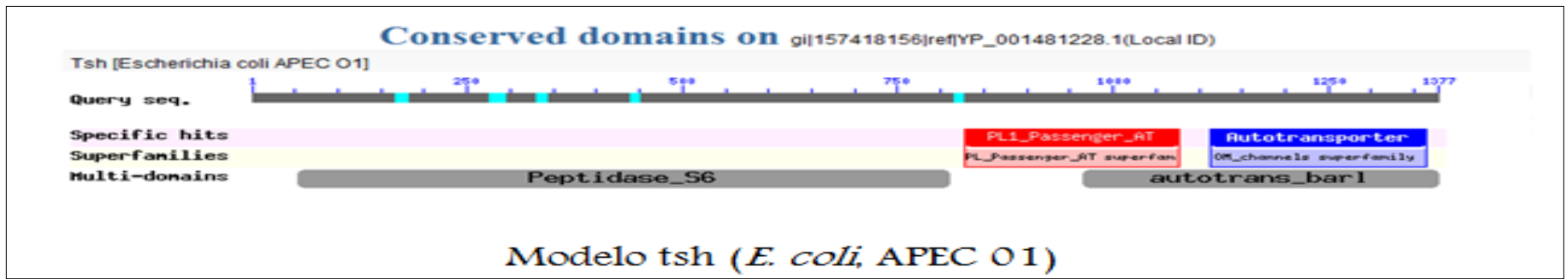


Secuencia de aminoácidos RDKAENK, para la proteína Pic, que corresponden del 68-75 aa, que se utilizó para generar el primer forward, denominado pic27F1D (CGTGATTTCGCTGAAAACAAAGGG).



Secuencias consenso ISWGYRGG, para la proteína Pic, que corresponden del 486-493 aa, que se utilizó para generar el primer reverse denominado pic27R1D (ACCTCCCCGGTATCCCCATGAAAT).

Figura 25. Modelo empleado y secuencias conservadas para diseño de oligos *pic* (Escobar-Muciño, 2014).



Consensus	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A			
17 Sequences	90	100	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	210	220	230	240	250	260	270	280	290	300	310	320	330	340	350	360	370	380	390	400	410	420	430	440	450	460	470	480	490	500	510	520	530	540	550	560	570	580	590	600	610	620	630	640	650	660	670	680	690	700	710	720	730	740	750	760	770	780	790	800	810	820	830	840	850	860	870	880	890	900	910	920	930	940	950	960	970	980	990	1000											
TSH_AA_NCB1_03.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A	V	A	G
TSH_AA_NCB1_02.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A	V	A	G
TSH_AA_NCB1_03.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A	V	A	G
TSH_AA_NCB1_04.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A	V	A	G
TSH_AA_NCB1_05.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A	V	A	G
TSH_AA_NCB1_07.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A	V	A	G
TSH_AA_NCB1_08.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A	V	A	G
TSH_AA_NCB1_09.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G	A	V	A	G
TSH_AA_NCB1_10.pro	AEN	V	P	L	Y	D	K	N	G	N	P	V	T	L	N	K	A	P	M	I	D	F	S	--	S	N	D	S	T	G	V	A	T	L	V	S	P	Q	V	V	S	V	K	H	N	G	G	Y	Y	V	K	F	G	Y	A	D	O	S	S	Y	A	L	V	D	R	N	N	H	W	-	R	D	F	H	T	P	R	L	N	K	I	V	T	E	V	T	P	L	D	I	T	N	A	G	T	A	K	S	T				
TSH_AA_NCB1_11.pro	AEN	V	P	L	Y	D	K	N	G	N	P	V	T	L	N	K	A	P	M	I	D	F	S	--	S	N	D	S	T	G	V	A	T	L	V	S	P	Q	V	V	S	V	K	H	N	G	G	Y	Y	V	K	F	G	Y	A	D	O	S	S	Y	A	L	V	D	R	N	N	H	W	-	R	D	F	H	T	P	R	L	N	K	I	V	T	E	V	T	P	L	D	I	T	N	A	G	T	A	K	S	T				
TSH_AA_NCB1_12.pro	AEN	V	P	L	Y	D	K	N	G	N	P	V	T	L	N	K	A	P	M	I	D	F	S	--	S	N	D	S	T	G	V	A	T	L	V	S	P	Q	V	V	S	V	K	H	N	G	G	Y	Y	V	K	F	G	Y	A	D	O	S	S	Y	A	L	V	D	R	N	N	H	W	-	R	D	F	H	T	P	R	L	N	K	I	V	T	E	V	T	P	L	D	I	T	N	A	G	T	A	K	S	T				
TSH_AA_NCB1_13.pro	-----	R	C	E	L	V	G	T	L	N	K	A	A	M	P	D	F	S	S	V	N	V	K	S	N	P	Q	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	K	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G							
TSH_AA_NCB1_14.pro	-----	R	C	E	L	V	G	T	L	N	K	A	A	M	P	D	F	S	S	V	N	V	K	S	N	P	Q	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	K	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G							
TSH_AA_NCB1_15.pro	ATNI	AI	Y	N	K	Q	G	E	F	V	G	T	L	D	K	A	A	M	P	D	F	S	--	A	V	D	S	E	I	G	V	A	T	L	I	N	P	Q	Y	A	S	V	K	H	N	G	G	Y	T	N	V	S	F	G	--	D	G	E	N	R	Y	N	I	V	D	R	N	N	A	P	S	L	D	F	H	A	P	R	L	D	K	L	V	T	E	V	A	P	T	A	V	T	A	Q	G	A	V	A	G				
TSH_AA_NCB1_17.pro	ASN	I	T	L	Y	D	K	N	G	N	P	A	O	V	L	O	K	V	P	M	D	F	S	--	S	V	D	K	L	I	A	T	L	V	N	P	Q	Y	V	S	V	K	H	N	G	G	Y	Q	S	V	R	Y	G	--	N	Y	T	T	I	V	D	R	N	N	H	W	L	D	F	H	A	P	R	L	N	K	I	V	T	E	V	I	P	S	E	M	T	H	A	G	T	V	N	I									
TSH_AA_NCB1_18.pro	ASN	I	T	L	Y	D	K	N	G	N	P	A	O	V	L	O	K	V	P	M	D	F	S	--	S	V	D	K	L	I	A	T	L	V	N	P	Q	Y	V	S	V	K	H	N	G	G	Y	Q	S	V	R	Y	G	--	N	Y	T	T	I	V	D	R	N	N	H	W	L	D	F	H	A	P	R	L	N	K	I	V	T	E	V	I	P	S	E	M	T	H	A	G	T	V	N	I									

Secuencia conservada de aminoácidos SVKHNGGY, para la proteína Tsh, que corresponden del 122 a 129 aa, que se utilizó para generar el primer forward, denominado tsh4F1D (AGCGTGAAACATAACGGGGGATAT).

Consensus	ADN	K	Q	V	Q	A	F	S	S	V	N	I	A	S	R	P	T	V	V	L	T	D	E	R	Q	V	N	P	D	T	V	S	R	G	Y	R	S	G	T	L	D	V	N	G	N	S	L	T	F
-----------	-----	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---	---

ID Investigador	ID Unidad	Unused	Total	% Cov	Accession #	Name	Species	Peptidos Mayor a 95
Banda 1	MS-2014-009-001	29.04	29.04	53.6	tr W7IBZ2 W7IBZ2_ECOLX	Flagellin OS=Escherichia coli EC096/10 GN=G654_18892 PE=4 SV=1	ECOLX	14
		1.05	11.4	34.7	tr Q9L9M1 Q9L9M1_ECOLX	Flagellin OS=Escherichia coli GN=flhC PE=4 SV=1	ECOLX	5
		1	7.48	34.5	tr V0XY84 V0XY84_ECOLX	Putative flagellin protein OS=Escherichia coli 908541 GN=HMPREF1609_01996 PE=4 SV=1	ECOLX	4
		0.86	0.86	10.1	tr M8ZAS7 M8ZAS7_ECOLX	Flagellar hook-associated protein FlgK OS=Escherichia coli 2845350 GN=flgK PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.79	0.79	8.3	tr X7R1K9 X7R1K9_ECOLX	Trigger factor OS=Escherichia coli BIDMC 6 GN=tig PE=3 SV=1	ECOLX	0
		0.64	13.36	34.8	tr V4E104 V4E104_ECOLX	Flagellin OS=Escherichia coli HVH 152 (4-3447545) GN=G810_01819 PE=4 SV=1	ECOLX	6
		0.64	0.64	8.7	tr T7NZ34 T7NZ34_ECOLX	Cellulose synthase operon protein C OS=Escherichia coli HVH 184 (4-3343286) GN=G836_03854 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.6	0.6	2.2	tr T8NVA1 T8NVA1_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli UMEA 3052-1 GN=G902_00651 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.47	0.47	3	tr H4X4X5 H4X4X5_ECOLX	Phage portal protein, lambda family OS=Escherichia coli DEC7B GN=ECDEC7B_1716 PE=4 SV=1	ECOLX	0

**Figura 27. Reporte de resultados para el análisis de banda 1 por Espectrometría de masas (EM).**

Banda 2	MS-2014-009-002	3.15	3.15	12.9	tr W8ZIP9 W8ZIP9_ECOLX	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase A OS=Escherichia coli O25b:H4-ST131 str. EC958 GN=gapA PE=3 SV=1	ECOLX	1
		3.06	3.06	10.3	tr X7PN55 X7PN55_ECOLX	Outer membrane protein A OS=Escherichia coli BWH 40 GN=L408_01464 PE=3 SV=1	ECOLX	1
		2.01	2.01	5.5	tr V3AP39 V3AP39_ECOLX	Lambda family phage tail tape measure protein OS=Escherichia coli BIDMC 37 GN=L474_00003 PE=4 SV=1	ECOLX	1
		1.11	1.11	4.2	tr A0A028KDH3 A0A028KDH3_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli 1140 GN=AU08_08265 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		1.1	1.1	11	tr L3JB20 L3JB20_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli KTE236 GN=A197_01167 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.85	0.85	17.1	tr S1CG00 S1CG00_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli KTE52 GN=A1SC_01829 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.8	0.8	5.8	tr V5DW56 V5DW56_ECOLX	Phage antitermination protein N OS=Escherichia coli CE516 GN=L342_1980 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.7	0.7	12.9	tr T9A097 T9A097_ECOLX	D-tagatose-1,6-bisphosphate aldolase subunit GatY OS=Escherichia coli UMEA 3200-1 GN=gatY PE=3 SV=1	ECOLX	0
		0.52	0.52	2.1	tr U9V759 U9V759_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli SCD1 GN=L912_1669 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.49	0.49	6.1	tr T7VTB3 T7VTB3_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli HVH 197 (4-4466217) GN=G849_02562 PE=4 SV=1	ECOLX	0

**Figura 28. Reporte de resultados para el análisis de banda 2 por Espectrometría de masas (EM).**

Banda 3	MS-2014-009-003	5.7	5.7	24.8	trjX7QWU5jX7QWU5_ECOLX	2,3-bisphosphoglycerate-dependent phosphoglycerate mutase OS=Escherichia coli BIDMC 6 GN=ggmA PE=3 SV=1	ECOLX	3
		2	2	19.5	trjN3KGT8jN3KGT8_ECOLX	Bacterial extracellular solute-binding s_3 family protein OS=Escherichia coli MP020980.1 GN=ECMP0209801_2212 PE=3 SV=1	ECOLX	1
		1.1	1.1	4.3	trjV3AP39jV3AP39_ECOLX	Lambda family phage tail tape measure protein OS=Escherichia coli BIDMC 37 GN=L474_00003 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.74	0.74	32.7	trjQ1RF50jQ1RF50_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli (strain UT189 / UPEC) GN=UT189_C0513 PE=4 SV=1	ECOUT	0
		0.62	0.62	3.9	trjM9DUS3jM9DUS3_ECOLX	Malate synthase G OS=Escherichia coli 174750 GN=glcB PE=1 SV=1	ECOLX	0
		0.62	0.62	9.1	trjE9UES6jE9UES6_ECOLX	Phage capsid scaffolding protein GpO OS=Escherichia coli MS 57-2 GN=HMPREF9532_03542 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.59	0.59	5.8	trjV5DW56jV5DW56_ECOLX	Phage antitermination protein N OS=Escherichia coli CE516 GN=L342_1980 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.49	0.49	11.4	trjN2WFT5jN2WFT5_ECOLX	Reverse transcriptase family protein OS=Escherichia coli P0299438.10 GN=ECP029943810_4798 PE=4 SV=1	ECOLX	0

**Figura 29. Reporte de resultados para el análisis de banda 3 por Espectrometría de masas (EM).**

Banda 4	MS-2014-009-004	4	4	23.2	trjX7QVJ3jX7QVJ3_ECOLX	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) OS=Escherichia coli BIDMC 6 GN=L432_05391 PE=3 SV=1	ECOLX	2
		2.25	2.25	7.5	trjA0A028KDH3jA0A028KDH3_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli 1140 GN=AU08_08265 PE=4 SV=1	ECOLX	1
		1.7	1.7	3.2	trjV3AP39jV3AP39_ECOLX	Lambda family phage tail tape measure protein OS=Escherichia coli BIDMC 37 GN=L474_00003 PE=4 SV=1	ECOLX	1
		1.05	1.05	5.8	trjV5DW56jV5DW56_ECOLX	Phage antitermination protein N OS=Escherichia coli CE516 GN=L342_1980 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.81	0.81	20.4	trjX7QRD4jX7QRD4_ECOLX	ABC-type organic solvent transporter OS=Escherichia coli BIDMC 6 GN=L432_07708 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.68	4	23.2	trjN3TM12jN3TM12_ECOLX	NAD(P)H dehydrogenase (quinone) OS=Escherichia coli P0304777.11 GN=wrbA PE=3 SV=1	ECOLX	2
		0.68	0.68	10.5	trjW1F0P1jW1F0P1_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli ISC7 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.59	0.59	6.3	trjV4D052jV4D052_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli HVH 148 (4-3192490) GN=G806_05002 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.48	0.48	4.8	trjT9L0J3jT9L0J3_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli UMEA 3490-1 GN=G976_04509 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.47	0.47	5.6	trjW1DFR8jW1DFR8_ECOLX	Mannose-specific adhesion FimH OS=Escherichia coli IS35 PE=4 SV=1	ECOLX	0

**Figura 30. Reporte de resultados para el análisis de banda 4 por Espectrometría de masas (EM).**

Banda 5	MS-2014-009-005	4.07	4.07	24	tr[L4IW38]L4IW38_ECOLX	DNA protection during starvation protein OS=Escherichia coli KTE144 GN=dps PE=3 SV=1	ECOLX	1
		2.11	2.11	22.4	tr[X7QMT9]X7QMT9_ECOLX	Osmotically-inducible protein Y OS=Escherichia coli BIDMC 6 GN=L432_08736 PE=4 SV=1	ECOLX	1
		1.53	1.53	9.6	tr[V3AP39]V3AP39_ECOLX	Lambda family phage tail tape measure protein OS=Escherichia coli BIDMC 37 GN=L474_00003 PE=4 SV=1	ECOLX	1
		1.22	1.22	11.6	tr[L4JEJ6]L4JEJ6_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli KTE146 GN=A311_01378 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.7	0.7	13.9	tr[Q08JM8]Q08JM8_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli GN=orf40 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.7	0.7	3.6	tr[F4TGR9]F4TGR9_ECOLX	Putative uncharacterized protein OS=Escherichia coli M718 GN=ECJG_01981 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.6	0.6	11	tr[E9UES6]E9UES6_ECOLX	Phage capsid scaffolding protein GpO OS=Escherichia coli MS 57-2 GN=HMPREF9532_03542 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.6	0.6	5.8	tr[V5DW56]V5DW56_ECOLX	Phage antitermination protein N OS=Escherichia coli CE516 GN=L342_1980 PE=4 SV=1	ECOLX	0

**Figura 31. Reporte de resultados para el análisis de banda 5 por Espectrometría de masas (EM).**

Banda 6	MS-2014-009-006	6.01	6.01	31.8	tr[V8KLS8]V8KLS8_ECOLX	DNA protection during starvation protein OS=Escherichia coli LAU-EC7 GN=dps PE=3 SV=1	ECOLX	3
		1.7	1.7	6.7	tr[V3AP39]V3AP39_ECOLX	Lambda family phage tail tape measure protein OS=Escherichia coli BIDMC 37 GN=L474_00003 PE=4 SV=1	ECOLX	1
		1.7	1.7	7.5	tr[E9UES6]E9UES6_ECOLX	Phage capsid scaffolding protein GpO OS=Escherichia coli MS 57-2 GN=HMPREF9532_03542 PE=4 SV=1	ECOLX	1
		1.22	1.22	11.7	tr[S1CG00]S1CG00_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli KTE52 GN=A1SC_01829 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.96	0.96	10.1	tr[V1B346]V1B346_ECOLX	Hca operon transcriptional activator OS=Escherichia coli 908658 GN=HMPREF1616_03348 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.55	0.55	2.2	tr[T8NVA1]T8NVA1_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli UMEA 3052-1 GN=G902_00651 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.54	0.54	14.4	tr[X7QP18]X7QP18_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli BIDMC 6 GN=L432_09240 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.54	0.54	8.8	tr[T7A1L4]T7A1L4_ECOLX	Protein TraV OS=Escherichia coli HVH 135 (4-4449320) GN=G793_04830 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.51	0.51	5.1	tr[T9QW29]T9QW29_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli UMEA 3682-1 GN=G986_02015 PE=4 SV=1	ECOLX	0
0.49	0.49	6.7	tr[Q1R7R0]Q1R7R0_ECOUT	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli (strain UT189 / UPEC) GN=UT189_C3152 PE=4 SV=1	ECOUT	0		

**Figura 32. Reporte de resultados para el análisis de banda 6 por Espectrometría de masas (EM).**

Banda 7	MS-2014-009-007	2.21	2.21	32.9	tr X7P622 X7P622_ECOLX	LysM/BON superfamily protein OS=Escherichia coli BWH 40 GN=L408_03309 PE=4 SV=1	ECOLX	1
		2.07	2.07	27.7	tr X7QXK2 X7QXK2_ECOLX	Osmotically-inducible lipoprotein E OS=Escherichia coli BIDMC 6 GN=L432_06178 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.96	0.96	2.8	tr I2Z1G6 I2Z1G6_ECOLX	ABC transporter, ATP-binding protein OS=Escherichia coli 3003 GN=EC3003_2887 PE=3 SV=1	ECOLX	0
		0.8	0.8	5.4	tr S1CG00 S1CG00_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli KTE52 GN=A1SC_01829 PE=4 SV=1	ECOLX	0
		0.56	0.56	3.5	tr T9QN77 T9QN77_ECOLX	Uncharacterized protein OS=Escherichia coli UMEA 3682-1 GN=G986_02082 PE=4 SV=1	ECOLX	0

**Figura 33. Reporte de resultados para el análisis de banda 7 por Espectrometría de masas (EM).**