

# **TRABAJO FIN DE GRADO**

## **BIOLOGÍA**

**Alteraciones en la transcripción de los genes implicados en la síntesis del tetrasacárido de unión de heparán/condroitín sulfato en células de colon inducidas por adherencia bacteriana**

**Jorge Castro Revuelta**

**Departamento de biología funcional/Área de microbiología**

**Julio/2024**



**UNIVERSIDAD DE OVIEDO  
FACULTAD DE BIOLOGÍA**





## RESUMEN

Los proteoglicanos (PGs) son moléculas con una gran importancia en la comunicación celular, no tan solo entre las células de los organismos, sino también entre estas y la microbiota, el conjunto de seres microscópicos que habitan en el mismo. La diferente composición de esta microbiota puede alterar los procesos celulares del hospedador, haciendo efecto tanto su fisiología como su fisionomía. Por tanto, es de esperar que la presencia de estos microorganismos ejerza un efecto en la biosíntesis de PGs de las células hospedadoras

En este trabajo, se realiza un estudio para comprobar si la diferente adhesión a células colorectales HT-29, bien de una bacteria comensal, *Escherichia. coli*, o bien una patógena, *Salmonella enterica* puede provocar alteraciones en la expresión génica de las enzimas implicadas en la síntesis del *linker* o tetrasacárido de iniciación de la síntesis de PGs de heparán sulfato (HS) y condroitín sulfato (CS). En los resultados se puede comprobar cómo la adhesión de la bacteria comensal y aumenta significativamente la expresión de los genes, mientras que la adhesión a las células de la bacteria patógena la disminuye en todos los casos.

Proteoglycans (PGs) are molecules with great importance in cellular communication, not only between the cells of organisms, but also between them and the microbiota, the set of microscopic beings that inhabit it. The different composition of this microbiota can alter the host's cellular processes, affecting both its physiology and physiognomy. Therefore, it is expected that the presence of these microorganisms will have an effect on the biosynthesis of PGs in host cells.

In this work, a study is carried out to verify whether the different adhesion to HT-29 colorectal cells, either of a commensal bacteria, *Escherichia. coli*, or a pathogen, *Salmonella enterica* can cause alterations in the gene expression of the enzymes involved in the synthesis of the linker or tetrasaccharide that initiates the synthesis of heparan sulfate (HS) and chondroitin sulfate (CS) PGs. The results show how the adhesion of the commensal bacteria significantly increases gene expression, while the adhesion to the cells of the pathogenic bacteria decreases it in all cases.

# **DECLARACIÓN DE ORIGINALIDAD**

Don **Jorge Castro Revuelta** como alumno del Grado Universitario en Biología de Oviedo, declaro que el Trabajo Fin de Grado titulado: **Alteraciones en la transcripción de los genes implicados en la síntesis del tetrasacárido de unión de heparán/condroitín sulfato en células de colon inducidas por adherencia bacteriana** es de mi autoría, es original y las fuentes bibliográficas utilizadas han sido debidamente citadas.

En Oviedo a 28 de junio de 2024

Firma

## Índice

Abreviaturas .....	1
1.Introducción .....	2
1.1 El ambiente microbiano, fuente de variabilidad genética.....	2
1.2 Composición de la microbiota, funciones y patogenicidad..	3
1.3 Bacterias patógena y comensal en el colon.....	5
1.4 Los proteoglicanos y glicosaminoglicanos. ....	8
1.5 Síntesis de glicosaminoglicanos, el tetrasacárido de iniciación .....	11
2.Objetivos .....	13
3.Materiales y método.....	14
3.1 Línea celular de colon .....	14
3.2 Microorganismos.....	14
3.3 Ensayo de adhesión .....	14
3.4 Extracción de ARN.....	15
3.5 Transcripción inversa, RT-PCR.....	15
3.6 PCR en tiempo real, q-PCR. ....	16
3.7 Análisis de datos.....	17
4.Resultados .....	18
4.1 Extracción de ARN.....	18
4.2 Análisis de la alteración en la expresión génica de los genes implicados en la síntesis del <i>linker</i> . ....	18
5. Discusión.....	20
6.Conclusiones .....	25
7.Bibliografía .....	26

## **Abreviaturas**

AGCC: ácidos grasos de cadena corta

CS: Condroitín sulfato

CSPG: Proteoglicanos de condroitín sulfato

GAGs: Glucosaminoglicanos

GalNAc: N-acetilgalactosamina

GI: Gastrointestinal

GlcA: Ácido glucurónico

GlcNAc: N-acetilglucosamina

G3PDH: Gliceraldehído 3 fosfato deshidrogenasa

HS: Heparán sulfato

HSPGs: Proteoglicanos de heparán sulfato

LPS: Lipopolisacárido

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa

PGs: Proteoglicanos

q-PCR: PCR en tiempo real

RT-PCR: PCR de transcripción reversa

# 1.Introducción

## 1.1 El ambiente microbiano, fuente de variabilidad genética

Las bacterias están en estrecho contacto con el ser humano. Estos seres microscópicos habitan en la totalidad de la superficie del cuerpo y sus cavidades interiores pudiendo, en algunas ocasiones penetrar en los tejidos. Como consecuencia de este contacto, se han desarrollado interacciones interespecíficas que pueden condicionar tanto la fisiología como la fisionomía del propio cuerpo humano y de las bacterias.

Tan estrecha puede llegar a ser esta relación que hay teorías que proponen que tanto el genoma de las bacterias como el de los humanos funciona como un todo, este concepto es lo que se denomina como holobionte (Suárez, 2021).

En base a este concepto se entiende que la presencia de bacterias, tanto en composición como en cantidad, se puede entender como un ecosistema en miniatura. Este conjunto de organismos microscópicos, que no solo está compuesto por bacterias, sino que también puede estar compuesto de hongos y virus, se le denomina microbiota (Merino Rivera et al., 2021).

La microbiota, difiere entre cada persona y entre las diferentes partes del cuerpo de la persona. No hay la misma cantidad, ni composición de bacterias, en la palma de nuestra mano que en nuestro epitelio intestinal.

Nuestro colon es el tejido que alberga mayor densidad bacteriana. Los últimos estudios apuntan a que en la última parte del tracto gastro intestinal humano, la densidad de bacterias es de alrededor de  $10^{12}$  células por mL de contenido. Esto lo convierte en uno de los hábitats microbianos más poblados conocidos por ahora en el medio terrestre. Una cantidad que supera en 10 veces el número de células del cuerpo humano y hace que se multiplique por 100 la cantidad de genoma presente (Calderón, 2023).

Esta gran cantidad de bacterias se debe principalmente a tres motivos. El primero es la motilidad del epitelio, mucho más lento a partir del ciego que en todo el tramo anterior. El segundo es el pH, existente, que para las bacterias es óptimo ya que es ligeramente ácido sin llegar a sobrepasar los niveles nocivos para sus membranas. Por último, la escasez de  $O_2$ , al ser un ambiente predominantemente anóxico, facilita la colonización por parte de bacterias anaerobias y anaerobias facultativas (Calderón, 2023).

Como se ha mencionado anteriormente, la microbiota humana se va modificando con el paso del tiempo y las diferentes condiciones tanto ambientales como fisiológicas a las que se somete el individuo, condicionando a su vez la fisiología del propio hospedador (Merino Rivera et al., 2021).

Por ejemplo, se pueden observar cambios en el porcentaje de grasa acumulado por ratones que son tratados con antibióticos y aquellos en los que no. Se observa en estos roedores una interacción directa entre las bacterias pobladoras del tracto intestinal y la expresión genética de proteínas relacionadas con el metabolismo de las grasas. Además, estas modificaciones no se producen en el propio intestino, sino que las alteraciones genéticas se producen a nivel hepático demostrando también un eje de comunicación a mayor distancia bacteria-hepatocito sin un contacto directo (Cox et al., 2014).

Mientras que en los ratones tratados con penicilina se observa el incremento de la expresión génica de PPAR $\gamma$ , CD36 y FABP2 (proteína acopladora de ácidos grasos), proteínas implicadas en mecanismos de adipogénesis, en los ratones sin tratar se observó cómo la expresión de genes implicados tanto en el metabolismo del colesterol como en la síntesis de ácidos grasos es más reducida (Cox et al., 2014). Estas alteraciones génicas tienen como consecuencia cambios fenotípicos en los ratones. Los ratones en cuya microbiota intestinal domina el género *Lactobacillus* son mucho menos propensos al acúmulo de grasas. Sin embargo, los ratones tratados con antibiótico cambian su microbiota y el género *Lactobacillus* deja de ser dominante. La dominancia de especies como *Candidatus Arthromitus*, o el género *Allobaculum*, en estos ratones, producen fenotipos obesos (Cox et al., 2014). También se observa en el estudio cómo el cambio de la dominancia en la microbiota se produce paulatinamente con el paso de los años, un efecto análogo al del tratamiento con antibióticos, que demuestra una diferente capacidad del organismo de metabolizar las grasas por los cambios producidos en su microbiota como consecuencia ontogénica (Cox et al., 2014).

## 1.2 Composición de la microbiota, funciones y patogenicidad

En condiciones de eubiosis, la mayoría de las bacterias de la microbiota intestinal corresponden al filo *Firmicutes* y *Bacteroidetes*, los cuales representando el 90% de la misma.

El género *Clostridium*, constituye el principal representante del filo *Firmicutes* en la microbiota gastro-intestinal (GI). Las bacterias de este género son las principales implicadas en la liberación de ácidos grasos de cadena corta (AGCC). Estas moléculas, derivadas de la fermentación bacteriana de las fibras prebióticas, estimulan la liberación del péptido antimicrobiano catelecidina. Además, estos AGCC contribuyen a la acidificación del lumen intestinal, impidiendo la colonización de bacterias sensibles a pH ácidos (Calderón, 2023).

Otro representante del filo *Firmicutes* lo compone el género *Lactobacillus*. La especie *L. innocua*, junto con la especie *Bacteroides thetaiotaomicron*, perteneciente al filo *Bacteroidetes*, constituyen los principales estimulantes de las células de Paneth para que estas secreten *mucus*. Este *mucus* cumple dos funciones en nuestro intestino. El primero, formar una barrera frente a los posibles

microorganismos colonizadores, y el segundo, mantener un ambiente microbiano estable y proteger a las bacterias que ya habitan este epitelio intestinal (Calderón, 2023).

También se encuentran enterobacterias como *Escherichia coli* Nissle 1917 (EcN, serotipo O6:K5:H1), que puede habitar el tracto GI tanto de animales como de personas, sin causar ningún daño, y además liberan al medio bacteriocinas. Esta capacidad antimicrobiana puede usarse como tratamiento contra infecciones de *Salmonella* spp. (Calderón, 2023).

La microbiota cumple también funciones inmuno-reguladoras muy importantes. En animales gnotobióticos, la ausencia de microbiota intestinal provoca un aumento de células NK (natural killer) en el intestino y pulmón, aumentando así el riesgo de colitis y asma (Calderón, 2023) .

Además, la presencia de géneros como *Faecalibacterium* spp., *Roseburia*, spp., *Dialister* spp., *Rothia* spp. y *Enterococcus* spp., favorecen la producción, en las células plasmáticas de la mucosa intestinal, de inmunoglobulina A en lugar de inmunoglobulina E. Esto se asocia con una menor predisposición a sufrir alergias. Por otro lado, también esta inmunoglobulina A interviene en la comunicación cruzada de las bacterias comensales del lumen intestinal y las células epiteliales, incrementando la producción de glicoproteínas principal componente del *mucus* (Calderón, 2023).

Las bacterias son partícipes también en procesos metabólicos. En el colon, especies que son capaces de digerir la materia vegetal, como puede ser la lignina, ayudan al proceso del tránsito intestinal. Otras generan en sus procesos metabólicos vitaminas como la K o B12 o ácidos como el fólico o el pantoténico, sustancias de vital importancia aprovechables por el hospedador. También la presencia de bacterias como *Oxalobacter* spp. *Formigenes* spp., y *Bifidobacterium* spp. eliminan sustancias procedentes de la fermentación colónica, por ejemplo el oxalacetato que pueden ser perjudiciales si son absorbidas por el hospedador (Calderón, 2023).

La patogenicidad de la microbiota puede surgir por dos motivos. Que las bacterias no comensales ya presentes, aumenten su número excesivamente por algún fallo en el sistema inmunológico o procesos fisiológicos del hospedador, o bien que la reducción de la concentración de bacterias comensales tenga como consecuencia la invasión del nicho por bacterias patogénicas, o que estas cuenten con mecanismos capaces de desplazar a las primeras.

Un ejemplo del primero de estos casos es la actividad antimicrobiana que presenta la bacteria *L. vaginalis* frente al hongo *Candida albicans*. Cuando la concentración de esta bacteria se ve reducida tanto en el epitelio como en la mucosa de la vagina, el hongo, que siempre está presente en la superficie de los epitelios, es capaz de desarrollar sus hifas, penetrando en las células escamosas. Esto se debe a que la desaparición de *L. vaginalis* provoca la pérdida de la biopelícula que forman las bacterias sobre estas células escamosas que actúa como barrera protectora (Parolin et al., 2021).

Como ejemplo de la segunda situación, las bacterias del género *Shigella*, un patógeno verdadero, al entrar en contacto con nuestras células epiteliales provoca desbalances de su contenido hídrico y son capaces de evitar al sistema inmunológico primario. Su dosis infectiva es muy baja, 100 bacterias son capaces de producir infección. En el intestino delgado se adhieren a los enterocitos y producen la toxina Shiga, enterotoxina que provoca que los enterocitos expulsen agua de su interior. Una vez llega al intestino grueso es capaz de unirse a las células M, situadas entre los colonocitos, y atravesarlas evadiendo la acción de los macrófagos a los que les induce la apoptosis (Johannes, 2017).

### 1.3 Bacterias patógena y comensal en el colon

En el presente estudio se utilizarán dos enterobacterias que están presentes a lo largo de todo el tractoGI: una comensal, *E. coli* y un patógeno, *S. enterica*.

#### *Salmonella enterica*.

Bacterias Gram- pertenecientes a la familia de enterobacterias. Son anaerobias facultativas y presentan forma bacilar. Estas bacterias que pueden vivir tanto fuera como dentro de las células. Tiene un sistema de motilidad basado en un flagelo periférico. Son siempre bacterias patogénicas, que pueden infectar tanto personas como animales. El género *Salmonella* cuenta con dos especies principales *S. enterica* y *S. bongori* (Andino & Hanning, 2015).

Esta primera especie, objeto del estudio, es la causante de los procesos infecciosos, que se manifiestan con vómitos y diarreas, una vez el patógeno ha colonizado el *mucus* intestinal, o bien, se ha introducido dentro de las células del hospedador. Puede dividirse en 6 subespecies que a su vez pueden ser clasificadas en varios serotipos, más de 2600 (Andino & Hanning, 2015).

Los dos serotipos de *S. enterica* mejor estudiados son *S. enterica* serotipo *typhimurum* que causa la gastroenteritis común y tan solo se queda sobre las células del intestino, y *S. enterica* serotipo *typhi*, causante de las fiebres tifoideas, que puede instalarse bajo el epitelio intestinal, pasar a la sangre y diseminarse y colonizar cualquier parte del organismo (Jiménez & Castro, 2003).

Los procesos infecciosos causados por *S. typhi* son los más graves. La diarrea que provocan puede venir acompañada de restos de reacciones inmunológicas, a nivel intestinal, que provocan una degradación del tejido, las denominadas diarreas blancas. Además provoca fiebres entéricas que suelen ir acompañadas de otros síntomas como pueden ser úlceras intestinales, cambios de color en las papilas gustativas y erupciones cutáneas (Andino & Hanning, 2015).

Sin embargo, en la mayoría de las salmonelosis, causadas por *S. typhimurum*, no desarrolla fiebres entéricas y los síntomas consisten en una pequeña diarrea y vómitos que no suelen perdurar más de una semana. Pero también puede producirse una infección crónica, que puede derivar en artritis reactiva aséptica conocida como síndrome de Reiter (Andino & Hanning, 2015).

*Salmonella* spp, se puede transmitir por la vía fecal-oral o bien directamente desde los alimentos. Esta bacteria puede acumularse y resistir como biofilms en grandes acúmulos de agua, como consecuencia de una contaminación fecal de las aguas, pero de manera genérica el patógeno hoy en día suele estar presente en aves de corral o en los huevos y sus derivados mal conservados o tratados (Andino & Hanning, 2015).

### *Escherichia coli*

Bacterias pertenecientes a la familia de las enterobacterias. Gram-, con forma bacilar y anaerobias facultativas.

La gran cantidad de serotipos existentes en esta especie hace que su distribución por el organismo humano sea prácticamente global. Aunque, si bien es cierto que en muchas zonas su mera presencia ni beneficia ni perjudica al hospedador, cuando su concentración se ve aumentada o llegan a lugares en los que de manera normal no están presentes debido a las islas de patogenicidad que poseen en su ADN tan variable, desarrollan procesos infecciosos (Ramos et al., 2020).

Las subespecies y serotipos comensales de *E. coli* no producen factores de virulencia, pese a que pueden estar en su código genético. De esta manera no dañan la continuidad del epitelio intestinal (Cañas,2017).

La presencia de *E. coli* comensal proporciona a la microbiota del hospedador varios efectos probióticos. Estimula la producción de beta defensina 2, molécula implicada en la protección de la mucosa frente a la adhesión de bacterias patógenas. Restaura el epitelio intestinal dañado a través de la modulación de proteínas de unión estrecha y la *zonula occludens*. Concretamente, la especie *E. coli* Nissle 1917 (EcN) posee una mutación genética del gen del antígeno O6, un componente del lipopolisacárido (LPS), que se traduce como un codón de parada que acorta las cadenas de LPS, provocando una inmuno-regulación por estimulación de proteínas de activación del complemento, pero sin producir respuesta virulenta (Cañas,2017).

### Adherencia bacteriana

Ya sea en bacterias comensales o patogénicas, hay un elemento común en cuanto a su adhesión, y es que toda la maquinaria para poder establecerse y colonizar nuestro tracto GI, se encuentra en sus islas de patogenicidad.

Tanto *S. enterica* como *E. coli* poseen un sistema de secreción de proteínas de Tipo III (Ilustración 1), que inyecta factores directamente al citoplasma de la molécula hospedadora, lo que provoca en las mismas una reorganización del citoesqueleto, tornando de este modo la superficie celular un mejor hábitat bacteriano y permitiendo su establecimiento (Jiménez & Castro, 2003).

Este sistema de secreción molecular se puede encontrar específicamente en islas de patogenicidad 1, secuencias concretas en los cromosomas tanto de *Salmonella* spp como en especies no

patogénicas como *E. coli* K-12. Tras la expresión del sistema de secreción y su internalización en la célula, la expresión génica de la isla de patogenicidad 2, provoca cambios en el citoplasma celular que permiten la supervivencia de *Salmonella* spp. (Ilustración 2) (Hensel, 2000).

Previo al paso anterior y por lo menos en el caso de *Salmonella*, existen 4 tipos de fimbrias que les ayudan a conseguir un contacto cerrado con las células hospedadoras. Estas fimbrias responden a cambios en el medio como pueden ser el pH y la osmolaridad (Jiménez & Castro, 2003).

Por su parte las cepas no patogénicas de *E. coli* pueden secretar factores que benefician su propia colonización del medio, denominados factores *fitness* como pueden ser las microcinas, adhesinas, sistemas de captación del hierro o proteasas. Ejemplos de estos factores *fitness* son la adhesina FimA o la fimbria FC1, necesarias para la formación de biopelículas bacterianas (Cañas, 2017).

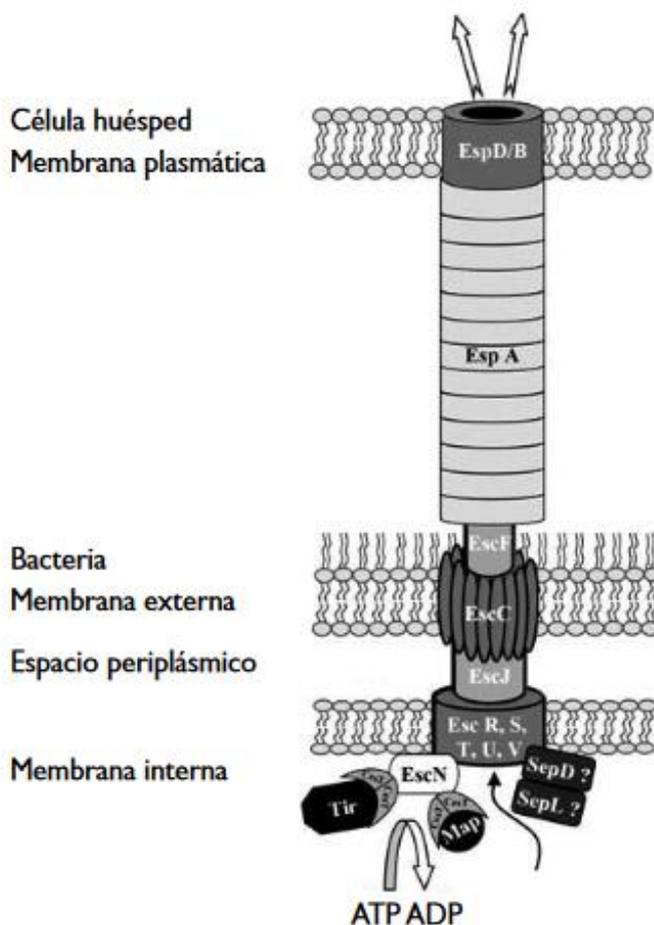


Ilustración 1 Mecanismo de secreción utilizado por las bacterias sometidas a estudio para transmitir al citoplasma de la célula diana moléculas que provocan la reorganización del citoesqueleto de la misma, modificando los filamentos de actina (Vidal et al., 2007).

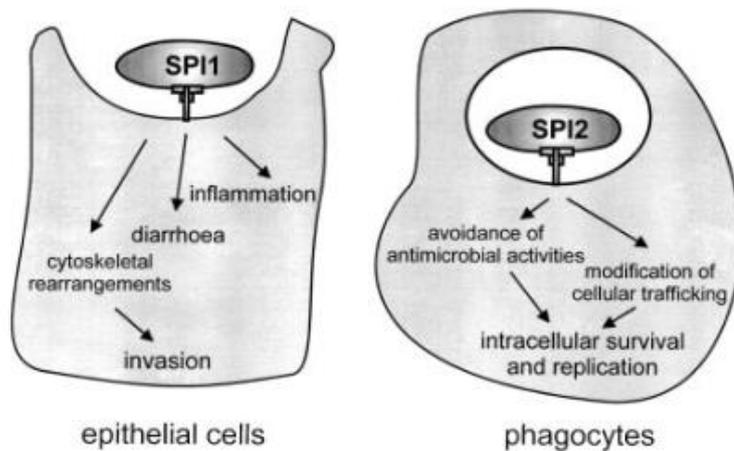


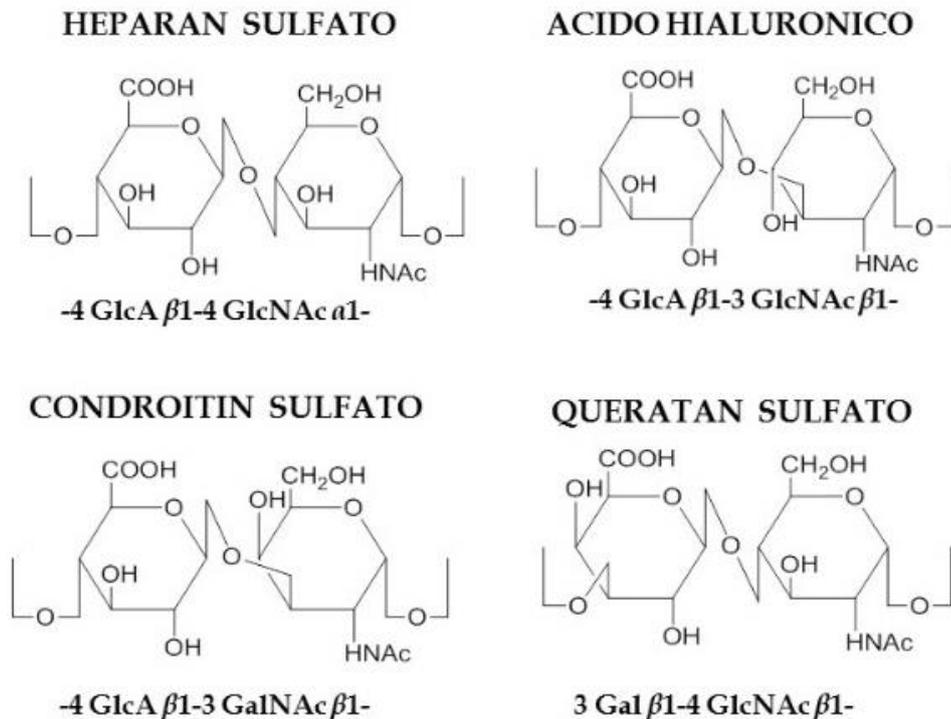
Ilustración 2: Cambios celulares que provocan la expresión diferencial de las distintas islas de patogenicidad de *Salmonella* (Vidal et al., 2007).

## 1.4 Los proteoglicanos y glicosaminoglicanos

Los proteoglicanos (PGs) son moléculas químicamente muy complejas, constituidas por una proteína núcleo a las que se le unen covalentemente cadenas de polisacáridos específicos que se denominan glicosaminoglicanos (GAGs). Están presentes tanto en la matriz extracelular como en las membranas celulares de todos los tejidos de los animales con tejidos verdaderos, pudiendo llegar incluso a veces a presentarse en el interior de nuestras células. El significado de la amplia localización de estas moléculas químicas es que están directamente relacionadas con los procesos de comunicación y señalización (Iturbe, 2014).

La estructura de los GAGs se basa en la repetición de unidades de disacáridos compuestos por una hexosamina N-acetilada o N-sulfatada y un ácido urónico, que son productos de la oxidación del C-6 en los monosacáridos glucosa, galactosa o manosa. Pueden ser clasificados en función de la composición de esta unidad sacarídica en cuatro grupos principales: heparán sulfato (HS), condrotín sulfato/dermatán sulfato (CS), ácido hialurónico y keratán sulfato (KS) (López, 2021).

Las diferencias entre los disacáridos pueden ser muy sutiles. Se diferencian solamente en si sus componentes son glucosa o galactosa, el carbono en el cual se produce la N-acetilación o la N-sulfatación y los carbonos en los que se produce el enlace O-glucosídico, proceso por el cual se unen los dos monómeros de estos carbohidratos. (Ilustración 3). Esta posición estereoquímica distinta del oxígeno también condiciona la electronegatividad de las moléculas.



*Ilustración 3: Estructura química de las unidades disacarídicas que forman los distintos tipos de glicosaminoglicanos (López, 2021).*

Los GAGs de HS y CS están formados por una unidad de ácido glucurónico (GlcA) y otra de N-acetilglucosamina (GlcNAc) que se unen por un enlace beta 1-4 en el caso del HS, una molécula de GlcA y otra de N-acetilgalactosamina (GalNAc) unidos por un enlace beta 1-3 en el caso de CS (Ilustración 3) (López, 2021).

Los PGs de HS (HSPGs) son los más importantes del organismo, esto se debe a que además de estar localizados tanto en la superficie celular como en todas las matrices extracelulares de nuestro cuerpo, poseen una gran versatilidad debida a la gran cantidad de modificaciones enzimáticas que pueden sufrir estas moléculas. Esto les permite una gran capacidad de almacenamiento de información biológica. Tanto es así, que este código molecular de información contenida en las cadenas de GAGs de este PG es conocido como “heparoma”(López, 2021).

Además, teniendo en cuenta que la proteína núcleo es distinta en los diferentes PGs, y que alguna vez pueden aparecer moléculas de CS junto a las de HS, la variedad se ve incluso aumentada(López, 2021).

Los HSPGs pueden clasificarse en distintos tipos en función de su composición. Hay HSPGs que tiene una localización específica como podemos observar en la siguiente imagen:

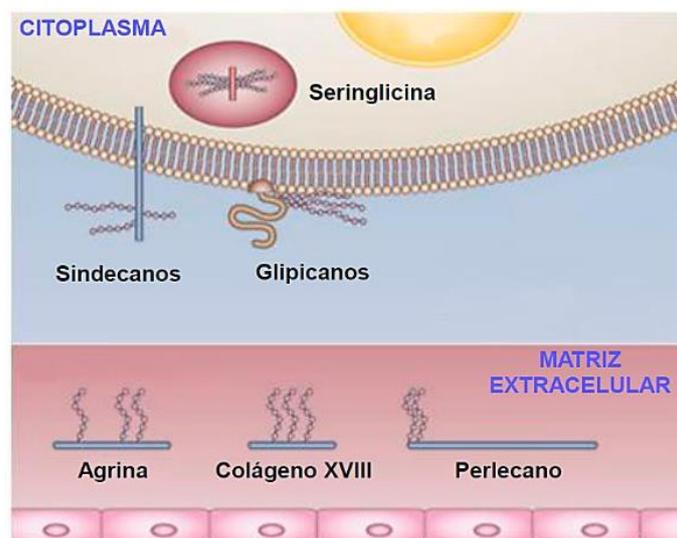


Ilustración 4: Tipos de PGs de HS su localización en los organismos (López, 2021)

Dentro de los HSPGs, los sindecanos y glipicanos tienen una gran importancia en la comunicación intercelular.

Los sindecanos pueden retrasar la angiogénesis, impidiendo la migración de células endoteliales. Gracias a sus cadenas de HS pueden marcar gradientes morfológicos imprescindibles durante la etapa del desarrollo. Pueden funcionar tanto como receptores para iniciar los procesos de endocitosis como pueden estar involucrados en la expulsión de vesículas, así como su transporte citosólico gracias a su parte proteica transmembrana. Actúan como co-receptores junto a los receptores de tirosín-quinasa. Son los principales encargados del tráfico de moléculas lipídicas, desde su trasvase del hígado a más partes del cuerpo, hasta de su absorción intestinal (Iozzo & Schaefer, 2015).

Una característica muy importante de estos HSPGs, que no es única de ellos, es que son capaces de escindir sus cadenas de GAGs que quedan unidas a otras moléculas o células mediante reacciones inmunológicas contra estas (Iozzo & Schaefer, 2015).

Los glipicanos, a diferencia de los sindecanos, presentan las cadenas de HS muy próximas a la membrana celular. Sin embargo, su radio de acción es mucho mayor, ya que son más extensas. Están implicados en el crecimiento tumoral, en condiciones de alteración del organismo, y procesos angiogénicos. Son receptores de alta afinidad de moléculas de comunicación intercelular como son las *Sonic hedgehog*. Las propias células pueden cambiar la afinidad de estos HSPGs cambiando las concentraciones de sulfatación de las cadenas de GAGs (Iozzo & Schaefer, 2015).

Por su parte, los HSPGs seringlicina cumplen un papel fundamental en el transporte citosólico de vesículas. Su adherencia a moléculas citosólicas cumple dos funciones. La primera es actuar como sensor para la célula, ya que la sulfatación y longitud de las cadenas de HS que muestran los PGs seringlicina unidos a moléculas diana informa a la célula del lugar de destino. Por otra parte, estas

mismas cadenas de HS sirven como anclaje a los filamentos de actina que están en continuo proceso de polimerización y despolimerización dentro del citosol, lo que permite el avance guiado de las moléculas de interés (Iozzo & Schaefer, 2015).

Por su parte, los PGs de CS (CSPGs), constituyen el principal PG que se encuentra en la matriz extracelular, además de ser uno de los principales componentes del cartílago. También es un factor importante en el biofuncionamiento de los tendones y ligamentos. La resistencia de estos tejidos orgánicos depende en gran medida de la cantidad y del posicionamiento de los grupos sulfato que se unen al disacárido y lo polimerizadas que puedan verse las cadenas (Rico, 2021.).

Este sulfatamiento, al igual que en el caso de lo HSPGs influye en la electronegatividad de los CSPGs y condiciona su manera de interactuar con otras moléculas. Dentro de la matriz extracelular del sistema nervioso central, que es la principal localización de estas moléculas, interacciona con factores de crecimiento celular y por ende es esencial para la formación, desarrollo y mantenimiento de estructuras como el cerebro. (Rico, 2021.).

## 1.5 Síntesis de proteoglicanos, el tetrasacárido de iniciación

El proceso de síntesis y ramificación de los PGs, es un proceso bioquímico de alta complejidad que requiere gran cantidad de pasos secuenciales. Si bien es cierto que la mayoría de su procesamiento tiene lugar en el aparato de Golgi, el primer paso tiene lugar en el citoplasma (Rico,2021).

De los seis grupos de GAGs que se conocen, tanto el HS como el CS, empiezan la ruta, previa a la entrada al aparato de Golgi, con una secuencia tetrasacáridica común Xyl-Gal-Gal-GlcA, que se unen entre sí por enlaces de tipo beta (1-3 y 1-4) y unidos por el átomo de oxígeno de un aminoácido de serina a su correspondiente proteína núcleo (Rico,2021). Este tetrasacárido conforma el denominado *linker* o secuencia de iniciación.

El primer paso de la síntesis consiste en anexionar a la serina de la proteína núcleo un residuo de xilosa a partir de uridin-difosfato-xilosa (UDP-Xyl) por acción de dos xilosiltransferasas, XYLT-1 y -2; A continuación, las galactosiltransferasas I y II, que son codificadas por los genes B4GALT7 y B3GALT6, respectivamente, se encargan de transferir los residuos de galactosa. Estas transferasas utilizan como donador la UDP-galactosa (UDP-gal) (López,2021).

Después de esto, y antes de producirse la entrada al aparato de Golgi, tan solo el primer residuo de xilosa es fosforilado. De esto se encarga una quinasa codificada por el gen FAM20B y funciona como una señal para que se active la enzima glucuroniltransferasa I (GlcAT-I), que está codificada por el gen B3GAT1, encargado de catalizar la transferencia desde el UDP-GlcA del residuo GlcA. Este gen posee dos análogos, B3GAT2 y B3GAT3. Al mismo tiempo que se está produciendo esta reacción, hay otra enzima, la 2-fosfoxilosa fosfatasa, codificada por el gen PXYLP1, que retira el

fosfato que inicialmente se añadió al residuo de xilosa, y así se configura, finalmente, la estructura química del *linker* (Ilustración 5).

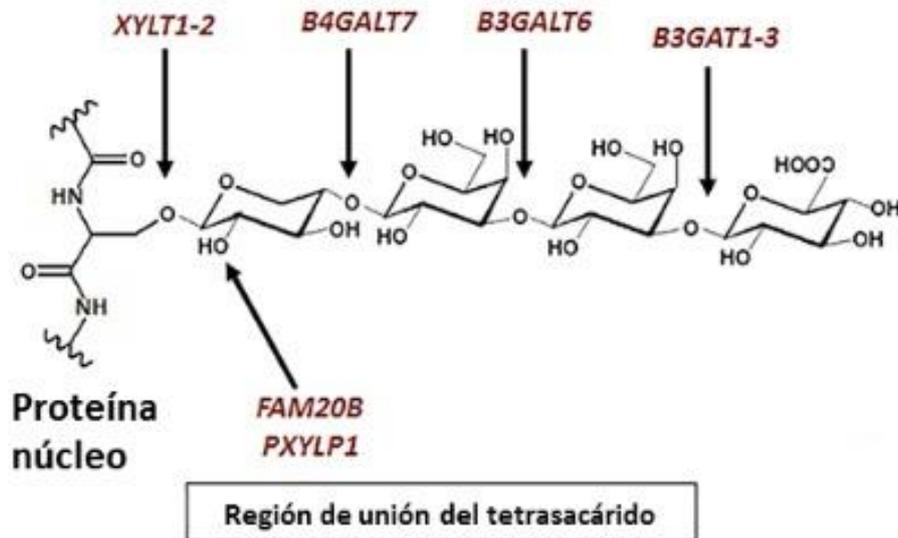


Ilustración 5: Estructura final del linker de HS y CS, genes que actúan en cada paso (López, 2021)

## 2.Objetivos

El objetivo principal consistió en estudiar si la presencia, o bien de bacterias comensales o bien de bacterias patógenas, es capaz de alterar, con su adhesión a los colonocitos, la expresión génica de los genes implicados en la iniciación de la secuencia polisacáridica de los GAGs heparán y condroitín sulfato.

Se siguieron los siguientes pasos:

1. Cultivo de bacteria comensal *E. coli* y de bacteria patógena *S. enterica*.
2. Cultivo de una línea celular de colon HT29.
3. Obtención del ARN eucariota total de la línea celular de colon en ausencia y presencia de cada bacteria.
4. Síntesis del ADNc a partir del ARN extraído.
5. Realización de un análisis por PCR a tiempo real de la transcripción diferencial de los genes codificadores de transferasas XYLT1, XYLT2, B4GALT7, B4GALT6, B3GAT1 y BAGT3 en cada una de las condiciones experimentales.
6. Realización de un análisis comparativo de los resultados e interpretación del posible efecto de la adhesión bacteriana sobre de la expresión la batería de genes anteriormente mencionados.

### **3. Materiales y método**

#### **3.1 Línea celular de colon**

La línea celular de colon utilizada para el procedimiento experimental fue la línea HT-29, originaria de un carcinoma colorrectal.

Utilizando placas de cultivo, de la marca Thermo Fisher Scientific, que han sido diseñadas y tratadas para permitir la adherencia celular, se lleva a cabo un cultivo de estas células.

Se utiliza un medio de cultivo DMEM (Dulbecco's Modified Eagle's essential medium), al cual se le añadieron, suero fetal bovino a una concentración del 10%, un antifúngico (anfotericina) y dos antimicrobianos (estreptomina y penicilina G), para evitar las posibles contaminaciones en el cultivo.

Tras esto, se mantuvieron y dejaron crecer a una temperatura de 37°C y una atmósfera húmeda con un 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.2 Microorganismos**

Se realizaron dos cultivos celulares de las enterobacterias, uno de *S. enterica* y otro de *E. coli*.

A partir de cada uno de los cultivos ya crecidos, se inocularon en 10 mL de medio BHI, Brain Heart Infusion, a una concentración del 1%. Se dejaron incubar en agitación durante 16 horas a una temperatura de 37°C hasta que alcanzaron una densidad óptica a 600 nm de 0,5

Los cultivos resultantes se sometieron a un centrifugado de 5 minutos de duración a 10.000 rpm. El sedimento celular se resuspendió en 1 mL de DMEM libre de antibiótico.

#### **3.3 Ensayo de adhesión**

Utilizando una placa previamente tratada, que alberga 6 pocillos de 9,6 cm<sup>2</sup>, se inoculan las células HT-29 procedentes del primer cultivo en DMEM, y se dejan crecer nuevamente en esta placa en las condiciones anteriormente mencionadas hasta que alcanzan una confluencia del 90%. Tras esto, el medio de la placa es aspirado y se le aplica un lavado con PBS (Phosphate Buffered Saline) varias veces. De este modo se asegura, por un lado, que se retira del cultivo las células muertas sobrantes, que podrían ser diana de las bacterias, y por el otro se retira del cultivo los antibióticos añadidos anteriormente, que frenarían el crecimiento de las bacterias tras su inoculación.

Se utilizan los 6 pocillos de la placa para crear condiciones experimentales por duplicado. En los dos primeros se añade 2mL de DMEM sin antibiótico, y actuarán como los pocillos de control.

En los otros cuatro pocillos se inoculan las bacterias, de tal manera que en 2 de ellos se cultivarán junto a 400 µl de la suspensión bacteriana de *E. coli* y 1,6 mL de medio DMEM sin antibiótico y en los dos restantes se añaden 400 µl de solución bacteriana correspondiente al patógeno *S. enterica* y se completará de nuevo con 1,6 mL de medio DMEM sin antibiótico.

Tras esto se deja que las bacterias estén en contacto con las células HT-29 durante 2h. Luego se realiza un nuevo lavado con PBS, para eliminar todas aquellas bacterias que no hayan conseguido adherirse a ninguna célula.

Tras el proceso de lavado, se añaden nuevamente al cultivo 2mL de DMEM sin antibiótico, y se deja de nuevo el cultivo en incubación por 6 horas más. Al cabo de estas se procede a una nueva ronda de aspirado y lavado del medio de cultivo, utilizando de nuevo PBS.

Como paso final se somete esta placa de cultivo a una congelación a -80°C.

Cabe mencionar que todos los procesos de manipulación directa sobre los cultivos celulares iniciales, los cultivos bacterianos y sobre la última placa de cultivo que se usa para la extracción de ARN, se realizan bajo una campana de flujo laminar para evitar las posibles contaminaciones del medio.

### **3.4 Extracción de ARN**

Para este proceso, que se llevó a cabo sobre los 6 pocillos de la placa (juntando los pocillos de la misma condición), se utilizó un kit “RNeasy Mini Kit” siguiendo el protocolo de la casa comercial del kit (Qiagen). También se llevó a cabo a un tratamiento con ADNasa libres de ARNasas de la misma casa comercial del kit utilizado para la extracción del ARN, para así poder eliminar posibles restos de ADN que puedan actuar posteriormente como contaminantes e interfieran en los procesos de q-PCR y obtención de ADN inverso.

Para concluir se realizó la cuantificación total del ARN obtenido de los cultivos mediante una espectrometría haciendo uso de un Picodrop (Picodrop, UK).

### **3.5 Transcripción inversa, RT-PCR**

El siguiente paso consistió en someter al ARN obtenido a un procedimiento de RT-PCR que permita obtener el ADN complementario. Este ADNc será necesario para poder llevar a cabo la q-PCR, ya que será la base de nucleótidos utilizada para cuantificar la cantidad de expresión de los genes que codifican los enzimas implicados en la síntesis del *linker*.

Para este proceso se ha utilizado un kit “High Capacity cDNA Reverse Transcription”, fabricado por Applied Biosystems, y se ha seguido el protocolo recomendado por la marca.

Para la reacción es necesario realizar la mezcla de:

- 2  $\mu$ l de mezcla de cebadores.
- 2  $\mu$ l de tampón.
- 0,8  $\mu$ l de mezcla de dNTPs
- 1  $\mu$ l de transcriptasa reversa.
- 1,5  $\mu$ l de ARN extraído.
- H<sub>2</sub>O hasta completar un volumen final de reacción de 20  $\mu$ l.

La reacción tuvo lugar en un termociclador bajo las siguientes condiciones:

- 10 minutos a 25°C.
- 2 horas a 37°C.
- 5 minutos a 85°C.
- Mantenimiento a 4°C hasta la retirada de las muestras del aparato.

### 3.6 PCR en tiempo real, q-PCR.

A continuación, utilizando el ADNc procedente de la prueba anterior, se lleva a cabo una PCR en tiempo real. Se utilizó para la prueba un kit “PowerSYBR Green PCR Master Mix”, de la compañía farmacéutica Applied Biosystems. Para la misma se utiliza una placa de 96 pocillos de la marca Axygen. Para este experimento fueron necesarios 72 pocillos, que fueron rellenados, cada uno de ellos, con 10  $\mu$ l de las soluciones que fueron preparadas de la siguiente manera:

- 5  $\mu$ l de reactivo SYBR Green.
- 2  $\mu$ l de H<sub>2</sub>O.
- 1  $\mu$ l del ADNc obtenido en la RT-PCR.
- 2  $\mu$ l de oligonucleótidos. (Tabla 1)

Las reacciones se llevaron a cabo en una máquina 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems), situada en el edificio de los Servicios Científico-Técnicos (SCTs) de la Universidad de Oviedo.

También se utiliza y se somete al proceso al gen gliceraldehído-3-fosfato deshidrogenas (G3PDH), como gen de referencia, para normalizar la expresión de los genes sometidos a estudio en las diferentes condiciones experimentales.

Gen	Enzima	Oligos	Secuencias	Tm del amplicón
XYLT1	Xilosiltransferasa 1 (Xyl 1)	XT-1D XT-1R	ACTACCCCATCAGGACAAATGA CTGCTCCGAATGAACCTTG	78
XYLT2	Xilosiltransferasa 2 (Xyl 2)	Xyl2 D Xyl2 R	AGGGCCTGGTAGTGTGGAG TGAAGTGTCTGTGTCCTTGAA	85
B4GALT7	Galactosiltransferasa I	GalT7 D GalT7 R	GCGAGGACGACGAGTTCTAC CTCCACCCTCTTACCACTACA CAGGTGGCGAAATGTCTTGTA ATCCATTGCACAGCCGGTA	81
B3GALT6	Galactosiltransferasa II	GalT6 D GalT6 R	CACGTGGCCTTCGAGTTC CCGAGAAGAAGCCCCAGTA	90
B3GAT3	Glucuroniltransferasa I	GAT3 D GAT3 D	GAAGAACGTGTTTCTCGCCTAC CCTCAGATCCTTCTGCCGTA	85
B3GAT1	Glucuroniltransferasa III	B3gat1 D B3gat1 R	TGGTGAATGAGGGCAAGAA CTTAGGAGTCGGCCTTGGA	83

Tabla 1 Secuencias de oligonucleótidos correspondientes para cada gen analizado por q-PCR junto a las Tm (temperaturas de melting) de cada uno de los amplicones.

### 3.7 Análisis de datos

Para tratar los datos obtenidos de la q-PCR se utilizan dos programas informáticos. Por un lado, el programa “SDS 2.3” AppliedBiosystems, con el cual se valora la validez de los datos obtenidos. A través de este programa se puede comprobar que tanto la temperatura de *melting* de los amplicones como su Ct, el ciclo umbral, son los esperados. Tras la validación, el estudio estadístico se lleva a cabo con el programa “Statistica” de la compañía Statsoft Inc, para Windows. La prueba estadística utilizada es una T-student, en la que se enfrentaron los datos obtenidos de cada uno de los genes en las condiciones bacterianas contra la expresión génica en las células de control, tomando como significativos todos aquellos valores con un p-valor menor de 0,05.

## 4.Resultados

### 4.1 Extracción de ARN

Los resultados obtenidos tras procesar las muestras de ARN y someterlas a espectrometría con la máquina Picodrop reflejan las siguientes cantidades, expresadas en nanogramos, en cada cultivo celular.

Grupo experimento	ARN extraído (ng)
Control	5256
<i>E. coli</i>	2244
<i>S. enterica</i>	6132

Tabla 2 Cantidad de ARN extraído de cada cultivo celular en nanogramos.

### 4.2 Análisis de la alteración en la expresión génica de los genes implicados en la síntesis del *linker*

En el diagrama de barras (Ilustración 6) se observa cómo hay una clara tendencia en la expresión de los genes a aumentar, en el caso de colonocitos en contacto con bacterias *E. coli* comensales, y a reducir su expresión en aquellos que se encuentran sometidos al patógeno *S. enterica*.

En el caso del primer gen, XYLT1, se obtiene un p-valor de 0,0072, de significancia de su aumento en cuanto a expresión en presencia de *E. coli*. Por su parte, este gen en condiciones de *S. enterica* fue descartado. Tras su análisis en el programa SDS 2.3 se encontraron valores distintos de su correspondiente Tm en los tripletes analizados, por lo que su valor tuvo que ser descartado. Este fallo en la detección del amplicón puede ser debido a que su nivel de expresión sea tan bajo que no llega al límite mínimo de detección (Ilustración 6).

El segundo gen analizado, XYLT2, muestra resultados significativos sólo en el caso de la presencia de *E. coli*, con p-valor de 0,020, mientras que, en el caso de este gen en presencia de la bacteria patógena *S. enterica*, su expresión, a pesar de ser menor respecto al control, no resulta significativo, con un p-valor de 0,09 (Ilustración 6).

En el caso del gen B4GALT7, ambos resultados son significativos, tanto como en el caso de la bacteria patógena con una reducción de expresión génica con un p-valor de 0,02, como su aumento, al igual que el primer gen (XYLT1) muy significativo con un p-valor de 0,004 para crecimiento con *E. coli* (Ilustración 6).

Para B4GAL6 se encuentra la misma situación que en el anterior gen con el comparte función. Se obtienen dos resultados significativos un p-valor de 0,0488 para ambos casos (Ilustración 6).

El gen B3GAT3 tan solo resulta significativo en el caso en presencia de *E. coli*, sobre expresándose con un p-valor de 0,0095 (Ilustración 6).

Para el último gen analizado, B3GAT1, el p-valor obtenido no fue significativo. En este gen se encuentra de nuevo tan solo el dato bajo la presencia de *E. coli* y se debe plantear, por tanto, que en condiciones de crecimiento con *S. enterica*, la expresión de este gen se limita tanto que no supera los límites de detección en la q-PCR (Ilustración 6).

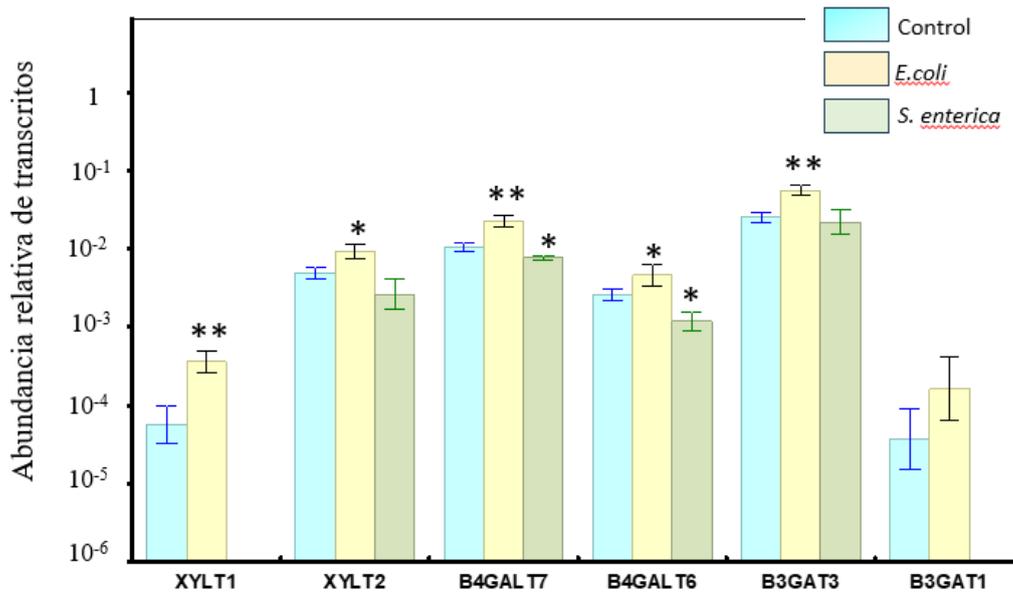


Ilustración 6: Diagrama de barras que muestra la expresión diferencial de los distintos genes que codifican las enzimas necesarias para la formación del linker en los PGs. Se muestran los valores de abundancia relativa de cada gen comparado con el mismo en cada una de las condiciones del experimento. Los asteriscos representan los p-valores significativos, siendo un asterisco menor de 0,05 y dos asteriscos, menor de 0,01.

## 5. Discusión

Los resultados obtenidos indican que la presencia de bacterias comensales, en este caso concreto *E. coli*, beneficia la síntesis de GAGs y en consecuencia la síntesis de PGs tanto de HS como CS en estas células colorrectales. Por otra parte, la bacteria patógena *S. enterica*, reduce en todos los casos la expresión génica de enzimas implicadas en la síntesis del *linker* de las moléculas que serán la base en la construcción de PGs tanto de HS como de CS.

Por tanto, siendo tanto HS como CS claves para la adhesión bacteriana, su presencia condiciona la expresión de genes implicados en su biosíntesis.

Se ha estudiado la unión de patógenos a otros tipos celulares como queratinocitos y los fibroblastos. La eliminación de los GAGs de HS tiene un efecto muy negativo en la adhesión de *Propionibacterium acnes* a estas células. Su capacidad de adherencia se ve reducida en un 15% y este efecto es mucho mayor si los GAGs que se eliminan son los de CS, que reducen la capacidad infectiva en hasta un 30% (Martín et al., 2022). La importancia de estas moléculas para adhesión de las bacterias contrasta con el efecto de estos patógenos sobre los genes implicados en la iniciación de su síntesis. *P. acnes*, como en este caso experimental con *S. entérica*, provoca en los queratinocitos una gran disminución de la síntesis de los genes XYLT1, B4GALT7, B4GALT6 y B3GAT3 en porcentajes de 70, 60, 85 y 50% respectivamente. Pero esta reducción de expresión no se manifiesta en los fibroblastos (Martín et al., 2022).

Una de las posibles explicaciones puede ser que el principal componente de los GAGs estudiados, el ácido glucurónico, está implicado en procesos que inhiben la adhesión de ciertas especies de microorganismos a la superficie celular. Estudios como los de Oliva (2023) refrendan esta propiedad del glucoácido. Por ello, todos aquellos patógenos que pretendan unirse a las células, ya no solo de colon, sino del resto de células del cuerpo humano, tienden a desarrollar mecanismos que eviten la síntesis de estos peptidoglicanos. Frenando el inicio de la síntesis de PGs pueden conseguir que los niveles del ácido glucurónico descendan en las células diana que pretenden colonizar. Otra posibilidad es que la bacteria contenga en su material genético enzimas implicadas en la detección, digestión o lisis del glucoácido. Esto puede provocar que la célula, al percibir una menor cantidad de la molécula en su citosol, frene los procesos metabólicos en los que está implicada.

Por otra parte, se ha visto en la introducción que la presencia de bacterias comensales beneficia en gran medida el correcto funcionamiento de la fisiología de un organismo. Los colonocitos pueden verse inducidos a la sobreexpresión de PGs en presencia de *E. coli*. De este modo se aumentan los puntos de conexión entre las distintas células (colonocitos y bacterias), permitiendo un mejor nicho para las bacterias con una mayor cantidad de puntos de anclaje y receptores de moléculas que permiten la comunicación interespecífica.

Hay trabajos que constatan que el HS, constituye una de las principales dianas para la interacción bacteria patógena-célula. De ahí que su reducción sea beneficiosa para la vida del hospedador. Hay antibióticos como la lactoferrina que están dirigidos específicamente contra las moléculas de las paredes bacterianas. Concretamente contra el N-acetilmurámico. La similitud estructural tiene como consecuencia una interacción con el HS presente en las superficies de las células que revisten el tracto GI. De este modo se bloquean puntos de interacción bacteria-célula. Este efecto secundario es beneficioso en cuanto a que evita la interacción del patógeno con las células, pero por otro lado también provoca que descienda la cantidad de bacterias comensales en el organismo. Este es el motivo por el que se necesita hacer uso de probióticos tras los tratamientos con antibióticos (Rodríguez-Franco et al., 2005).

La reducción de expresión génica de estos genes responsables del ensamblaje del *linker* podría constituir un mecanismo de defensa celular frente a la bacteria patógena, ya que el ciclo de infección de *S. enterica* depende de los PGs. La enzima a través de la cual estas bacterias pueden entrar y fusionarse con los lisosomas (orgánulos que aprovecharán para su motilidad, replicación y diseminación en capas de tejidos más interiores en las células infectadas (Andino & Hanning, 2015)), está completamente condicionada por la presencia de los HsPGs dentro de la propia célula infectada. En experimentos realizados con ovarios de hámsteres (Galeev et al., 2020), se pudo observar cómo había una diferencia muy significativa en la presencia de *S. enterica* intracelular en función de si estos ovarios eran de fenotipo salvaje o bien presentaban una mutación deletérea para el gen XylT que es un gen análogo al gen XYLT2 en células humanas. Los resultados mostraron claramente como tanto la adhesión extracelular como la fusión endo-lisosomal de las bacterias era mucho mayor que en las células mutantes y además se conseguía revertir la situación y que la diferencia no fuera significativa si a estas células mutantes se le añadía o bien directamente heparina, similar en estructura y función al HS, o bien directamente el ARN-m de XylT.

Siguiendo el razonamiento en este estudio, los colonocitos, al detectar en su interior la presencia de *S. entérica*, disminuyen la síntesis de PGs para evitar que el patógeno consiga los medios para sobrevivir, moverse y reproducirse dentro de ellos. En consecuencia, la transcripción de secuencias génicas de enzimas implicadas en el ensamblaje del *linker* se ve reducida.

Se puede confirmar también que en otras partes del cuerpo humano se produce una paradoja y es que a pesar de que tanto HS como CS son claves para la unión de bacterias, su adhesión y presencia condiciona negativamente la expresión de estos. Esto puede deberse a que, en estas otras partes del cuerpo, las células epiteliales, también eviten en la medida de lo posible, que las bacterias patógenas se sigan propagando (Martín et al., 2022).

Otro aspecto a tener en cuenta es la implicación de moléculas de HSPGs o CSPGs relacionadas en procesos cancerosos como puede ser el caso del cáncer colorectal (Solis-Hernandez et al., 2021).

En este estudio se muestra como la presencia de sindecanos dentro del citoplasma, puede ocasionar alteraciones genéticas que conlleven el desarrollo de procesos tumorales en las células. Se ha visto que la interacción *S. enterica*-sindecano es clave para el proceso de entrada por endocitosis, de la bacteria a la célula (Iozzo & Schaefer, 2015). La formación de estas vacuolas es clave para la supervivencia dentro de la célula de *S. enterica* (Andino & Hanning, 2015).

Puede que estas vesículas de endocitosis lleven adheridos en su membrana restos de las cadenas de HS y CS presentes en los sindecanos de la superficie de membrana celular. Esto puede ser el desencadenante de que la propia célula al detectarlos y verificar que no es su localización correcta inhiba todo su ciclo celular. Este mecanismo de defensa no sería específico contra la bacteria sino contra las alteraciones fisiológicas que esta provoca. De este modo la reducción de expresión génica de enzimas relacionadas con los PGs sería consecuencia de un proceso de alteración genética global celular por la presencia bacteriana. De hecho, se ha visto como esta reducción de expresión de genes implicados en la síntesis del *linker* no concuerda con la expresión génica global de las células. Los datos de la primera prueba, la RT-PCR, muestran como resultado una cantidad de ARN extraído mucho mayor en los cultivos con presencia de *S. enterica*, y en el cultivo control que en el cultivo con presencia de *E. coli*. Esto podría implicar una mayor actividad de expresión génica focalizada en otro tipo de genes.

Se puede comprobar cómo las afecciones a las que están sometidas las células pueden ser revertidas por su exposición a bacterias comensales siempre y cuando este estrés no sea muy intenso ni continuado. Tanto la continuidad epitelial de los colonocitos, es decir su permeabilidad de membrana, como las disrupciones de las funciones normales de sus orgánulos se modifican y vuelven a su normalidad en presencia de por ejemplo *E. coli* HB101 (Nazli et al., 2004).

Estos procesos infectivos o colonizadores, en caso de que sean beneficiosos, pueden ser por otra parte la respuesta a una tendencia tan clara en la sobreexpresión o baja expresión y en algunos casos nula, de los genes del presente estudio. Es sabido que hay muchos tipos de PGs, tanto de HS como de CS tanto dentro, como fuera, como alrededor de nuestras células. Estos son clave a la hora de la formación de enlaces intercelulares, y la presencia de los mismos en las membranas y en la matriz extracelular, son necesarios para el crecimiento, movimiento, adhesión y comunicación intercelular (Iozzo & Schaefer, 2015). En contra posición a esto se encuentran los procesos infectivos provocados por *S. enterica*, al tener estas bacterias como objetivo atravesar las células hasta capas más profundas del epitelio donde completar su ciclo de vida. De esta forma,

una menor activación de los genes *linker* daría lugar a una menor continuidad de la membrana y una composición morfológica diferente en los colonocito.

Se ha podido confirmar que el óptimo crecimiento de bacterias comensales, muy estudiado en el caso de *E. coli*, radica en la capacidad bacteriana de no causar patogenicidad, en las zonas tanto del epitelio del intestino delgado y grueso, y de ser capaces de dar continuidad a la capa de mucus que rodea estas células y además adquirir genes que tienen que ver con el procesamiento de N-acetilglucosamina.

Esta digestión y utilización de estas moléculas podría tener como consecuencia la liberación en el medio extracelular de una mayor cantidad de mono y oligosacáridos. Estos pueden desencadenar dos procesos. El primero sería dotar de capacidad de asimilación de nutrientes y por ende del crecimiento de las bacterias (Conway et al., 2004), de las cuales se pueden beneficiar los colonocitos y enterocitos, funcionando como un proceso de retroalimentación positiva, y por otra parte, podría desempeñar algún proceso de señalización celular en la que al haber disponibles muchos más recursos y además ser estos las moléculas implicadas en la formación de PGs, la expresión génica de los genes implicados tanto en el inicio de su síntesis como de su elongación se vuelva más activa para beneficiarse.

Además, hay estudios que demuestran que ante una infección por enterobacterias y entre las cuales se encontraba concretamente *S. entérica* y un tipo de *E. coli* enteropatógeno, los colonocitos provocan un descenso del oxígeno disponible sobre su mucosa. En este mecanismo se activan procesos que obligan a las células a realizar la beta oxidación de las grasas en sus mitocondrias (Byndloss et al., 2017). De esta manera se puede apoyar la teoría de una reducción del metabolismo de glúcidos en detrimento de una activación de genes responsables de la lipólisis y consiguiendo a su vez una menor disponibilidad de oxígeno y, en consecuencia, de la posibilidad de producción de ATP necesario para los mecanismos de secreción T3 patogénicos (Byndloss et al., 2017).

Por otra parte, en cuanto al sistema inmunológico se ha comprobado que la presencia de HS es crucial para hacer frente a las infecciones bacterianas, y que estas moléculas son responsables de la entrada en acción del sistema inmune innato. Concretamente estas cadenas son necesarias para que los neutrófilos puedan crear trampas extracelulares en las que atrapar a las bacterias (Xu et al., 2015). Por eso tendría sentido que aquellas células que estuviesen siendo infectadas, las bacterias provocasen de algún modo que estas cesaran de producir estas moléculas, que no beneficiarían a las futuras bacterias colonizadoras o que viniesen detrás. Aunque también se encuentra una cierta contradicción en este sistema, ya que aquellas células carentes de HS son mucho más susceptibles a la entrada en apoptosis celular (Xu et al., 2015), lo cual reduciría el número de células epiteliales disponibles para colonizar perjudicando la supervivencia y transmisión de genes que es lo que

buscan estos patógenos. Y este puede ser el proceso que explique los resultados de este estudio. Las células colorrectales, al verse infectadas, favorecen su propia apoptosis para frenar el avance de la infección a células vecinas.

También por su parte los CSPGs pueden ser claves en frenar la translocación de bacterias patógenas, teniendo una mayor relevancia durante los procesos de inflamación fisiológica (Burge et al., 2019). Y aunque en este estudio no se muestra que sea estadísticamente significativo, los resultados dejan entrever que las interacciones de estas moléculas con citoquinas responsables de la inflamación, son beneficiosas para reducir la propia inflamación más rápidamente y con ello dejar menos partes de las superficies epiteliales disponibles para la adhesión bacteriana y su translocación al interior celular (Burge et al., 2019), por ello también tendría sentido que los patógenos busquen un modo de inhibir esta ruta de defensa celular y una de ellas puede ser perfectamente la regulación negativa de los genes responsables de iniciación de estos PGs.

Los sulfatos presentes en las cadenas de GAGs son imprescindibles para la formación de redes de neutrófilos (Xu et al., 2015). Las bacterias tendrán que desarrollar mecanismos que impidan la formación de estas redes. Bloquear la síntesis de HS y CS desde su inicio podría ser una de las soluciones.

Estos cambios en la sulfatación provocan una evolución de la microbiota presente en las vías respiratorias, favoreciendo procesos metabólicos bacterianos que llevan a la formación de biopelículas que confieren resistencia a los antibióticos a estas bacterias patógenas. De esta manera se eleva el riesgo de sufrir una enfermedad crónica (Martin et al., 2019).

También un estado fisiológico alterado previo del hospedador puede tener implicaciones en el efecto causado por las bacterias.

Pese a la importancia de los PGs de HS y CS en la colonización por parte de *S. enterica*, el resultado de la adhesión celular en este experimento provoca la disminución de la expresión génica de enzimas del *linker*. La mayoría los procesos vistos en esta discusión tienen como consecuencia última mecanismos celulares por los cuales las células infectadas por el patógeno entran en procesos de apoptosis o salida del ciclo celular, para así frenar la infección y conseguir la supervivencia del organismo.

Por otra parte, se ha visto que la adhesión de *E. coli* aumenta la expresión génica de las mismas enzimas. Los procesos tratados en la discusión, en cuanto a estas bacterias comensales conducen a mecanismos celulares en los cuales se ve favorecida la continuidad de membrana, así como los factores que permiten una mejor adhesión celular, entre los que se encuentran los PGs sometidos a este estudio.

## 6.Conclusiones

- El contacto de bacterias con células de colon HT-29 provoca una alteración en la expresión de los genes implicados en la síntesis del linker de los PGs de HS y CS.
- El efecto en la alteración de la expresión génica es diferente en función de si la bacteria es patógena o comensal.
- Cuando HT-29 es expuesta a la bacteria comensal *E. coli*, se observa una disminución en la expresión de los genes implicados en el linker.
- Cuando HT-29 es expuesta a la bacteria patógena *S. enterica*, se observa un aumento en la expresión de los genes implicados en el linker.

## 7. Bibliografía

Andino, A., & Hanning, I. (2015). *Salmonella enterica*: Survival, Colonization, and Virulence Differences among Serovars. *The Scientific World Journal*, 2015, 1-16. <https://doi.org/10.1155/2015/520179>

Burge, K. Y., Hannah, L., Eckert, J. V., Gunasekaran, A., & Chaaban, H. (2019). The Protective Influence of Chondroitin Sulfate, a Component of Human Milk, on Intestinal Bacterial Invasion and Translocation. *Journal of Human Lactation*, 35(3), 538-549. <https://doi.org/10.1177/0890334419845338>

Byndloss, M. X., Olsan, E. E., Rivera-Chávez, F., Tiffany, C. R., Cevallos, S. A., Lokken, K. L., Torres, T. P., Byndloss, A. J., Faber, F., Gao, Y., Litvak, Y., Lopez, C. A., Xu, G., Napoli, E., Giulivi, C., Tsois, R. M., Revzin, A., Lebrilla, C. B., & Bäumlér, A. J. (2017). Microbiota-activated PPAR- $\gamma$  signaling inhibits dysbiotic Enterobacteriaceae expansion. *Science*, 357(6351), 570-575. <https://doi.org/10.1126/science.aam9949>

Calderón, X. M. (2023). *Composición de la microbiota intestinal en condiciones de eubiosis*. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología* 2023;43:155-162

Cañas, M.A. (2017). Comunicación microbiota-huésped: internalization y señalización intracelular de vesículas de membrana externa de cepas probióticas y comensales de *E. coli* en células de epitelio intestinal. Tesis doctoral. Biblioteca de la Universitat de Barcelona.

Conway, T., Krogfelt, K. A., & Cohen, P. S. (2004). The Life of Commensal *Escherichia coli* in the Mammalian Intestine. *EcoSal Plus*, 1(1), 10.1128/ecosalplus.8.3.1.2. <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.8.3.1.2>

Cox, L. M., Yamanishi, S., Sohn, J., Alekseyenko, A. V., Leung, J. M., Cho, I., Kim, S. G., Li, H., Gao, Z., Mahana, D., Zárate Rodríguez, J. G., Rogers, A. B., Robine, N., Loke, P., & Blaser, M. J. (2014). Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences. *Cell*, 158(4), 705-721. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052>

Galeev, A., Suwandi, A., Bakker, H., Oktiviyari, A., Routier, F. H., Krone, L., Hensel, M., & Grassl, G. A. (2020). Proteoglycan-Dependent Endo-Lysosomal Fusion Affects Intracellular Survival of *Salmonella* Typhimurium in Epithelial Cells. *Frontiers in Immunology*, 11, 731. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00731>

Hensel, M. (2000). *Salmonella* Pathogenicity Island 2. *Molecular Microbiology*, 36(5), 1015-1023. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2000.01935.x>

Iozzo, R. V., & Schaefer, L. (2015). Proteoglycan form and function: A comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biology*, 42, 11-55. <https://doi.org/10.1016/j.matbio.2015.02.003>

Iturbe, V. L. (2014). *Los proteoglicanos como receptores específicos de microorganismos infecciosos*. Trabajo fin de grado. Biblioteca de la Universidad de Oviedo.

Jiménez, M. M. S., & Castro, N. M. C. (2003). *Mecanismos de interacción de Salmonella con la mucosa intestinal*. 7.

Johannes, L. (2017). Shiga Toxin—A Model for Glycolipid-Dependent and Lectin-Driven Endocytosis. *Toxins*, 9(11), 340. <https://doi.org/10.3390/toxins9110340>

López, N. P. (2021). *Alteraciones en la síntesis del heparán sulfato en pacientes con enfermedad de Alzheimer*. Tesis doctoral. Biblioteca de la Universidad de Oviedo.

- Martin, C., Lozano-Iturbe, V., Girón, R. M., Vazquez-Espinosa, E., Rodríguez, D., Merayo-Lloves, J., Vazquez, F., Quirós, L. M., & García, B. (2019). Glycosaminoglycans are differentially involved in bacterial binding to healthy and cystic fibrosis lung cells. *Journal of Cystic Fibrosis*, *18*(3), e19-e25. <https://doi.org/10.1016/j.jcf.2018.10.017>
- Martín, C., Ordiales, H., Vázquez, F., Pevida, M., Rodríguez, D., Merayo, J., Vázquez, F., García, B., & Quirós, L. M. (2022). Bacteria associated with acne use glycosaminoglycans as cell adhesion receptors and promote changes in the expression of the genes involved in their biosynthesis. *BMC Microbiology*, *22*(1), 65. <https://doi.org/10.1186/s12866-022-02477-2>
- Merino Rivera, J. A., Taracena Pacheco, S., Díaz Greene, E. J., & Rodríguez Weber, F. L. (2021). Microbiota intestinal: El órgano olvidado. *Acta Médica Grupo Ángeles*, *19*(1), 92-100. <https://doi.org/10.35366/98577>
- Nazli, A., Yang, P.-C., Jury, J., Howe, K., & Watson, J. L. (2004). *Epithelia Under Metabolic Stress Perceive Commensal Bacteria as a Threat*. *164*(3).
- Oliva, C. M. G. (2022). *Síntesis sostenible de glicoestructuras con potencial actividad antiinfecciosa*. Tesis doctoral. Biblioteca de la Universidad Complutense de Madrid.
- Parolin, C., Croatti, V., Laghi, L., Giordani, B., Tondi, M. R., De Gregorio, P. R., Foschi, C., & Vitali, B. (2021). Lactobacillus Biofilms Influence Anti-Candida Activity. *Frontiers in Microbiology*, *12*, 750368. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.750368>
- Ramos, S., Silva, V., Dapkevicius, M. D. L. E., Caniça, M., Tejedor-Junco, M. T., Igrejas, G., & Poeta, P. (2020). Escherichia coli as Commensal and Pathogenic Bacteria among Food-Producing Animals: Health Implications of Extended Spectrum  $\beta$ -Lactamase (ESBL) Production. *Animals*, *10*(12), 2239. <https://doi.org/10.3390/ani10122239>
- Rico, M. T. (2021). *Estudios estructurales y de interacción de miméticos de Condroitín Sulfato con los factores de crecimiento Midkina y Pleiotrofina*. Tesis doctoral. Biblioteca de la Universidad de Sevilla.
- Rodríguez-Franco, D. A., Vázquez-Moreno, L., & Montfort, G. R.-C. (s. f.). Actividad antimicrobiana de la lactoferrina: Mecanismos y aplicaciones clínicas potenciales. *Rev Latinoam Microbiol*.
- Solis-Hernandez, M. P., Martín, C., García, B., Pérez-López, N., García-Mesa, Y., González-Fernández, S., García-Suárez, O., Merayo, J., Fernández-Vega, I., & Quirós, L. M. (2021). The Genes Encoding Small Leucine-Rich Proteoglycans Undergo Differential Expression Alterations in Colorectal Cancer, Depending on Tumor Location. *Cells*, *10*(8), 2002. <https://doi.org/10.3390/cells10082002>
- Suárez, J. (2021). El holobionte/hologenoma como nivel de selección: Una aproximación a la evolución de los consorcios de múltiples especies. *THEORIA. An International Journal for Theory, History and Foundations of Science*, *36*(1), 81-112. <https://doi.org/10.1387/theoria.21611>
- Vidal, J. E., Canizález-Román, A., Gutiérrez-Jiménez, J., & Navarro-García, F. (2007). Patogénesis molecular, epidemiología y diagnóstico de Escherichia coli enteropatógena. *Salud Pública de México*, *49*(5). <https://doi.org/10.1590/S0036-36342007000500008>
- Xu, D., Olson, J., Cole, J. N., Van Wijk, X. M., Brinkmann, V., Zychlinsky, A., Nizet, V., Esko, J. D., & Chang, Y.-C. (2015). Heparan Sulfate Modulates Neutrophil and Endothelial Function in Antibacterial Innate Immunity. *Infection and Immunity*, *83*(9), 3648-3656. <https://doi.org/10.1128/IAI.00545-15>