



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA  
DE MÉXICO**

---

---

**FACULTAD DE QUÍMICA**

**“CARACTERIZACIÓN DE LAS PROTEÍNAS O TOXINAS  
SECRETADAS POR CEPAS DE *Escherichia coli*  
AISLADAS DE INFECCIONES DEL TRACTO URINARIO”**

TESIS  
que para obtener el Título de  
**QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**  
Presenta:  
**SANDRA GUADALUPE PÉREZ ROJAS**



**México, D.F.**

**2006**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

Jurado asignado:

Presidente Profra. Adriana Guadalupe Mejía Chávez

Vocal Profra. María Elena Ibarra Rubio

Secretario Prof. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández

1er Suplente Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

2do Suplente Prof. Gonzalo Castillo Rojas

Sitio dónde se desarrolló el tema:

Laboratorio 35, Unidad de Postgrado, Facultad de Medicina, UNAM

---

Dr. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández  
Asesor

---

M. en C. Sandra Gavilanes Parra  
Supervisor Técnico

---

Sandra Guadalupe Pérez Rojas  
Sustentante

*A mis padres...*

*A mis hermanos...*

*A Miguelito y Ángelito...*

*... con todo mi amor e infinito agradecimiento.*

## **AGRADECIMEINTOS**

### *A mis padres...*

*Esperanza e Isaías*

*Por su amor, sus cuidados y su apoyo incondicional.*

### *A mis hermanos...*

*Beatriz, Alberto y Miguel Ángel*

*Por su cariño, su confianza y porque nada sería igual sin ustedes.*

### *A mis amigos...*

*Alicia, Bárbara, Dulce, Elena, Fabiola, Gustavo, Ivone, Itzel, Martín, Nalleyi y Rebeca.*

*Por todos los años que me han permitido ser parte de su vida y por todos los momentos que hemos compartido.*

### *A mis asesores...*

*Dr. Manjarrez y Dra. Gavilanes*

*Por la oportunidad de ser parte de este proyecto, por las enseñanzas y por todas las atenciones que he recibido.*

### *A la UNAM, a la Facultad de Química y a sus profesores...*

## **RECONOCIMEINTOS**

- El proyecto fue apoyado por el **Programa de Apoyo a Proyectos de Investigación e Innovación Tecnológica (PAPIIT)** de la UNAM. Clave del proyecto: IN219102. Mediante este proyecto obtuve una beca para la elaboración de la presente tesis.
- **Bióloga Maria Elena Chávez Berrocal:** realizó la serotipificación de las cepas estudiadas en el presente trabajo.
- **Maestro en Ciencias Armando Navarro Ocaña:** asesoró y proporcionó los antisueros y reactivos necesarios para la serotipificación de las cepas utilizadas en el presente trabajo.
- **Dra. Yolanda López Vidal:** permitió el uso del microscopio y software necesarios para la obtención de las fotos de citotoxicidad presentadas en esta tesis.
- **Mauricio Rodríguez Álvarez:** proporcionó asesoría técnica en el manejo del microscopio.

**ÍNDICE**

	Página
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. MARCO TEÓRICO.....	3
2.1 Epidemiología.....	3
2.2 Generalidades de las Infecciones en las Vías Urinarias.....	4
2.3 Patogénesis.....	5
2.4 Factores de Virulencia.....	6
3. JUSTIFICACIÓN.....	15
4. HIPÓTESIS Y OBJETIVOS.....	16
5. DISEÑO EXPERIMENTAL .....	17
6. MATERIALES Y MÉTODOS .....	19
7. RESULTADOS.....	30
8. DISCUSIÓN DE RESULTADOS .....	41
9. CONCLUSIONES .....	49
10. PERSPECTIVAS. ....	50
11. REFERENCIAS.....	51
12. APÉNDICE.....	59

## **RESUMEN**

*Escherichia coli* es el principal agente causal de infecciones en el tracto urinario (ITUs). Las cepas *E. coli* uropatógenas (UPEC) poseen factores de virulencia que las distinguen de las comensales y les permiten inducir la enfermedad. La producción de toxinas por las cepas UPEC puede causar daño celular, y una respuesta inflamatoria que conduce a la aparición de los síntomas de ITU. En este estudio se determinó la presencia de toxinas (genes) en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes de una población mexicana con ITUs y se evaluó el daño celular que producen *in vitro*. De las 51 cepas analizadas por el método de PCR, los genes *sat*, *hly*, *cnf1*, *stx*<sub>1</sub> estuvieron presentes en el 43, 12, 10, y 4% de las cepas aisladas, respectivamente. Ninguna de estas cepas tuvo el gen *stx*<sub>2</sub>. Se probaron 12 sobrenadantes bacterianos de cepas que, en estudios previos, produjeron algún tipo de daño celular; 3 de ellos fueron capaces de causar alteraciones morfológicas a pesar de no presentar los genes determinados anteriormente (*hly*, *sat*, *cnf1*, *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>). El 45% de las cepas no presentó ninguno de los cinco genes buscados. El serogrupo más frecuente en este estudio fue el O25, el cual es diferente a los reportados en otros países de Europa, en donde el más frecuente es el O6. El gen *sat* fue encontrado con mayor frecuencia respecto a otros genes caracterizados en este estudio y significativamente en mayor porcentaje que en las fecales. Este estudio nos sugiere que pueden existir toxinas en cepas UPEC que aún no han sido identificadas y que podrían ser importantes factores de virulencia.

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>ADN</b>	ácido desoxirribonucleico
<b>APEC*</b>	<i>Escherichia coli</i> patógena aviar
<b>°C</b>	grados centígrados
<b>Cnf1*</b>	factor necroizante citotóxico 1
<b>CO<sub>2</sub></b>	dióxido de carbono
<b>DMEM</b>	medio de Eagle modificado de Dulbecco
<b>EAEC*</b>	<i>E. coli</i> enteroagregativa
<b>GB<sub>3</sub></b>	receptor globotriacilceramida
<b>HlyA</b>	α-hemolisina
<b>hrs</b>	horas
<b>ISSSTE</b>	Instituto de Seguridad Social al Servicio de los Trabajadores del Estado
<b>ITU/ITUs</b>	infección/infecciones en el tracto urinario
<b>kDa</b>	kiloDalton
<b>LB</b>	Luria-Bertani
<b>LPS</b>	lipopolisacárido
<b>MgCl<sub>2</sub></b>	cloruro de magnesio
<b>μL</b>	microlitro
<b>μm</b>	micrometro
<b>mA</b>	miliamper
<b>mM</b>	milimolar
<b>mL</b>	mililitro
<b>PAI*</b>	isla de patogenicidad
<b>PAGE</b>	electroforesis en gel de poliacrilamida
<b>PBS</b>	buffer salino de fosfatos
<b>PCR*</b>	reacción en cadena de la polimerasa
<b>PicU</b>	proteína homóloga de Pic (proteína involucrada en la colonización intestinal)
<b>RTX*</b>	repeticiones en toxina
<b>Sat*</b>	toxina autotransportadora secretada
<b>SFB</b>	suero fetal bovino
<b>SDS</b>	duodecil sulfato de sodio
<b>SLT*</b>	toxinas tipo Shiga
<b>SPATE*</b>	serin proteasa autotransportadora de <i>Enterobacteriaceae</i>
<b>Stx1*</b>	toxina tipo Shiga 1
<b>Stx2*</b>	toxina tipo Shiga 2
<b>TAE</b>	solución reguladora para electroforesis
<b>Tsh*</b>	hemaglutinina temperatura sensible
<b>UPEC*</b>	<i>Escherichia coli</i> uropatógena
<b>Vat*</b>	toxina autotransportadora vacuolizante
<b>VTEC</b>	<i>Escherichia coli</i> verotoxigénica

\* por sus siglas en inglés

## **INTRODUCCIÓN**

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son una de las infecciones bacterianas más frecuentes en humanos. Los individuos más susceptibles a estas infecciones son: neonatos, mujeres sexualmente activas y personas mayores [23]. *Escherichia coli* es el principal causante de las ITUs y el estudio de sus características, tanto genotípicas como fenotípicas, ha mostrado que expresan una variedad de factores de virulencia que la capacitan para adaptarse a las condiciones hostiles del tracto urinario y para evadir al sistema inmune [19]. Sin embargo, la mitad de todas las *E. coli* uropatogénicas (UPEC) aisladas poseen uno o ninguno de los factores de virulencia caracterizados hasta el momento, y esto, aunado al hecho de que recientemente se han identificado otros posibles genes de virulencia en la secuencia genómica completa de la cepa UPEC CFT073, nos hace pensar que factores bacterianos aun no caracterizados pueden ser importantes en la patogénesis de ITU [22].

En México se conoce poco respecto a las características de virulencia de las cepas de *E. coli* que afectan a la población mexicana, aún cuando la Secretaría de Salud indica que es la tercera causa de morbilidad en este país [37]. El presente estudio forma parte de un proyecto grande que tiene como objetivo caracterizar a las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITUs en la Ciudad de México. Actualmente, no sabemos cuales son los principales factores de virulencia que portan las cepas UPEC causantes ITUs en la población mexicana.

En general, las toxinas producen daño celular y frecuentemente una respuesta inflamatoria las cuales posiblemente conducen a la aparición de los síntomas [18]. En el presente trabajo determinamos la frecuencia y distribución de genes que codifican para toxinas (*hly*, *sat*, *cnf1*, *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>*) en cepas de *E. coli* que producen ITUs en la población mexicana. Así mismo, mediante el empleo de ensayos de citotoxicidad buscamos obtener evidencia de la participación de las toxinas como factores de virulencia importantes en la patogénesis de las ITUs. De tal forma que se cree una base para futuras investigaciones que permitan entender mejor el mecanismo patógeno de las cepas de *E. coli* causantes de las ITUs.

## **MARCO TEÓRICO**

### **2.1 EPIDEMIOLOGÍA**

Las infecciones en el tracto urinario (ITUs) son consideradas entre las enfermedades bacterianas más comunes y representan un serio problema de salud que afecta a millones de personas cada año [36]. Se ha estimado que anualmente se presentan de 130 a 175 millones de casos de ITUs en todo el mundo, ocasionando que los costos asociados a esta enfermedad sean elevados [1]. Tan sólo en Estados Unidos, durante el periodo comprendido entre los años de 1988 a 1994, se estimó que 34% (61.4 millones) de los adultos, de 20 años o mayores, presentaron al menos un caso de ITU. La prevalencia en mujeres fue significativamente mayor que la estimada en hombres, ya que del total, 13.9% fueron hombres y el 53.5% mujeres [36], e incluso se ha calculado que 11% de las mujeres en Estados Unidos experimentan al menos una ITU por año y cerca del 60% tendrán una o más ITUs durante su vida [19].

La población infantil también es un grupo susceptible de padecer ITUs, ya que cerca del 10% de éste sector se ve afectado. El grado de recurrencia para ITU en niños está estimado entre el 30% y 40%, teniendo una mayor recurrencia en los primeros 12 meses después de la infección primaria [8].

En México, la Secretaría de Salud establece que las ITUs son la tercera causa de morbilidad, reportándose 3228 casos por cada 100 mil habitantes en el 2005 [37]; sin embargo, pocos estudios se han realizado respecto a dicha problemática, de tal forma que no se conocen las características de las cepas bacterianas que con frecuencia son causantes de ITUs en la población mexicana [27].

## **2.2 GENERALIDADES DE LAS INFECCIONES EN LAS VÍAS URINARIAS**

Las ITUs se originan cuando un agente patógeno invade el tracto urinario, lo cual conduce a una respuesta inflamatoria y finalmente a alteraciones tanto morfológicas como funcionales. Suelen dividirse en dos grandes categorías anatómicas, las infecciones de vías urinarias bajas (uretritis, cistitis y prostatitis) y la infección de las vías altas (pielonefritis). Las infecciones de la uretra y de la vejiga a menudo se consideran superficiales (o mucosas), mientras que la prostatitis y pielonefritis indican invasión tisular [34]. Las infecciones en estos diversos puntos pueden producirse de manera conjunta o separada, cursar de manera aguda o como un proceso crónico, y pueden ser asintomáticas u ofrecer manifestaciones clínicas que dependen de la porción del trato urinario involucrada, la severidad de la infección, el agente etiológico y la habilidad del hospedero para montar una respuesta inmune frente a la infección [31].

*Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el agente causal en más del 80% de las ITUs en paciente ambulatorios y de cerca del 30% de las infecciones nosocomiales [33]. Sin embargo, otras bacterias como por ejemplo *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Serratia*, pueden causar ITU. Así mismo, *Pseudomonas* es un importante agente etiológico de ITU en infecciones intrahospitalarias [23].

Las ITUs resultan del ascenso de la bacteria de la uretra a la vejiga y, en la minoría de los pacientes, las bacterias ascienden a los riñones y entran al torrente sanguíneo [17]. El intestino grueso, el introitus vaginal y el tejido periuretral, pueden funcionar como reservorios para las cepas uropatógenas de *E. coli* [17], de donde pueden ser transferidos al interior de la uretra por efectos mecánicos, en el caso de bacterias no-móviles, o alcanzar el uroepitelio activamente en el caso de bacterias móviles [28].

### **2.3 PATOGÉNESIS**

La secuencia de eventos durante la progresión y establecimiento de una ITU, comienza con la unión de la bacteria a las células epiteliales del hospedero, por lo tanto, la adherencia de las UPEC a los tejidos del tracto urinario es considerada como el determinante más importante de patogenicidad [15, 20, 21]. La adhesión está mediada por proteínas expresadas sobre la superficie bacteriana denominadas adhesinas (pueden o no estar asociadas con fimbrias) que, por su unión específica a

un receptor, dictan el tropismo hacia un tejido y pueden modular la respuesta de la célula hospedera hacia la infección [17, 21].

Después de que las bacterias han establecido un sitio primario de infección, se multiplican y se dispersan directamente a través de los tejidos. Recientemente se ha observado que las UPEC no son estrictamente patógenos extracelulares, de tal forma que la internalización de la bacteria en la célula hospedera puede proveer a la bacteria de ventajas en el proceso infeccioso, ya que incrementa su protección hacia las defensas innatas y adaptativas del hospedero, facilita su acceso a los nutrientes, la diseminación a través de los tejidos, y está asociada con la persistencia y recurrencia de las ITUs. Sin embargo, la internalización ocasiona la exfoliación hacia la orina de algunas células de la superficie de la vejiga que contienen las bacterias internalizadas. Después de la exfoliación, la bacteria intracelular comienza a replicarse y a inducir la respuesta inmune, conduciendo a los síntomas de ITU [1, 4, 15, 19, 21].

## **2.4 FACTORES DE VIRULENCIA**

Además de las adhesinas, las cepas de UPEC expresan una variedad de factores de virulencia que incluyen sistemas de captación de hierro, lipopolisacáridos (LPS), toxinas y proteínas autotransportadoras, que le permiten colonizar el tracto urinario y persistir a pesar de las altamente efectivas defensas del hospedero [1, 21]. Actualmente, diversos genes han sido asociados con las cepas de *E. coli* causantes de ITU debido a que están potencialmente implicados en

el establecimiento de la infección [18]; sin embargo, ninguno de los genes o grupo de genes conocidos puede definir claramente un prototipo de *E. coli* uropatógena, ya que las cepas UPEC difieren considerablemente en cuanto a los factores de virulencia que poseen indicando una significativa diversidad genética entre ellas [26]. La Tabla 1 muestra un grupo de genes de *E. coli* que han sido potencialmente identificados como importantes en el establecimiento de las ITUs [18].

**TABLA 1.** Posibles factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena y función propuesta u homología.

Genes (factor de virulencia)	Función u homología
<i>cnf1</i> (factor necrozante citotóxico)	Causa multinucleación y redondeamiento de células humanas
<i>craC</i> (colicina V)	colicina
<i>drb</i> ( familia de adhesinas Dr)	Factor de adherencia que une al factor acelerador del decaimiento
<i>fim</i> (pili tipo 1)	Adherencia a células uroepiteliales y FimH medía la invasión
<i>hly</i> ( $\alpha$ -hemolisina)	Lisis de eritrocitos
<i>hra</i> ( aglutinina temperatura resistente)	Factor de adherencia
<i>Iha</i> (Adhesina homóloga de IrgA)	Factor de adherencia
<i>IvonN<sub>E.coli</sub></i> (IvonN <sub>E.coli</sub> )	Sideróforo receptor
<i>iucD</i> (aerobactina)	Sideróforo que une hierro
<i>kpsMT</i> (cápsula grupo II)	Producción de polisacárido capsular
<i>ompT</i> (ompT)	Proteasa de membrana externa
<i>papG<sub>AD/IA2</sub></i> (pil P clase II)	Adherencia a células uroepiteliales
<i>prsG<sub>J96</sub></i> (pil P clase III)	Adherencia a células uroepiteliales
<i>picU</i> (PicU)	Homólogo de Pic (proteína involucrada en la colonización intestinal) serin proteasa autotransportadora
<i>sat</i> (Sat)	serin proteasa autotransportadora
<i>sfa</i> (familia de fimbria S)	Factores de adherencia
<i>usp</i> (proteína específica uropatógena)	Bacteriocina
<i>vat</i> (Vat)	Toxina autotransportadora vacuolizante
Paill <sub>cf1073</sub>	Múltiples genes (isla de patogenicidad)
<i>tsh</i> (Tsh)	Hemaglutinina termo-sensible

Referencia: MARRS, *et al*<sup>18</sup>.

Sin embargo, la mitad de las cepas UPEC que se han aislado sólo poseen uno o ninguno de los factores de virulencia caracterizados, así que, se asume que otros

factores bacterianos, aun no caracterizados, pueden ser importantes en la patogénesis de las infecciones en el tracto urinario [22, 26].

Ciertos serotipos O:K:H ocurren más frecuentemente en los aislados urinarios que en los aislados fecales, indicando su asociación con el potencial uropatógeno de la *E. coli*; y se ha observado que las cepas de *E. coli* que causan ITU pertenecen principalmente a los serogrupos: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25 y O75 [3, 23].

Las toxinas bacterianas alteran los procesos metabólicos críticos en la célula hospedera, y en general actúan dañando la membrana celular o modificando proteínas que son esenciales en el mantenimiento de la fisiología de la célula [32]. En el caso de UPEC, la producción de toxinas ha sido vinculada con la aparición de una respuesta inflamatoria la cual podría ser la causa de los síntomas de la ITU [18]. Dos toxinas han sido asociadas con su capacidad de causar infección en las vías urinarias:  $\alpha$ -hemolisina (HlyA) y factor necroizante citotóxico 1(Cnf1) [1, 19, 24].

#### **2.4.1 $\alpha$ -HEMOLISINA (HlyA).**

La HlyA está codificada en el operon hlyCABD, donde el gen A codifica para la porción estructural de la toxina (110 kDa) y los genes restantes están involucrados en el procesamiento y exportación de la hemolisina. El operon de la HlyA puede encontrarse tanto en un plásmido como en una isla de patogenicidad (PAI y PAII)

insertada en el cromosoma. La HlyA pertenece a la familia de toxinas RTX que exhiben una doble actividad dependiente de la dosis. Dosis altas de la toxina resultan en la oligomerización de la HlyA y formación de poros transmembranales que permite el flujo libre de cationes, azúcar y agua, lo cual finalmente lisa la célula hospedera [7, 32, 33]; mientras que dosis subléxicas pueden inducir oscilaciones de calcio en las células epiteliales ocasionando la movilización de las defensas del hospedero mediante la producción de mediadores proinflamatorios [1, 32].

#### **2.4.2 FACTOR NECROZANTE CITOTÓXICO 1 (Cnf1)**

El factor necrozante citotóxico 1 es una proteína de 114 kDa codificada por el gen monocistrónico *cnf* localizado en el cromosoma bacteriano como parte de una isla de patogenicidad (PAI II) [7]. La familia de GTPasas Rho, que incluye a Rho, Rac y Cdc42, son proteínas localizadas en el citoplasma que están involucradas en la regulación del citoesqueleto de actina y son el blanco de acción del Cnf1. Esta toxina es capaz de entrar a la célula hospedera en una vesícula endocítica mediante su unión al precursor del receptor de laminina. Una vez dentro de la célula cataliza la deamidación de la glutamina en posición 63 de las proteínas Rho, y en posición 61 de Rac y de Cdc42. Esta remoción del grupo amino cambia la glutamina a ácido glutámico, lo cual resulta en la activación constitutiva de las GTPasas [4, 16, 30]. *In vitro*, se ha observado que, pocas horas después de la constitutiva activación por Cnf1, las GTPasas Rho y Rac modificadas son degradadas por el proteosoma de la célula hospedera. La activación y degradación de estas proteínas son necesarias

para producir una eficiente internalización de las UPEC dentro de vesículas fagocíticas en células epiteliales de vejiga [4, 16].

La activación de las GTPasas inducida por Cnf1, se ha asociado con alteraciones en la morfología de la célula (multinucleación, prolongación y ondulación de la membrana citoplasmática, formación de fibras de estres) o en su comportamiento, ya que se ha observado que es capaz de provocar un proceso apoptótico o estimular la migración celular, entre otras modificaciones, que están en función de la línea celular sobre la que esté actuando dicha toxina [4, 20].

#### **2.4.3 SERIN PROTEASAS AUTOTRANSPORTADORAS DE *Enterobacteriaceae* (SPATEs)**

Los factores de virulencia generalmente son de naturaleza proteica y muchas veces requieren ser secretados, ya sea para permanecer en la superficie bacteriana o para ser liberados al ambiente externo, por tal motivo el sistema de secreción por sí mismo es considerado un determinante de virulencia [12]. En recientes estudios se han encontrado 10 genes que codifican para posibles proteínas autotransportadoras en el genoma de *E. coli* CFT073 (cepa altamente virulenta aislada de la sangre y la orina de una mujer con pielonefritis aguda), sugiriendo que el sistema de secreción Tipo V es la principal vía por la cual esta cepa secreta proteínas [22].

Las proteínas autotransportadoras son una familia de proteínas secretadas mediante el sistema de secreción tipo V, poseen una estructura completa unificada que comprende: 1) un péptido guía amino terminal (para la secreción a través de la membrana interna de la bacteria), 2) la proteína madura secretada (o dominio pasajero), y 3) un dominio C-terminal, el cual forma un poro en la membrana externa por donde pasa el dominio pasajero a la superficie celular y puede permanecer anclado o ser liberado al medio extracelular [11, 12].

Las cepas de UPEC tienen como factor de virulencia la producción de proteínas autotransportadoras pertenecientes a la familia de SPATEs (Serin Proteasas Autotransportadoras de *Enterobacteriaceae*) las cuales, además de presentar un motivo de proteasa de serina, poseen varias características en común: 1) ninguna de las SPATEs se une o corta IgA1, 2) el motivo de serin proteasa de las proteínas SPATEs no participa en el autoprosesamiento, 3) cada miembro de la familia SPATEs está entre las proteínas secretadas predominantes de su respectiva bacteria patógena, 4) ninguna SPATE ha sido identificada en organismos no patógenos, y 5) son proteínas altamente inmunogénicas [12].

Sat (Toxina autotransportadora secretada) es una proteína SPATE de 107 kDa, identificada en la cepa *E. coli* CFT073 y el gen *sat* fue localizado en la PAI II de esta misma cepa [9]. La toxina Sat produjo efectos citotóxicos en células Vero (riñón de mono verde), HK-2 (células de vejiga) y Hep-2 (células de laringe humana),

que se manifiestan como cambios morfológicos, incluyendo elongación celular y desprendimiento de la monocapa celular [9, 12]. Además provoca vacuolización en otras líneas celulares de vejiga y riñón humano [9].

Vat, es una proteína SPATE codificada en un plásmido, la cual es responsable de la actividad citotóxica (formación de vacuolas) producida por ciertas cepas de *E. coli* patógena aviar (APEC). Vat está codificada en una isla de patogenicidad I insertada adyacente al gen *thr* tRNA. La presencia de *vat* en esta posición ha sido demostrada para la cepa uropatógena de *E. coli* CFT073. Recientemente se ha observado que Vat se expresa en ratones durante infecciones experimentales en el tracto urinario; aunque la contribución de esta SPATE a la infección, en este modelo, no ha sido reportada. Se ha demostrado que Vat es necesaria para la invasión de los tejidos del hospedero y para la completa virulencia de la cepa APEC Ec222 [12].

PicU es otra proteína SPATE, la cual es una homóloga de Pic (proteína involucrada en la colonización intestinal), una proteasa de serina identificada en *Shigella flexneri* y en *E. coli* enteroagregativa (EAEC) encontrada en el cromosoma bacteriano. PicU muestra actividad mucinolítica, degrada la espectrina, pepsina y el factor de coagulación humano V [26]. Como el tracto urinario está revestido con una capa mucosa, PicU puede estar asociada con la colonización, ya que su capacidad mucinolítica le permitiría abrir una brecha en esta capa protectora permitiendo el

establecimiento de la infección bacteriana [22]. No se ha observado que la proteína Pic produzca efectos citotóxicos [6, 11].

Tsh también es una proteína SPATE, tiene actividad de hemaglutinina sensible a la temperatura, fue identificada inicialmente en una cepa APEC, la cual causa infecciones diseminadas en aves [12]. Recientemente se ha asociado con cepas de *E. coli* causantes de pielonefritis aguda, se ha observado que se expresa durante la ITU y que el gen *tsh* es más frecuente entre las cepas de *E. coli* causantes de ITU que entre las cepas comensales de esta bacteria [12]. Estudios posteriores mostraron que *E. coli* K-12 contienen el gen recombinante *tsh* que produce 2 proteínas, una extracelular de 106 kDa y una proteína de membrana externa de 33kDa [11].

#### **2.4.4 TOXINAS TIPO SHIGA (SLT)**

Manjarrez, *et al*<sup>38</sup> han encontrado que entre las cepas aisladas de ITUs en la población mexicana, están presentes serotipos vinculados con cepas de *E. coli* productoras de toxinas tipo Shiga, también llamadas Verotoxinas. Estas toxinas, son características de las cepas enterohemorrágicas de *Escherichia coli*, poseen una alta similitud con las toxinas producidas por *Shigella dysenteriae* y son codificadas por bacteriófagos. Han sido clasificadas en dos tipos antigénicamente distintos: Stx1 que es idéntica la toxina de *Shigella dysenteriae* y Stx2 que muestra un 56% de homología con ésta [33]. Ambas están codificadas por bacteriófagos y están compuestas por una subunidad A enzimáticamente activa (32 kDa) rodeada de un

pentámero de subunidades B (77kDa cada subunidad) que reconocen al receptor glucolípido específico (GB<sub>3</sub>). La subunidad A entra a la célula hospedera e induce la muerte celular mediante la inhibición de la síntesis de proteínas a nivel ribosomal [5, 33].

## **JUSTIFICACIÓN**

### **3. Justificación**

Las infecciones en el tracto urinario (ITUs) afectan a una gran proporción de la población mundial y son consideradas como una de las infecciones bacterianas que más comúnmente afectan al ser humano. *Escherichia coli* es el agente causal en la mayoría de los casos de infecciones urinarias, por lo que el conocimiento de sus características genotípicas y fenotípicas permitirá entender mejor el mecanismo de patogenicidad de dichas bacterias y así proveer herramientas para un diagnóstico certero y un mejor tratamiento. Se conoce poco respecto a los factores de virulencia que portan las cepas de *E. coli* causantes de ITUs en la población mexicana. Las toxinas son un importante factor de virulencia en una variedad de enfermedades causadas por *E. coli*. La producción de toxinas por bacterias colonizadoras puede causar una respuesta inflamatoria que conduzca a la aparición de los síntomas de ITU.

En consecuencia, en el presente trabajo se consideró importante determinar la presencia de genes que codifican para toxinas en cepas de *E. coli* responsables de ITU y analizar los serotipos de dichas cepas. Las cepas bacterianas fueron aisladas de la orina de pacientes de hospitales localizados en la Ciudad de México.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **4.1 HIPÓTESIS**

Las cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU, en la ciudad de México, tienen una variedad de toxinas que producen daño celular.

### **4.2 OBJETIVOS**

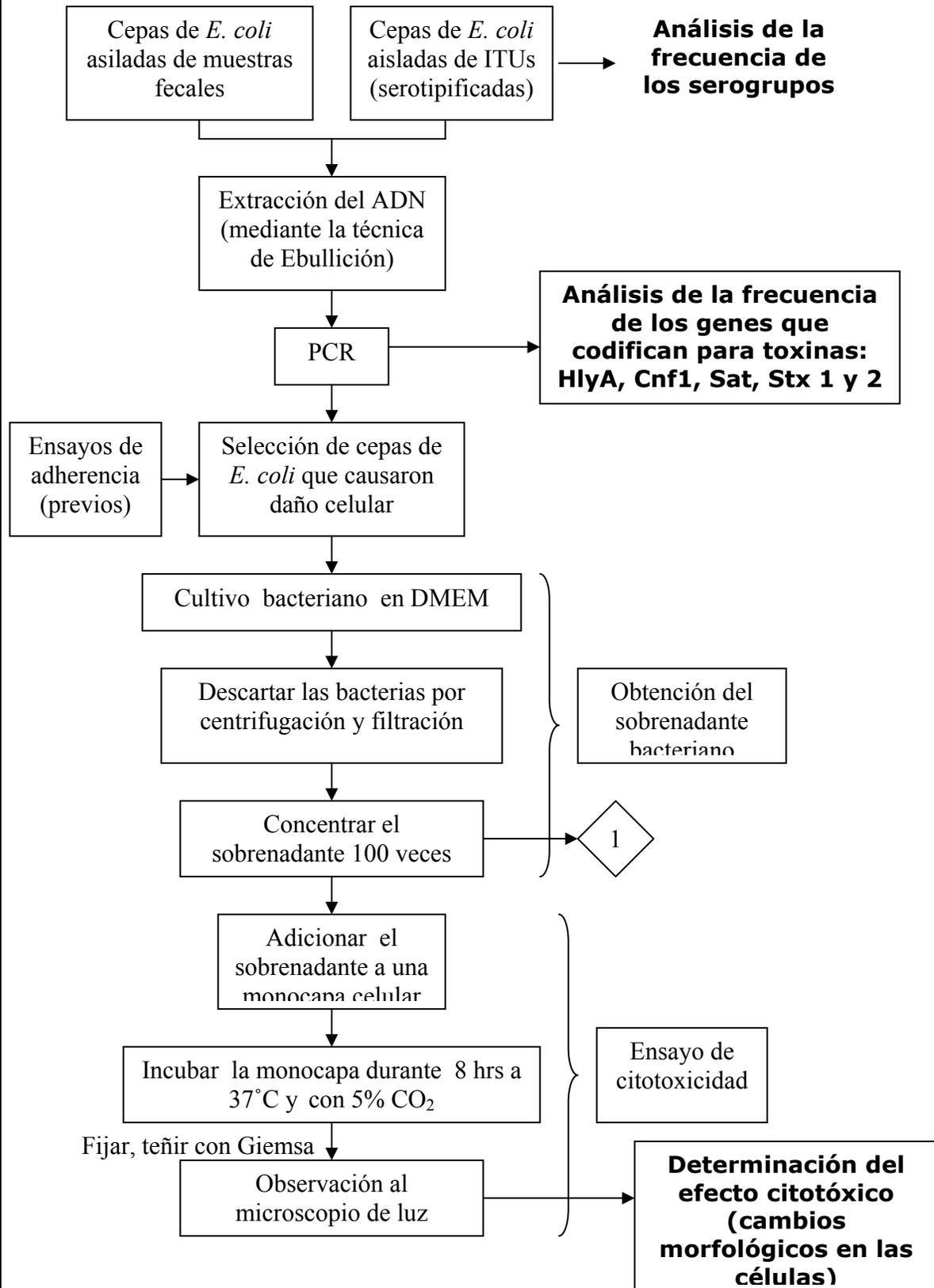
#### **4.2.1 OBJETIVO GENERAL**

Determinar la presencia de genes que codifican para toxinas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes con ITUs y evaluar el daño celular que producen en células cultivadas.

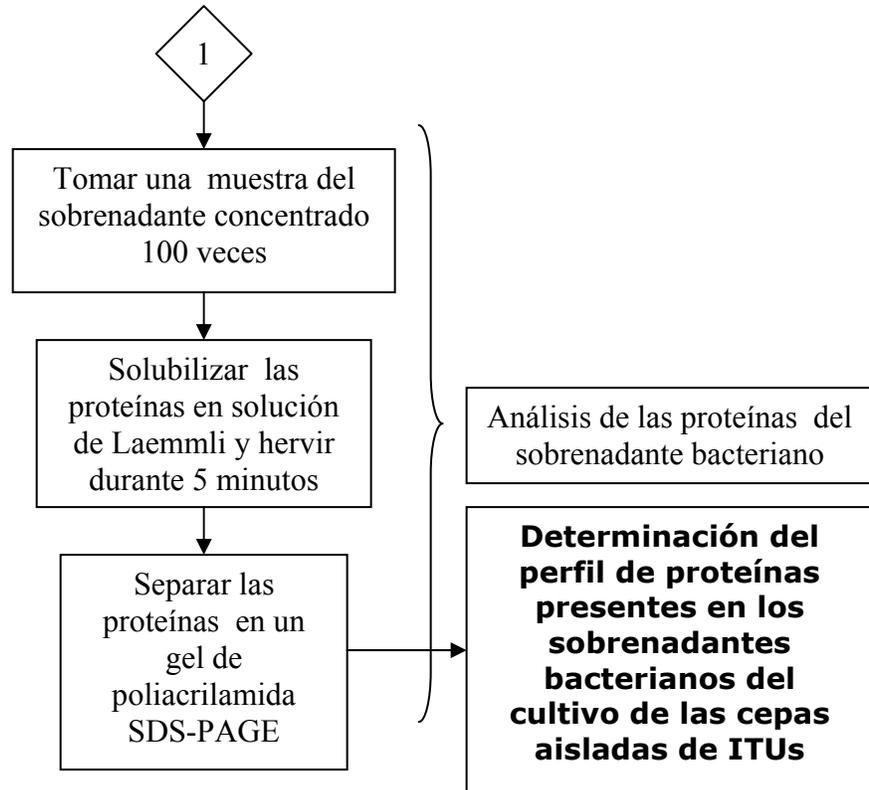
#### **4.2.2 OBJETIVOS PARTICULARES**

- Determinar la frecuencia y distribución de cinco genes (*hly*, *sat*, *cnf1*, *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>*) que codifican para toxinas, tanto en cepas de *E. coli* causantes de ITUs como en cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales.
- Determinar si las proteínas secretadas producen daño en células de vejiga humana (células T24) y células de riñón de mono verde africano (VERO).
- Analizar las proteínas bacterianas secretadas al medio de cultivo mediante electroforesis.
- Determinar la frecuencia y distribución de los serotipos de las cepas de *E. coli* aisladas de ITUs.

**Diseño experimental**



**Diseño experimental**  
(continuación)



## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **6.1 APARATOS**

- *Electroforesis en geles de agarosa.* Electroforesis Power Supply- EPS 3500 Pharmacia, cámara horizontal minicell primo S320, High Performance Ultraviolet Transilluminador UVP Upland, CA 91786 USA.
- *Centrifugación.* Centrífuga SORVALL RC 5B plus DUPONT, rotor SORVALL H 1000B, concentrador AMIKON 8200, microcentrífuga de mesa Sigma 1-15K.
- *Varios.* Incubadora Fisher 230F, termociclador BIO RAD iCycler, campana de flujo laminar 1839 S/N15010-453 Forma Scientific. Inc SA, refrigerador and/of Freezer Lab-line Instruments, Inc., membrana Millipore 50 KDa, incubadora Baxter WJ301 D Scientific Products Ultra Tech, microscopio de luz invertido ZEISS West Germany J 473012-9901, microscopio de luz CARL ZEISS West Germany J 08086611, mini cámara para electroforesis BIO RAD.

### **6.2 MATERIALES**

#### **6.2.1 REACTIVOS**

##### **6.2.1a PCR**

- *Procedimiento de amplificación.* dNTP's 10mM (mezcla de los cuatro desoxirribonucleótidos) (invitrogen), MgCl<sub>2</sub> 50 mM (invitrogen), buffer para PCR

10X (Invitrogen), Taq polimerasa (Invitrogen), secuencia de oligonucleótidos para PCR (Invitrogen).

- *Electroforesis en geles de agarosa.* TAE (solución reguladora para electroforesis), bromuro de etidio (BIO RAD), agarosa (Bio-Whittaker), Gene Ruler™ 100pb DNA Ladder (Fermentas), amortiguador de carga 10X.
- *SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida.* Ácido tricloroacético, tris-base, acrilamida (Sigma), N,N'-metilen-bis-acrilamida (Sigma), TEMED (LKB), duodecil sulfato de sodio (Sigma), persulfato de amonio, anfolinas pH 3.5-10 y pH 5.0-7.0 (LKB), amortiguador de Laemmli, β-mercaptoetanol (LKB), azul de Coomassie R-250 (GIBCO BRL).

### **6.2.1b Ensayo de Citotoxicidad**

- *Ensayo de citotoxicidad.* Tripsina (Biomedics, Inc), PBS, metanol (Tecsiquim), ácido acético (Tecsiquim), giemsa, acetona, xilol, bálsamo de Canadá (Fisher Scientific Company).

## **6.2.2 CÉLULAS**

### **6.2.2a Cepas Bacterianas**

Las 51 cepas de *E. coli* utilizadas en este estudio fueron obtenidas de muestras de pacientes con signos clínicos de infección en el tracto urinario y una cuenta mayor a

100 000 UFC por ml. Además, ninguno de los pacientes presentaba alteraciones morfológicas en el tracto urinario, embarazo o padecen alguna enfermedad degenerativa grave. También fueron recuperadas 29 cepas de *E. coli* de muestras fecales de individuos sanos. Todos los pacientes provienen del Hospital Regional de Tlatelolco, ISSSTE.

Como controles positivos en la búsqueda de genes se emplearon:

- Cepa de *E. coli* (57). Donada por el Dr. Joaquín Ruiz, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, España. Aislada de un paciente con prostatitis (para los genes *hly* y *cnf1*).
- Cepa de *E. coli* (28). Donada por el Dr. Joaquín Ruiz, Facultad de Medicina, Universidad de Barcelona, España. Aislada de un paciente con prostatitis (para el gen *sat*).
- Cepas de *E. coli* (91984). Aislada de un paciente con ITU procedente del Hospital regional de Tlatelolco (para los genes *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>*).

#### **6.2.2b Líneas Celulares**

Para realizar los ensayos de citotoxicidad se emplearon dos líneas celulares:

- Vero: células de riñón de mono verde africano.
- T24: células de carcinoma de vejiga de humana.

### **6.2.3 MEDIOS DE CULTIVO**

- *Cultivo celular.* Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) para células Vero, y medio McCoy para las células T24.
- *Cultivo bacteriano.* Caldo Luria-Bertani (LB), agar sangre, agar Mc Conkey, medio gelosa especial.

## **6.3 MÉTODOS**

### **6.3.1 CULTIVO BACTERIANO**

Se verificó la pureza de las cepas mediante la observación de la morfología de las colonias en agar Sangre y agar Mac Conkey, posteriormente fueron almacenadas en medio gelosa especial inclinado.

### **6.3.2 MÉTODOS PARA LA OBTENCIÓN DEL ADN BACTERIANO**

Para la extracción del ADN total se probaron la técnica de ebullición (LE BOUGUENEC, *et al*<sup>17</sup>) y el protocolo de aislamiento de ADN genómico para bacterias gram negativas (QIAGEN) que a continuación se describen.

### **6.3.2a Técnica de Ebullición**

Las cepas fueron inoculadas en 1 ml de caldo LB y se incubaron por 18 horas a 37 °C. Posteriormente, el cultivo se centrifugó a 8000xg durante 10 minutos, el sobrenadante obtenido se desechó y el botón fue resuspendido en 500 µL de agua destilada estéril y se hirvió 10 minutos. Al concluir este tiempo, se centrifugó a 8000xg por 10 minutos. El sobrenadante se guardó a –20 °C hasta que se realizó la PCR.

**6.3.2b Protocolo de aislamiento de ADN genómico para bacterias gram negativas (QIAGEN).** Este es un juego de reactivos (kit, del inglés) comercial para obtener eficiente el ADN celular. Se utilizó cuando los resultados fueron dudosos o para confirmar los datos obtenidos.

Las cepas fueron inoculadas en 1 ml de caldo LB y se incubaron por 18 horas a 37 °C, posteriormente el cultivo se centrifugó a 5000xg por 10 minutos, se descartó el sobrenadante y el botón fue resuspendido en 180 µl del amortiguador ATL, enseguida se adicionaron 20 µl de proteinasa K, se mezcló y fue incubada a 55 °C por 3 horas, durante este tiempo se agitó ocasionalmente para dispersar la muestra. Al concluir la incubación, se colocaron 4 µl de ARNasa A (100 mg/ml), fue mezclada y se incubó por 2 minutos a temperatura ambiente, luego se agregaron 200 µl del amortiguador AL, se homogenizó la muestra y se incubó 10 minutos a 70 °C. Al finalizar el tiempo de incubación, se adicionaron 200 µl de etanol (100%) y la mezcla

fue colocada en la columna, la cual fue centrifugada durante un minuto a 6000xg. Se desechó el líquido que pasó a través de la columna y se añadieron 500 µl del amortiguador AW1, se centrifugó nuevamente por 1 minuto a 6000xg para posteriormente descartar el líquido y adicionar 500 µl del amortiguador AW2, la centrifugación se hizo a la máxima velocidad por 3 minutos para lavar la membrana. Para eluir el ADN, se colocaron 200 µl del amortiguador AE directamente sobre la membrana, se incubó a temperatura ambiente por 1 minuto y se centrifugó por un minuto a 6000xg. El líquido que pasó a través de la membrana fue guardado a -20 °C hasta que se realizó la PCR.

El ADN obtenido mediante ambas técnicas mostraron una pureza satisfactoria para llevar a cabo la reacción en cadena de la polimerasa, por lo cual la elección de la metodología a emplear se llevó a cabo tomando en cuenta otros factores como son el costo y el tiempo de extracción. De tal forma que la extracción del ADN genómico de la mayoría de las cepas de *E. coli* se realizó mediante la técnica de ebullición.

### **6.3.3 REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)**

Se emplearon oligonucleótidos específicos para amplificar las secuencias de los genes *hly*, *cnf1*, *sat*, *stx<sub>1</sub>* y *stx<sub>2</sub>*. Los detalles de las secuencias, los tamaños de los productos amplificados y las temperaturas de alineamiento se muestran en la Tabla 2.

**TABLA 2.** Oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento usados durante la amplificación de los genes que codifican para proteínas o toxinas de cepas de *Escherichia coli*.

Proteína o toxina	Secuencia del oligonucleótido (5'-3')	Temperatura de alineamiento (°C)	Tamaño (pb) del producto amplificado	Referencia
HlyA	AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA	63	1177	RUIZ, <i>et. al.</i> <sup>24</sup>
Cnf1	AAGATGGAGTTTCCTATGCAGGAG CATTGAGAGTCCTGCCCTCATtATT	63	498	RUIZ, <i>et. al.</i> <sup>24</sup>
Sat	ACTGGCGGACTCATGCTGT AACCCCTGTAAGAAGACTGAGC	55	387	RUIZ, <i>et. al.</i> <sup>24</sup>
Stx1	CGCTGAATGTCATTCGCTCTGC CGTGGTATAGCTACTGTCCACC	55	302	BLANCO, <i>et. al.</i> <sup>2</sup>
Stx2	CTTCGGTATCCTATTCCCGG CTGCTGTGACAGTGACAAAACGC	55	516	BLANCO, <i>et. al.</i> <sup>2</sup>

HlyA = hemolisina, Cnf1= factor necrozante citotóxico, Sat = toxina autotransportadora secretada, Stx1= toxina tipo Shiga 1, Stx2 = toxina tipo Shiga 2.

La composición de la mezcla de reacción empleada para la amplificación del extracto de ADN bacteriano se indica en la Tabla 3.

**TABLA 3.** Composición de la mezcla de reacción para PCR.

Reactivos	Volumen	Concentración final
Agua	14.35 µl	-
Templado de ADN bacteriano	5.00 µl	-
Oligonucleótido 1	3.00 µl	1.0µM
Oligonucleótido 2	3.00 µl	1.0µM
Amortiguador para PCR	3.00 µl	1X
dNTP's	0.60 µl	0.2 mM (cada dNTP)
MgCl <sub>2</sub>	0.90 µl	1.5 mM
Taq polimerasa	0.15 µl	2.5 U
Volumen final 30.00 µl		

El procedimiento de amplificación consiste en una desnaturalización inicial a 95 °C durante un minuto, seguido de 30 ciclos de desnaturalización a 95 °C por 1 minuto, alineamiento a 63 °C (*hly* y *cnf1*) o 55 °C (*sat*, *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>) por un minuto, y expansión a 72 °C por un minuto.

Los productos obtenidos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.5% que contenía 4 µl de bromuro de etidio por cada 100 mL de agarosa. El gel se colocó en una cámara horizontal para electroforesis, en cada pozo de este se depositaron 5 µl de la muestra, y se le aplicó una corriente de 60 volts por 45 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador UV.

#### **6.3.4 OBTENCIÓN DEL SOBRENADANTE BACTERIANO**

Se sembró la cepa bacteriana en 1 ml de caldo LB y se incubó a 37 °C durante toda la noche. Al día siguiente, se inocularon 200 µl del cultivo bacteriano en 200 ml de medio de cultivo de células eucariontes llamado DMEM (proporción 1:1000), a este medio se le aumentó la concentración de bicarbonato de sodio a 24.0 mM y de HEPES a 20 mM y se incubó durante 8 horas a 37 °C. Al concluir el tiempo de incubación, el cultivo fue centrifugado a 7000xg durante 20 minutos, se desechó el botón bacteriano y el sobrenadante se filtró a través de una membrana de 0.45 µm para eliminar residuos bacterianos. Posteriormente el sobrenadante fue concentrado a un volumen de 1 ml utilizando un concentrador Amikon con una membrana con corte a los 50 kDa. Para evitar contaminación bacteriana, el sobrenadante

concentrado se filtró con una membrana de tamaño de poro de 0.25  $\mu\text{m}$ . El sobrenadante se transfirió a un tubo eppendorf estéril y se guardó a  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  para ser usado cuando se requiera en el ensayo de citotoxicidad.

### **6.3.5 CULTIVO CELULAR**

Las células VERO fueron mantenidas en una atmósfera con 5% de  $\text{CO}_2$  a  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  en DMEM suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB), 1 ml de solución de bicarbonato de sodio al 7.5%, 1% de HEPES 1.0 M, 1% de antibióticos (penicilina/streptomicina 10, 000 U/mL) y 1% de L-Glutamina 200 mM. Las células fueron rutinariamente propagadas en botellas especiales para cultivo celular y cuando alcanzaron la confluencia fueron sembradas a otras dos botellas. El medio fue reemplazado cada 2 días y las células fueron utilizadas cuando alcanzaron el 80% de confluencia.

El procedimiento de cultivo de las células T24 sólo varía en el medio de cultivo empleado, ya que en este caso se utilizó Medio McCoy.

### **6.3.6 ENSAYO DE CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS (VERO o T24)**

El ensayo de citotoxicidad se realizó para determinar si el sobrenadante bacteriano tiene actividad citotóxica, para esto se empleó la técnica descrita por DUTTA, *et al*<sup>6</sup> a la cual se le realizaron ligeras modificaciones.

Brevemente, los sobrenadantes de los cultivos bacterianos, concentrados y libres de bacterias, se agregaron a la monocapa de células (Vero o T24) mantenidas en cultivo y se incubaron por 8 hrs. La prueba se desarrollo colocando una lenteja de vidrio de 1 cm de diámetro en cada uno de los 24 pozos de una placa de polipropileno, a los cuales se les agregó una suspensión de células a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  células por ml, se incubaron a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub> durante 24 horas para formar una monocapa con 80% de confluencia. El ensayo se realizó en un volumen total de 500 µl para lo cual se adicionaron 300 µl de medio de cultivo (pH 7.2) a cada pozo y 200 µl del sobrenadante bacteriano concentrado (muestras problema). Se realizó la observación de cada uno de los pozos (con el microscopio invertido) para determinar las características iniciales del cultivo celular como: cantidad de células adheridas, distribución, células desprendidas, etc. La placa fue incubada por 8 horas a 37 °C con 5% CO<sub>2</sub>. Después de este tiempo se eliminó el medio de cultivo y la placa se dejó secar durante dos o tres minutos. Las células se fijaron con 1 ml de una mezcla de metanol:ácido acético en una proporción 3:1 durante 20 minutos. Posteriormente se tiñeron con el colorante de Giemsa por 20 minutos y se lavaron 3 veces con 1 mL de agua desionizada para eliminar el exceso de colorante. Las células se deshidrataron pasando la lenteja por acetona y xileno. La preparación se colocó en un portaobjetos fijándola con bálsamo de Canadá para posteriormente observarlas al microscopio de luz.

### **6.3.7 SDS-ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)**

#### **6.3.7a. Precipitación de Proteínas**

A una muestra de 30  $\mu$ l del sobrenadante bacteriano concentrado se le agregó ácido tricloroacético hasta obtener una concentración final del 10%. Posteriormente se dejaron a  $-20$  °C durante 5 minutos para después ser centrifugados a 14 000xg por 10 minutos. Al concluir la centrifugación el sobrenadante fue eliminado y se neutralizó la acidez adicionando 40  $\mu$ l de Tris base 1.0 M.

#### **6.3.7b. Preparación de la Muestra**

Para correr la electroforesis, a la suspensión de proteínas se le adicionó 10  $\mu$ l de amortiguador de Laemmli y 2.5  $\mu$ l de  $\beta$ -mercaptoetanol y la mezcla fue hervida a 100 °C durante 5 minutos.

#### **6.3.7c. SDS-PAGE**

Las proteínas presentes en los sobrenadantes obtenidos de los aislados de ITU fueron separadas en un gel de poliacrilamida al 12.5%. El gel se colocó en una mini cámara vertical para electroforesis, en cada pozo de este se depositaron 30  $\mu$ l de la muestra, y se realizó a un amperaje constante de 20 mA por 1 hora. Las proteínas fueron teñidas con azul de Coomassie durante 1 hora en agitación. El exceso de colorante fue eliminado empleando una mezcla de etanol:ácido acético (1:1).

## RESULTADOS

### 7.1 DETECCIÓN DE GENES DE VIRULENCIA MEDIANTE LA TÉCNICA DE PCR

La presencia de los genes que codifican para cinco proteínas o toxinas en cepas de *E. coli* fue determinada mediante la técnica de PCR. De las 51 cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con infección en el tracto urinario, los resultados obtenidos se muestran en la Tabla 4.

**TABLA 4.** Serotipos y genes que codifican para toxinas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones en el tracto urinario.

Cepa	Serotipo	Gen Amplificado				
		<i>hly</i>	<i>cnf1</i>	<i>sat</i>	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>
01	<b>O7:H-</b>			♦		
02	<b>O18ab:H31</b>					
03	<b><u>O6:H31</u></b>	♦	♦			
04	O?:H-					
05	O103:H?					
06	<b>O25</b>			♦		
07	<b>O12:H-</b>					
08	O11:H-			♦		
09	<b>O25</b>			♦		
010	O53:H2			♦		
011	O164:H-	♦	♦	♦		
012	O?:H9					
013	O12:H2					
014	O15:H-					
015	<b>O18ac:H-</b>			♦		
017	OR			♦		
018	OR			♦		
019	O?:H-					
020	<b><u>O8:H-</u></b>	♦				
021	O?:H-					
022	<b><u>O4:H-</u></b>					
023	O?:H-				♦	
024	<b><u>O75:H5</u></b>			♦		
025	O?:H-					
026	O44:H18			♦		
027	OR:H28			♦		

*hly* = hemolisina, *cnf1* = factor necrozante citotóxico, *sat* = toxina autotransportadora secretada, *stx*<sub>1</sub> = toxina tipo Shiga 1, *stx*<sub>2</sub> = toxina tipo Shiga 2, ♦ = presencia del gen, O = serogrupos asociados a ITU[3], \_\_\_ = serotipos asociados a cepas productoras de toxinas tipo Shiga [35]

**TABLA 4.** Serotipos y genes que codifican para toxinas en cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones en el tracto urinario (continuación)

Cepa	Serotipo	Gen Amplificado				
		<i>hly</i>	<i>cnf1</i>	<i>sat</i>	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>
028	OR:H-					
029	O?			♦		
030	O100:H12					
032	OR:H6					
033	O90:H-			♦		
034	O?			♦		
035	O9:H-					
036	OR:H-					
037	O166:H42					
038	O37:H10					
039	<b>O6:H?</b>	♦	♦			
040	<b>O25</b>			♦		
041	<b>O6:H-</b>	♦	♦	♦		
042	OR:H-					
043	<b>O25:H4</b>			♦		
045	<b>O2</b>	♦	♦			
046	O101:H-					
049	OR					
050	O?:H10				♦	
051	<b>O25:H4</b>			♦		
052	OR			♦		
053	<b>O25:H?</b>			♦		
054	O?					
056	<b>O25:H4</b>					
057	<b>O6:H1</b>			♦		

*hly* = hemolisina, *cnf1* = factor necrozante citotóxico, *sat* = toxina autotransportadora secretada, *stx*<sub>1</sub> = toxina tipo Shiga 1, *stx*<sub>2</sub> = toxina tipo Shiga 2, ♦ = presencia del gen, **O** = serogrupos asociados a ITU[3], \_\_\_ = serotipos asociados a cepas productoras de toxinas tipo Shiga[35].

Los resultados muestran que el gen que codifica para la proteína Sat es el que se encuentra con mayor frecuencia, ya que el 43% de las cepas de *E. coli* estudiadas lo poseen. De las 51 cepas analizadas el 12% presentan el gen de hemolisina, 10% tienen secuencias relacionadas con el Cnf1 y sólo el 4% de éstas poseen el gen de la toxina Stx1. Ninguna cepa posee el gen que codifica para Stx2.

Un análisis de PCR similar fue realizado a 29 cepas de *E. coli* aisladas de muestras fecales de individuos sanos.

**TABLA 5.** Serotipos y genes que codifican para toxinas en cepas fecales de *Escherichia coli*

Cepa	Serotipo	Gen Amplificado				
		<i>hly</i>	<i>cnf1</i>	<i>sat</i>	<i>stx</i> <sub>1</sub>	<i>stx</i> <sub>2</sub>
809	O8					
1750	O107					
1757	OR	♦	♦			
1759						
1765	O86					
1767A	O22			♦		
1767B	O86	♦		♦		
1768						
1770	O169					
1771A				♦		
1773	O125ab					
1774	O17			♦		
1776		♦	♦			
1782	O25			♦		
1795				♦		
1797						
1802	O103					
1803	OR					
1807						
1808	O59					
036816						
037487						
037216						
046483						
038227						
040934						
037231						
040099						
042173						

*hly* = hemolisina, *cnf1* = factor necrozante citotóxico, *sat* = toxina autotransportadora secretada, *stx*<sub>1</sub> = toxina tipo Shiga 1, *stx*<sub>2</sub> = toxina tipo Shiga 2, ♦ = presencia del gen, O = serogrupos asociados a ITU [3]

Al concluir el análisis de las cepas fecales se encontró que el gen que codifica para la proteína Sat está presente en el 21% de las cepas, notándose que el

porcentaje es menor en relación con el obtenido en las cepas de *E. coli* aisladas de ITUs. Una distribución semejante se observó en los porcentajes de los genes *hly* y *cnf1*, sin embargo la diferencia no es tan clara, ya que en las cepas aisladas de ITUs estos genes se encontraron en 12 y 10% respectivamente, mientras que en las fecales la frecuencia del gen *hly* fue de 10% y del gen *cnf1* de 7%. Así mismo es importante notar que ninguna de las cepas aisladas de muestras fecales posee los genes para las toxinas tipo Shiga 1 y 2.

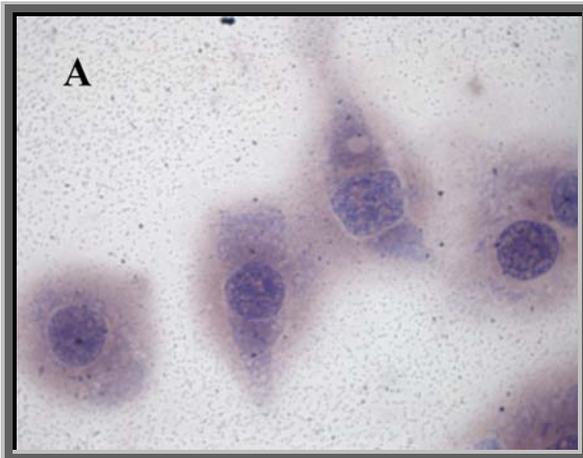
## **7.2 CITOTOXICIDAD**

Durante ensayos de adherencia realizados previamente en nuestro laboratorio, se observó que 12 de las cepas analizadas en el presente trabajo produjeron algún tipo de daño a las células T24 utilizadas en el ensayo, este dato nos indicó que probablemente algunas de las cepas secretan toxinas. Por esta razón se escogieron estas cepas para realizar ensayos de cito toxicidad empleando los sobrenadantes bacterianos concentrados (medio de cultivo donde crecen las bacterias).

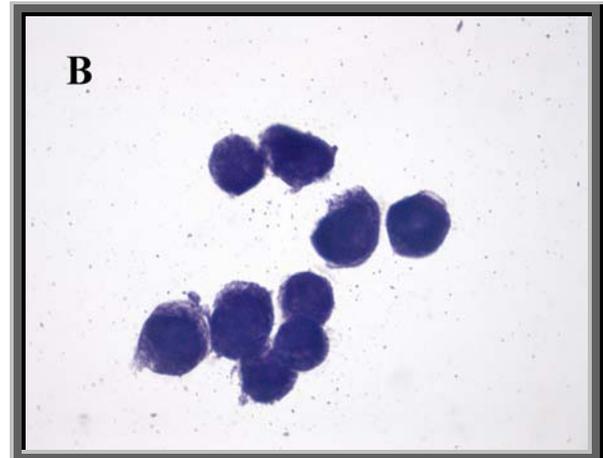
### **7.2.1 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS T24**

Se probaron los 12 sobrenadantes bacterianos de las cepas de *E. coli* mencionadas arriba para observar su posible efecto citotóxico sobre cultivos de células de vejiga humana (células T24). Los resultados mostraron que sólo 5 sobrenadantes produjeron alguna alteración morfológica en las células. Tales sobrenadantes correspondieron las cepas 03, 011, 014, 015 y 041 (Figura 1B). Las principales características observadas en las células T24 dañadas fueron:

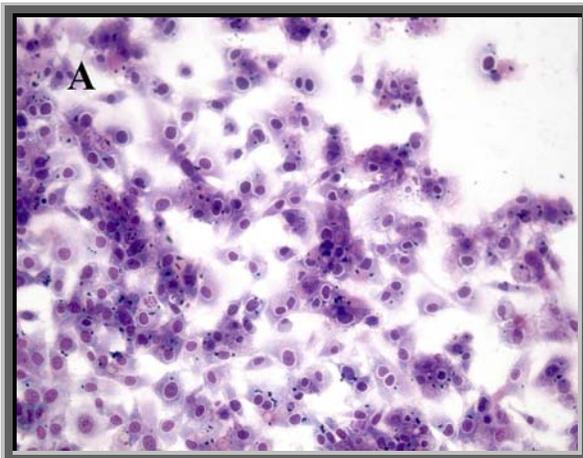
redondeamiento y disminución en la cantidad de citoplasma, este efecto hizo que aumentara la intensidad de la tinción de las células. Los sobrenadantes de las cepas 03, 011 y 014 provocaron además desprendimiento de las células de la superficie del plato de cultivo (Figura 2B), dicho desprendimiento se pudo observar a partir de las 3 horas de incubación.



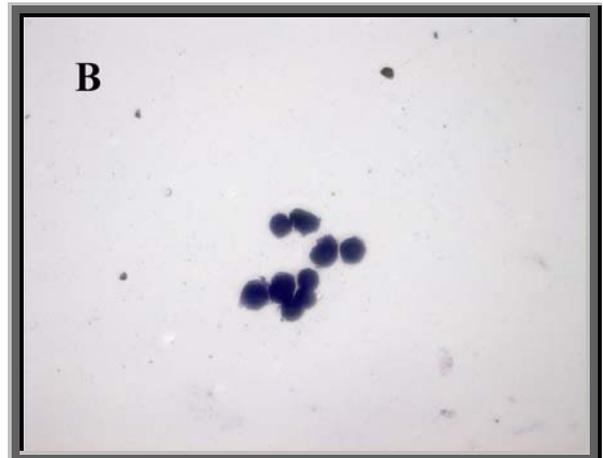
**FIGURA 1A.**Control de Células T24. Se observan células ligeramente alargadas con citoplasma abundante de color claro que rodea al núcleo el cual está intensamente teñido. Aumento 100x



**FIGURA 1B** Redondeamiento celular. Las células se observan redondas y con poco citoplasma lo cual intensifica el color de la tinción (Cepa 03). Aumento 100x



**FIGURA 2A.** Control de Células T24. Las células se encuentran distribuidas de manera homogénea en todo el campo. Aumento 20X.



**FIGURA 2B.** Desprendimiento celular. Una gran parte de la superficie de cultivo presenta zonas vacías debido al desprendimiento celular. (Cepa 03) Aumento 40x.

Los efectos citotóxicos observados en este ensayo se resumen y muestran en la Tabla 6. A pesar del efecto citotóxico producido por algunos sobrenadantes, no observamos en ningún caso la formación de sincitios. Dicho efecto es comúnmente producido por el Cnf1.

**TABLA 6.** Ensayo de citotoxicidad sobre células T24 (observaciones).

Cepa	Redondeamiento celular	Sincitios	Desprendimiento celular	Daño en el citoplasma	Genes
03	+++	-	+++	-	<i>hly, cnf1</i>
06	-	-	-	-	<i>sat</i>
07	-	-	-	-	
011	+	-	+	+	<i>hly, cnf1, sat</i>
012	-	-	-	-	
014	++	-	++	-	
015	+	-	-	+	<i>sat</i>
022	-	-	-	-	
041	+	-	-	-	<i>hly, cnf1, sat</i>
045	-	-	-	-	<i>hly, cnf1</i>
051	-	-	-	-	<i>sat</i>
052	-	-	-	-	<i>sat</i>

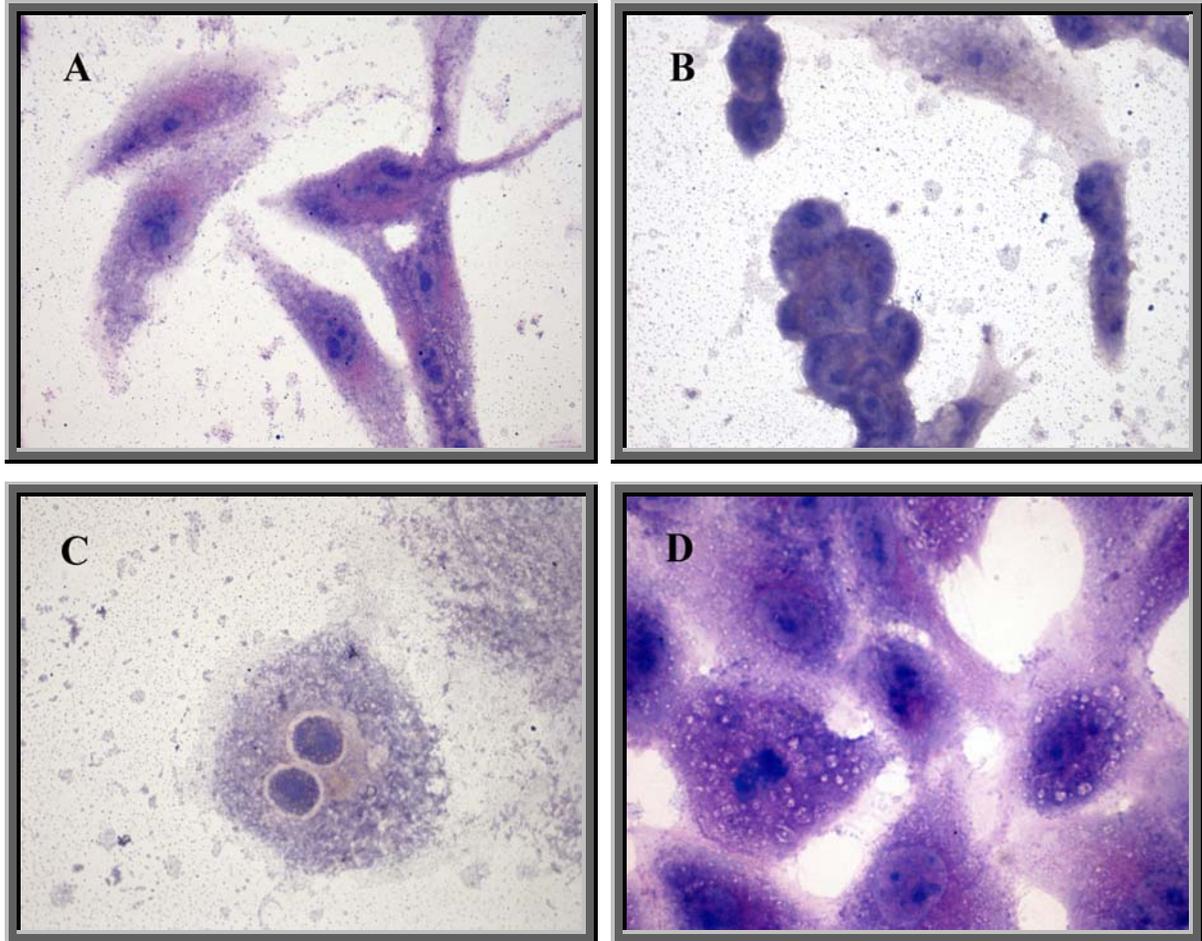
+++ = 40% del cultivo celular presenta el efecto/sobre control celular, ++ = 25% del cultivo celular presenta el efecto/sobre control celular, + = 10 % del cultivo celular presenta el efecto/sobre control celular, - Ausencia del efecto

### 7.2.1 CITOTOXICIDAD EN CÉLULAS VERO

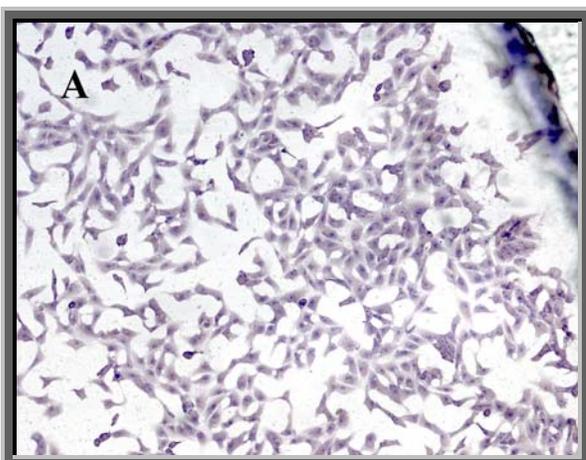
La actividad citotóxica de los 12 sobrenadantes se probó también en células VERO (células de riñón de mono verde). Las células VERO han sido ampliamente usadas como blanco celular de toxinas tales como la toxina Shiga y las toxinas tipo Shiga 1 y 2 (SLT-1 y SLT-2), estas últimas también son llamadas verotoxinas 1 y 2, debido a que tienen una actividad muy marcada sobre las células VERO. En general

dichas células han demostrado ser sensibles a una amplia variedad de toxinas bacterianas.

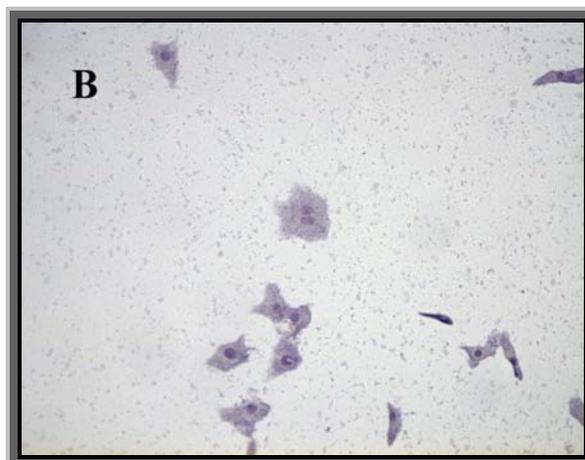
En el ensayo de citotoxicidad en células VERO se observó que la mayoría de los sobrenadantes concentrados produjeron cambios morfológicos en las células, tales como: redondeamiento celular (disminución de la cantidad de citoplasma y coloración intensa de la célula) (Figura 3B), multinucleación (sincitios) (Figura 3C), y daño en el citoplasma (presencia de vacuolas) (Figura 3D). Además hubo desprendimiento de células de la monocapa (Figura 4B); efecto que se observó en algunas cepas desde las 3 horas de incubación (06, 07, 015, 045), las cepas 012 y 014 presentaron dicho efecto a las 6 horas, y otras hasta concluir el tiempo de incubación que fue de 8 horas (051).



**FIGURA 3A.** Control de Células VERO. Las células se observan alargadas con gran cantidad de citoplasma que rodea al núcleo el cual es redondo y se observa la presencia de zonas teñidas intensamente en su interior. **FIGURA 3B.** Redondeamiento celular. Las células se observan agrupadas y han adquirido una forma redondeada. se aprecia poca cantidad de citoplasma y una coloración intensa (Cepa 03). **FIGURA 3C.** Multinucleación. Se observa la presencia de dos núcleos en una sola célula. El citoplasma es abundante y rodea a estas dos estructuras que se encuentran teñidas de un color más intenso. (Cepa 012). **FIGURA 3D.** Daño en el citoplasma (presencia de vacuolas). Se aprecian zonas traslucidas en el citoplasma de la célula (Cepa 015). Aumento 100x.



**FIGURA 4A.**Control de Células VERO. Las células se encuentran distribuidas de manera homogénea a lo en todo el campo. Aumento 10x.



**FIGURA 4B**Desprendimiento celular. Gran parte de la superficie de cultivo presenta zonas vacías debido al desprendimiento celular. (Cepa 012). Aumento 10x.

La siguiente tabla muestra un resumen de los efectos producidos por los sobrenadantes concentrados sobre monocapas de células VERO.

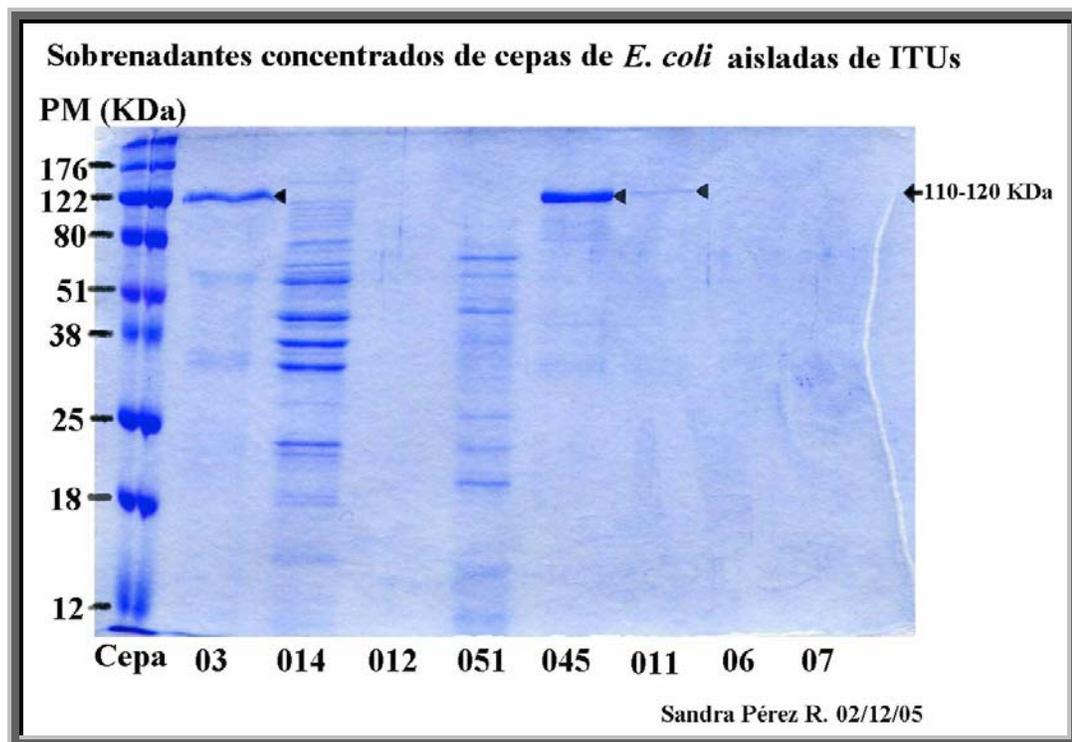
**TABLA 7.** Ensayo de citotoxicidad sobre células VERO (observaciones).

Cepa	Redondeamiento celular	Sincitios	Desprendimiento celular	Daño en el citoplasma	Genes
03	+++	-	+	-	<i>hly, cnf1</i>
06	+++	-	+	+	<i>sat</i>
07	+	-	+	-	
011	+	-	+	+	<i>hly, cnf1, sat</i>
012	+	+++	++	-	
014	++	-	+	-	
015	++	++	-	+	<i>sat</i>
022	-	-	-	-	
041	++	+	-	-	<i>hly, cnf1, sat</i>
045	-	-	-	-	<i>hly, cnf1</i>
051	++	+	+++	-	<i>sat</i>
052	+	-	-	-	<i>sat</i>

+++ = 40% del cultivo celular presenta el efecto/sobre control celular, ++ = 25% del cultivo celular presenta el efecto/sobre control celular, + = 10 % del cultivo celular presenta el efecto/sobre control celular, - Ausencia del efecto

### 7.3 SDS-ELECTROFORESIS EN GEL DE POLIACRILAMIDA (SDS-PAGE)

Los sobrenadantes del cultivo bacteriano de las cepas 03, 06, 07, 011, 012, 014, 045 y 051, fueron sometidos a un análisis electroforético. La elección de estos sobrenadantes fue hecha en base a los genes encontrados mediante PCR y a los efectos de citotoxicidad observados. El patrón de bandas encontrado se visualiza en la Figura 5.



**FIGURA 5.** Perfil de proteínas presentes en los sobrenadantes bacterianos del cultivo de cepas de *E. coli* aisladas de ITUs (SDS-PAGE).

La presencia de una banda en la zona correspondiente a los 110-120 KDa en las cepas 03, 011 y 045 correlaciona con los pesos moleculares de las proteínas Hly, Sat y Cnf1 que son de 110 KDa, 107 KDa y 114 KDa respectivamente. Es

interesante notar que las cepas 03 y 045 sólo poseen los genes *hly* y *cnf1*; mientras que la cepa 011 tiene los tres genes (*hly*, *cnf1* y *sat*).

Una gran cantidad de bandas de diferentes pesos moleculares se observan en los sobrenadantes correspondientes a las cepas 014 y 051, las cuales probablemente se deben a contaminación proveniente de muerte celular bacteriana. Con este experimento preliminar podemos saber si las distintas cepas bacterianas secretan proteínas en nuestros cultivos. La estandarización de estos métodos es muy útil para la futura purificación e identificación de toxinas causantes de daño celular. Ninguna banda fue apreciada en el resto de los sobrenadantes (cepas 012, 06 y 07), no obstante que la cepa 06 tiene el gen *sat*.

## **DISCUSIÓN DE RESULTADOS**

Las ITUs son causadas principalmente por cepas de *Escherichia coli*, las cuales expresan una variedad de factores de virulencia como por ejemplo: sideróforos, adhesinas y toxinas, que le permiten la adaptación a un ambiente hostil como lo es el tracto urinario, y la evasión del sistema inmune [26].

Ciertos genes han sido asociados con cepas de *E. coli* capaces de ocasionar ITUs, sin embargo, ninguno de ellos por sí mismo puede ser empleado para definir una cepa como uropatógena ya que se ha observado que éstas difieren considerablemente en cuanto a los factores de virulencia que poseen y al serotipo al que pertenecen, indicando una gran diversidad genética entre ellas [4, 18, 26].

La serotipificación de las 51 cepas analizadas en el presente estudio muestra que 20 % de las cepas no produjeron una reacción positiva con los 196 antisueros empleados y otro 18 % posee un fenotipo rugoso; de tal forma que sólo fue posible determinar el antígeno somático de 30 cepas (62%), las cuáles se repartieron en 21 serogrupos diferentes. Un estudio semejante fue realizado por BLANCO, *et al*<sup>3</sup>, en el cual se serotificaron 103 cepas de *E. coli* aisladas de ITUs, las cuales se repartieron en 27 serogrupos distintos, corroborando lo heterogéneo que es el grupo de cepas de *E. coli* aisladas de ITUs.

El 56 % de las cepas serotipificadas en el presente estudio pueden englobarse en los siguientes serogrupos: O2, O4, O6, O7, O8, O18, O25, O75; los cuáles han sido continuamente asociados con cepas causantes de ITUs. La frecuencia del serogrupo O25 es mayor entre nuestras cepas (7 cepas) seguido del O6 con 4 cepas. Estos datos difieren con respecto a los reportados en otros países, como España, Inglaterra y Finlandia [3], en donde el serogrupo O6 ha sido hallado con mayor frecuencia, mientras que el O25 sólo ha sido encontrado en un 3 % de las cepas analizadas en Finlandia [3]. Al igual que la frecuencia, la distribución de los serogrupos O en estos países varía con respecto a lo encontrado en el presente estudio, observándose serogrupos no hallados entre nuestras cepas y viceversa, sugiriendo que los factores geográficos pueden estar relacionados [3].

En el presente estudio se analizó la distribución de cinco genes en las 51 cepas de *E. coli* aisladas de ITUs, tres de los cuales codifican para proteínas asociadas a ITUs (Sat, Hly, Cnf1), y los dos restantes para las toxinas tipo Shiga 1 y 2. Aunque estas dos últimas toxinas no han sido relacionadas con la patogénesis de las infecciones en las vías urinarias, nosotros encontramos que 9 de las cepas de este estudio poseen serotipos asociados con cepas productoras de verotoxinas (VTEC) (O6/H31, O12/H-, O11/H-, O15/H-, O8/H-, O4, H-, O75/H5 y O9/H-). Datos reportados por MANJARREZ, *et al*<sup>38</sup> corroboran nuestros resultados ya que reporta que serotipos vinculados con cepas VTEC se encuentran presentes entre cepas aisladas de ITUs. Sin embargo, sólo dos de las 51 cepas estudiadas poseen el gen

que codifica para la proteína Stx1 (cepas 023 y 050 cuyos serotipos son O?:H- y O?:H10, respectivamente); mientras que ninguna de las cepas contienen el gen para la verotoxina 2. Estos resultados parecen indicarnos que las toxinas tipo Shiga no están involucradas en la patogénesis de las infecciones urinarias.

Ciertos factores fueron encontrados con mayor frecuencia en cepas de *E. coli* que causan ITU que en los aislados fecales de pacientes control, sugiriendo que estos factores pueden contribuir a la virulencia de dichas cepas, tal es el caso de las toxinas  $\alpha$ -hemolisina y Cnf1, las cuales han sido sugeridas como potenciales factores de virulencia, sin embargo el papel de éstas proteínas en la patogénesis de las ITUs no ha sido completamente establecido [13].

Los datos reportados por MARRS *et al*<sup>18</sup> muestran una significativa diferencia en la presencia de *hly* entre varias ITUs (31-48%) con respecto a aislados fecales (15%), en contraste con esos reportes, la distribución de este factor de virulencia entre las cepas analizadas en este estudio no presenta una diferencia clara ya sólo el 12% de las cepas recuperadas de ITUs son hemolíticas, mientras que 10% de las cepas fecales son productoras de  $\alpha$ -hemolisina.

Se encontró que la prevalencia del gen *cnf1* entre las cepas aisladas de ITU es del 10 % y en los aislados fecales del 7%. Estos resultados, al igual que los obtenidos para el gen *hly*, son diferentes a los presentados por MARRS *et al*<sup>18</sup>, el cual

encontró al gen en el 9% de las cepas fecales y entre un 27-41% en las cepas aisladas de ITUs.

Las diferencias entre nuestros hallazgos y los de MARRS *et al*<sup>18</sup> pueden ser explicadas tanto por el tamaño de la muestra, como por las características de las colecciones de cepas empleadas, ya que la distribución de ciertos factores de virulencia difiere de acuerdo a la sintomatología que causa (cistitis, prostatitis, pielonefritis), siendo el *Cnf1* y la hemolisina encontrados con mayor frecuencia en cepas causantes de prostatitis, seguido en frecuencia por las cepas nefropatógenas [14, 24]. Variaciones geográficas, también pueden haber influido en la distribución de los factores de virulencia como se observa en los reportes hechos por SILVEIRA *et al*<sup>25</sup>, en Brasil, que indican que 61% de las cepas aisladas de ITUs poseen el gen *hly* y 15% *cnf1*, mientras que BLANCO *et al*<sup>3</sup> encontró en España que una frecuencia menor de cepas poseen estos genes (*hly* 41% y *cnf1*, 28%); y en el estudio realizado por USEIN *et al*<sup>29</sup>, en Rumania, sólo el 23 % tienen el gen *hly* y el 13% *cnf1*.

Varios estudios han notado la estrecha relación entre el *cnf1* y la hemolisina. El *cnf1* es encontrado en aproximadamente el 70% de las cepas hemolíticas, pero raramente en aislados no hemolíticos, debido a que ambos genes son acarreados en una misma isla de patogenicidad [13, 24], esto explica el hallazgo de que 5 de las 6 cepas que acarrean el gen *hly* aisladas de ITUs (83%) posean también el gen *cnf1*, y

que en las cepas fecales se encuentre una relación similar (3 cepas son *hly*<sup>+</sup> pero sólo 2 de ellas son *cnf1*<sup>+</sup>).

Sat es una proteína autotransportadora la cual actúa como una toxina proteolítica y que recientemente ha sido identificada en cepas de *E. coli* aisladas de ITUs. En nuestro estudio la prevalencia del gen que codifica para esta proteína fue de 43% en cepas aisladas de ITUs y de 21% en las cepas fecales. Este último dato correlaciona con el 22% de cepas que acarrean el gen *sat* en entre los aislados fecales reportado por GUYER *et al*<sup>9</sup>, así mismo encontró que secuencias relacionadas con la proteína Sat están presentes con mayor frecuencia en aislados de ITU que en aislados fecales, ya que observó que el 55% de cepas de *E. coli* aisladas de muestras de pacientes con pielonefritis contienen el gen que codifica para esta toxina. Aunque nuestra colección de cepas no está constituida exclusivamente por cepas causantes de pielonefritis, sí encontramos que la presencia del gen *sat* entre los aislados fecales es menor con respecto a aquellas cepas que causan ITU.

Hasta el momento las proteínas SPATE (Serin Proteasas Autotransportadoras de *Enterobacteriaceae*) han sido identificadas mayoritariamente en cepas patógenas [12], de tal forma que la presencia del gen que codifica para la proteína Sat entre cepas aisladas de muestras fecales parece indicarnos que la flora intestinal está actuando como reservorio de cepas de *E. coli* causantes de ITU. De igual manera, la estrecha

diferencia entre la frecuencia en que fueron hallados tanto la  $\alpha$ -hemolisina como el Cnf1 en aislados fecales con respecto a aquellos obtenidos de pacientes con ITU soportan la idea de que muchas de las cepas de *E. coli* causantes de ITU proceden de la flora rectal [1, 3, 8, 21, 28] y que sólo aquellas que poseen factores de virulencia tienen la habilidad entrar en el tracto urinario y producir una infección [3, 9].

La secuencia genómica de la cepas uropatógena de *E. coli* (UPEC) CFT073 ha aportado evidencia definitiva de que las UPEC forman una familia distinguible de otras *E. coli* [16]. Se ha encontrado que la mitad de todos los aislados de UPEC no posee, o sólo posee uno de los factores de virulencia caracterizados hasta el momento; así que, se asume que otros factores bacterianos, aun no caracterizados, pueden ser importantes en la patogénesis de las infecciones en el tracto urinario [22, 26]. De manera interesante el 45% de las cepas de *E. coli* aisladas de ITUs no poseen alguno de los genes caracterizados en el presente estudio.

Mediante ensayos de citotoxicidad sobre dos líneas celulares (Vero y T24) buscamos obtener evidencia de la presencia, en los sobrenadantes concentrados, de otros factores que puedan estar implicadas en el daño celular causado por *E. coli* durante el curso de una ITU. Nuestros resultados muestran que 3 de las cepas que no poseen alguno de los genes caracterizados previamente (*hly*, *sat*, *cnf1*, *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>) son capaces de dañar las células Vero (07, 012 y 014), y que, sólo una de

ellas, produce daño también a las células de vejiga humana (014). Estos hallazgos parecen indicarnos que existen factores adicionales a las proteínas codificadas por los genes antes mencionados que son capaces de inducir cambios morfológicos en la monocapa celular.

Varios reportes han identificado múltiples proteínas autotransportadoras en una sola cepas de *E. coli*, como lo reporta Parham *et al*<sup>22</sup>, que recientemente han documentado la presencia de 10 miembros de la familia de autotransportadoras en la cepas UPEC CFT073 sugiriendo que la habilidad de *E. coli* de causar enfermedad puede estar asociado con las presencia de proteínas SPATE. De tal forma que genes que no fueron determinados en este estudio (como son PicU, Tsh y Vat) y que codifican para serinproteasas autotransportadoras asociadas a cepas de *E. coli* aisladas de ITUs, pueden ser las causantes de el daño celular observado durante nuestros ensayos. La búsqueda de los genes que codifican para estas toxinas nos permitiría atribuir los cambios morfológicos a alguna de las proteínas ya identificadas o incluso evidenciar la presencia de factores de virulencia aun no caracterizados. Por otro lado, DUTTA, *et al*<sup>6</sup> observaron que ni Pic (proteína homóloga de PicU) ni Tsh produjeron cambios morfológicos en las células Vero después de las incubación con estas proteínas. Mientras que la actividad vacuolizante de la proteína Vat, hasta el momento, sólo se ha reportado *in vitro* en fibroblastos de embrión de pollo.

El análisis mediante SDS-PAGE de los sobrenadantes concentrados de algunas cepas (03, 06, 07, 011, 012, 014, 045) que produjeron cambios morfológicos durante los ensayos de citotoxicidad, fue realizado con el objetivo tanto de separar las proteínas presentes en los sobrenadantes, como de visualizar proteínas posiblemente implicadas en el daño celular. Los resultados obtenidos muestran que las cepas 03, 011 y 045 presentan una banda en la región donde se encuentran las proteínas Hly, Sat, Cnf1 (110-115 KDa), indicando que, bajo las condiciones de cultivo utilizadas para nuestro experimento, las bacterias fueron capaces de producir dichas proteínas. En el patrón de bandas de la cepa 051, la cual posee el gen *sat*, no se observó una banda en la zona correspondiente a los 107 kDa que es el peso molecular de esta proteína lo cual pudo deberse a errores en el procedimiento experimental que condujeron a la degradación de la proteína. La presencia de una gran cantidad de proteínas de pesos moleculares distintos, tanto en el sobrenadante de la cepa 014, como en el de la 051 puede deberse a la contaminación de este sobrenadante con proteínas presentes en el citoplasma bacteriano. Es importante notar que los efectos producidos por el sobrenadante de la cepa 014 en la monocapa celular, pueden haber sido ocasionados por proteínas que no son secretadas por la bacteria; sin embargo, tomando en consideración que la bacteria completa produjo desprendimiento celular durante ensayos previos, es necesario proveer a la cepa 014 de condiciones de cultivo adecuadas para evitar la muerte bacteriana.

## **CONCLUSIONES**

- La frecuencia de los genes de *hly* y *cnf1* fue significativamente más bajos que los reportados por otros autores como MARRS *et al*<sup>18</sup> y BLANCO *et al*<sup>3</sup>, y no mostraron una diferencia clara con respecto a los datos encontrados en las cepas fecales.
- El gen *sat* fue el encontrado con mayor frecuencia respecto a los otros genes caracterizados en este estudio (*hly*, *cnf1*, *stx*<sub>1</sub> y *stx*<sub>2</sub>) y significativamente en mayor porcentaje que en las cepas fecales.
- Creemos que existen toxinas en cepas UPEC que aun no han sido identificadas. Detectamos cepas que no poseen los genes de virulencia determinados en este estudio y sin embargo producen daño celular.
- En el presente estudio el serogrupo O25 fue el encontrado con mayor frecuencia y es diferente a los reportados en otros países.

## **PERSPECTIVAS**

Sin duda un mejor conocimiento de las características de las cepas uropatógenas de *E. coli* nos permitirá comprender mejor el mecanismo por medio del cual ocasionan la enfermedad. En futuras investigaciones sería interesante corroborar el hecho de que el serogrupo O25 es el más frecuente entre las cepas que afectan a la población mexicana; así como la baja frecuencia de genes comúnmente asociados a las ITUs, como son *cnf1* y *hly*; para ello es necesario el análisis de un mayor número de cepas y de muestras representativas de la población; sin embargo debemos tomar en cuenta que las cepas aisladas de ITUs han mostrado una gran variabilidad genética.

Utilizando las cepas de *E. coli* que ya tenemos, podríamos caracterizar las proteínas autotransportadoras que se han descrito recientemente y que por falta de una cepa control no pudimos determinar; así como las adhesinas, y sistemas de captación de hierro que también están implicados en la patogénesis de las ITUs; lo cual nos permitiría atribuir el daño celular observado en el presente estudio, ya sea a un factor de virulencia ya conocido o a uno aún no descrito.

## REFERENCIAS

### 11.1 ARTÍCULOS

- [1] Anderson, G., Dodson, K., Hooton, T., Hultgren, S. 2004. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *TRENDS in Microbiology* 12 (9):424-430.
- [2] Blanco, J. E., Blanco, M., Alonso, M., Mora, A., Dhabhi, G., Coira, M., Blanco, J. 2004. Serotypes, Virulence Genes, and Intimin Types of Shiga Toxin (Verotoxin)-Producing *Escherichia coli* Isolates from Human Patients: Prevalence in Lugo, Spain, from 1992 through 1999. *Journal of Clinical Microbiology* 42(1): 311-319.
- [3] Blanco, M., Blanco, J., Blanco, J.E., Alonso, P., Abalia, I., Rodríguez, E., Bilbao, J., Umaran, A. 1995. Factores de Virulencia y Serogrupos O de *Escherichia coli* causantes de infecciones urinarias comunitarias. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica* 13: 236-241.
- [4] Brower, J., Eto, D., Mulvey, A., 2005. Covert Operations of Uropathogenic *Escherichia coli* within the Urinary Tract. *Traffic* 6:18-31.
- [5] Cornick, N., Matise, I, Samuel, J., Bosworth, B., Moon, H. 2000 Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* infection: Temporal and Quantitative Relationships among

Colonization, Toxin Production, and Systemic Disease. The Journal of Infectious Disease.181: 242-251.

[6] Dutta, P., Cappello, R., Navarro-García, F., Nataro, J. 2002. Functional Comparison of Serine Protease Autotransporters of *Enterobacteriaceae*. Infection and Immunity 70(12): 7105-7113.

[7] Elliott, S. Srinivas, S., Albert, J., Alam, K., Robins-Browne, R., Gunzburg, S. Mee, B., Chang, B. 1998. Characterization of the Roles of Hemolysin and Other Toxins in Enteropathy Caused by Alpha-Hemolytic *Escherichia coli* Linked to Human Diarrhea. Infection and Immunity 66 (5):2040-2051

[8] Finer, G., Landau, D. 2004. Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. The Lancet Infectious Diseases 4:631-635.

[9] Guyer, D., Henderson, I., Nataro, J. Mobley, H. 2000. Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. Molecular Microbiology 38(1): 53-66

[10] Heimer, S., Rasko, D., Lockatell, V., Johnson, D., Mobley, H. 2004. Autotransporter Genes *pic y tsh* Are Associated with *Escherichia coli* Strains That Cause Acute Pyelonephritis and Are Expressed during Urinary Tract Infection. Infection and Immunity 72(1): 593-597.

- [11] Henderson, I., Nataro, J. 2001. Virulence Functions of Autotransporter Proteins. *Infection and Immunity* 69(3): 1231-1243.
- [12] Henderson, I., Navarro-Garcia, F., Desvaux, M., Fernandez, R., Ala'Aldeen, D. 2004. Type V Protein Secretion Pathway: the Autotransporter Story. *Microbiology And Molecular Biology Reviews* 68(4): 692–744.
- [13] Island, M., Cut, X., Foxman, B., Marrs, C., Stamm, W., Stapleton, A., Warren, J. 1998. Cytotoxicity of Hemolytic, Cytotoxic Necrotizing Factor 1-Positive and – Negative *Escherichia coli* to Human T24 Bladder Cells. *Infection and Immunity* 66(7):3384-3389.
- [14] Johnson, J., Kuskowski, M., Gajewski, A., Soto, S., Horcajada, J., Jiménez de Anta, T., Vila, J. 2005. Extended Virulence Genotypes and Phylogenetic Background of *Escherichia coli* Isolates from Patients with Cystitis, Pyelonephritis, or Prostatitis. *The Journal of Infectious Diseases* 191: 46-50
- [15] Justice, S., Hung, C., Theriot, J., Fletcher, D., Anderson, G., Footer, M., Hultgren, S. 2004. Differentiation and Developmental Pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *PNAS* 101(5): 1333-1338.

- [16] Landraud, L., Pulcini, C., Gounon, P., Flatau, G., Boquet, P., Lemichez, E. 2004. *E. coli* CNF1 Toxin: A Two-in-One system for host-cell invasion. *International Journal of Medical Microbiology* 293:513-518.
- [17] Le Bouguenec, C., Archambaud, M., Labigne, A. 1992. Rapid and Specific Detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* Adhesin-Encoding Operons in Uropathogenic *Escherichia coli* Strains by Polymerase Chain Reaction. *Journal of Clinical Microbiology* 30(5): 1189-1193.
- [18] Marrs, C., Zhang, L., Foxman, B. 2005. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) Pathotypes?. *FEMS Microbiology Letters* 252: 183-190.
- [19] Mulvey, M. 2002. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* 4:193.1-195.15
- [20] Mulvey, M., Schilling, J., Hultgren, S. 2001. Establishment of a Persistent *Escherichia coli* Reservoir During the Acute Phase of Bladder Infection. *Infection and Immunity* 69(7):4572-4579.

- [21] Mulvey, M., Schilling, J., Martínez, J., Hultgren, S. 2000. Bad bugs and beleaguered bladders: Interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and Innate host defenses. PNAS 97(16): 8829-8835.
- [22] Parham, N., Srinivasan, U., Desvaux, M., Foxman, B., Marrs, C., Henderson, I. 2004. PicU, a second serine protease autotransporter of uropathogenic *Escherichia coli*. FEMS Microbiology Letters 230:73-83.
- [23] Rama, G., Chhina, D., Chhina, R., Sharma, S. 2005. Urinary tract infections—microbial virulence determinants and reactive oxygen species. Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases 28:339-349.
- [24] Ruiz, J., Simon, K., Horcajada, J., Velasco, M., Barranco, M., Roig, G., Moreno-Martínez, A., Martínez, J., Jiménez de Anta, T., Mensa, J., Vila, J. 2002. Differences in Virulence Factors among clinical isolates of *Escherichia coli* causing Cystitis and Pyelonephritis in Women and Prostatitis in Men. Journal of Clinical Microbiology 40(12): 4445-4449.
- [25] Silveira, W., Benetti, F., Lancellotti, M., Ferreira, A., Solferini, V., Brocchi, M. 2001. Biological and Genetic Characteristics of Uropathogenic *Escherichia coli* Strains. Rev. Inst. Med. Trop S. Paulo 43(6):303-310.

[26] Sorsa, L., Dufke, S., Schubert, S. 2004. Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization. FEMS Microbiology Letters 230:203-208.

[27] Stapleton, A., Stamm, W. 1997. Prevention of Urinary Tract Infection. Infection Disease Clinics North American 11:719-733.

[28] Sussman, M., Gally, D. 1999. The Biology of Cystitis: Host and Bacterial Factors. Annual Reviews Medical 50: 149-158.

[29] Usein, C., Damian, M., Tatu-Chitoiu, D., Capusa, C., Fagaras, R., Tudorache, D., Nica, M., Le Bouguéneq, C. 2001. Prevalence of virulence genes in *Escherichia coli* strains isolated from Romanian adult urinary tract infection cases. Journal of Cellular Molecular Medicine. 5(3):303-310.

### **11.2 LIBROS**

[30] Aktories, K. 2003. Glucosylating and Deamidating Bacterial Protein Toxins (Capítulo 16). Bacterial Protein Toxins. Editores: Burns, D. et al. ASM Press. EUA. pp 229-243.

[31] Griebing, T. 2004. Urinary Tract Infections in Women (Capítulo 6). Urologic Diseases in America . Editores: Litwin MS, Saigal CS. Urologic Diseases in America. US Department of Health and Human Services, Public Health Service, National Institutes of Health, National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases. Oficina de Publicaciones Gubernamentales Washington, DC. Publicación NHI No. 04-5512 EUA. pp. 153 -279.

[32] Oxhamre, C., Richter-Dahlfors, A. 2003. Membrane-Damaging Toxins: Family of RTX Toxins (Capítulo 14). Bacterial Protein Toxins. Editores: Burns, D., *et al.* ASM Press. EUA. pp 203-227.

[33] Puente, J., Finlay, B. 2001. Pathogenic *Escherichia coli* (Capítulo 9). Principles of Bacterial Pathogenesis. Editor: Graisman, A. Academic Press. USA.

[34] Stamm, W. 1994. Enfermedades Infecciosas: Infecciones de las Vías Urinarias y Pielonefritis (Capítulo 90). Harrison: Principios de Medicina Interna. Editores: Isselbacher, K., Braunwald, E., Wilson, J., Martin, J., Fauci, A., Kasper, D. Vol 1. 13ª edición. Ed. Interamericana· McGraw-Hill. España. pp. 639-643.

### 11.3 PÁGINAS DE INTERNET

[35] Blanco, J., Blanco M., Blanco, J. E., Mora, A., Alonso, P., González, E., Bernárdez, M. 2004 O:H serotypes of human Verocytotoxigenic *E. coli* (VTEC). Laboratorio de referencia de *E. coli*. <http://lugo.usc.es/ecoli/SEROTIPOSHUM.htm>.

[36] National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Diseases (NIDDK). 2005 [www.kidney.niddk.nih.gov](http://www.kidney.niddk.nih.gov)

[37] Secretaría de Salud. 2006. SUIVE. Dirección General de Epidemiología. [www.dgepi.salud.gob.mx](http://www.dgepi.salud.gob.mx).

### 11.4 CONGRESOS

[38] Manjarrez, A., Gavilanes, S., Chávez, M., Martínez, S., Navarro, A., León, L. 2004. Factores de Virulencia y Serogrupos O de *E. coli* Causantes de Infecciones Urinarias, abstr. E-8, p S65. Enfermedades Infecciosas y Microbiología (Suplemento). XXXIX Congreso Anual de la Asociación Mexicana de Infecciones y Microbiología Clínica A.C. Puebla, Puebla México.



## APÉNDICE

### 12.1 REACTIVOS

- *TAE (solución reguladora para electroforesis para DNA.* Tris-base 48.40g , Ácido acético glacial 11.42 ml, EDTA 0.5 M 20.00 ml, Agua destilada c.b.p. 1000.00 ml, pH = 8
- *Amortiguador de carga 10X.* 20% de FICOLL 400 , EDTA concentración final 0.1M, 1.0% de SDS, 0.25% de azul de bromofenol.
- *PBS (Solución Salina de Fosfato).* Cloruro de sodio 8.00 g, cloruro de potasio 20 g, fosfato de sodio dibásico 1.44 g, fosfato de potasio monobásico 0.24 g, agua destilada c.b.p. 1.00 L. pH 7.2.
- *Gel concentrador.* Reactivos requeridos para preparar 20 mL de la mezcla para el gel concentrador: 2.5 mL de acrilamida-bis acrilamida (30:0.8), 5.0 mL de solución 0.5 M Tris-HCl pH 6.8, 0.2 mL de SDS al 10%, 1.0 mL de persulfato de amonio al 1.5%, 11.3 mL de agua desionizada y 15 µL de TEMED.
- *Gel separador.* Reactivos requeridos para preparar 30 mL de la mezcla para el gel separador: 12.5 mL de acrilamida-bis acrilamida (30:0.8), 3.73 mL de

solución 0.3 M Tris-HCl pH 6.8, 0.3 mL de SDS al 10%, 1.5 mL de persulfato de amonio al 1.5%, 11.95 mL de agua desionizada y 15 µL de TEMED.

- *Solución amortiguadora de corrida.* Reactivos requeridos para preparar 1.0 L de la solución amortiguadora de corrida: 30.3 g de Tris, 144.0 g de glicina y 10.0 g de SDS.
- *Azul de Coomassie.* Azul de Coomassie 0.1%, metanol 30%, ácido acético 10%.

## 12.2 MEDIOS DE CULTIVO

- *Caldo Luria-Bertani*

Componentes	Gramos/Litro
triptona	10
extracto de levadura	5
Cloruro de sodio	5

Ajustar el pH a 7.0 con 1.0 M de NaOH, esterilizar con autoclave por 15 minutos a 121°C (15 lbs de presión).

- *Agar Sangre (BD Bioxon)*

Componentes	Gramos/Litro
infusión de músculo cardíaco	2
peptona de caseína	13
Cloruro de sodio	5
agar	5
extracto de levadura	5
5% de sangre desfibrinada	

Esterilizar el medio base con autoclave por 15 minutos a 121°C (15 lbs de presión) y posteriormente adicionar en condiciones de asepsia la sangre desfibrinada estéril, pH final  $7.3 \pm 0.2$ .

- *Agar Mac Conkey (Bioxon)*

Componentes	Gramos/Litro
peptona de gelatina	17
peptona de caseína	1.5
peptona de carne	1.5
lactosa	10
mezcla de sales biliares	1.5
cloruro de sodio	5
agar	13.5
rojo neutro	0.03
cristal violeta	0.001

Ajustar el pH a 7.1, esterilizar con autoclave por 15 min a 121°C (15 lbs de presión).

- *Medio gelosa especial (conservación de cepas) (1L)*

Componentes	Gramos/Litro
base gelosa sangre	20
agar bacteriológico	15
extracto de carne	1.5

Ajustar el pH a 7.4, esterilizar con autoclave por 15 min a 121°C (15 lbs de presión).

- *Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) para células Vero*

Componentes:

- Medio basal de Eagle
- 1ml de solución de bicarbonato de sodio al 7.5%
- 1% de HEPES 1.0 M
- 1% de antibióticos penicilina/streptomina 10, 000 U/mL
- 1% de L-Glutamina 200 mM
- 10% de Suero fetal bovino

Ajustar el pH a 7.2

- *Dulbecco`S Modified Eagle`S Medium (DMEM) para bacterias*

Componentes:

- Medio basal de Eagle
- 4% de solución de bicarbonato de sodio al 7.5%
- 2% de HEPES 1.0 M

Ajustar el pH a 7.2 y esterilizar por filtración con una membrana de tamaño de poro de 0.45  $\mu$ m.

- **McCoy**

Suplementado con :

- 1% de solución de bicarbonato de sodio al 7.5%
- 1% de HEPES 1.0 M

- 1% de antibióticos penicilina/streptomina 10, 000 U/mL
- 1% de L-Glutamina 200mM

Ajustar el pH a 7.2