



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

---

# POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

“INVESTIGACIÓN SOBRE LA CAPACIDAD INVASIVA DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA A CÉLULAS EPITELIALES Y ALTERACIONES EN PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO INDUCIDAS POR LA INTERNALIZACIÓN DE LA BACTERIA”.

# TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS  
(BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)**

P R E S E N T A

ALBERTO ALFARO LÓPEZ

DIRECTOR DE TESIS: DR. HIPÓLITO ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ

MÉXICO, D.F.

NOVIEMBRE, 2009.



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.

**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
**Director General de Administración Escolar, UNAM**  
**Presente**

Me permito informar a usted que en la reunión ordinaria del Comité Académico del Posgrado en Ciencias Biológicas, celebrada el día 12 de octubre de 2009, se aprobó el siguiente jurado para el examen de grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS (BIOLOGÍA EXPERIMENTAL)** del (la) alumno (a) **ALFARO LÓPEZ ALBERTO** con número de cuenta **96043853** con la tesis titulada **"INVESTIGACION SOBRE LA CAPACIDAD INVASIVA DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATÓGENA A CÉLULAS EPITELIALES Y ALTERACIONES EN PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO INDUCIDAS POR LA INTERNALIZACIÓN DE LA BACTERIA."**, realizada bajo la dirección del (la) **DR. HIPÓLITO ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ**:

Presidente: DR. GONZALO CASTILLO ROJAS  
Vocal: DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO  
Secretario: DR. HIPÓLITO ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ  
Suplente: DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA  
Suplente: DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**Atentamente**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 13 de noviembre de 2009.

Dr. Juan Núñez Farfán  
Coordinador del Programa

c.c.p. Expediente del (la) interesado (a)

# ***AGRADECIMIENTOS***

AL POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS DE LA UNAM POR PERMITIRME REALIZAR MIS ESTUDIOS DENTRO DEL PROGRAMA DE MAESTRÍA EN LA ESPECIALIDAD DE BIOLOGÍA EXPERIMENTAL.

AL CONSEJO NACIONAL DE CIENCIA Y TECNOLOGÍA (CONACYT) POR EL APOYO ECONÓMICO OTORGADO CON NÚMERO DE CVU 225718 PARA LA REALIZACIÓN DE MIS ESTUDIOS DE MAESTRÍA.

AL PROGRAMA DE FOMENTO A LA TITULACIÓN DE LA COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO DE LA UNAM POR EL APOYO ECONÓMICO OTORGADO PARA LA OBTENCIÓN DEL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS.

A LA DIRECCIÓN GENERAL DE ASUNTOS DEL PERSONAL ACADÉMICO (DEGAPA) DE LA UNAM POR EL FINANCIAMIENTO OTORGADO PARA LA REALIZACIÓN DEL TRABAJO DE INVESTIGACIÓN GRACIAS AL PROYECTO (PAPIIT) IN220607-3.

AL DR. H. ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ (TUTOR PRINCIPAL), DR. GONZALO CASTILLO ROJAS Y AL DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA POR FORMAR PARTE DE MI COMITÉ TUTORAL.

A LOS MIEMBROS DE MI JURADO DE EXAMEN: DRA. BERTHA GONZÁLEZ PEDRAJO Y DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA.

## ***MÁS AGRADECIMIENTOS***

A LOS MIEMBROS DEL COMITÉ EVALUADOR DE ESTA TESIS:

A EL DR. ÁNGEL MANJARREZ HERNÁNDEZ POR EL APOYO BRINDADO EN LA DIRECCIÓN DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN Y EN LA ELABORACIÓN DEL MANUSCRITO; PERO SOBRE TODO POR SU CONFIANZA, SUS INVALUABLES CONSEJOS Y SU INCONDICIONAL APOYO PARA QUE PUDIERA LOGRAR UNA META MÁS EN MI FORMACIÓN ACADÉMICA. ADEMÁS MI MÁS SINCERO AGRADECIMIENTO POR HABERME OTORGADO LA OPORTUNIDAD DE ASISTIR A MI PRIMER CONGRESO INTERNACIONAL Y PERMITIRME SER PARTE DE SU EQUIPO DE TRABAJO.

A EL DR. LUIS FELIPE JIMÉNEZ GARCÍA MI AGRADECIMIENTO POR HABER SIDO PARTE DE MI COMITÉ TUTORAL, POR EL TIEMPO QUE ME OBSEQUIÓ, Y POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS Y ATINADAS SUGERENCIAS EN EL MEJORAMIENTO DEL PROYECTO DE INVESTIGACIÓN, ASÍ COMO EN LA REDACCIÓN DE LA TESIS.

A EL DR. GONZALO CASTILLO ROJAS POR HABER FORMADO PARTE DEL COMITÉ TUTORAL, ASÍ MISMO POR SUS SUGERENCIAS EN LA ELABORACIÓN DEL MANUSCRITO., Y MUY EN ESPECIAL POR SUS EXCELENTE COMENTARIOS EN LAS EVALUACIONES TUTORALES QUE AYUDARON A MEJORAR EL PRESENTE TRABAJO Y A FORTALECER MI FORMACIÓN ACADÉMICA., MUCHAS GRACIAS.

A LA DRA. BERTHA MARÍA JOSEFINA GONZÁLEZ PEDRAJO POR SUS VALIOSOS COMENTARIOS Y POR EL TIEMPO QUE ME BRINDÓ PARA LA REVISIÓN DE ESTA TESIS.

Y A EL DR. ABRAHAM LANDA PIEDRA, AGRADEZCO SUS OBSERVACIONES Y SUGERENCIAS EN LA REVISIÓN DEL MANUSCRITO.

A LAS PERSONAS QUE COLABORARON EN EL PROYECTO:

A EL DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO, INVESTIGADOR DEL HOSPITAL GENERAL “DR. MANUEL GEA GONZÁLEZ”, SS., DEL D.F., A EL Q.F.B. LEONARDO SALAZAR GONZÁLEZ, MIEMBRO DEL DEPTO. DE ANÁLISIS CLÍNICOS DEL HOSPITAL GENERAL “DR. GONZALO CASTAÑEDA ESCOBAR”, ISSSTE., DE LA CIUDAD DE MÉXICO Y A LA DRA. SILVIA MARTÍNEZ JIMÉNEZ, DEL HOSPITAL GENERAL DE MÉXICO, SS., DEL D.F., POR LA DONACIÓN DEL MATERIAL BIOLÓGICO DEL ESTUDIO.

A LA BIÓLOGA MARÍA ELENA CHÁVEZ BERROCAL, TÉCNICO ACADÉMICO DEL DEPTO. DE SALUD PÚBLICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM. POR EL APOYO TÉCNICO Y PARTICIPACIÓN EN LA SEROTIPIFICACIÓN DE LAS CEPAS DEL ESTUDIO.

A EL M. EN C. JOSÉ MOLINA LÓPEZ, ACADÉMICO DEL DEPTO. DE SALUD PÚBLICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM. POR EL APOYO TÉCNICO BRINDADO EN LA ESTANDARIZACIÓN DEL MÉTODO DE ANÁLISIS CUALITATIVO DE INVASIVIDAD BACTERIANA.

A LA DRA. SANDRA GABILANES PARRA, TÉCNICO ACADÉMICO DEL DEPTO. DE SALUD PÚBLICA, FACULTAD DE MEDICINA, UNAM. POR EL APOYO RECIBIDO EN LA ESTANDARIZACIÓN DE LA TÉCNICA DE WESTERN BLOTTING.

A EL DR. ARMANDO PÉREZ TORRES, ACADÉMICO DE LA FACULTAD DE MEDICINA, UNAM. POR EL APOYO EN LA OBTENCIÓN DE LAS IMÁGENES DE MICROSCOPÍA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

Y A TODAS AQUELLAS PERSONAS QUE DE UNA U OTRA FORMA INFLUYERON EN LA REALIZACIÓN DE ESTE TRABAJO DE INVESTIGACIÓN.

*A TODOS GRACIAS...*

## **DEDICATORIA:**

**A MI MAMÁ:**

**ISABEL LÓPEZ TIERRABLANCA (CRIS).**

HACE POCO MÁS DE DOS AÑOS TODOS TUS ESFUERZOS RINDIERON FRUTO, Y LOGRASTE GRADUARME COMO BIÓLOGO; DESPUÉS COMENZAMOS OTRO SUEÑO, QUE HOY SE HACE REALIDAD. Y COMO EN AQUEL ENTONCES HOY VUELVES HACER EL PILAR MÁS IMPORTANTE DE ÉSTE, NUESTRO NUEVO ÉXITO, NUESTRO NUEVO TRIUNFO: OBTENER EL GRADO ACADÉMICO DE MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS., ASÍ QUE UNA VEZ MÁS GRACIAS POR TODO TU APOYO Y POR SER PARTE DE ESTE LOGRO. Y AUNQUE SEGURAMENTE VENDRÁN MÁS ÉXITOS., EL HONOR MÁS GRANDE DE MI VIDA, HA SIDO, ES Y SERÁ, PODER DECIR ORGULLOSAMENTE QUE ERES MI MADRE, QUE NACÍ DE TI Y QUE TODO LO QUE SOY ES GRACIAS A TU INFINITO AMOR, MAMITA...

**A MIS AMADOS HERMANOS:**

**JUAN HECTOR, JOSÉ ROGELIO Y FERNANDO.**

GRACIAS POR SER PARTE DE MI VIDA, POR COMPARTIR LA MESA, POR HACERME SONREIR EN MIS MOMENTOS DE TRISTEZA, POR JUGAR CONMIGO, POR DEJARME GANAR Y POR ENSEÑARME A PERDER., Y SOBRE TODO GRACIAS POR AYUDARME A CONQUISTAR MIS ANHELOS. POR TODO LO VIVIDO Y CON EL AMOR DE SIEMPRE, ESTE TRIUNFO ES TAMBIÉN PARA USTEDES, MIS QUERIDOS AMIGUITOS DE LA INFANCIA.

**A MARICHU:** GRACIAS POR HABERME REGALADO PARTE DE TU VIDA, POR AYUDARME A SONREIR Y POR ENSEÑARME A SOÑAR, POR QUE JUNTO A TI APRENDÍ MUCHAS COSAS QUE JAMÁS OLVIDARE. PARA TI, PARA TUS PAPIS Y TUS HERMANOS ESTE ÉXITO, MI GRATITUD Y MIS MEJORES DESEOS.

**A TODOS MIS AMIGOS QUE ME APOYARON:** AARÓN, ERICK, GABY, HÉCTOR, JAVIER, JORGE, LULUSITA, MIGUEL, PALOMA, PAULINA, ULISES Y WENDY.

**A MI UNIVERSIDAD:**

POR DARME LA OPORTUNIDAD DE SER PARTE DE LA MEJOR INSTITUCIÓN EDUCATIVA DE AMÉRICA LATINA, POR SU GRANDEZA, POR SU AZUL Y ORO, POR SU ENSORDECEDORA GOOOOYA... MI ETERNA GRATITUD, LEALTAD Y AMOR.

***GRACIAS...***

# ÍNDICE

	Pág.
<b>ABREVIATURAS</b>	i
<b>LISTA DE FIGURAS Y CUADROS</b>	ii
<b>RESUMEN</b>	iv
<b>ABSTRACT</b>	v
<b>1. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>2. ANTECEDENTES</b>	3
2.1 Importancia clínica y epidemiológica.	3
2.2 Patogénesis.	6
2.2.1 Factores de virulencia de UPEC.	9
2.3 Invasividad bacteriana.	11
2.3.1 Factores de virulencia asociados a la invasividad de UPEC.	11
2.3.2 Factor Citotóxico Necrozante 1 (CNF1).	11
2.3.3 Adhesinas afimbriales y fimbriales Afa/Dr.	13
2.3.4 Adhesina fimbrial FimH.	15
2.4 Modelo murino de cistitis para el estudio de la invasividad de UPEC.	17
2.5 Internalización bacteriana y alteraciones del citoesqueleto.	18
<b>3. JUSTIFICACIÓN</b>	23
<b>4. HIPÓTESIS</b>	24
<b>5. OBJETIVO GENERAL</b>	24
5.1 Objetivos particulares.	24
<b>6. DISEÑO EXPERIMENTAL</b>	25
<b>7. MATERIAL Y MÉTODOS</b>	26
7.1 Población de estudio y material biológico.	26
7.2 Bacterias de referencia.	27
7.3 Serología por aglutinación en placa.	28
7.4 Cultivo celular.	30
7.5 Ensayo cuantitativo de invasividad bacteriana de protección a gentamicina en células "T-24".	30
7.6 Análisis cualitativo de invasividad bacteriana de protección a gentamicina en células "T-24" y "Vero".	32
7.7 Microscopía Electrónica de Transmisión	33

7.8 Análisis de proteínas del citoesqueleto involucradas en la internalización de la bacteria.	34
7.8.1 Obtención de proteínas del citoesqueleto.	35
7.8.2 Inmuno-electrotransferencia.	35
<b>8. RESULTADOS</b>	<b>37</b>
8.1 Detección de bacterias intracelulares en células uroepiteliales obtenidas de una paciente con ITU.	37
8.2 Ensayo cuantitativo de invasividad bacteriana en células "T-24".	38
8.3 Análisis cualitativo de invasividad bacteriana en células "T-24" y "Vero".	44
8.4 Serotipificación.	48
8.5 Análisis de proteínas del citoesqueleto involucradas en la internalización de la bacteria.	49
<b>9. DISCUSIÓN</b>	<b>52</b>
<b>10. CONCLUSIONES</b>	<b>61</b>
<b>11. PERSPECTIVAS</b>	<b>62</b>
<b>12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>64</b>
<b>13. APÉNDICE</b>	<b>72</b>

## ABREVIATURAS

<b>ARP</b>	Proteínas Relacionadas con la Actina	<b>K:</b>	Antígeno Capsular
<b>ATCC</b>	Colección Americana de Cultivos Tipo	<b>LB</b>	Medio Luria Bertani
<b>CEACAM</b>	Moléculas de Adhesión Celular Relacionadas con el Antígeno Carcinoembriónico	<b>LPS</b>	Lipopolisacárido
<b>CNF1</b>	Factor Citotóxico Necrozante 1	<b>MEM</b>	Medio Mínimo Esencial de Eagle
<b>DAF, CD55</b>	Factor Acelerador del Consumo	<b>MLEE</b>	Electroforesis de Enzimas Multilocus
<b>DAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Difusamente adherente	<b>MOI</b>	Multiplicidad de Infección
<b>EHEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	<b>NM:</b>	No Móvil
<b>EIEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	<b>O:</b>	Antígeno Somático
<b>EPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	<b>O?:</b>	No Tipificable
<b>EAEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enteroadherente	<b>OR:</b>	Rugoso
<b>ERIC</b>	Secuencias Intergénicas Consenso Repetitivas de Enterobacterias	<b>PAIs</b>	Islas Asociadas de Patogenicidad
<b>ETEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	<b>PME</b>	Proteína de Membrana Externa
<b>ExPEC</b>	Patógeno Extraintestinal de <i>E. coli</i>	<b>PMNs</b>	Polimorfonucleares
<b>GAP</b>	Proteína Aceleradora de la Actividad GTPasa	<b>Sat</b>	Toxina Autotransportadora Secretada
<b>GTP</b>	Guanosín Trifosfato	<b>SBF</b>	Suero Fetal de Bovino
<b>GPI, CD48</b>	Glicosilfosfatidilinositol	<b>SDS-PAGE</b>	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Dodecil Sulfato Sódico
<b>H:</b>	Antígeno Flagelar	<b>SS</b>	Secretaría de Salud
<b>CBI</b>	Comunidad Bacteriana Intracelular	<b>TSA</b>	Agar Soya Trypticasa
<b>ISSSTE</b>	Instituto del Seguro Social para los Trabajadores del Estado	<b>TTSS</b>	Sistema de Secreción Tipo III
<b>ITU</b>	Infección del Tracto Urinario	<b>TU</b>	Tracto Urinario
		<b>UFC</b>	Unidad Formadora de Colonia
		<b>UP1a</b>	Uroplakina 1a
		<b>UP1b</b>	Uroplakina 1b
		<b>UP2</b>	Uroplakina 2
		<b>UP3a</b>	Uroplakina 3a
		<b>UP3b</b>	Uroplakina 3b
		<b>UPEC</b>	<i>Escherichia coli</i> Uropatógena
		<b>X g</b>	Fuerza Centrífuga

## LISTA DE FIGURAS Y CUADROS

	Pág.
<b>Fig. 1.</b> Representación esquemática de una bacteria de <i>Escherichia coli</i> .	1
<b>Fig. 2.</b> Patogénesis de las infecciones del tracto urinario causadas por la bacteria <i>Escherichia coli</i> uropatógena.	8
<b>Fig. 3.</b> Estrategias de invasión y el rearrreglo del citoesqueleto: <i>Yersinia</i> , <i>Salmonella</i> y <i>Shigella</i> .	19
<b>Fig. 4.</b> Esquema general de trabajo.	25
<b>Fig. 5.</b> Células uroepiteliales aisladas de orina de una mujer con infección aguda del tracto urinario.	38
<b>Fig. 6.</b> Plaqueo de diluciones seriadas en gelosa Mac Conkey (conteo de bacterias viables).	39
<b>Fig. 7.</b> Eficiencia de invasividad de cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de ISU en células de vejiga humana "T-24".	43
<b>Fig. 8.</b> Microscopía óptica de luz de células de vejiga humana (Línea T-24) después del ensayo de invasividad <i>in vitro</i> .	45
<b>Fig. 9.</b> Microscopía electrónica de transmisión de células de vejiga humana (T-24) después del ensayo de invasividad <i>in vitro</i> .	46
<b>Fig. 10.</b> Microscopía óptica de luz de células de riñón de mono (Línea Vero) después del ensayo de invasividad <i>in vitro</i> .	47
<b>Fig. 11.</b> Inmuno-electrotransferencia para detectar la proteína Arp2 en la fracción del citoesqueleto de células "T-24" infectadas con UPEC (1162).	50
<b>Fig. 12.</b> Inmuno-electrotransferencia para detectar la proteína Arp3 en la fracción del citoesqueleto de células "T-24" infectadas con UPEC (1162).	51
<b>Fig. 13.</b> Inmuno-electrotransferencia para detectar la proteína actina en la fracción del citoesqueleto de células "T-24" infectadas con UPEC (1162).	51
<b>Cuadro. 1.</b> Factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> uropatógena asociados a infecciones del tracto urinario.	10

<b>Cuadro. 2.</b>	Cepas de referencia de <i>Escherichia coli</i> .	28
<b>Cuadro. 3.</b>	Aislados de <i>E. coli</i> que mostraron capacidad de invadir células “T-24” <i>in vitro</i> , número de bacterias intracelulares (UFC/pozo).	41
<b>Cuadro. 4.</b>	Serogrupos encontrados entre las cepas invasivas.	49

## RESUMEN

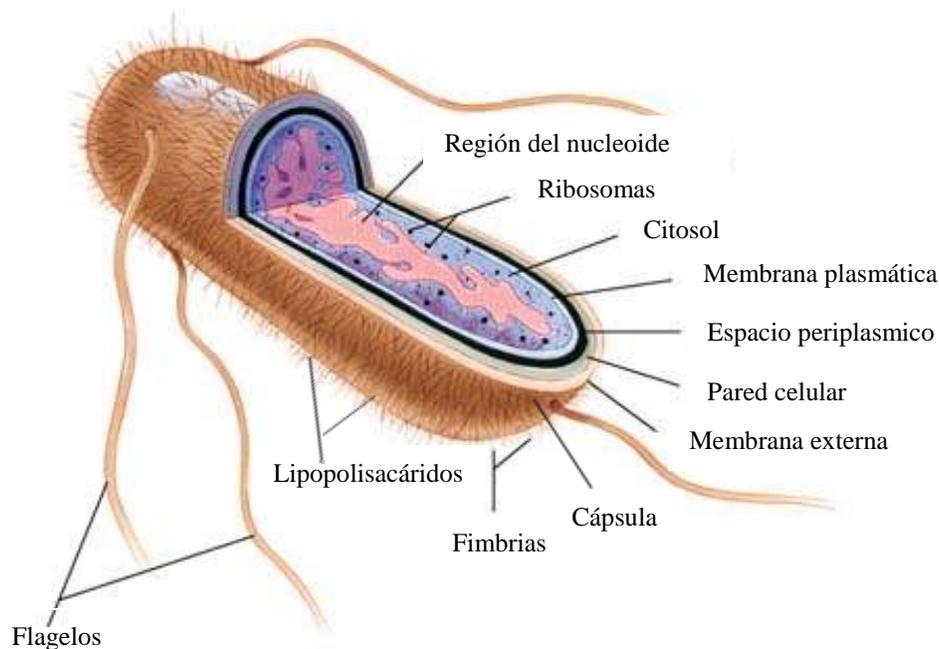
*Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el principal responsable de las infecciones del tracto urinario (ITU). Tradicionalmente UPEC no es considerado un patógeno intracelular. Sin embargo, estudios recientes sobre la patogénesis de este microorganismo indican que algunas cepas pueden ser capaces de internalizar células uroepiteliales. En el presente estudio, se trabajó con 60 cepas aisladas de pacientes con ITU de la Ciudad de México y se determinó si dichas cepas tienen la habilidad de invadir células de vejiga humana *in vitro*. Para esto se utilizó el ensayo de invasividad de protección a gentamicina. Además se investigó la participación de las proteínas del citoesqueleto Arp2, Arp3, actina y clatrina en la internalización de la bacteria mediante inmunoblot. En nuestro estudio se detectó la presencia de células uroepiteliales con filamentos bacterianos que parecen emerger de las células infectadas, en la orina de una mujer con cistitis aguda. Encontramos que 36 (60%) de las 60 cepas analizadas fueron capaces de internalizar células en cultivo; sin embargo, consideramos que sólo 12 de éstas tienen un verdadero potencial invasivo debido a la alta eficiencia de invasividad mostrada en los ensayos *in vitro*, en cuatro casos la eficiencia de internalización fue mayor al 10%. El serogrupo O25 fue el más frecuente identificado en este estudio, en contraste con lo reportado en otras partes del mundo donde los serogrupos O6 y O2 son los más representativos. El serotipo O25:H4 se identificó principalmente en las cepas invasivas. La presencia de las proteínas Arp2, Arp3 y actina en las fracciones de citoesqueleto de células infectadas, sugiere que pueden tener un papel activo en el proceso de invasividad. Nuestros resultados indican que la circulación de cepas de UPEC con habilidad invasiva puede ser más común de lo esperado, y que en algunos casos tal habilidad puede alcanzar altos niveles de eficiencia. Esta característica de internalizar eficientemente células uroepiteliales puede contribuir a que cepas de UPEC sobrevivan y persistan dentro del tracto urinario. La evaluación, vigilancia y estudio de cepas de *E. coli* uropatógena con habilidad de internalizar células uroepiteliales, deben ser objeto de investigaciones tendientes a determinar la importancia creciente de la invasividad como un nuevo factor de virulencia.

## ABSTRACT

Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the primary causative agent of the urinary tract infections (UTIs). UPEC has not traditionally been considered an intracellular pathogen; however, recent studies indicate that some strains can be able to invade uroepithelial cells. The aim of the present study was to investigate the prevalence and invasive efficiency of 60 UPEC strains isolated from patients showing clinical signs of UTI from Mexico City. Bacterial invasion was assessed in human bladder cells T-24 by a quantitative invasion assay of gentamicin protection. We also evaluated if the proteins of the cytoskeleton Arp2, Arp3, actin and clathrin are involved in the bacterial internalization by Western blotting. In this study, we detected long filaments (constructed by united bacillus) that seem to emerge from infected uroepithelial cells, which were obtained from urine of a woman with acute cystitis. We found that 36 (60%) of the 60 strains tested were capable to internalize culture cells; nevertheless, we considered that only 12 have a true invasive potential due to the high efficiency of internalization showed in the *in vitro* assays, in four of these cases the efficiency of invasion was over 10%. The serogroup O25 was the most frequently identified in this study, in contrast to reports from other parts of the world where the O6 and O2 serogroups are the most representative. The serotype more frequently found among the invasive strains was O25:H4. The presence of Arp2, Arp3 and actin proteins in the cytoskeleton fractions from T-24 infected cells indicate that these proteins may have an active role in the invasiveness processes. Our results suggest that UPEC strains with invasive abilities may be more common in UTIs than what expected by us, and that some isolates can be highly invasive. The efficient internalization of uroepithelial cells could contribute to the strains survival and persistence of UPEC strains within of the urinary tract. The evaluation, monitoring and study of uropathogenic *E. coli* strains with invasive ability, must be object of investigations to determine the increasing importance of the invasiveness as new virulence factor.

## 1. INTRODUCCIÓN

*Escherichia coli* es un bacilo gramnegativo, anaerobio facultativo de la familia *Enterobacteriaceae*, el cual presenta en su superficie celular estructuras tales como: flagelos, pilis o fimbrias, proteínas de membrana externa (PME) importantes en investigaciones epidemiológicas y lipopolisacáridos (LPS) con actividad de endotoxina. Además, muchas de las cepas de *E. coli* están cubiertas por una cápsula de polisacárido antifagocítica (Figura 1) (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002; Rodríguez-Angeles, 2002).



**Figura 1. Representación esquemática de una bacteria de *Escherichia coli*.** Se observa un bacilo gramnegativo con sus principales antígenos de superficie, además de algunos componentes estructurales internos. Modificado de <http://www.canariculturacolor.com/colibacilosis-aves>.

Esta bacteria es un importante comensal de la biota intestinal de humanos y otros mamíferos. Sin embargo, existen cepas que pueden causar daño y producir enfermedad. Dependiendo del lugar de aislamiento estas cepas han sido divididas en dos grandes grupos, patógenos intestinales y patógenos extraintestinales de

*E. coli* (ExPEC, por sus siglas en inglés). Entre los patógenos intestinales se encuentra un grupo de cepas causantes de diarrea (ETEC, EIEC, EPEC, EHEC, EAEC y DAEC), las cuales se diferencian por la combinación de factores de virulencia que portan (Wiles *et al.*, 2008).

Dentro de la categoría de ExPEC hay cepas que tienen la capacidad de diseminarse, colonizar otros nichos ecológicos (sangre, sistema nervioso central y tracto urinario) y causar enfermedad. Dentro de este grupo se encuentra *Escherichia coli* uropatógena (UPEC, por sus siglas en inglés) el principal responsable de las infecciones del tracto urinario (IsTU) (Lloyd *et al.*, 2007; Wiles *et al.*, 2008), las cuales afectan a gran parte de la población (ambulatoria y hospitalizada), resultando en una seria morbilidad y representando altos costos para el diagnóstico y tratamiento médico.

Tradicionalmente, UPEC no es considerado un patógeno intracelular. Sin embargo, recientes estudios indican que algunas cepas pueden ser capaces de internalizarse y sobrevivir dentro de células epiteliales y tejidos que constituyen el tracto urinario (Bower *et al.*, 2005; Kau *et al.*, 2005). La internalización a células eucariontes es un proceso dinámico que involucra el rearrreglo coordinado del citoesqueleto de actina y el remodelaje de la membrana del hospedero en el sitio de entrada de la bacteria. No obstante, poco es conocido acerca de los activadores de actina que modulan y/o facilitan la internalización de UPEC.

El presente trabajo es uno de los primeros estudios que trata sobre la frecuencia con que se encuentran cepas invasivas en aislados de pacientes con ITU, además se evaluó la eficiencia invasiva de dichas cepas en células en cultivo; y se investigó la participación de las proteínas de citoesqueleto Arp2, Arp3, actina y clatrina en la internalización de la bacteria. Con esta investigación se pretende contribuir a la importancia y entendimiento del papel que juega la invasividad en la patogénesis de UPEC, y al conocimiento de los posibles efectores de actina que favorecen su internalización.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 IMPORTANCIA CLÍNICA Y EPIDEMIOLÓGICA.

Por definición el tracto urinario es un ambiente normalmente estéril, protegido de patógenos bacterianos por el flujo de orina y por la actividad bactericida de células inmunes efectoras. Sin embargo, incluso en poblaciones con estas defensas naturales aparentemente intactas, y a pesar del incremento en el uso de antibióticos, las IsTU afectan a una gran parte de la población mundial (Anderson *et al.*, 2004; Bower *et al.*, 2005), por lo que constituyen un problema importante de salud pública (Mulvey, 2002; Anderson *et al.*, 2004).

Una amplia variedad de organismos han sido asociados a IsTU. Estos incluyen miembros de la familia *Enterobacteriaceae* tales como especies de los géneros: *Enterobacter*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Citrobacter* y *Pseudomonas*, éste último considerado un importante agente etiológico en las infecciones intrahospitalarias. *Enterococcus especies* y *Staphylococcus saprophyticus* son los microorganismos grampositivos aislados con menor frecuencia. Además algunas especies de levaduras son ocasionalmente aisladas, donde *Candida albicans* es su mayor representante (Rama *et al.*, 2005; Engleberg *et al.*, 2007).

Estudios recientes sugieren que en más del 95% de las IsTU, UPEC es el microorganismo aislado con mayor frecuencia (Ronald, 2002; Anderson *et al.*, 2004). UPEC es el principal causante de infecciones adquiridas en la comunidad (70% a 95%) y responsable de una gran proporción de infecciones hospitalarias con el 50% (Foxman, 2003). En ambos casos, la mayoría de los aislados que

colonizan el tracto urinario (TU) son eliminados con el flujo de orina. Sin embargo, cuando la infección ha tenido lugar, la bacteria puede ser capaz de persistir y reproducirse en los tejidos infectados (Mulvey *et al.*, 2001).

Entre la población de alto riesgo para contraer ISTU sintomáticas se incluyen neonatos, mujeres en edad escolar, mujeres sexualmente activas y adultos mayores. No obstante, la mayoría de las infecciones sintomáticas agudas afectan a mujeres jóvenes (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002). En los Estados Unidos, alrededor del 60% de las mujeres de edad  $\geq 18$  años presenta al menos una ITU durante su ciclo de vida, y el 11% de éstas presentará una infección cada año. Además cerca del 3% podrían experimentar recurrencia múltiple (Ronald, 2002; Anderson *et al.*, 2004 y Bower *et al.*, 2005). En 1991, el último año para el cual la información de pacientes fue viable, las ISTU fueron la causa de 9.6 millones de visitas médicas en los Estados Unidos, haciendo de esto un problema de significancia médica y económica, con gastos cercanos a los dos mil millones de dólares solamente en este país (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002).

Además de afectar principalmente a mujeres, las ISTU pueden ser una importante causa de morbilidad en niños y adultos mayores. Las ISTU afectan a más del 10% de la población infantil, y el rango de recurrencia está estimado entre 30 y 40%, en donde la mayoría de las recurrencias se presentan en los primeros 12 meses después de la infección primaria. La mayoría de las ISTU recurrentes en niños mayores de 6 meses de edad se presentan en niñas (Finer y Landau, 2004).

Entre los padecimientos más frecuentes ocasionados por UPEC se encuentran cistitis y pielonefritis. La cistitis representa una infección de la vejiga, cuyos principales síntomas incluyen disuria, urgencia o frecuencia de orinar. (Sussman y Gally, 1999; Engleberg *et al.*, 2007). Aunque menos frecuente, la más seria enfermedad es pielonefritis aguda, la cual puede presentarse en uno o en ambos riñones, como resultado del ascenso de organismos de la vejiga vía los uréteres (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002). Los pacientes de pielonefritis aguda regularmente presentan fiebre, dolor de costado, dolor abdominal o de ingle, náuseas y vómito; y en el 30% de los casos bacteriemia, lo cual puede conducir a sepsis si la bacteria logra entrar directamente al torrente sanguíneo (Hooton, 2001; Engleberg *et al.*, 2007).

Además de las IstU sintomáticas agudas, se ha reportado que la bacteriuria asintomática es la infección más común entre mujeres y hombres adultos mayores (los cuales pueden portar  $\geq 10^5$  UFC/mL de *E. coli* en su orina), encontrándose con tasas de hasta 40% y 50% (Pedraza-Avilés *et al.*, 2004; Svanborg *et al.*, 2006).

En México, poco es conocido acerca de la problemática de las IstU, de tal forma que no se conoce con precisión su frecuencia en la población mexicana, ni tampoco se conocen las características de las cepas de UPEC que comúnmente son la causa de estas infecciones.

## 2.2 PATOGÉNESIS.

El conjunto de cepas de UPEC causantes de IsTU es considerado un grupo distinto de las cepas comensales/fecales de *E. coli* que comprenden la gran mayoría de la población que coloniza el tracto intestinal. Generalmente, los aislados de UPEC difieren de las cepas comensales de *E. coli* debido a que éstas poseen material genético extra (grandes bloques de ADN, llamados islas de patogenicidad; PAIs, por sus siglas en inglés) que codifica para productos de genes que pueden contribuir a la patogénesis bacteriana. De tal forma que UPEC puede ser definido como un grupo virulento de cepas relacionadas que portan un grupo de genes que le permiten infectar el TU de un hospedero inmunocompetente (Schmidt y Hensel, 2004; Lloyd *et al.*, 2007).

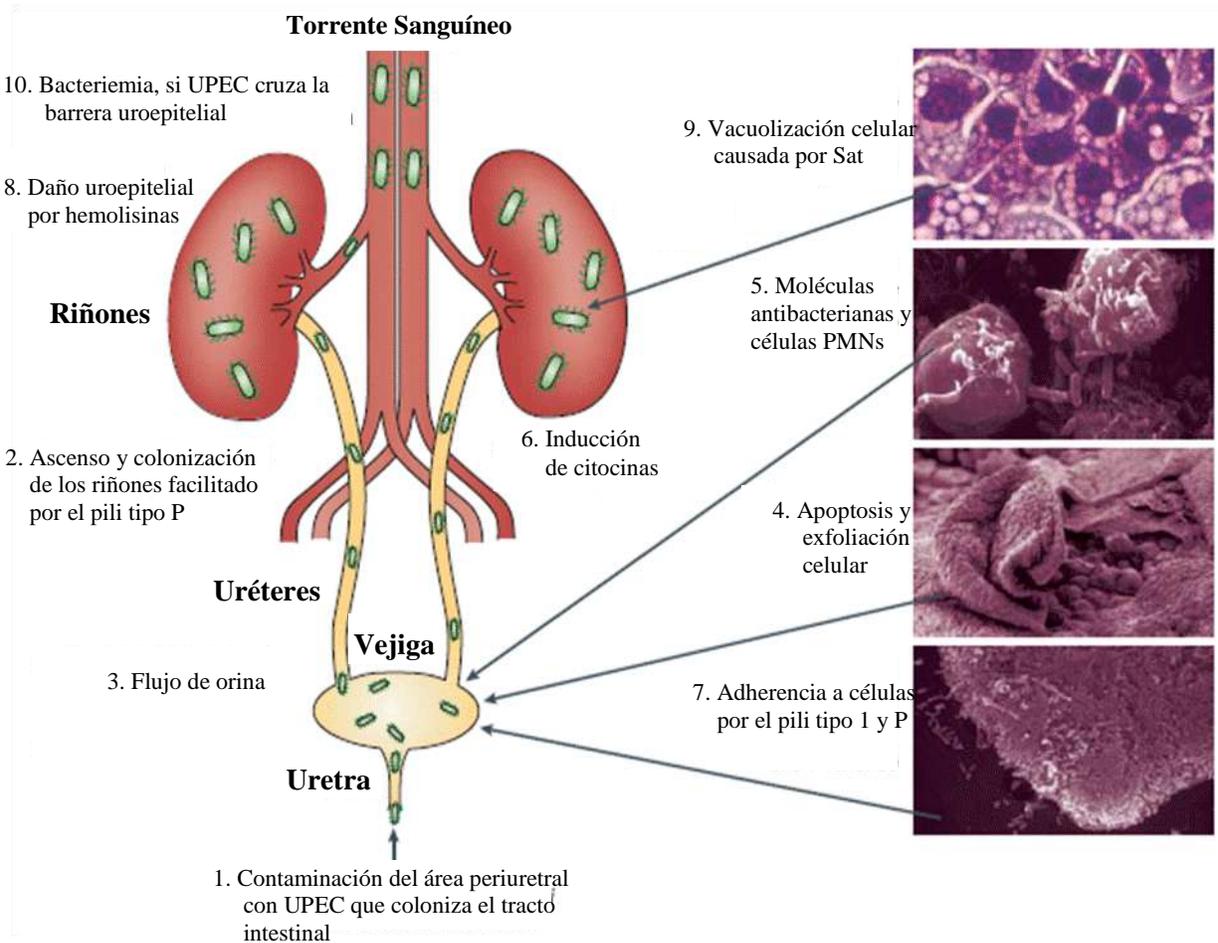
Este grupo heterogéneo de aislados está restringido a un pequeño número de serogrupos O, entre los que se encuentran: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O22, O25, O73 y O75; y aunque muchos aislados de IsTU parecen ser clonales, no hay un claro perfil fenotípico que cause estas infecciones (Orskov *et al.*, 1982; Johnson *et al.*, 1994; Marrs *et al.*, 2005).

Un aspecto crítico que conduce a una ITU es la habilidad de las cepas de UPEC de moverse del tracto intestinal y establecerse en el TU, y aunque algunos de estos movimientos pueden ser mecánicos, la habilidad para establecerse y colonizar el TU es el reflejo de las características bacterianas propias de UPEC. Sin embargo, poco es conocido acerca de los genes o factores presentes en

cepas de UPEC que ayudan al movimiento del tracto intestinal hacia el TU para el subsecuente establecimiento extraintestinal (Stamey, 1987; Stapleton *et al.*, 2002).

Dentro de los factores que favorecen la introducción de UPEC en el TU se encuentran la cercanía del recto con la vagina, en el caso de las mujeres, así como ciertas prácticas sexuales (Hooton *et al.*, 1996). Además, la alta frecuencia de infecciones presentada en mujeres es atribuida a que la uretra de la mujer es más corta que la del hombre, facilitando el ascenso de bacterias a la vejiga. Una vez que la bacteria se ha introducido y establecido en el área periuretral da como resultado el posterior ascenso por la uretra hacia la vejiga y después hacia los riñones vía los uréteres. (Figura 2) (Engleberg *et al.*, 2007).

Cuando la bacteria uropatógena entra en el TU enfrenta una multitud de defensas del hospedero tanto constitutivas como inducibles, las cuales incluyen el flujo de orina, numerosas moléculas antibacterianas y la afluencia de células inmunes efectoras (Figura 2). Para vencer y evadir estas defensas y persistir, UPEC ha desarrollado un número de mecanismos para adherirse e invadir tejidos del hospedero (Mulvey, 2002; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006; Wiles *et al.*, 2008). El uso exitoso de estos mecanismos de virulencia se ve reflejado en parte por la prevalencia de las ISTU, las cuales son una de las infecciones más frecuentes adquiridas por humanos.



**Figura 2. Patogénesis de las infecciones del tracto urinario causada por la bacteria *Escherichia coli* uropatógena.** Se muestran las diferentes fases de una ITU, las cuales incluyen la contaminación (1), ascenso y colonización de vejiga y riñones (2), elicitación de los mecanismos de defensa del hospedero: flujo de orina (3), exfoliación celular (4), afluencia de células inmunes efectoras (5 y 6), y la evasión de estas defensas mediante: adhesinas (2 y 7) y toxinas (8 y 9). Además de bacteriemia si UPEC logra entrar en el torrente sanguíneo (10). Modificado de Kaper *et al.*, 2004.

### 2.2.1 FACTORES DE VIRULENCIA DE UPEC.

Las bacterias emplean diversas estructuras superficiales mediante las cuales se unen a blancos localizados en la superficie de las células de un hospedero (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002). Esto es particularmente importante en áreas donde las superficies de las mucosas son lavadas por fluidos, como por

ejemplo: la boca, intestino y tracto urinario; la colonización en éstos y otros tejidos es mediada por adhesinas presentes en la superficie de la bacteria (Sansonetti, 2002; Rama *et al.*, 2005; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006).

Típicamente, las adhesinas están presentes en la superficie bacteriana como componentes de filamentos proteínicos llamados pilis (también conocidos como fimbrias), ó como moléculas afimbriales ancladas a la membrana externa de la bacteria (Mulvey y Hultgren, 2000). UPEC codifica una gran variedad de adhesinas (FimH, PapG, Afa/Dr, SfaA y Foc) responsables del reconocimiento y de la unión a receptores específicos en las células del hospedero (Cuadro 1). Estas adhesinas son codificadas por los pilis tipo 1, P, Afa/Dr (afimbrial/fimbrial), S y F1C respectivamente, siendo el pili tipo 1, P y las estructuras adherentes Afa/Dr las más importantes en el establecimiento y colonización del TU (Emody *et al.*, 2003; Bower *et al.*, 2005).

Además, UPEC presenta otros factores de virulencia relacionados en mayor medida al desarrollo y/o adquisición de IsTU (Cuadro 1), dentro de los que se encuentran: producción de hemolisina, toxina autotransportadora secretada (Sat), factor citotóxico necrozante 1 (CNF1), mecanismos para la obtención de hierro (sideróforos y aerobactina), cápsula, entre otros (Donnenberg y Welch, 1996; Silveira *et al.*, 2001; Bauer *et al.*, 2002; Mulvey, 2002; Rama *et al.*, 2005).

**Cuadro 1. Factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena asociados a infecciones del tracto urinario**

<b>Factores de Virulencia</b>	<b>Función y Reconocimiento Celular</b>	<b>Enfermedad Asociada</b>
<b>Pili Tipo 1 (FimH)</b>	Adhesión a células epiteliales de riñón, vejiga y matriz extracelular. Formación de biofilms e invasividad.	Cistitis, sepsis y meningitis.
<b>Pili Tipo P (PapGI, II y III)</b>	Adhesión a células epiteliales de riñón e inducción de citocinas.	Pielonefritis.
<b>Afa/Dr (F1845, Dr, Dr-II, Afa-1 y Afa-2, Afa-3, Afa-4 y Nfa-I)</b>	Adhesión a células epiteliales de vejiga y riñón; activan PI-3 Kinasa. Colonización ascendente e invasividad.	Cistitis, pielonefritis, diarrea y sepsis.
<b>Pilis Tipo S y F1C (SfaA, SfaG, SfaH y SfaS y Foc)</b>	Adhesión a células epiteliales de riñón y endoteliales de vejiga. Diseminación.	Pielonefritis, cistitis, sepsis y meningitis.
<b>CNF1 (factor citotóxico necrozante 1)</b>	Interferencia con fagocitosis y apoptosis. Necrosis celular y alteración del citoesqueleto. Invasividad.	Cistitis, pielonefritis y prostatitis.
<b>Sat (toxina auto transportadora secretada)</b>	Citotoxicidad y formación de vacuolas.	Cistitis y pielonefritis.
<b><math>\alpha</math>-Hemolisina (HlyA)</b>	Hemolisis de eritrocitos y leucocitos. Lisis celular.	Pielonefritis y cistitis.
<b>Aerobactina y Sideróforos (IreA y Iron)</b>	Captación de hierro en ambientes con bajos niveles de este metal.	Infección del tracto urinario.
<b>Cápsula</b>	Antifagocítica, efecto anticomplemento, resistencia al suero y evasión de la respuesta inmune.	Infección del tracto urinario.

Adaptado de Mulvey, 2002; Emody *et al.*, 2003 y Kaper y cols., 2004.

La presencia de éstos y otros factores de virulencia proveen a UPEC con la habilidad de adherirse, colonizar, evadir la respuesta inmune y causar daño a un hospedero inmunocompetente. Además se ha observado que algunos de estos factores promueven la internalización a células del uroepitelio.

### 2.3 INVASIVIDAD BACTERIANA.

Tradicionalmente, UPEC no es considerado un patógeno intracelular. Sin embargo, un estudio a finales de los años 1970s y un número de investigaciones

más recientes sobre la patogénesis de este microorganismo indican que algunas cepas pueden ser capaces de invadir transitoriamente, sobrevivir y multiplicarse dentro de células epiteliales y tejidos que constituyen el TU (Fukushi *et al.*, 1979; Mulvey *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2000; Mulvey *et al.*, 2001; Springall *et al.*, 2001; Bower *et al.*, 2005; Kau *et al.*, 2005).

### 2.3.1 FACTORES DE VIRULENCIA ASOCIADOS A LA INVASIVIDAD DE UPEC.

Dentro de los factores de virulencia asociados a UPEC, sólo el factor citotóxico necrozante 1 (CNF1), el cual es producido por el 30% de las cepas de UPEC (Mulvey *et al.*, 1998; Bower *et al.*, 2005; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006), y dos adhesinas (Afa/Dr y la adhesina FimH) han mostrado independientemente mediar la internalización de bacterias a células no fagocíticas profesionales (como lo son las células del uroepitelio) del hospedero (Jouve *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 2000; Doye *et al.*, 2002; Mulvey, 2002; Emody *et al.*, 2003; Plancon *et al.*, 2003; Kansau *et al.*, 2004; Bower *et al.*, 2005; Eto *et al.*, 2007). No obstante, estudios realizados *in vitro* y en el modelo murino de cistitis sugieren que los mecanismos bioquímicos involucrados en tales procesos no son claros (Kau *et al.*, 2005).

### 2.3.2 FACTOR CITOTÓXICO NECROZANTE 1 (CNF1).

El factor citotóxico necrozante 1 (CNF1) es una toxina comúnmente encontrada en cepas de *E. coli* aisladas de pacientes con ITU. CNF1 es una proteína de aproximadamente 110 kDa, la cual fue caracterizada en base a su efecto necrozante y a la habilidad de promover la multinucleación en cultivos celulares (Caprioli *et al.*, 1983). La forma en que se secreta CNF1 es poco

entendida debido a su carácter altamente hidrofílico y que carece de una secuencia señal distinguible. Sin embargo, una vez secretada la toxina es capaz de entrar a las células del hospedero vía endocitosis debido a un pH bajo y a la subsecuente unión con el precursor del receptor de laminina, una proteína de membrana del hospedero que también funciona como receptor para varios virus (Mills *et al.*, 2000; Chung *et al.*, 2003).

Se ha propuesto que CNF1 estimula la formación de fibras de actina, lamelipodios, filopodios y membranas en forma de “ondulación” (del inglés ruffle), lo cual traería como consecuencia posibles episodios de internalización (Chung *et al.*, 2003). Dentro de las células del hospedero, CNF1 funciona como una deamidasa, convirtiendo residuos específicos de glutamina de algunas Rho GTPasas (RhoA, Rac o Cdc42) en ácido glutámico. Este cambio de aminoácidos inhibe la actividad hidrolítica de GTP y la hidrólisis de GTP inducida por las proteínas que activan GTPasas (GAPs), lo cual provoca que Rho GTPasas permanezcan constitutivamente activas; tal evento es importante debido a que las GTPasas son moléculas de señalización que participan en una gran variedad de procesos celulares, incluyendo la reorganización del citoesqueleto (Boquet, 1997). Muchos de los efectos observados de CNF1 (tales como la formación de fibras y protrusión de membrana) son desde luego consistentes con los mecanismos de acción de la toxina provocados en Rho GTPasas; no obstante, no se sabe con precisión como estos efectos participan en la patogénesis de UPEC.

Un estudio realizado por Doye y cols. (2002) en una línea celular de vejiga indica que la activación de Rac por CNF1 promueve la formación de una “ondulación” en la membrana plasmática y la subsecuente formación de lamelipodios, estimulando la movilidad celular y un posible incremento de la internalización bacteriana. La internalización podría promover la sobrevivencia dentro del TU, y el aumento de la movilidad celular facilitaría la diseminación de UPEC dentro del tejido infectado.

### 2.3.3 ADHESINAS AFIMBRIALES Y FIMBRIALES Afa/Dr.

La familia de adhesinas Afa/Dr consiste de estructuras adhesivas fimbriales (F1845, Dr, Dr-II) y afimbriales (Afa-1 y Afa-2, Afa-3, Afa-4 y Nfa-I), las cuales son codificadas por cinco genes (llamados A hasta B). Todos los miembros de la familia de adhesinas Afa/Dr reconocen secuencias presentes en el factor acelerador del consumo (DAF, CD55), el cual es una proteína de membrana que evita la lisis celular mediada por el complemento, y funciona como un receptor ligado a glicosilfosfatidilinositol (GPI) y como factor de regulación expresado en células del uroepitelio. Una subclase de adhesinas Afa/Dr, incluyendo F1845, Dr y Afa-3, también se unen a tres miembros de la familia de moléculas de adhesión relacionadas con el antígeno carcinoembriogénico (CEACAM) (Bahrani-Mougot *et al.*, 2002; Berger *et al.*, 2004). Además, la fimbria Dr que comprende las subunidades DraE y DraD, unen colágeno tipo IV y, tanto Dr y Afa-3 reconocen  $\alpha 5 \beta 1$ -integrinas (Plancon *et al.*, 2003).

En años recientes algunas proteínas asociadas a Afa/Dr (AfaD, DraE y DraD) también han sido implicadas como invasinas (moléculas capaces de estimular la internalización a células del hospedero). Ensayos realizados en líneas celulares (Hela, CHO y Caco2) confirman lo anterior. El reconocimiento de CD55 y/o  $\alpha 5\beta 1$ -integrinas por las adhesinas Afa/Dr promueven el desarrollo progresivo de microbios adherentes o la internalización de gotas cubiertas de invasina por la membrana de la célula del hospedero vía un mecanismo de “cierre” (del inglés zipper), (Jouve *et al.*, 1997; Plancon *et al.*, 2003 Kansau *et al.*, 2004; McCaw *et al.*, 2004).

Evidencias recientes han mostrado que la unión de la fimbria Dr a colágeno IV facilita la persistencia de UPEC dentro de compartimentos intersticiales de los riñones en un modelo de pielonefritis en ratón (Selvarangan *et al.*, 2004). Además se ha reportado que las UPEC que codifican adhesinas Dr pueden sobrevivir por más de un año dentro del parénquima renal (Mulvey, 2002). La alta persistencia de patógenos bacterianos ha sido vinculada a procesos invasivos. Sin embargo, no es claro el papel que juega Afa/Dr en el proceso de internalización de UPEC a células uroepiteliales.

#### 2.3.4 ADHESINA FIMBRIAL FimH.

La adhesina FimH es codificada por el pili tipo 1, el cual es expresado por la mayoría de los aislados de UPEC. Estas estructuras consisten de filamentos delgados conformados por subunidades repetidas de FimA, acopladas a hebras cortas que contienen la adhesina de unión a manosa FimH y dos proteínas

adaptadoras, FimF y FimG (Martinez *et al.*, 2000; Mulvey, 2002; Kau *et al.*, 2005; Seed y Hultgren, 2005).

El receptor predominante del hospedero para la unión de FimH a residuos de monomanosa dentro del tracto urinario se cree es una proteína integral de membrana conocida como uroplakina 1a (UP1a) (Zhou *et al.*, 2001). Junto con UP2, UP1a forma complejos hexagonales que se asocian con otras tres proteínas (UP1b, UP3a y UP3b). Estos complejos de proteínas están ensamblados en placas que cubren casi por completo la superficie del epitelio de la vejiga (Apodaca, 2004). Además, FimH puede mediar la adherencia bacteriana a un número de receptores glicosilados y no glicosilados dentro del hospedero, incluyendo proteínas asociadas a matriz extracelular, colágeno tipo I y IV, laminina, fibronectina, componentes de glicocálix presentes en la superficie de la vejiga, la proteína glicosilfosfatidilinositol GPI (CD48), miembros de la familia CEACAM y la proteína altamente glicosilada Tamm-Horsfall (Sokurenko *et al.*, 1992; Kukkonen *et al.*, 1993; Pak *et al.*, 2001, Mulvey, 2002).

Se ha especulado que FimH puede actuar también como una invasina, promoviendo la internalización de la bacteria a células epiteliales de vejiga, así como a mastocitos y macrófagos (Baorto *et al.*, 1997; Martinez *et al.*, 2000; Emody *et al.*, 2003; Eto *et al.*, 2007). La internalización bacteriana a mastocitos y macrófagos ocurre vía interacción con CD48, una proteína expresada principalmente por células de la línea hematopoyética (Malaviya *et al.*, 1999).

Mientras que, se ha sugerido que el receptor involucrado en la invasión mediada por FimH a células epiteliales es la proteína UP1a (Zhou *et al.*, 2001).

Ensayos realizados en el modelo de infección de vejiga en ratón, muestran una aparente interacción entre complejos hexagonales de uroplakina y la adhesina del pili tipo 1 (FimH), éste y otros estudios han mostrado que la invasión es un proceso completamente dependiente de FimH (Mulvey *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2000). La invasión bacteriana mediada por FimH parece ocurrir vía un mecanismo de “cierre”, en el cual la membrana del hospedero envuelve al patógeno adherente en respuesta a la interacción entre la adhesina y el receptor del hospedero (Martinez *et al.*, 2000). Además, utilizando espectroscopía de masas se ha especulado que la interacción del pili tipo 1 con ciertas integrinas ( $\alpha 3$  y  $\beta 1$ ) modula la internalización de la bacteria a células de vejiga (Eto *et al.*, 2007). Además de promover la adhesión y/o invasión, se ha observado que algunas variantes de FimH median contactos interbacterianos, estimulando la autoagregación bacteriana y la formación de biopelículas (del Inglés biofilms), generando que UPEC sea capaz de resistir mejor los tratamientos con antibióticos y las defensas antibacterianas dentro del TU (Mulvey, 2002).

#### 2.4 MODELO MURINO DE CISTITIS PARA EL ESTUDIO DE LA INVASIVIDAD DE UPEC.

Recientemente se desarrolló un modelo de infección de vejiga en ratón para evaluar de una mejor manera el proceso invasivo de UPEC, en el cual se ha descrito que la invasión de UPEC a células uroepiteliales activa una cascada de señalización resultando en la formación de comunidades bacterianas

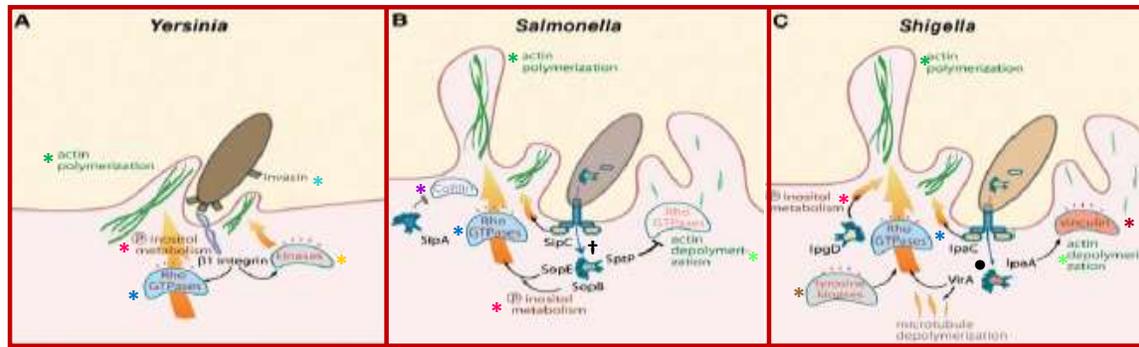
intracelulares (CBI). Una vez que UPEC se ha introducido en la célula, la formación de una CBI presenta cuatro estadios de desarrollo, que difieren con respecto a la maduración y/o crecimiento de la comunidad, entre los cuales se incluyen: multiplicación bacteriana, organización colonial, movilidad y dispersión (Mulvey *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2004).

Básicamente, una vez dentro de las células superficiales de la vejiga, UPEC se divide rápidamente en el citoplasma de la célula hospedera, resultando en la formación de una pequeña CBI. Durante el crecimiento, las bacterias mantienen su típica forma de bacilo y se encuentran orientadas azarosamente en el citoplasma. Posteriormente, la primera CBI madura en una estructura parecida a un biofilm, durante este cambio fenotípico las bacterias disminuyen su tasa de crecimiento y empiezan a unirse y formar un delgado y compacto grupo, denominado CBI intermedia. La superficie de las células de vejiga en este punto de la infección presenta protuberancias o extensiones, cada una de las cuales está llena de cientos de bacterias. Eventualmente, las bacterias en el borde de la CBI se desprenden y se diferencian a una forma alargada y tubular, con una alta movilidad en un punto de la célula del hospedero. Una vez que éstas se extienden en el borde de la célula infectada, las bacterias emergen, en un proceso denominado “eflujo”. A menudo caracterizado por la formación de largos filamentos (bacilos unidos) de hasta 70  $\mu\text{m}$  de largo. Tal mecanismo ha sido asociado en mayor medida con la persistencia y/o recurrencia de las IsTU, más que a la evasión de las defensas del hospedero (Mulvey *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2003; Justice *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2004).

## 2.5 INTERNALIZACIÓN BACTERIANA Y ALTERACIONES DEL CITOESQUELETO.

Es bien conocido que varios patógenos han desarrollado estrategias para inducir activamente su entrada a células no fagocíticas profesionales, los cuales presentan proteínas de superficie e interactúan con componentes de la membrana celular del hospedero, o translocan proteínas bacterianas hacia el citosol de la célula, promoviendo la entrada de la bacteria (Dramsí y Cossart, 1998). La internalización de patógenos bacterianos tales como: *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella*, entre otros, es un proceso altamente activo que involucra el rearrreglo coordinado del citoesqueleto de actina y el cambio de la arquitectura de la membrana plasmática en el sitio de unión de la bacteria, induciendo la endocitosis del patógeno (Figura 3) (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006; Sousa *et al.*, 2007).

Microorganismos como *Yersinia* se internalizan a células epiteliales mediante el establecimiento secuencial de una alta afinidad ligando-receptor. El compromiso directo entre la proteína bacteriana invasina y el receptor  $\beta$ 1-integrina conduce a la activación de varias GTPasas, incluyendo Rac1, un miembro de la familia de reguladores de actina (Rho), y Arf6, la cual ha sido implicada en el tráfico de membranas; estas proteínas promueven el reclutamiento de segundos mensajeros afectando la localización subcelular y la activación de moléculas reguladoras de actina (GPI, cinasas, entre otros), promoviendo la entrada del patógeno a través del proceso conocido como “cierre” (Figura 3) (Isberg y Leong, 1990; Pizarro-Cerdá y Cossart, 2004).



\* Polimerización de      \* Proteína invasina   \* Metabolismo de      \* Rho GTPasas   \* Cinasas   † Proteínas Sip  
 \* Proteína cofilina   \* Despolimerización de actina   \* Tirosina-cinasas   ● Proteínas Ipa y VirA   \* Proteína vinculina

**Figura 3. Estrategias de invasión y el rearrreglo del citoesqueleto: *Yersinia*, *Salmonella* y *Shigella*.** (A) La proteína de *Yersinia* (invasina) interactúa con el receptor  $\beta$ 1-integrina y activa una cascada de señalización que induce el rearrreglo de actina en el sitio de entrada de la bacteria mediante un mecanismo de “cierre”. (B) *Salmonella* transloca varios efectores dentro de la célula (proteínas Sip) mediante el sistema de secreción tipo tres (TTSS, por sus siglas en inglés); conduciendo la polimerización de actina y la formación de una “ondulación” para su internalización. (C) *Shigella* también transloca varios efectores dentro de la célula mediante el TTSS para inducir la invasión (mecanismo de “ondulación”). La nucleación de filamentos de actina y el posterior rearrreglo en la membrana es inducida por los efectores proteínicos Ipa y VirA. Modificado de Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006.

Patógenos como *Shigella* y *Salmonella* internalizan células epiteliales mediante la translocación de proteínas efectoras (proteínas denominadas Sip en el caso de *Salmonella* y proteínas llamadas Ipa y VirA en el caso de *Shigella*) por el TTSS, provocando el rearrreglo masivo de filamentos de actina y la formación de una “ondulación” en la membrana plasmática de la célula hospedera, logrando la entrada de la bacteria. Este rearrreglo del citoesqueleto es caracterizado por la inducción y/o reclutamiento de numerosas moléculas nucleadoras de actina en el lado interno de la membrana citoplasmática (complejo Arp2/3), en el sitio de interacción entre la bacteria y la célula (Criss y Casanova, 2003; Bougneres *et al.*, 2004). Además de la participación del metabolismo de inositoles (GPI), Rho GTPasas y cinasas en el proceso invasivo de estas enterobacterias, también se

ha detectado la presencia de las proteínas cofilina y vinculina como mediadores de la internalización de *Salmonella* y *Shigella*, respectivamente (Figura 3) (Fu y Galan, 1999; Cossart y Sansonetti, 2004).

En el caso de UPEC, poco es conocido acerca de los efectores que regulan el tránsito en la polimerización de actina requeridos en el sitio de entrada de la bacteria. Sin embargo, se ha propuesto que en la invasión mediada por FimH, el rearrreglo del citoesqueleto de actina es activado por proteínas cinasas (PI-3 cinasa) que catalizan la síntesis de segundos mensajeros, provocando cambios en el citoesqueleto de la célula y alterando directa o indirectamente la localización subcelular, conformación y activación de numerosas moléculas (GTPasas, vinculina, cinasa de adhesión focal, FAK por sus siglas en inglés) (Martinez *et al.*, 2000; Martinez y Hultgren, 2002). En contraste, se ha especulado que los aislados positivos a Afa/Dr no requieren del rearrreglo de actina para la internalización de la bacteria; sino al parecer, tal evento está relacionado con la inestabilidad de microtúbulos (otro componente del citoesqueleto) y la participación de caveolina, proteína asociada al tráfico celular (Guignot *et al.*, 2001).

Como se ha observado, la endocitosis de patógenos bacterianos es un proceso altamente activo que involucra receptores específicos de superficie celular y/o la elaboración y translocación de los mismos (Hall y Nobes, 2000). Los receptores unidos a la superficie antigénica de las bacterias generan una cascada de señalización que involucra la activación de pequeñas moléculas (GTPasas), promoviendo la dinámica en el rearrreglo del citoesqueleto de actina y la formación

de protuberancias en la superficie celular (en forma de “cierre” u “ondulación”) alrededor de la bacteria para endocitarla (Conner y Schmid, 2007).

En células eucariontes, la polimerización de actina no es un proceso espontáneo. Una molécula nucleadora es necesaria para iniciar eficientemente la formación y elongación de filamentos de actina. Hasta ahora, se han descrito tres clases de nucleadores: el complejo Arp2/3, las proteínas formina y spire (Chhabra y Higgs, 2007). El complejo Arp2/3 está compuesto por siete proteínas (ARPC 1 a 5, Arp2 y Arp3), de las cuales sólo Arp2 y Arp3 están relacionadas con la actina, y que al unirse forman un complejo nucleador que regula el ensamble dinámico de los filamentos de actina y la formación de estructuras (parecidas a las dendritas) entre filamentos. De esta manera, el complejo Arp2/3 no sólo funciona como un factor nucleador, sino que además provee estructura a la red intrincada de filamentos de actina (Machesky *et al.*, 1997; Millard *et al.*, 2003), y que en respuesta a diferentes estímulos puede resultar en la formación de extensiones de la membrana (lamelipodios), implicadas en la endocitosis fisiológica propia de las células eucariontes (Chhabra y Higgs, 2007), y en algunos casos en la internalización de ciertos patógenos bacterianos (Svitkina y Borisy, 1999).

En contraste con el complejo Arp2/3, las proteínas spire y formina no son capaces de establecer contacto entre filamentos de actina, y se han relacionado en mayor medida con la formación de estructuras de absorción (filopodios, entre otras) en las células animales (Higgs, 2005; Chhabra y Higgs, 2007).

Otras proteínas asociadas al citoesqueleto, entre las que se incluyen: vinculina, cofilina, cortactina, miosina, por mencionar algunas, también han sido implicadas como importantes mediadores en la internalización de patógenos bacterianos. Además, se ha establecido que algunas bacterias utilizan proteínas involucradas en el tráfico celular (clatrina y caveolina) para lograr su entrada a células del hospedero (Pizarro-Cerdá y Cossart, 2006; Boisvert y Duncan, 2008).

### **3. JUSTIFICACIÓN**

El hallazgo de que algunos aislados de UPEC han mostrado ser capaces de internalizar células en cultivo y tejidos que constituyen el tracto urinario (modelo de ratón), sugiere que la invasión es un evento importante en la patogénesis de estas cepas. Sin embargo, no se conoce con precisión la frecuencia con la que cepas invasivas son las causantes de infecciones en el tracto urinario, ni tampoco se ha establecido la eficiencia de internalización de dichos aislados. Además, aunque se sabe que el rearrreglo de actina es una característica común en la mayoría de los eventos de invasión, los factores bacterianos y otros factores celulares (del hospedero) involucrados en la internalización a las células son específicos para cada bacteria. En el caso específico de UPEC se desconoce en gran medida el mecanismo mediante el cual la bacteria penetra al interior de las células uroepiteliales, en particular las proteínas efectoras que regulan el tránsito en la polimerización de actina, requeridas en el sitio de entrada de la bacteria.

#### 4. HIPÓTESIS

Cepas de *Escherichia coli* uropatógena con capacidad invasiva frecuentemente causan infecciones del tracto urinario en pacientes ambulatorios, dichas bacterias al internalizarse producen alteraciones en la distribución de proteínas del citoesqueleto de la célula epitelial infectada.

#### 5. OBJETIVO GENERAL

Conocer la frecuencia con la cual se encuentran cepas invasivas entre los aislados de *Escherichia coli* obtenidos de pacientes con infección de vías urinarias, e investigar la eficiencia de internalización bacteriana a células epiteliales y detectar las alteraciones en el citoesqueleto inducidas por la internalización de la bacteria.

##### 5.1 OBJETIVOS PARTICULARES.

- ✚ Evaluar la frecuencia de aparición de cepas invasivas de *Escherichia coli* uropatógena en aislados de pacientes con infecciones del tracto urinario.
- ✚ Determinar la capacidad y la eficiencia de internalización bacteriana a células epiteliales.
- ✚ Detectar alteraciones en proteínas del citoesqueleto (Arp2, Arp3, actina y clatrina) inducidas por la internalización de la bacteria.

## 6. DISEÑO EXPERIMENTAL

La estrategia para determinar la frecuencia y eficiencia de invasividad de aislados de UPEC de la ciudad de México, y el análisis de proteínas del citoesqueleto involucradas en la internalización bacteriana fue la siguiente:

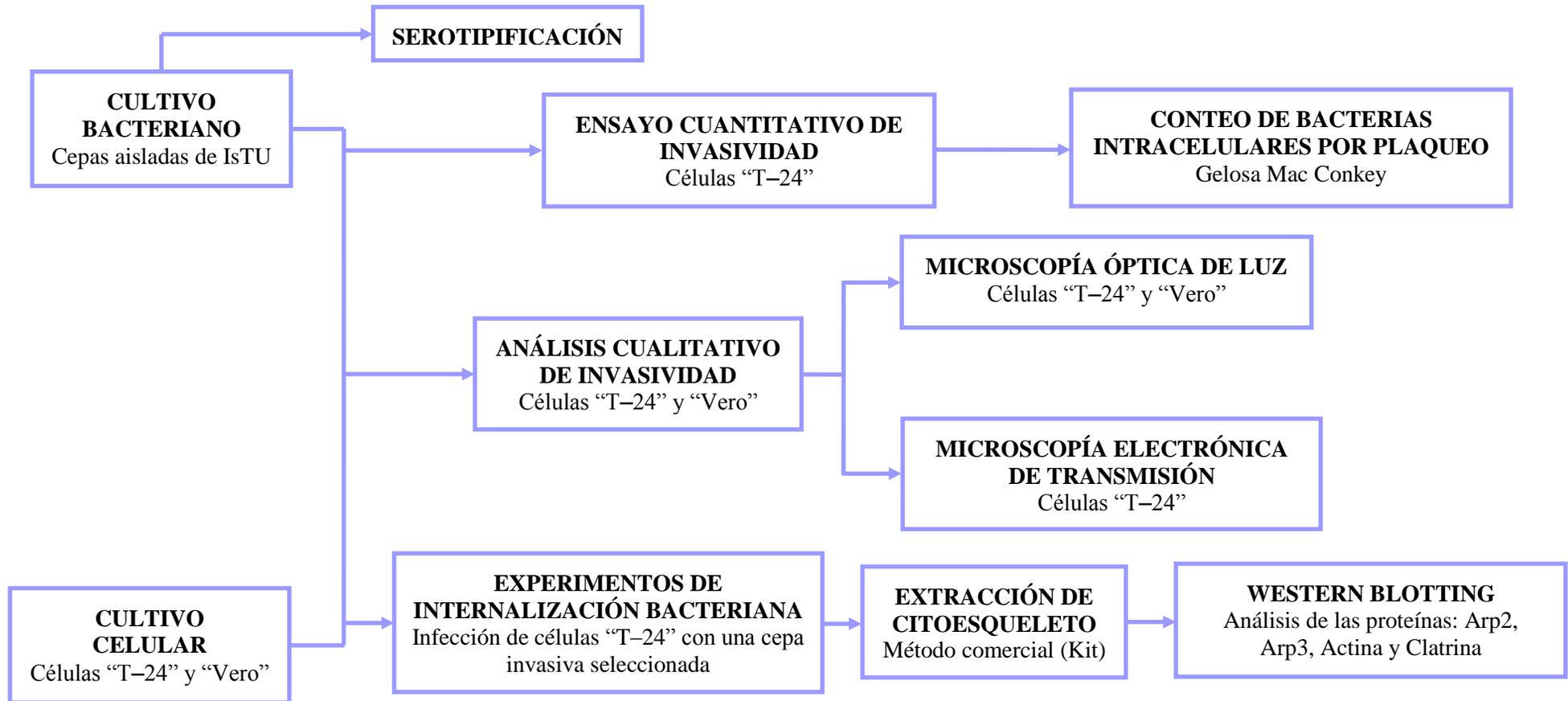


Figura 4. Esquema general de trabajo

## 7. MATERIAL Y MÉTODOS

### 7.1 POBLACIÓN DE ESTUDIO Y MATERIAL BIOLÓGICO.

Se realizó un estudio transversal descriptivo, en el que se analizaron un total de 60 cepas de *Escherichia coli* aisladas de orina (colectada del chorro medio de la micción en condiciones asépticas con un catéter) de pacientes ambulatorios (hombres y mujeres) que mostraron síntomas clínicos de infección aguda no complicada del tracto urinario y que en el urocultivo presentaron más de 100,000 unidades formadoras de colonias (UFC) de *E. coli* por mL de orina. Los pacientes eran en su mayoría mujeres (75%), y las edades fluctuaron entre los 14 y 75 años (el 70% tenía de 22-55 años). No se incluyeron pacientes con alguna otra enfermedad, ni mujeres embarazadas. Las cepas se colectaron durante los años 2006 y 2007, y proceden de la Dirección de Investigación del Hospital General “Dr. Manuel Gea González”, SS., Hospital General de México, SS y Hospital General “Dr. Gonzalo Castañeda Escobar”, ISSSTE., de la Ciudad de México. Las cepas se biotipificaron como *Escherichia coli* mediante el Sistema de Diagnóstico Automatizado Vitek. Las muestras con más de una especie bacteriana se excluyeron del estudio.

Las cepas se recibieron en cajas Petri en gelosa Mac Conkey (Bioxon). Se mantuvieron a temperatura ambiente, tomando en cuenta que no transcurrieran más de 4 horas hasta su procesamiento. Se comprobó que las cepas estuvieran puras sembrándolas en gelosa Mac Conkey (Bioxon) y en medio gelosa Sangre (Bioxon) suplementado con 5% de sangre de carnero desfibrinada (Hemoprovedores). Las placas se incubaron a 37°C durante 18-24 horas. Con el fin de

mantener las cepas bacterianas viables y disponibles para su uso, éstas fueron crecidas durante toda la noche en 10 mL de medio Luria-Bertani (LB), al siguiente día el cultivo se centrifugó, y el botón bacteriano se resuspendió en 1.0 mL de medio LB suplementado con glicerol al 60% y se congelaron a  $-70^{\circ}\text{C}$  para estudios posteriores.

## 7.2 BACTERIAS DE REFERENCIA.

Se utilizaron dos cepas de referencia: *Escherichia coli* uropatógena (CFT073) y *Escherichia coli* enteropatógena (E2348/69) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés). Además se utilizó la cepa de *Escherichia coli* 1162 (O25:H4), obtenida de células de una mujer que tenía infección aguda recurrente del tracto urinario. La cepa bacteriana se identificó por el sistema automatizado Vitek. También se realizó identificación presuntiva de *E. coli* directamente sobre placa Chromogenic UTI Medium (OXOID). Esta cepa se utilizó como un control positivo debido a la peculiaridad de formar filamentos bacterianos intracelulares, observados en las células a partir de las cuales se aisló; como controles negativos se usaron 20 cepas de *Escherichia coli* fecales/comensales aisladas de individuos sanos, procedentes de la colección de cepas del Depto. de Salud Pública de la Facultad de Medicina, UNAM., además de la cepa *E. coli* de referencia K-12 (Cuadro 2).

**Cuadro 2. Cepas de referencia de *Escherichia coli***

<b>Especies</b>	<b>Identidad</b>	<b>Serotipo</b>	<b>Control</b>
<b><i>Escherichia coli</i> uropatógena</b>	CFT073*	O6:K2:H1	POSITIVO
<b><i>Escherichia coli</i> uropatógena</b>	1162**	O25:H4	POSITIVO
<b><i>Escherichia coli</i> enteropatógena</b>	E2348/69*	O127:H6	POSITIVO
<b><i>Escherichia coli</i> K-12</b>	MG1655*	OR:H11	NEGATIVO
<b>20 <i>Escherichia coli</i></b>	Fecales/Comensales***	Varios	NEGATIVO

\* ATCC, Colección Americana de Cultivos Tipo.

\*\* Cepa aislada de una mujer con síntomas de cistitis aguda.

\*\*\* Colección del Depto. de Salud Pública de la FM, UNAM.

### 7.3 SEROLOGÍA POR AGLUTINACIÓN EN PLACA.

Las cepas se serotipificaron en el laboratorio mediante aglutinación en microplacas de 96 pozos, utilizando 175 antisueros somáticos y 56 antisueros flagelares, obtenidos en conejo (Orskov y Orskov, 1975).

Brevemente, para preparar el antígeno somático cada cepa se resembró en un tubo de TSA inclinado mediante estría cerrada incubándolo a 37°C durante 24 horas. El crecimiento obtenido se cosechó con una solución salina (0.15 M), la suspensión obtenida se transfirió a un tubo limpio para hervirlo a vapor fluyente por espacio de 1 hora. Al concluir se agregó solución salina con formaldehído (0.06%) para preservar el antígeno.

Para el caso de los antígenos flagelares se inoculó la cepa por picadura en un tubo con medio semisólido incubándola a 30°C por un período máximo de 14 días. Cuando en el tubo se hizo visible la movilidad, se tomó un inóculo con asa

bacteriológica y se transfirió a un tubo con caldo biotriptasa al 2% incubándolo a la misma temperatura durante 24 horas para conservar el antígeno.

La identificación de los antígenos somáticos se realizó colocando 50  $\mu$ L de cada suero monoespecífico y 50  $\mu$ L del antígeno en cada uno de los 96 pozos de que consta la microplaca. Cada placa se incubó a 50°C durante 24 horas cubriéndola para evitar la desecación. Después de este período se leyó la aglutinación para determinar los positivos y posteriormente realizar la titulación correspondiente con los sueros preparados a una dilución 1:100; se colocaron 100  $\mu$ L en la primera línea de la placa y 50  $\mu$ L de solución salina en los pozos restantes para realizar diluciones 1:2 seriadas hasta obtener una dilución final de 1:12,800. A cada pozo se le agregaron 50  $\mu$ L de antígeno en estudio, incubando la placa durante toda la noche a 50°C para realizar la lectura. El serogrupo de la bacteria se definió como aquél en que la reacción de aglutinación se presentó con la mayor dilución. Para el caso en el que los títulos fueron muy cercanos se utilizaron sueros puros absorbidos con los antígenos que presentaron cruce antigénico. La determinación del antígeno flagelar se realizó siguiendo el procedimiento descrito anteriormente, a excepción de que el tiempo de incubación fue de 3 horas.

Los criterios de evaluación de la aglutinación fueron: 100% (4+), 75% (3+), 50% (2+) y 25% (1+), sin aglutinación (negativa, O?) y aglutinación con todos los antisueros (rugoso, OR) de acuerdo a lo establecido por el Laboratorio de Serología de la Facultad de Medicina de la UNAM.

#### 7.4 CULTIVO CELULAR.

Para los ensayos de invasividad *in vitro*, se utilizaron células de vejiga humana (*Homo sapiens*) llamadas “T-24” (ATCC, USA) y células de riñón de mono verde africano (*Cercopithecus aethiops*) denominadas “Vero” (ATCC, USA). Las células “T-24” se crecieron rutinariamente en botellas de cultivo de 250 mL (Nunc, Inc.) en medio McCoy (*In vitro* S.A.) conteniendo L-glutamina y suplementado con 10% de suero fetal de bovino (SFB) inactivado (GIBCO) y una mezcla de estreptomicina-penicilina al 1% (*In Vitro* S.A.), se mantuvieron en incubación a 37°C en una atmósfera de 3% de CO<sub>2</sub>. Las células “Vero” se crecieron en medio mínimo esencial de Eagle, MEM (Laboratorios *In vitro* S.A. México, D.F.) en las mismas condiciones. Las células se sembraron rutinariamente cuando éstas alcanzaron el 80% de confluencia.

#### 7.5 ENSAYO CUANTITATIVO DE INVASIVIDAD BACTERIANA DE PROTECCIÓN A GENTAMICINA EN CÉLULAS “T-24”.

El ensayo cuantitativo de invasividad bacteriana en células “T-24” se realizó según Luck y cols. (2005), con algunas modificaciones. Células “T-24” con una confluencia del 80% se desprendieron con una solución de tripsina al 0.25% y verseno al 0.1% (*In vitro* S.A.), y se sembraron a una concentración de  $2.5 \times 10^5$  células/mL en placas de cultivo de 24 pozos (Nunc, Inc.) en medio McCoy suplementado con 10% de SFB y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 3% CO<sub>2</sub> durante 18 horas. Transcurrido este tiempo, se les cambió el medio a las células por medio McCoy sin SFB ni antibióticos.

Las cepas de *E. coli* se crecieron durante 12 horas en medio LB a 37°C y luego por una hora más en medio MEM, esto se realizó de la siguiente manera: el cultivo bacteriano se centrifugó a 8,000 x g durante 3 minutos, se decantó el sobrenadante y se resuspendió en 1.0 mL de medio MEM sin suero ni antibióticos y se incubaron durante una hora a 37°C. La monocapa celular se inoculó con una multiplicidad de infección (MOI, por sus siglas en inglés) de aproximadamente 100:1 de cada cepa a evaluar y se incubó a 37°C en 3% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron tres veces con PBS y se lisaron con 200 µL de Tritón X-100 (Merck) al 0.1% en PBS durante 20 minutos a temperatura ambiente. Seguido de la lisis celular, las bacterias se resuspendieron en PBS y se cuantificaron por plaqueo de diluciones seriadas (1:50 y 1:2500) en cajas Petri con gelosa Mac Conkey para obtener el número total de bacterias asociadas a las células.

Para determinar el número de bacterias intracelulares de los aislados de UPEC un segundo grupo de células "T-24" se infectó como se describió previamente. Después de las 3 horas de incubación, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron por 1 hora más en medio McCoy suplementado con 100 µg/mL de gentamicina (*In vitro* S.A.) y 300 µg/mL de lisozima (Sigma Chemical CO), lo anterior con la finalidad de eliminar a las bacterias que no se internalizaron a las células. Las células se lavaron con PBS y se lisaron con 0.1% de Tritón X-100 en PBS, y las bacterias se recuperaron y cuantificaron por plaqueo de diluciones seriadas (1:50 y 1:2500) en placas con gelosa Mac Conkey. Las

placas se incubaron a 37°C durante toda la noche y las colonias bacterianas se contaron para su análisis estadístico.

El ensayo se realizó por duplicado, y los resultados de dos experimentos independientes se expresaron como porcentaje del número de bacterias intracelulares con respecto a las bacterias asociadas a la monocapa celular.

#### 7.6 ANÁLISIS CUALITATIVO DE INVASIVIDAD BACTERIANA DE PROTECCIÓN A GENTAMICINA EN CÉLULAS “T-24” Y “VERO”.

El análisis cualitativo de invasión bacteriana se realizó según Elsinghorst, 1994, con algunas modificaciones. A una placa de cultivo de 24 pozos que contenía lentes de polipropileno de 13 mm (Sarstedt, Inc.) se le agregó una suspensión de células “T-24” o “Vero” a una concentración de  $2.5 \times 10^5$ /mL en medio McCoy o MEM (según la línea celular) suplementado con 10% de SFB y una mezcla de estreptomicina-penicilina al 1% y se incubaron a 37°C en una atmósfera de 3% CO<sub>2</sub> durante 18 horas. Posteriormente, se les cambió el medio a las células por medio McCoy o MEM sin SFB ni antibióticos. Cada una de las cepas a evaluar se creció como se describió previamente. La monocapa celular se infectó a una MOI de aproximadamente 100:1 y se incubó a 37°C en 3% de CO<sub>2</sub> durante 3 horas.

Transcurrido este tiempo, las células se lavaron tres veces con PBS y se incubaron durante 1 hora más en medio McCoy o MEM suplementado con 100 µg/mL de gentamicina y 300 µg/mL de lisozima; sólo las bacterias intracelulares

sobrevivieron al tratamiento. Después de la incubación las células se lavaron con PBS, fijaron con metanol y tiñeron con Giemsa (Sigma Chemical CO) durante 20 minutos. Las muestras se deshidrataron en acetona-xileno y se fijaron a un portaobjetos con bálsamo de Canadá (Fisher Scientific Company) para examinarlas posteriormente por microscopía de luz (40X y 100X) (Carl Zeiss, West Germany) bajo aceite de inmersión. Se realizaron dos ensayos independientes con sus respectivos duplicados.

#### 7.7 MICROSCOPIA ELECTRÓNICA DE TRANSMISIÓN.

La microscopía electrónica de transmisión se realizó según Becker y cols. (1996) por el Dr. Armando Pérez Torres de la Facultad de Medicina, UNAM. Las células "T-24" infectadas durante el análisis cualitativo de invasividad bacteriana, se fijaron con 2.5% de glutaraldehído en 0.1 M de amortiguador de cacodilato de sodio (pH 7.4) durante 90 min a 4°C. Las muestras se lavaron tres veces en el mismo buffer (0.15 M) y se fijaron en tetraóxido de osmio al 1% durante 30 minutos a 4°C. Después de tres lavados más, las preparaciones se deshidrataron en concentraciones ascendentes de etanol y se embebieron en resina (Epon 812) durante 5 min; las lentes se colocaron con las células fijadas hacia abajo, opuestas a la cápsula de resina durante toda la noche a temperatura ambiente para permitir una adecuada infiltración de la resina a las células. Posteriormente, se calentó la cápsula a 55°C durante 48 horas para permitir la polimerización de la resina.

Finalmente, la cápsula se congeló con nitrógeno líquido para romper las lentejas y liberar la monocapa celular embebida en Epon 812. Se obtuvieron secciones ultra delgadas (entre 70 y 80 nm) con un ultramicrotomo (Sorvall MT 6000), las cuales se tiñeron con 2% de acetato de uranilo y citrato de plomo para su posterior evaluación por microscopía electrónica de transmisión (Carl Zeiss EM-10, West Germany).

#### 7.8 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO INVOLUCRADAS EN LA INTERNALIZACIÓN DE LA BACTERIA.

Células “T-24” a una confluencia del 80% se tripsinizaron y crecieron en cajas Petri (100 x 15 mm) para cultivo (Nunc, Inc.) a una concentración de  $2.5 \times 10^5$ /mL, conteniendo medio McCoy suplementado con 10% de SFB inactivado y se incubaron a 37°C en atmósfera de 3% de CO<sub>2</sub> durante 72 horas. Se seleccionó una cepa (1162) que tuvo la capacidad de internalizarse eficientemente a células en el ensayo cuantitativo de invasividad bacteriana de protección a gentamicina.

El aislado se creció como se describió previamente en los ensayos de invasividad. Se infectaron dos cultivos celulares a una MOI de aproximadamente 100:1 durante 3 horas a 37°C en 3% de CO<sub>2</sub>; además se sembraron células sin infectar como control negativo durante 4 y 6 horas. Posteriormente, los cultivos infectados se lavaron tres veces con PBS e incubaron durante 1 y 3 horas más en medio McCoy suplementado con 100 µg/mL de gentamicina y 300 µg/mL de lisozima. Las monocapas celulares se lavaron con PBS frío y se desprendieron de

los platos de cultivo con un gendarme de plástico para cosecharlas en tubos Eppendorf de 1 mL.

#### 7.8.1 OBTENCIÓN DE PROTEÍNAS DE CITOESQUELETO.

La obtención de proteínas de citoesqueleto se realizó utilizando el método comercial “Compartmental Protein Extraction Kit” (Chemicon, Inc.), el cuál se basó en la lisis celular, fraccionamiento secuencial, centrifugación y solubilización selectiva de las proteínas del citoesqueleto. Una vez obtenidas las fracciones enriquecidas de citoesqueleto, se preparó la muestra adicionando el 25% de amortiguador de Laemmli 4X del volumen final de la muestra, y 5% de  $\beta$ -mercapto-etanol (LKB, Sweden) y se hirvió durante 5 min. Las fracciones enriquecidas de proteínas de citoesqueleto se separaron esencialmente por el método descrito por Laemmli, (1970). Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Dodecil Sulfato Sódico (SDS-PAGE) al 10%, el cual se corrió en una solución electrodo (50 Mm, glicina 380 Mm y SDS 2%) en una cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD) a 20 miliamperios constantes.

#### 7.8.2 INMUNO-ELECTROTRANSFERENCIA (DEL INGLÉS WESTERN BLOTTING).

El inmunoblot se realizó según Towbin y cols (1979) con la modificación de utilizar el método horizontal en semiseco (Harlow y Lane, 1988). Las proteínas contenidas en el gel de poliacrilamida se transfirieron a membranas de nitrocelulosa (Millipore, Bedford), mediante una solución electrodo (Tris-Base 50 mM, glicina 380 mM, SDS 1% y metanol al 20%) en una cámara de electrotransferencia (Owl separation systems) a 150 miliamperios constantes.

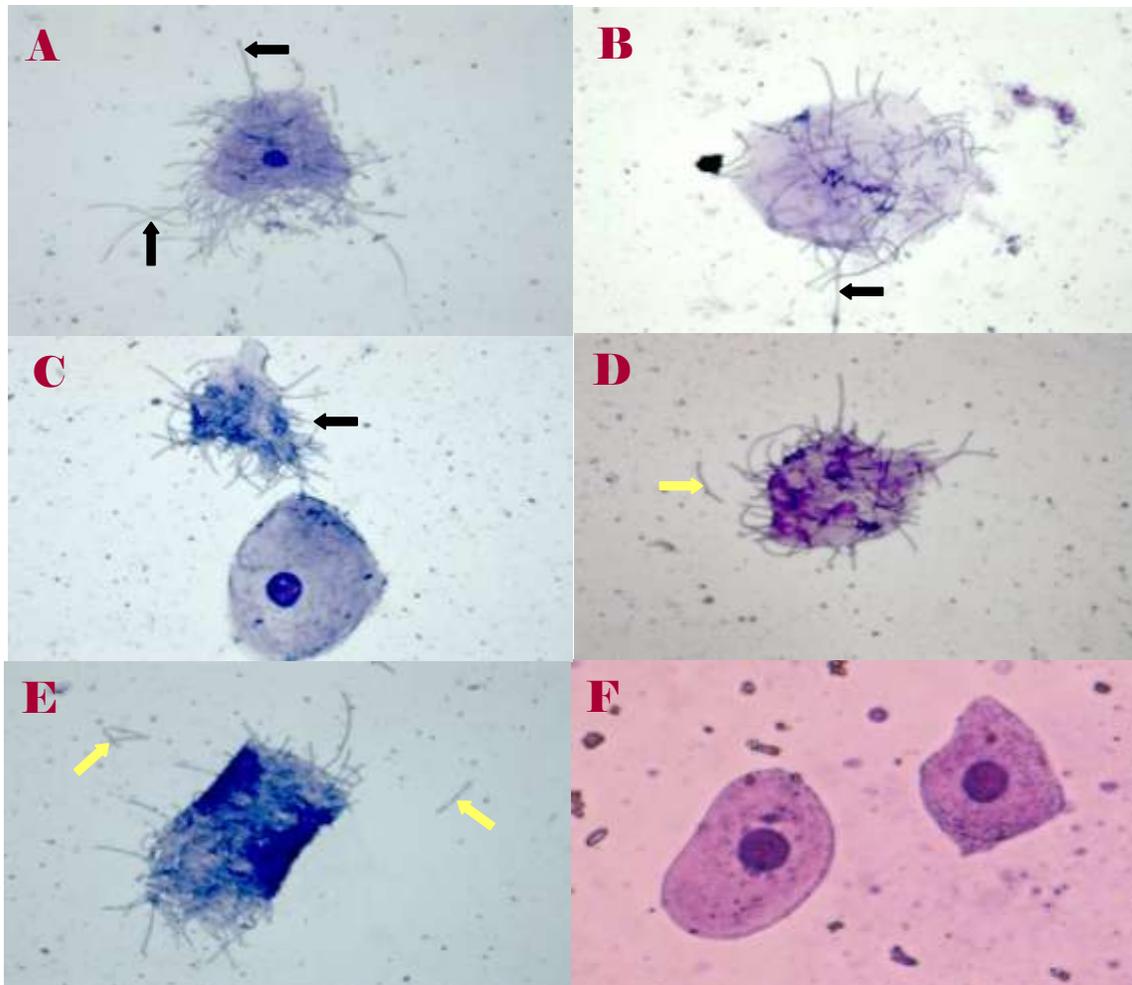
Las membranas se bloquearon con leche descremada al 4% en PBS durante una hora a temperatura ambiente. Las membranas que contenían los antígenos se incubaron con el anticuerpo primario (anti-Arp2, anti-Arp-3, anti-actina y anti-clatrina), dilución 1:200, durante 48 horas a 4°C. Después de lavar las membranas (PBS-Tween al 0.2%) y quitar el primer anticuerpo, se incubó con un anticuerpo secundario anti-IgG (dilución 1:5,000) conjugado con la enzima horseradish-peroxidasa durante una hora a temperatura ambiente. La reacción se visualizó con Tris-Base 50 mM, 4-chloro-1-naphthol y peróxido de hidrógeno al 30%.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 DETECCIÓN DE BACTERIAS INTRACELULARES EN CÉLULAS UROEPITELIALES OBTENIDAS DE UNA PACIENTE CON ITU.

Se aislaron células uroepiteliales a partir de la orina de una mujer con síntomas de cistitis aguda. Las células se fijaron y tiñeron con Giemsa para observarlas en el microscopio de luz. Las Figuras 5A y 5B muestran a las células uroepiteliales con filamentos largos (compuestos de bacilos unidos) que emergen o escapan de las células infectadas. Algunas células presentan deformación y protuberancias (Figura 5C). También observamos filamentos de diferentes longitudes no adheridos a las células (Figura 5D y 5E). Aparentemente los bacilos se unen por los extremos y forman filamentos parecidos a las hifas de los hongos. Como control negativo tenemos células uroepiteliales sin bacterias ni filamentos adheridos (Figura 5F), obtenidas de personas sanas sin síntomas de ITU.

A partir de estas células uroepiteliales se aisló una bacteria, la cual se identificó mediante pruebas bioquímicas y por serología como *Escherichia coli* con serotipo O25:H4. Esta cepa de *E. coli* a la cual nombramos 1162 se incluyó como parte del estudio y se utilizó como un control positivo interno en los ensayos de invasividad, debido a la particularidad de formar filamentos bacterianos intracelulares *in vivo*.



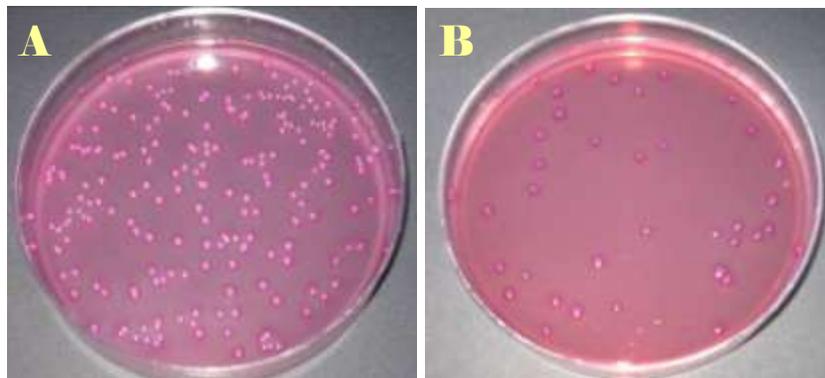
**Figura 5. Células uroepiteliales aisladas de orina de una mujer con infección aguda del tracto urinario.** En A, B, C, D y E células infectadas teñidas con Giemsa, aumento con el objetivo 100X. Las flechas negras indican los **filamentos** formados por bacilos bacterianos que parecen emerger de las células infectadas (A y B), dichas bacterias son potencialmente comunidades intracelulares. En C una célula deforme con protuberancias en la superficie, la cual está completamente cubierta por los filamentos bacterianos. En D y E filamentos (flechas amarillas) no vinculados a las células, donde se puede apreciar la septación de los mismos (bacilos unidos). El panel F muestra células uroepiteliales de una persona sana, control negativo. La bacteria aislada se identificó como *Escherichia coli* con serotipo O25:H4. La presencia en esta bacteria de otros factores de virulencia confirmó que se trata de una cepa UPEC.

## 8.2 ENSAYO CUANTITATIVO DE INVASIVIDAD BACTERIANA EN CÉLULAS “T-24”.

Se realizaron ensayos de invasividad *in vitro* a 60 cepas de *Escherichia coli* aisladas de orina de pacientes con ITU en células de vejiga humana. El ensayo consistió en infectar, con cada cepa a evaluar, la monocapa celular, incubarla y

exponerla al antibiótico gentamicina, posteriormente recuperar a las bacterias del interior de las células y finalmente sembrarlas en platos con gelosa Mac Conkey para cuantificarlas. Únicamente las bacterias invasivas pueden crecer debido a que la gentamicina no penetra al interior de las células durante el ensayo. Las células fueron infectadas a una MOI de aproximadamente 100:1 durante 3 horas para determinar adherencia e invasividad bacteriana de las cepas de *E. coli*.

Los porcentajes de invasividad se expresaron como número de bacterias intracelulares respecto a las adheridas inicialmente (Figura 6A y 6B).



**Figura 6. Plaqueo de diluciones seriadas en gelosa Mac Conkey (conteo de bacterias viables).** (A) Plato Petri con gelosa donde crecieron las colonias bacterianas a partir de las bacterias que se adhirieron a las células “T-24” después de 3 h de incubación (bacterias asociadas). Se observan las colonias bacterianas, cada colonia representa una UFC (en este caso el conteo fue de 222 UFC). (B) Plato Petri con gelosa donde crecieron las colonias bacterianas a partir de las bacterias intracelulares después del tratamiento con gentamicina (el conteo fue de 42 UFC). En consecuencia el porcentaje de invasividad fue de 18.9% de una cepa UPEC serotipo O152:NM. Dilución 1:2500.

De las 60 cepas evaluadas mediante este método se encontró que 36 (60%) resultaron invasivas, el número de bacterias intracelulares (UFC/pozo) recuperadas varió entre los 36 aislados positivos al ensayo de 1,660 a 866,000 UFC/pozo (que corresponden a las cepas 13932B y 14018 respectivamente, ver

cuadro 3). En diez de estas cepas invasivas el número de bacterias intracelulares fue mayor a 100,000 UFC/pozo (Cuadro 3). Las cepas prototipo uropatógena (CFT073) y enteropatógena (E2348/69) mostraron 36,750 UFC/pozo y 29,000 UFC/pozo, respectivamente.

Por el contrario, de las 20 cepas de *E. coli* fecales/comensales usadas como control negativo, sólo dos presentaron bacterias internalizadas en el ensayo *in vitro* y el número fue inferior a 3,000 UFC/pozo.

**Cuadro 3. Aislados de *E. coli* que mostraron capacidad de invadir células “T-24” *in vitro*, número de bacterias intracelulares (UFC/pozo)**

Cepas	Clave	Serotipos	Promedio de Bacterias Intracelulares (UFC/pozo)	(%) Invasividad
1	13640	O166:NM	135,500	4.24
2	13641	O?	8,000	0.60
3	13643	O102:H6	3,500	0.85
4	13646	O102:NM	21,000	1.49
5	13882	OR:NM	90,000	2.64
6	13925	OR:NM	12,000	0.39
7	13929	O2:H31	81,250	2.85
8	13932B	OR:NM	1,660	0.37
9	13957	O8:NM	33,500	2.75
10	13959	O86:H18	37,500	2.01
11	13996	O39:H16	224,500	10.63
12	14018	O152:NM	866,000	19.14
13	14029	O?	75,000	5.95
14	14030	O25:H4	207,000	8.38
15	14036	O8:H18	180,000	6.67
16	14041	O77:H18	249,500	9.51
17	14043	O77:H18	117,500	4.93
18	14044	O25:H4	74,000	2.01
19	14045	O?	79,500	3.39
20	14063	O6:H1	4,500	0.87
21	14067	O?	17,500	1.53
22	14068	OR:NM	96,500	7.89
23	14069	O25:H4	147,500	3.41
24	14070	O2:H6	22,000	0.85
25	14073	O25:H4	36,000	1.47
26	14129	O2:NM	65,000	3.41
27	14134	O6:H1	9,250	0.67
28	14672	O25:H4	89,000	6.70
29	A8-1	O25:H4	52,500	1.90
30	A8-3	O1:NM	27,500	2.18
31	A8-7	O25:H4	50,000	2.10
32	A8-15	O25:H4	110,000	11.13
33	A8-35	O25:H4	2,000	1.62
34	A8-44	O100:H12	8,000	0.52
35	047	OR:H6	17,500	2.07
36	1162	O25:H4	534,000	13.57
37*	E2348/69	O127:H6	29,000	1.87
38*	CFT073	O6:H1	36,750	4.19

\* Cepas prototipo.

Los porcentajes son el promedio del cociente de dos experimentos independientes.

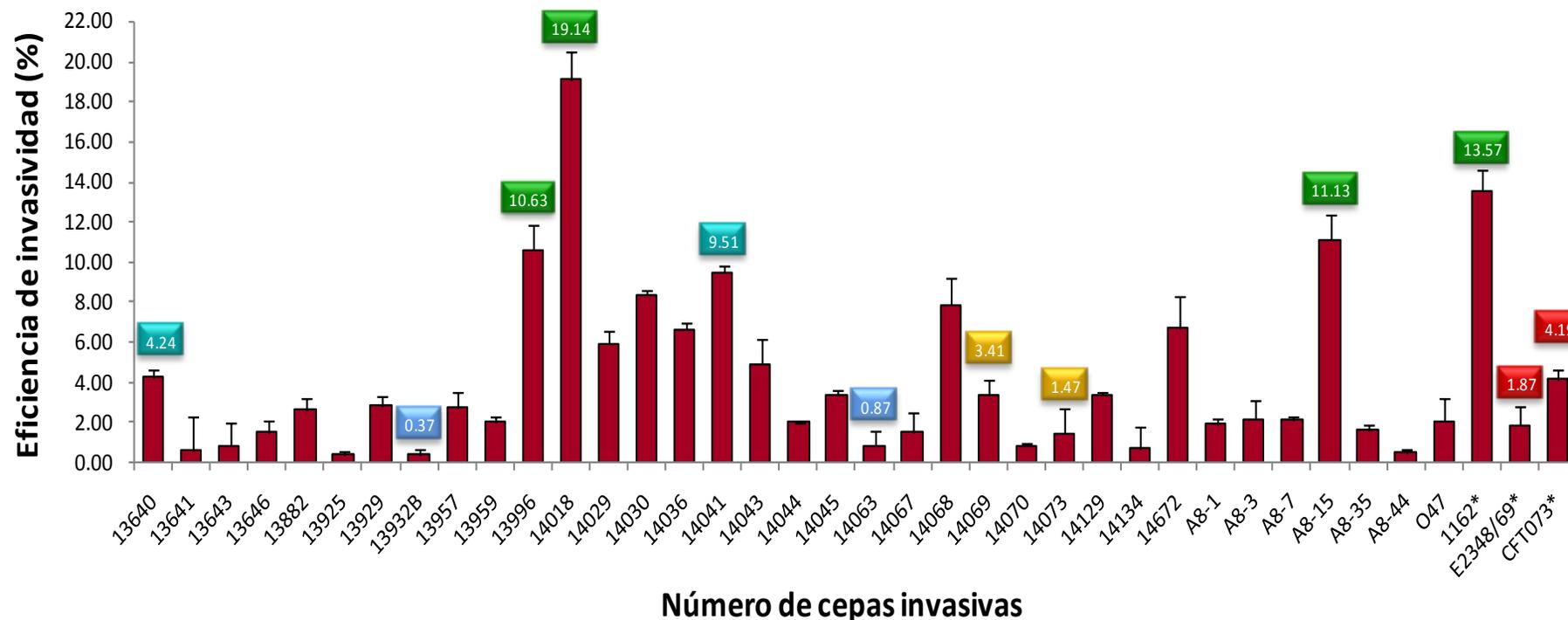
Al analizar la eficiencia de internalización (calculada en porcentaje) de las 36 cepas invasivas encontramos que 12 presentaron más del 4% de invasividad, dentro de las cuales, cuatro cepas sobresalen por presentar una eficiencia de internalización mayor al 10%, resultando con 10.63%, 11.13%, 13.57% y 19.14% que correspondieron a las cepas 13996, A8-15, 1162 y 14018, respectivamente (Figura 7). La cepa prototipo UPEC CFT073 se presentó con un eficiencia invasiva del 4.19%.

En contraste, 16 de los aislados mostraron una moderada eficiencia de internalización con porcentajes de entre el 1.47% y 3.41% (Figura 7). Estos porcentajes estuvieron cercanos a los de la cepa prototipo EPEC E2348/69 reportada en trabajos anteriores con porcentajes de invasividad cercanos al 2% (Hernandes *et al.*, 2008). En nuestro ensayo este aislado presentó un porcentaje de invasividad del 1.87%, lo cual indica que nuestros experimentos estuvieron dentro de los estándares de eficiencia establecidos en otros laboratorios. Además se encontró un grupo de cepas con menos del 1% de invasividad (Figura 7).

Dos cepas desprendieron la monocapa celular durante el ensayo, por lo tanto no se evaluó su capacidad invasiva.

Finalmente, de las 20 cepas de *E. coli* fecales/comensales evaluadas, se observó que sólo dos fueron capaces de internalizar células, el porcentaje de invasividad para estos aislados fue de 1.22% y 1.28%.

## Invasividad de cepas de *Escherichia coli* uropatógena a células de vejiga humana "T-24"

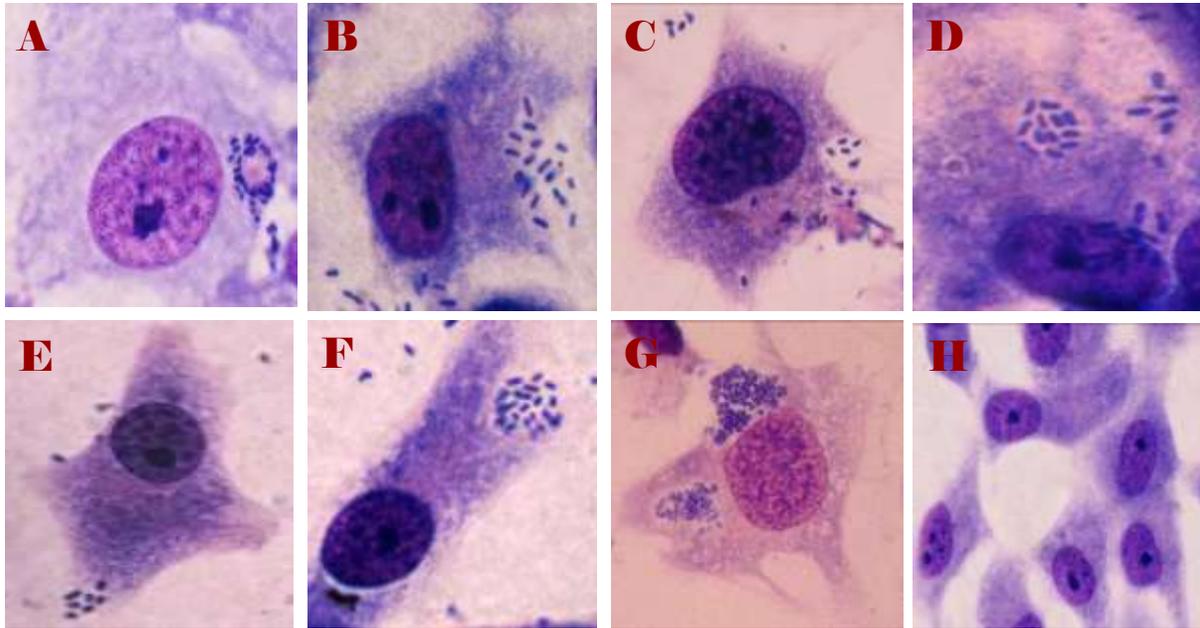


**Figura 7. Eficiencia de invasividad de cepas de *Escherichia coli* aisladas de IsTU en células de vejiga humana "T-24".** El ensayo de invasividad *in vitro* evidenció que 36 cepas fueron capaces de internalizar células "T-24". El grado de invasividad de las cepas probadas varió ampliamente: una invasividad baja (menor al 1%), invasividad moderada entre el 1.47% y 3.41%, porcentajes muy cercanos a la cepa enteropatógena prototipo E2348/69), cepas muy invasivas (entre el 4.24% y 9.51%, porcentajes de internalización cercanos a la cepa uropatógena prototipo CFT073), y aislados altamente invasivos (mayor al 10%), entre estas se encuentra la cepa 1162 serotipo O25:H4 que, además de ser parte del estudio fue utilizada como un control positivo interno. \*Control positivo E2348/69 1.87%, CFT073 4.19% y 1162 13.57%).

### 8.3 ANÁLISIS CUALITATIVO DE INVASIVIDAD BACTERIANA EN CÉLULAS “T-24” y “VERO”.

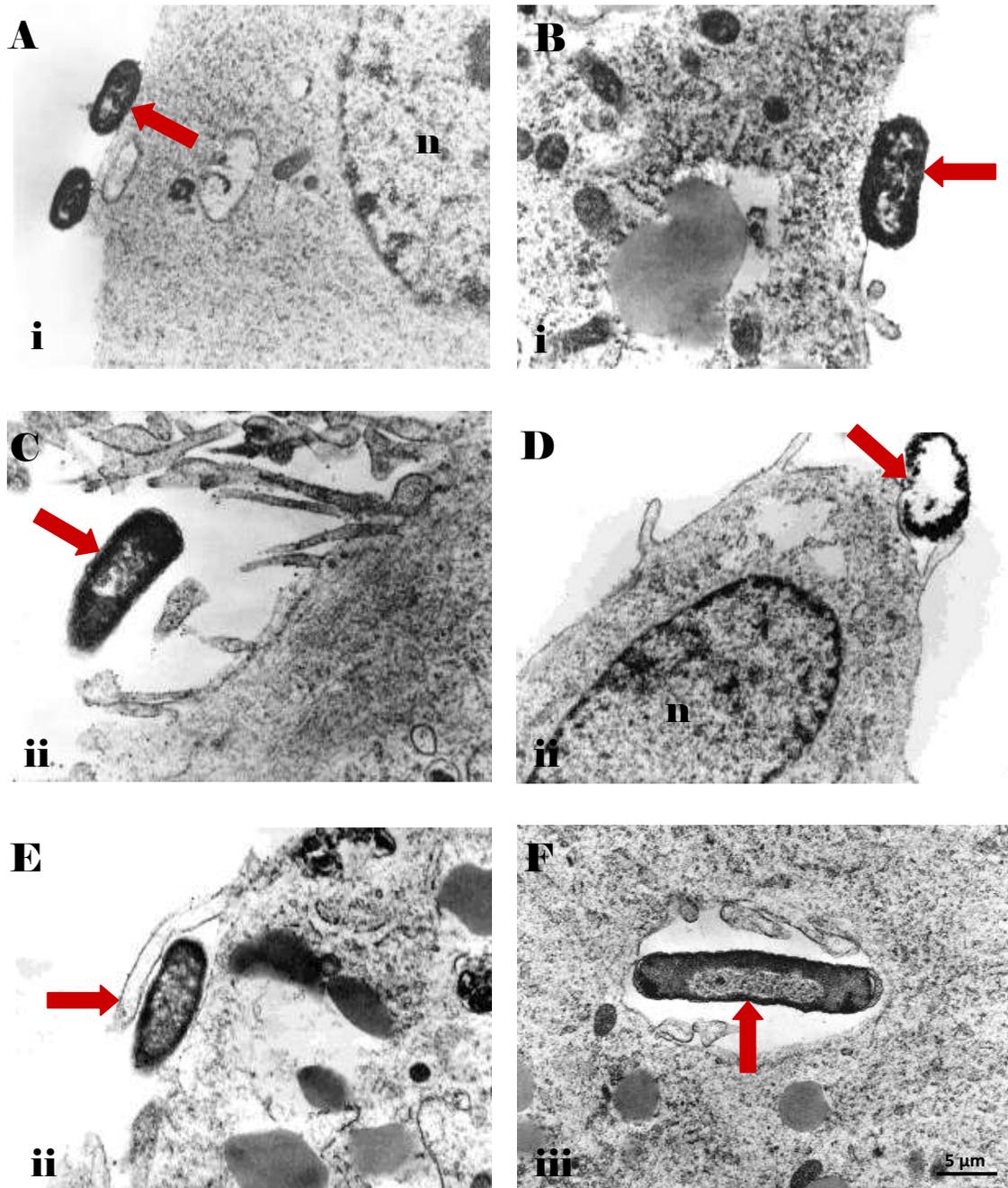
Con la finalidad de observar a las bacterias al interior de las células se seleccionaron 10 cepas con capacidad de internalizar células en el ensayo cuantitativo, dentro de las cuales se incluyó a la cepa 1162 como control positivo y a una cepa K-12 como control negativo. El análisis cualitativo consistió en teñir y examinar, en el microscopio de luz, las preparaciones de células “T-24” después del ensayo de invasividad. En las muestras positivas al ensayo se observaron bacterias que permanecieron en la monocapa celular a pesar del tratamiento con gentamicina y de ser lavadas extensivamente. Aparentemente, estas bacterias fueron capaces de internalizar células “T-24”.

La observación de las células con el objetivo de 100X nos permitió contar el número de bacterias encontradas al interior de las células, el cual fue de entre 12 y  $43 \pm 3$  bacterias por célula (b/cel) para cinco de las cepas evaluadas (Figura 8A y 8B). En tres casos las células invadidas presentaron muy pocas bacterias de 4 a  $13 \pm 2$  b/cel (Figura 8C, 8D y 8E). Finalmente, dos cepas sobresalieron por el alto número de bacterias observadas en las células de 36 a 56 y de 50 a  $70 \pm 3$  b/cel (Figura 8F y 8G). La cepa con los números más altos fue la cepa 1162, la cual además de ser parte del estudio se utilizó como un control interno. En algunos casos se observó, en el citoplasma de algunas células, bacterias que parecían estar dentro de vacuolas y en algunos de ellos se puede apreciar la liberación de las bacterias al medio (Figuras 8C, 8F y 8G). Es importante mencionar que sólo una fracción de las células observadas en las preparaciones presentó bacterias.



**Figura 8. Microscopía óptica de luz de células de vejiga humana (Línea T-24) después del ensayo de invasividad *in vitro*.** Se observan bacilos aislados o colonias de bacterias en el citoplasma celular, algunos parecen estar dentro de vacuolas y otros al parecer escapan o emergen de las células infectadas (A cepa 13929, B cepa A8-1, C cepa 14063, D cepa 14073, E cepa A8-35, F cepa 13640 y G cepa 1162). En el panel H se observan células sin bacterias, al infectarlas con la cepa K-12 (control negativo). Las bacterias se identificaron por pruebas bioquímicas y por serología como: *Escherichia coli* con serotipo O2:H31 (A), O25:H4 (B), O6:H1 (C), O25:H4 (D), O25:H4 (E), O166:NM (F) y O25:H4 (G). Aumentos con los objetivos 40X y 100X.

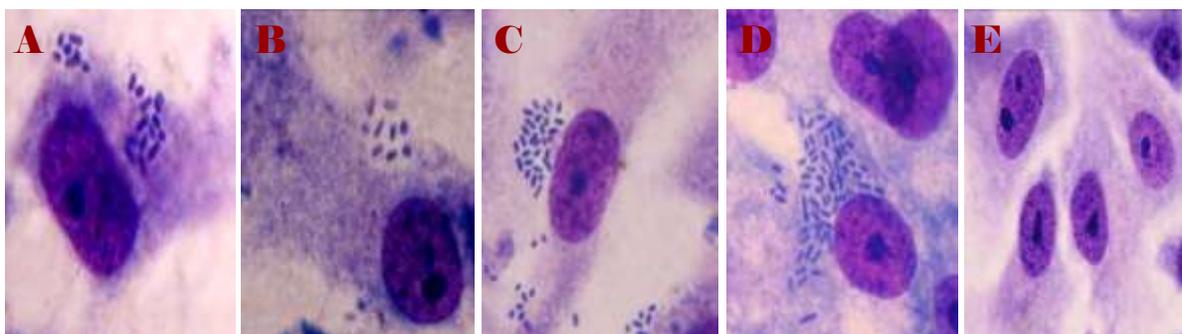
El empleo de microscopía electrónica de transmisión nos permitió detectar, en las células de vejiga humana (T-24) cultivadas, una posible secuencia de la internalización de la bacteria al interior de la célula (Figura 9); i) se observan algunas bacterias adheridas a la superficie celular (Figura 9A y 9B), ii) observamos a la bacteria envuelta o rodeada por extensiones de la membrana celular llamados lamelipodios (Figura 9C, 9D y 9E), los cuales facilitan la endocitosis del patógeno mediante un mecanismo de “ondulación” y iii) su posterior establecimiento al interior de la célula en un endosoma (Figura 9F).



**Figura 9. Microscopía electrónica de transmisión de células de vejiga humana (T-24) después del ensayo de invasividad *in vitro*.** Se incubaron las células con la cepa UPEC (1162, serotipo 025:H4) por 4 h. En A y B (i) se observan las bacterias adheridas a la superficie celular. En C, D y E (ii) observamos prolongaciones de la membrana celular (lamelipodios) que engloban a la bacteria; (F) iii Endosoma con una bacteria internalizada. Las flechas indican la posición de la bacteria. Escala bar, 5 µm. (n) núcleo.

Además, se empleó una línea celular adicional, en el ensayo cualitativo de invasividad con el objetivo de corroborar que el fenómeno de invasividad bacteriana no es exclusivo de las células “T-24”. Se utilizaron células “Vero” provenientes de riñón de mono de África (*Cercopithecus aethiops*). Después de realizar las pruebas *in vitro* se examinaron las preparaciones y se detectaron bacterias al interior de las células en las 10 muestras evaluadas.

En las fracciones de células en las que se observaron bacterias, el número contabilizado fue de entre 12 y  $30 \pm 4$  bacterias por célula para 8 de las bacterias analizadas (Figura 10A y 10B). En dos casos se observaron de 31 a 58 y de 48 a  $62 \pm 3$  bacterias por célula (Figura 10C y 10D). El número más alto observado en este ensayo también correspondió a la cepa 1162 (Figura 10D). Células sin infectar se utilizaron como control negativo (Figura 10E).



**Figura 10. Microscopía óptica de luz de células de riñón de mono (Línea Vero) después del ensayo de invasividad.** (A cepa 13646, B cepa 13957, C cepa 14036 y D cepa 1162). Algunas bacterias se observan en espacios parecidos a vacuolas y otras a nivel del núcleo. En el panel E se observan células sin infectar como control negativo. Aumentos con los objetivos 40X y 100X. Las bacterias se identificaron por pruebas bioquímicas y por serología como: *Escherichia coli* con serotipo O102:NM (A), O8:NM (B), O8:H18 (C) y O25:H4 (D).

#### 8.4 SEROTIPIFICACIÓN.

El empleo de serología por aglutinación en placa con 175 antisueros somáticos y 56 flagelares permitió la tipificación de las cepas objeto de nuestro estudio. Dentro de las 60 cepas de *E. coli* aisladas de IsTU encontramos una gran variedad de serogrupos, distribuidos en 18 serogrupos O diferentes. De las 47 cepas que resultaron tipificables con los antisueros O empleados, el 70.22% (33 aislados) pertenecieron a los serogrupos considerados como clásicos de UPEC (O1, O2, O6, O7, O8, O18, O25 y O75), siendo el serogrupo O25 el más representativo entre estos aislados con 15 cepas (31.91%), seguido por el serogrupo O2 con 5 cepas y por los serogrupos O8 y O75 con 3 aislados cada uno, los demás serogrupos estuvieron representados en 7 cepas. Entre los serogrupos diferentes a los uropatógenos (29.78%) se observaron el O36, O39, O53, O54, O77, O86, O100, O102, O152 y O166, distribuidos en 14 aislados. Trece aislados de los 60 analizados no fueron tipificables (O? y OR).

En nuestra muestra, no sólo el serogrupo, sino el serotipo más frecuente entre los aislados invasivos de UPEC fue el O25:H4 (observado en al menos 10 cepas). Los demás serogrupos UPEC O1, O2, O6 y O8 estuvieron representados en 8 cepas, siendo el serogrupo O2 el más representativo entre éstas con 3 aislados; el resto lo comprenden serogrupos que no son clásicos de UPEC (O39, O77, O86, O100, O102, O152 y O166) y cepas que no fueron tipificables con los antisueros O utilizados (O? y OR) (Cuadro 4).

**Cuadro 4. Serogrupos encontrados entre las cepas invasivas**

Serogrupos	Clave de las cepas invasivas
<b>O1</b>	A8-3
<b>O2</b>	13929, 14070,14129
<b>O6</b>	14063, 14134
<b>O8</b>	13957, 14036
<b>O25:H4*</b>	14030, 14044, 14069, 14073, 14672, A8-1, A8-7, A8-15, A8-35, 1162
O39	13996
O77	14041, 14043
O86	13959
O100	A8-44
O102	13643, 13646
O152	14018
O166	13640
O?	13641, 14029, 14045, 14067
OR	13882, 13925, 13932B, 14068, 047

O? No tipificable (no reaccionó con ninguno de los antisueros utilizados).

OR Rugoso (las cepas tiene una cápsula que reacciona con todos los antisueros).

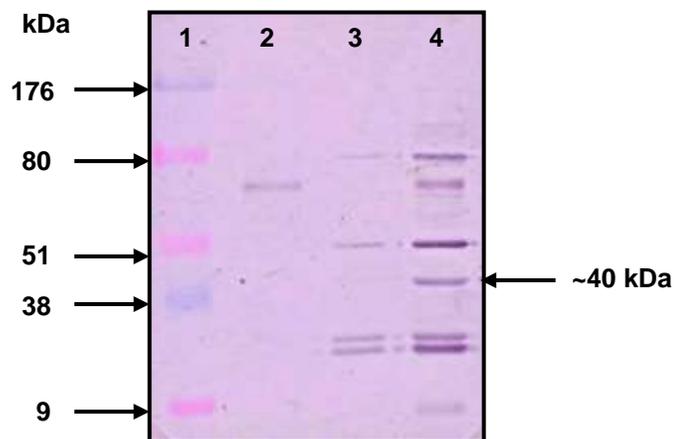
Los datos en negritas representan los serogrupos clásicos de UPEC.

\* Serotipo más frecuente encontrado entre los aislados invasivos.

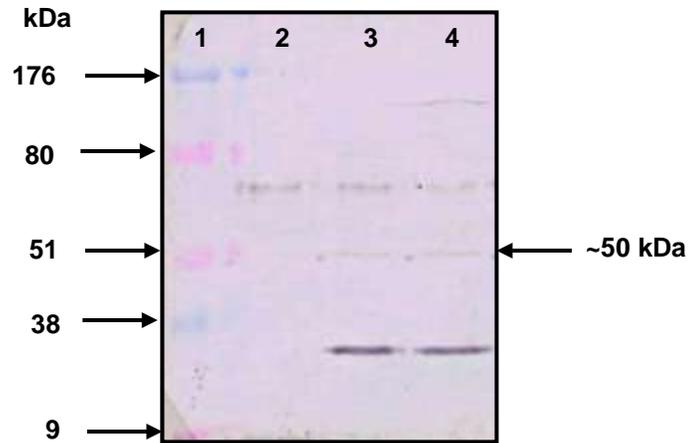
#### 8.5 ANÁLISIS DE PROTEÍNAS DEL CITOESQUELETO INVOLUCRADAS EN LA INTERNALIZACIÓN DE LA BACTERIA.

Debido a que algunas bacterias utilizan el citoesqueleto para entrar a las células, en el presente trabajo determinamos la presencia de las proteínas Arp2, Arp3, y actina en el citoesqueleto de células “T-24” que han sido invadidas por bacterias. El complejo Arp2/3 es un conjunto de 7 proteínas, dos de las cuales son ARP, (Arp2 y Arp3) y que al unirse forman un complejo que al estar activado es capaz de inducir la polimerización de actina. Para este análisis se obtuvo una fracción celular enriquecida en proteínas del citoesqueleto a partir de células que contenían bacterias invasivas. Posteriormente, se determinó la presencia de las

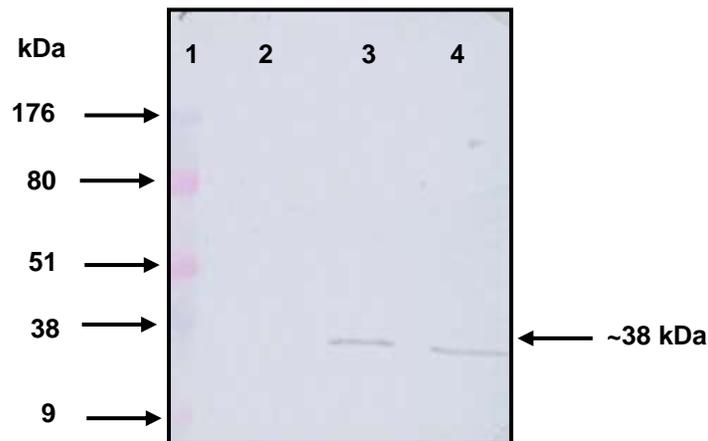
proteínas Arp2, Arp3, actina y clatrina, esto mediante inmuno-electrotransferencia. Con el antisuero Anti-Arp2, se observó una banda de aproximadamente 40 kDa correspondiente al de la proteína Arp2 en la fracción del citoesqueleto de células infectadas por 4 y 6 horas (Figura 11). Se observó un mayor aumento de la proteína Arp2 a las 6 horas. No se detectó la presencia de Arp2 en las células que no fueron infectadas con bacterias. Cuando se incluyó el antisuero anti-Arp3 en las fracciones del citoesqueleto se detectó una banda tenue de aproximadamente 50 kDa correspondiente al peso de la proteína Arp3 (Figura 12). La intensidad de las bandas inmunoteñidas fue igual a las 4 y 6 horas de infección. Al utilizar el antisuero anti-actina se detectó una banda de alrededor de 38 kDa que corresponde al peso de la actina, nuevamente como en los casos anteriores, esta banda se observó en la fracción del citoesqueleto de las células que contenían bacterias invasivas (Figura 13). La intensidad de estas bandas fue igual a las 4 y 6 horas de infección.



**Figura 11. Inmuno-electrotransferencia para detectar la proteína Arp2 en la fracción del citoesqueleto de células “T-24” infectadas con UPEC (1162).** Carril 1, marcador de peso molecular kDa; carril 2, células sin infectar, carril 3 y 4, células infectadas e incubadas durante 4 y 6 horas, respectivamente. La flecha señala la banda correspondiente al peso molecular de Arp2 que reaccionó con el antisuero anti-Arp2.



**Figura 12. Inmuno-electrotransferencia para detectar la proteína Arp3 en la fracción del citoesqueleto de células “T-24” infectadas con UPEC (1162).** Carril 1, marcador de peso molecular kDa; carril 2, células sin infectar, carril 3 y 4, células infectadas e incubadas durante 4 y 6 horas, respectivamente. La flecha señala la banda correspondiente al peso molecular de Arp3 que reaccionó con el antisuero anti-Arp3.



**Figura 13. Inmuno-electrotransferencia para detectar la proteína actina en la fracción del citoesqueleto de células “T-24” infectadas con UPEC (1162).** Carril 1, marcador de peso molecular kDa; carril 2, células sin infectar, carril 3 y 4, células infectadas e incubadas durante 4 y 6 horas, respectivamente. La flecha señala la banda correspondiente al peso molecular de la actina que reaccionó con el antisuero anti-actina.

## 9. DISCUSIÓN

*Escherichia coli* uropatógena (UPEC), el principal responsable de las IsTU es considerado un grupo genéticamente heterogéneo y puede variar en sus habilidades para colonizar y persistir dentro de la vejiga o los riñones (Mulvey, 2002). Tradicionalmente, UPEC no es considerado un patógeno intracelular. Sin embargo, en los últimos años esta bacteria ha adquirido una gran relevancia debido a que en diversos estudios basados en cultivos celulares y en un modelo animal se ha establecido que algunas cepas pueden invadir células epiteliales (Fukushi *et al.*, 1979; Mulvey *et al.*, 1998; Martinez *et al.*, 2000; Mulvey, 2002; Plancon *et al.*, 2003; Bower *et al.*, 2005; Eto *et al.*, 2007; Wiles *et al.*, 2008). En particular, en el modelo de infección en ratón (modelo de cistitis murino), se ha evidenciado que algunas bacterias uropatógenas se adhieren, invaden y replican en las células de la vejiga y forman comunidades bacterianas intracelulares (CBI). Estas CBI se disocian y salen de las células infectadas formando largos filamentos de bacilos unidos. Finalmente, establecen reservorios intracelulares quiescentes que podrían ser fuente de infecciones recurrentes (Mulvey *et al.*, 2001; Justice *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2004).

En nuestro estudio obtuvimos células uroepiteliales a partir de orina humana, las cuales estaban infectadas con una cepa de *E. coli* aparentemente invasiva. Al observar las preparaciones al microscopio de luz se pudieron notar largos filamentos bacterianos que dan la apariencia de emerger o escapar de las células infectadas (ver figura 5), muy similar a los filamentos bacterianos observados en el modelo murino (Anderson *et al.*, 2003; Justice *et al.*, 2004;

Anderson *et al.*, 2004). Lo relevante en este caso es que se trata de células uroepiteliales humanas, las cuales fueron aisladas de una mujer con infecciones recurrentes del tracto urinario. La historia clínica de la paciente reportó la sintomatología de cistitis aguda e infecciones recurrentes (confirmadas con exámenes de laboratorio) cada dos o tres meses durante un periodo de dos años. Este resultado sugiere que algunas cepas UPEC tienen la habilidad de internalizar células epiteliales de vejiga durante la infección en humanos y que dichas cepas siguen el mismo mecanismo patógeno descrito en el modelo de infección en ratón.

La habilidad de invadir células uroepiteliales puede ser un importante factor de virulencia en cepas de UPEC. Sin embargo, la mayoría de los grupos que se dedican al estudio de esta bacteria, se han enfocado en mayor medida a su detección, identificación y patrones de resistencia a antibióticos; dejando de lado la frecuencia con la cual se presentan cepas invasivas en aislados de IsTU, lo cual podría ser de gran relevancia debido a la alta persistencia y/o recurrencia de estas infecciones. En el presente trabajo investigamos si las cepas aisladas de pacientes con ITU tienen la habilidad de invadir células cultivadas *in vitro*. Los resultados mostraron que el 60% de los aislados fueron capaces de internalizar células en cultivo (línea T-24), lo que sugiere que las cepas de *E. coli* con capacidad invasiva causan frecuentemente IsTU. Entre los aislados con habilidad invasiva, creemos que sólo a doce se les puede considerar como verdaderas cepas intracelulares, debido a que presentaron niveles de invasividad superiores a los observados en las cepas prototipo de referencia E2348/69 y CFT073, las cuales son consideradas como poco invasivas (Hernandes *et al.*, 2008;

comunicación verbal Mulvey, 2009) y que en nuestro ensayo fueron encontradas con porcentajes cercanos al 2 y 4% (29,000 y 36,000 UFC/mL), respectivamente. Además, otras cepas uropatógenas invasivas que se han descrito en trabajos anteriores como la UTI89 y NU14 mostraron títulos intracelulares cercanos a las 100,000 UFC/mL (Mulvey *et al.*, 2001), similares a los observados en los aislados que consideramos como verdaderos patógenos invasivos; dentro de las cuales cuatro sobresalen por presentar una eficiencia de internalización mayor al 10%. Niveles similares de invasividad han sido observados en otras bacterias patógenas tales como *Salmonella typhimurium* y *Listeria monocytogenes* (Huang *et al.*, 1998; Kim y Wei, 2007).

Debido a lo anterior, consideramos como poco invasivas a las cepas que presentaron menos del 4% en nuestros ensayos *in vitro*. Dieciséis de las cuales son consistentes con la moderada eficiencia de invasividad (alrededor del 2%) descrita para la cepa prototipo EPEC E2348/69 (Hernandes *et al.*, 2008). El resto de los aislados se encontraron con una eficiencia de internalización (menor al 1%) similar a la observada en algunos patógenos oportunistas intracelulares tales como *Campylobacter jejuni* y *Enterobacter sakazakii*, reportados con intervalos de 0.1% y 0.4% (Biswas *et al.*, 2003; Mohan y Venkitanarayanan, 2007).

Hasta ahora, la invasividad no ha sido considerada un factor de virulencia en cepas uropatógenas. Sin embargo, la capacidad invasiva mostrada por algunas cepas de UPEC en el modelo de infección de vejiga en ratón (Mulvey *et al.*, 2001; Anderson *et al.*, 2003; Justice *et al.*, 2004; Anderson *et al.*, 2004; Anderson *et al.*,

2004), los diversos estudios sobre eventos de internalización de esta bacteria en cultivos celulares (Fukushi *et al.*, 1979; Doye *et al.*, 2002; Mulvey, 2002; Bower *et al.*, 2005; Eto *et al.*, 2007) y el fenotipo invasivo caracterizado en 36 cepas en nuestro estudio indican, que la invasión a células uroepiteliales puede ser un paso importante en la patogénesis de este microorganismo. Tal capacidad invasiva puede darle a UPEC ventajas en la colonización, sobrevivencia y diseminación efectiva dentro del tracto urinario.

El alto porcentaje encontrado de cepas con habilidad invasiva entre nuestros aislados, indican que la circulación de estas cepas entre la población de la Ciudad de México puede ser más común de lo esperado, y que posiblemente tienen un papel importante en las infecciones recurrentes, frecuentemente observadas en los pacientes con ITU. Hoy en día, la recurrencia de IsTU ha sido asociada en mayor medida a la reinoculación con cepas que colonizan el tracto gastrointestinal y a la resistencia a antibióticos (Hooton, 2001; Kim y Wei, 2007). Sin embargo, otra posibilidad viable es que la bacteria que originó la infección persista dentro de las células del hospedero mediante el fenómeno de invasividad. Un ejemplo de lo anterior puede ser el caso de la cepa 1162, la cual fue aislada de una mujer quien presentó numerosas infecciones y síntomas de cistitis aguda durante más de dos años. Tal aislado fue uno de los que presentó mayor eficiencia de invasividad (13.57%) en nuestro ensayo. La capacidad invasiva de esta cepa junto con la habilidad de formar filamentos bacterianos pudo haber contribuido a la recurrencia sufrida por la paciente. Estudios adicionales sobre la capacidad invasiva de cepas aisladas de casos de persistencia bacteriana en IsTU

podrían dar un nuevo panorama acerca de otra posible causa de las infecciones urinarias recurrentes.

Los datos descritos en nuestro estudio y reportes anteriores acerca del fenómeno de invasividad, proveen evidencia de que UPEC pudiera no sólo ser un simple patógeno extracelular, sino que este microorganismo pudo haber desarrollado los mecanismos necesarios para invadir, multiplicarse y persistir dentro de las células del tracto urinario. Por tal motivo, la evaluación, vigilancia y estudio de cepas de *E. coli* uropatógena con habilidad de internalizar células uroepiteliales, deben ser objeto de investigaciones tendientes a determinar la importancia creciente de la invasividad como un nuevo factor de virulencia.

En el contexto anterior, la internalización de patógenos bacterianos es un proceso altamente activo que involucra receptores específicos de superficie celular y/o la elaboración y translocación de los mismos (Hall y Nobes, 2000). Los receptores unidos a la superficie antigénica de las bacterias generan una cascada de señalización que involucra la activación de pequeñas moléculas, promoviendo la dinámica en el rearrreglo de la actina del citoesqueleto y la formación de protuberancias en la superficie celular (del hospedero) alrededor de la bacteria para endocitarla (Rottner *et al.*, 2004; Conner y Schmid, 2007). En el caso específico de UPEC, poco es conocido acerca de los factores bacterianos y otros factores celulares del hospedero involucrados en la internalización de la bacteria a células uroepiteliales, en particular se desconocen las proteínas bacterianas efectoras que puedan inducir la endocitosis mediante la polimerización de actina.

Hasta ahora, el complejo Arp2/3 es probablemente el activador de actina mejor caracterizado en células eucariontes (Higgs y Pollard, 2001; Pollard y Borisy, 2003). Este complejo está compuesto por dos proteínas relacionadas con la actina (Arp2 y Arp3), que al unirse induce la formación y elongación de los filamentos de actina. Estas proteínas son altamente conservadas y se expresan en casi todas las células animales en respuesta a diferentes estímulos (Chhabra y Higgs, 2007). Recientemente, el complejo Arp2/3 ha sido implicado en el proceso invasivo de ciertos patógenos intracelulares tales como: *Yersinia enterocolitica* (Wiedemann *et al.*, 2001), *Salmonella entérica* (Criss y Casanova, 2003), *Shigella flexneri* (Bougnères *et al.*, 2004), así como de *Listeria monocytogenes* (Sousa *et al.*, 2007).

En nuestro estudio analizamos mediante inmunoblot la participación de las proteínas Arp2, Arp3 y actina en el proceso invasivo de una cepa UPEC (1162) a células T-24. Observamos que sólo en las fracciones de células infectadas fue posible detectar a las proteínas Arp2, Arp3 y actina, la intensidad de la inmunotinción de las bandas fue más marcada al aumentar el tiempo de incubación de la infección. Este resultado sugiere, que en la invasión de la cepa 1162 participa activamente el complejo Arp2/3, posiblemente promoviendo el rearrreglo de los filamentos de actina y el remodelaje de la membrana celular del hospedero para la internalización de la bacteria, similar a lo observado en *Listeria monocytogenes* (Sousa *et al.*, 2007).

Este cambio en la arquitectura de la membrana de las células infectadas fue observado en nuestras micrografías electrónicas de transmisión a modo de protuberancias (lamelipodios) en forma de “ondulación”, a diferencia de lo mostrado en otros trabajos, en los cuales se ha postulado que la internalización ocurre vía un mecanismo de “cierre” (Martinez *et al.*, 2000; Martinez y Hultgren, 2002). Tal diferencia, podría deberse a que UPEC es un grupo genéticamente heterogéneo, el cual puede variar en su habilidad para colonizar e infectar a un hospedero animal. Pensamos que puede haber diferentes vías de internalización bacteriana entre las mismas cepas UPEC debido a que en este grupo la diversidad en factores de virulencia es muy grande, de hecho se ha postulado que el grupo UPEC tiene al menos cuatro patotipos (Marrs *et al.*, 2005).

La cepa UPEC 1162 utilizada en el presente estudio posiblemente controla el proceso celular de endocitosis, al igual que otros patógenos intracelulares que se apoderan de la endocitosis fisiológica propia de las células eucariontes, y mediante el complejo Arp2/3 modulan y estabilizan los filamentos de actina para su posterior establecimiento en el interior de las células.

Tradicionalmente la clasificación de los serotipos de *E. coli* está basada en la presencia de ciertos antígenos O (somáticos), H (flagelares) y K (capsulares). Una asociación entre la expresión de los antígenos somáticos específicos y los patotipos de *E. coli* ha sido bien documentada, sin embargo, el grado con el cual estos antígenos impactan en la patogénesis de estas cepas no es del todo entendido (Lloyd *et al.*, 2007). En nuestro estudio de las 60 cepas de *E. coli*

aisladas de IsTU el 78.3% fue serológicamente tipificable, esto concuerda con lo reportado en estudios similares donde logran serotipificar entre el 77% y 87% de sus aislados (Blanco *et al.*, 1995; Paciorek *et al.*, 2002). En nuestra muestra encontramos 18 serogrupos O diferentes. Algunos de los cuales pertenecen a patotipos comunes de *E. coli* causantes de diarrea (ETEC, EIEC, EPEC y EAEC). Sin embargo, para conocer si realmente estos son grupos patógenos es necesario verificar que portan los factores de virulencia específicos para cada patotipo. Cabe mencionar que de las 47 cepas que resultaron tipificables con los antisueros O empleados, el 70.21% (33 aislados) se repartieron en 8 serogrupos O (O1, O2, O6, O7, O8, O18, O25 y O75) de los preferencialmente llamados UPEC. Dentro de los cuales, el más representativo fue el O25, observado en 15 cepas, seguido del O2 con 5 cepas y el O8 y O7 con tres cepas cada uno.

En contraste, la frecuencia y distribución de serogrupos comúnmente encontrados entre aislados de UPEC en diferentes países como: España, Finlandia, Hungría, Inglaterra, Japón, China, Canadá, Estados Unidos y Brasil indican que los serogrupos encontrados con mayor frecuencia han sido el O6, seguido del O2 (Johnson *et al.*, 1997; Rodríguez-Siek *et al.*, 2005; Manges *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2008). Es importante mencionar que este es el primer estudio en México donde se quiere conocer el serogrupo de las cepas de *E. coli* que causan infecciones en personas del Distrito Federal. En otro estudio similar realizado por este mismo grupo de investigación, se reportó que el serogrupo O25 fue el más frecuente identificado en los aislados de ITU, seguido por el O8 (Ibarra-López, 2007). Lo anterior sugiere que los serogrupos de cepas causantes de IsTU en

pacientes de la ciudad de México podrían ser distintos a los identificados en otras zonas geográficas como Europa y Asia y en algunos países del Continente Americano.

Con respecto a los aislados invasivos, el serotipo más frecuente fue el O25:H4 (observado en al menos 10 aislados). Los serogrupos O1, O2, O6 y O8 (asociados a UPEC) estuvieron representados en 9 cepas (siendo el serogrupo O2 el más representativo entre éstas, con 4 aislados), el resto lo comprendieron serogrupos que no son clásicos de UPEC (O39, O77, O86, O100, O102, O152 y O166) y cepas que no fueron tipificables con los antisueros O empleados (O? y OR). Cabe mencionar que sólo dos de las 36 cepas invasivas pertenecieron a los serotipos reportados para UPEC (O6:H1 y O75:H5, con una cepa cada uno). El serotipo O25:H4 recientemente se describió como un posible grupo clonal multiresistente a drogas antimicrobianas (Nicolas-Chanoine *et al.*, 2008). La frecuencia del serotipo O25:H4 observada en este estudio, sugiere un posible origen clonal entre dichas cepas uropatógenas, sobre todo porque todas las cepas fueron aisladas de pacientes que habitan la misma área, y fueron colectadas en el mismo período.

Mientras mejor entendamos los mecanismos mediante los cuales las cepas UPEC colonizan y persisten dentro del hospedero, mejor podremos desarrollar tratamientos basados en los factores de virulencia específicos de la cepa infectante encontrada dentro de un paciente individual.

## 10. CONCLUSIONES

1. La presencia de células uroepiteliales con filamentos bacterianos que dan la apariencia de emerger de las células infectadas sugiere que lo establecido en el modelo murino, también podría ocurrir en humanos.
2. Treinta y seis cepas (60%) fueron capaces de internalizar células de vejiga humana "T-24".
3. Consideramos que sólo 12 de las 36 cepas poseen verdadero potencial invasivo, debido a que mostraron una alta eficiencia de internalización en los ensayos *in vitro*.
4. La alta capacidad invasiva (13.57%) mostrada por la cepa 1162 aislada del caso de infección aguda recurrente, pudo haber contribuido a la persistencia bacteriana sufrida por la paciente.
5. El serogrupo O25 se presentó con la frecuencia más alta entre los 60 aislados obtenidos de pacientes con ITU. Además el serotipo O25:H4 se identificó principalmente entre las cepas invasivas.
6. Las proteínas del citoesqueleto Arp2, Arp3 y actina podrían tener un papel activo en el proceso de internalización de la cepa UPEC.

## 11. PERSPECTIVAS

✚ Hasta ahora, la recurrencia de IsTU ha sido asociada en mayor medida a la reinoculación y a la resistencia a antibióticos. Sin embargo, otra posibilidad viable es que la bacteria que originó la infección persista dentro del TU mediante el fenómeno de invasividad. Estudios adicionales sobre la capacidad invasiva de cepas aisladas de casos de persistencia bacteriana en IsTU podrían dar un nuevo panorama acerca de otra posible causa de las infecciones urinarias recurrentes.

✚ Si bien los datos sobre la alta frecuencia del serotipo O25:H4 encontrada entre los aislados invasivos, apunta hacia un posible origen clonal, se requiere de estudios de biología molecular (ERIC-PCR, Finger-prints, Campos Pulsados y/o MLEE) para construir dendogramas que demuestren el parentesco filogenético entre estas cepas.

✚ En nuestro estudio detectamos que el complejo nucleador de actina Arp2/3 puede estar involucrado en la internalización de UPEC. Para que éste y otros componentes celulares del hospedero puedan participar en la invasión del patógeno, deben ser activados por ciertos efectores bacterianos. En el caso de UPEC, se ha establecido que la adhesina FimH (más que cualquier otro factor de virulencia) puede iniciar el evento de internalización. Sin embargo, la gran mayoría de cepas UPEC que expresan FimH no son capaces de invadir células. Lo anterior sugiere que además de la adhesina antes mencionada existen otras proteínas adicionales que facilitan el proceso de invasividad, o que la presencia de la adhesina FimH en la bacteria, es más bien un requisito que estabiliza la

adherencia pero no la proteína que, por si sola, induce el proceso de internalización. Debido a lo anterior, sería importante identificar las proteínas bacterianas efectoras involucradas en la endocitosis del patógeno.

✚ Tradicionalmente, UPEC no es considerado un patógeno intracelular. Sin embargo, el fenotipo invasivo caracterizado en 36 cepas en nuestro estudio y la capacidad invasiva mostrada por algunas cepas uropatógenas en el modelo de infección en ratón y en cultivos celulares, proveen evidencia de que la invasividad puede ser un paso importante en la uropatogénesis de este microorganismo. Por tal motivo, la evaluación y caracterización de cepas de *E. coli* uropatógena con potencial invasivo, deben ser objeto de investigaciones tendientes a desarrollar herramientas que permitan el diagnóstico e identificación oportuna de dichas bacterias potencialmente peligrosas.

## 12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abe C, Salvador F, Falsetti I, Vieira M, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado A, Elias W, Hernandez R, Gomes T. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. FEMS Immunol Med Microbiol 2008; **52**:397–406.

Anderson G, Palermo J, Schilling J, Roth R, Heuser J, Hultgren S. Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. Science 2003; **301**:105–107.

Anderson G, Dodson k, Hooton T, Hultgren S. Intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. TRENDS Microbiol 2004; **12**:424–430.

Anderson G, Martin M, Hultgren J. Host subversion by formation of intracellular bacterial communities in the urinary tract. Microb Infect 2004; **6**:1094–1101.

Apodaca G. The uroepithelium: not just a passive barrier. Traffic 2004; **5**:117–128.

Bahrani-Mougeot F, Gunter IV N, Donnenberg M, Mobley H. Uropathogenic *Escherichia coli*. En: Donnenberg., ed. *Escherichia coli*: virulence mechanisms of a versatile pathogen. Elsevier Science. USA, 2002. p. 239–268.

Baorto D, Gao Z, Malaviya R, Dustin M, van der Merwe A, Lublin D, Abraham S. Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid. Traffic Nature 1997; **389**:636–639.

Bauer R, Zhang L, Foxman B, Siitonen A, Jantunen M, Saxen H, Marrs C. Molecular epidemiology of 3 putative virulence genes for *Escherichia coli* urinary tract infection—*usp*, *iha*, and *iroN*<sub>*E. coli*</sub>. J Infect Dis 2002; **185**:1521–1524.

Becker I, Pérez-Montfort R, Pérez-Torres A, Rondán-Zárate A, Montfort I, Pérez-Tamayo R. *Entamoeba histolytica*: Localization of a 30kDa cysteine proteinase using a monoclonal antibody. Exp Parasitol 1996; **82**:171–181.

Berger C, Billker O, Meyer T, Servin A, Kansau I. Differential recognition of members of the carcinoembryonic antigen family by Afa/Dr adhesins of diffusely adhering *Escherichia coli* (Afa/Dr DAEC). Mol Microbiol 2004; **52**:963–983.

Biswas D, Itoh K, Sasakawa C. Role of microfilaments and microtubules in the invasion of INT-407 cells by *Campylobacter jejuni*. Microbiol Immunol 2003; **47**:469–473.

Blanco M, Blanco J, Blanco JE, Alonso M, Abalia I, Rodríguez E, Bilbao J, Umaran A. Virulence factors and O serogroups of *Escherichia coli* as a cause of community-acquired urinary infections. Enferm Infecc Microbiol Clin 1995; **13**:236–241.

Boisvert H, Duncan M. Clatrin-dependent entry of a gingipain adhesion peptide and *Porphyromonas gingivalis* into host cells. Cell Microbiol 2008; **10**:2538–2552.

Boquet P. Toxin-induced activation of the G protein p21 Rho by deamidation of glutamine. Nature 1997; **387**:729–733.

Bougneres L, Girardin S, Weed S, Karginov A, Olivo-Marin J, Parsons J, Sansonetti P, Van Nhieu G. Cortactin and Crk cooperate to trigger actin polymerization during *Shigella* invasion of epithelial cells. *J Cell Biol* 2004; **166**:225–235.

Bower J, Eto D, Mulvey M. Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic* 2005; **6**:18–31.

Caprioli A, Falbo V, Roda L, Ruggeri F, Zona C. Partial purification and characterization of an *Escherichia coli* toxic factor that induces morphological cell alterations. *Infect Immun* 1983; **39**:1300–1306.

Chhabra E, Higgs N. The many faces of actin: matching assembly factors with cellular structures. *Nature Cell Biology* 2007; **9**:1110–1121.

Chung J, Hong S, Kim K, Goti D, Stins M, Shin S, Dawson V, Dawson T, Kim K. 37-kDa laminin receptor precursor modulates cytotoxic necrotizing factor 1 mediated RhoA activation and bacterial uptake. *J Biol Chem* 2003; **278**:16857–16862.

Conner S, Schmid S. Regulated portals of entry into the cell. *Nature* 2007; **422**:37–44.

Cossart P, Sansonetti P. Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* 2004; **304**:242–248.

Criss A, Casanova J. Coordinate regulation of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* invasion of epithelial cells by the Arp2/3 complex and Rho GTPases. *Infect Immun* 2003; **71**:2885–2891.

Donnenberg M, Welch R. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. En: Mobley H, Warren J., eds. *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. Washington, ASM Press, 1996. p. 135–174.

Doye A, Mettouchi A, Bossis G, Clement R, Buisson-Touati C, Flatau G, Gagnoux L, Piechaczyk M, Boquet P, Lemichez E. CNF1 exploits the ubiquitin-proteasome machinery to restrict Rho GTPase activation for bacterial host cell invasion. *Cell* 2002; **111**:553–564.

Dramsi S, Cossart P. Intracellular pathogens and the actin cytoskeleton. *Cell Dev Biol* 1998; **14**:137–66.

Elsinghorst E. Measurement of invasion by gentamicin resistance. *Methods Enzymol* 1994; **236**:405–420.

Emody L, Kerényi M, Nagy G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Inter J Antimicrob Agents* 2003; **22**:S29–S33.

Engleberg N, Dirita V, Dermody T (eds). *Schaechter's mechanisms of microbial disease*. 4<sup>th</sup> Ed. Philadelphia Lippincott Williams and Wilkins, 2007.

Eto D, Jones T, Sundsbak J, Mulvey M. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog* 2007; **3**:949–961.

Finer G, Landau D. Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis* 2004; **4**:631–35.

Foxman B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon* 2003; **49**:53–70.

Fu Y, Galan J. A salmonella protein antagonizes Rac-1 and Cdc42 to mediate host-cell recovery after bacterial invasion. *Nature* 1999; **401**:293–297.

Fukushi Y, Orikasa S, Kagayama M. An electron microscopic study of the interaction between vesical epithelium and *E. coli*. *Invest Urol* 1979; **17**:61–68.

Pedraza-Avilés A, Medina-Zarco L, Moreno-Castillo Y, Ortiz-Zaragoza C, Dávila-Mendoza R. Prevalencia de bacteriuria sintomática y asintomática en adultos mayores, y sensibilidad *in vitro* a antimicrobianos. *Archivo de Medicina Familiar* 2004; **6**:52–56.

Guignot J, Bernet-Camard M, Pous C, Plancon L, Le Bouguenec C, Servin A. Polarized entry of uropathogenic Afa/Dr diffusely adhering *Escherichia coli* strain IH11128 into human epithelial cells: evidence for  $\alpha 5\beta 1$  integrin recognition and subsequent internalization through a pathway involving caveolae and dynamic unstable microtubules. *Infect Immun* 2001; **69**:1856–1868.

Hall A, Nobes C. Rho GTPases: molecular switches that control the organization and dynamics of the actin cytoskeleton. *Phil Trans R Soc Lond* 2000; **355**:965–970.

Harlow E, Lane D. *Antibodies a Laboratory Manual*. Chapter 20. Cold Spring Harbor Laboratory, Box, Cold Spring Harbor, New York, 1988. pp. 11724.

Hernandes R, Silva R, Salvador F, Fernandes M, Padovan A, Yamamoto D, Mortara R, Elias W, da Silva Briones M, Gomes T. The localized adherence pattern of an atypical enteropathogenic *Escherichia coli* is mediated by intimin omicron and unexpectedly promotes HeLa cell invasion. *Cell Microbiol* 2008; **10**:415–425.

Higgs H, Pollard T. Regulation of actin filament network formation through Arp2/3 complex: activation by a diverse array of proteins. *Annu Rev Biochem* 2001; **70**:649–676.

Higgs H. Formin proteins: a domain-based approach. *Trends Biochem Sci* 2005; **30**:342–353.

Hooton T, Scholes D, Hughes J, Winter C, Roberts P, Stapleton A, Stergachis A, Stamm W. A prospective study of risk factors for symptomatic urinary tract infection in young women. *N Engl J Med* 1996; **335**:468–474.

Hooton T. Recurrent urinary tract infection in women. *Int J Antimicrob Agents* 2001; **17**:259–268.

Huang X, Tall B, Schwan W, Kopecko D. Physical limitations on *Salmonella typhi* entry into cultured human intestinal epithelial cells. *Infect Immun* 1998; **66**:2928–2937.

Ibarra-López A. Determinación de la capacidad adherente de cepas de *Escherichia coli* asiladas de infecciones del tracto urinario. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM, México. 2007.

Isberg R, Leong J. Multiple  $\beta$ 1 chain integrins are receptors for invasion, a protein that promotes bacterial penetration into mammalian cells. *Cell* 1990; **60**:861–871.

Johnson J. Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clin Microbiol Rev* 1997; **4**:80–128.

Johnson J, Orskov L, Orskov F, Goulet P, Picard B, Moseley S, Roberts P, Stamm W. O, K, and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis. *J Infect Dis* 1994; **169**:119–126.

Johnson J, Russo T, Scheutz F, Brown J, Zhang L, Palin K, Rode C, Bloch C, Marrs C, Foxman B. Discovery of disseminated J96-like strains of uropathogenic *Escherichia coli* O4:H5 containing genes for both PapG (J96) (class I) and PrsG (J96) (class III) Gal ( $\alpha$ 1-4) Gal-binding adhesins. *J Infect Dis* 1997; **175**:983–988.

Jouve M, Garcia M, Courcoux P, Labigne A, Gounon P, Le Bouguenec C. Adhesion to and invasion of HeLa cells by pathogenic *Escherichia coli* carrying the afa-3 gene cluster are mediated by the AfaE and AfaD proteins, respectively. *Infect Immun* 1997; **65**:4082–4089.

Justice S, Hung C, Theriot J, Fletcher D, Anderson G, Footer M, Hultgren S. Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; **101**:1333–1338.

Kansau I, Berger C, Hospital M, Amsellem R, Nicolas V, Servin A, Bernet-Camard M. Zipper-like internalization of Dr-positive *Escherichia coli* by epithelial cells is preceded by an adhesin-induced mobilization of raft-associated molecules in the initial step of adhesion. *Infect Immun* 2004; **72**:3733–3742.

Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Rev* 2004; **2**:123–140.

Kau A, Hunstad D, Hultgren S. Interaction of uropathogenic *Escherichia coli* with host uroepithelium. *Curr Opin Microbiol* 2005; **8**:54–59.

Kim S, Wei C. Invasiveness and intracellular growth of multidrug-resistant *Salmonella* and other pathogens in Caco-2 cells. *JFS* 2007; **72**:M72–M78.

Kukkonen M, Raunio T, Virkola R, Lahteenmaki K, Mekela P. Basement membrane carbohydrate as a target for bacterial adhesion: binding of type 1 fimbriae of *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* to laminin. *Molec Microbiol* 1993; **7**:229–237.

Laemmli. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 1970; **227**:680–685.

Lloyd A, Rasko D, Mobley H. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J Bacteriol* 2007; **189**:3532–3546.

Luck S, Bennett-Wood V, Poon R, Robins-Browne R, Hartland E. Invasion of epithelial cells by locus of enterocyte effacement-negative enterohemorrhagic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 2005; **73**:3063–3071.

Machesky L, Reeves E, Wientjes F, Mattheyse F, Grogan A, Totty N, Burlingame A, Hsuan J, Segal A. Mammalian actin-related protein 2/3 complex localizes to regions of lamellipodia protrusion and is composed of evolutionarily conserved proteins. *Biochem J* 1997; **328**:105–112.

Malaviya R, Gao Z, Thankavel K, van der Merwe A, Abraham S. The mast cell tumor necrosis factor alpha response to FimH-expressing *Escherichia coli* is mediated by the glycosylphosphatidylinositol-anchored molecule CD48. *Proc Natl Acad Sci USA* 1999; **96**:8110–8115.

Manges A, Natarajan P, Solberg O, Dietrich P, Riley W. The changing prevalence of drug-resistant *Escherichia coli* clonal groups in a community: evidence for community outbreaks of urinary tract infections. *Epidemiol Infect* 2006; **134**:425–431.

Marrs C, Zhang L, Foxman B. *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiol Letters* 2005; **252**:183–190.

Martinez J, Mulvey M, Schilling J, Pinkner J, Hultgren S. Type 1 pilus mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. *EMBO J* 2000; **19**:2803–2812.

Martinez J, Hultgren S. Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 2002; **4**:19–28.

McCaw S, Liao E, Gray-Owen S. Engulfment of *Neisseria gonorrhoeae*: revealing distinct processes of bacterial entry by individual carcinoembryonic antigen-related cellular adhesion molecule family receptors. *Infect Immun* 2004; **72**:2742–2752.

Millard T, Behrendt B, Launay S, Fütterer K, Machesky L. Identification and characterization a novel human isoform of Arp2/3 complex subunit p16-ARC/ARPC5. *Cell Motil Cytoskeleton* 2003; **54**:81–90.

Mills M, Meysick K, O'Brien A. Cytotoxic necrotizing factor type 1 of uropathogenic *Escherichia coli* kills cultured human uroepithelial 5637 cells by an apoptotic mechanism. *Infect Immun* 2000; **68**:5869–5880.

Mohan M, Venkitanarayanan K. Role of bacterial OmpA and host cytoskeleton in the invasion of human intestinal epithelial cells by *Enterobacter sakazakii*. *Pediatric Research* 2007; **62**:1–6.

Mulvey M, Hultgren S. Adhesion, bacterial. En: *Encyclopedia of Microbiology*. London: Academic Press, 2000. p. 42–52.

Mulvey M, Lopez-Boado Y, Wilson C, Roth R, Parks W, Heuser J, Hultgren S. Induction and evasion host defenses by 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science* 1998; **282**:1494–1497.

Mulvey M, Schilling J, Hultgren S. Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun* 2001; **69**:4572–4579.

Mulvey M. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol Microrev* 2002; **193**:1–193.

Nicolas-Chanoine M, Blanco J, Leflon-Guibout V, Demarty R, Alonso M, Canica M, Park Y, Lavigne J, Pitout J, Johnson J. Intercontinental emergence of *Escherichia coli* O25:H4-ST131 producing CTX-M-15. *J Antimicrob Chemother* 2008; **61**:273–281.

Orskov F, Orskov I. *Escherichia coli* O:H serotypes isolated from human blood. *APMIS* 1975; **83B**:565–600.

Orskov I, Orskov F, Birch-Andersen A, Kanamori M, Svanborg-Eden C. O, K, H and fimbrial antigens in *Escherichia coli* serotypes associated with pyelonephritis and cystitis. *Scand J Infect Dis* 1982; **33**:18–25.

Paciorek J. Virulence properties of *Escherichia coli* faecal strains isolated in Poland from healthy children and strains belonging to serogroups O18, O26, O44, O86, O126 and O127 isolated from children with diarrhea. *J Med Microbiol* 2002; **51**:548–556.

Pak J, Pu Y, Zhang Z, Hasty D, Wu X. Tamm-Horsfall protein binds to type 1 fimbriated *Escherichia coli* and prevents *E. coli* from binding to uroplakin 1a and 1b receptors. *J Biol Chem* 2001; **276**:9924–9930.

Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Subversion of phosphoinositide metabolism by intracellular bacterial pathogens. *Nat Cell Biol* 2004; **6**:1026–1033.

Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell* 2006; **124**:715–727.

Plancon L, Du Merle L, Le Friec S, Gounon P, Jouve M, Guignot J, Servin A, Le Bouguenec C. Recognition of the cellular beta1-chain integrin by the bacterial AfaD invasin is implicated in the internalization of afa-expressing pathogenic *Escherichia coli* strains. *Cell Microbiol* 2003; **5**:681–693.

Pollard T, Borisy G. Cellular motility driven by assembly and disassembly of actin filaments. *Cell* 2003; **112**:453–465.

Rama G, Chhina D, China R, Sharma S. Urinary tract infections—microbial virulence determinants and reactive oxygen species. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* 2005; **28**:339–349.

Rodríguez-Angeles G. Principales características y diagnóstico de los grupos patógenos de *Escherichia coli*. *Intern J Medic Microbiol* 2002; **295**:463–470.

Rodriguez-Siek K, Giddings W, Doetkott C, Johnson T, Fakhr M, Nolan L. Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection an avian colibacillosis. *Microbiol* 2005; **151**:2097–2110.

Ronald A. The etiology of urinary tract infections: Traditional and emerging pathogens. *Am J Med* 2002; **113**:14S–19S.

Rottner K, Lommel S, Wehland J, Stradal T. Pathogen-induced actin filament rearrangement in infectious diseases. *J Pathol* 2004; **204**:396–406.

Sansonetti P. Host-pathogen interactions: the seduction of molecular cross talk. *Gut* 2002; **50**:iii2–iii8.

Schmidt H, Hensel M. Pathogenicity islands in bacterial pathogenesis. *Clin Microbiol* 2004; **17**:14–56.

Seed C, Hultgren J. Blueprinting the regulatory response of *Escherichia coli* to the urinary tract. *TRENDS Microbiol* 2005; **13**:246–248.

Selvarangan R, Goluszko P, Singhal J, Carnoy C, Moseley S, Hudson B, Nowicki S, Nowicki B. Interaction of Dr adhesin with collagen type IV is a critical step in *Escherichia coli* renal persistence. *Infect Immun* 2004; **72**:4827–4835.

Silveira W, Benetti F, Lancellotti M, Ferreira, Solferini V, Brocchi M. Biological and genetic characteristics of uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Rev Inst Med Trop S Paulo* 2001; **43**:303–310.

Sokurenko E, Courtney H, Abraham S, Klemm P, Hasty D. Functional heterogeneity of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Infect Immun* 1992; **60**:4709–4719.

Sousa S, Cabanes D, Bougneres L, Lecuit M, Sansonetti P, Tran-Van-Nhieu G, Cossart P. Src, cortactin and Arp2/3 complex are required for E-cadherin-mediated internalization of *Listeria* into cells. *Cell Microbiol* 2007; **9**:2629–2643.

Springall T, Sheerin N, Abe K, Holers V, Wan H, Sacks S. Epithelial secretion of C3 promotes colonization of the upper urinary tract by *Escherichia coli*. *Nat Med* 2001; **7**:801–806.

Stamey T. Recurrent urinary tract infections in female patients: an overview of management and treatment. *Rev Infect Dis* 1987; **9**:S195–S208.

Stapleton A, Fennell D, Coder C, Wobbe P, Roberts P, Stamm W. Precise and rapid assessment of *Escherichia coli* adherence to vaginal epithelial cells by flow cytometry. *Cytometry* 2002; **50**:31–37.

Sussman M, Gally D. The biology of cystitis: host and bacterial factors. *Annu Rev Med* 1999; **50**:149–158.

Svanborg C, Bergsten G, Fischer H, Godaly G, Gustafsson M, Karpman D, Lundstedt A, Ragnarsdottir B, Svensson M, Wullt B. Uropathogenic *Escherichia coli* as a model of host-parasite interaction. *Curr Opin Microbiol* 2006; **9**:33–39.

Svitkina T, Borisy G. Arp2/3 complex and actin depolymerizing factor/cofilin in dendritic organization and treadmilling of actin filament array in lamellipodia. *J Cell Biol* 1999; **145**:1009–1026.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets. Procedure and some applications. Proc Natl Acad Sci USA 1979; **76**:4350–4354.

Wiedemann A, Linder S, Grassl G, Albert M, Autenrieth I, Aepfelbacher M. *Yersinia enterocolitica* invasin triggers phagocytosis via beta1 integrins, CDC42Hs and WASp in macrophages. Cell Microbiol 2001; **3**:693–702.

Wiles T, Kulesus R, Mulvey M. Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. Exp Mol Pathol 2008; **2924**:1–9.

Zhou G, Mo W, Sebbel P, Min G, Neubert T, Glockshuber R, Wu X, Sun T, Kong X. Uroplakin 1a is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from *in vitro* FimH binding. J Cell Sci 2001; **114**:4095–4103.

Colibacillosis-*Escherichia coli* (2006). <http://www.canariculturacolor.com/colibacillosis-aves>

### 13. APÉNDICE

#### MEDIOS DE CULTIVO BACTERIANOS

##### Medio para Congelar Bacterias

Glicerol	60 %
Luria–Bertani	40 mL

##### Gelosa Especial

Base de gelosa sangre	20 g
Agar bacteriológico	15 g
Extracto de carne	1.5 g
Agua destilada c.b.p	1 L
pH=7.4	

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos y almacenar a temperatura ambiente.

##### Medio Luria–Bertani (LB) Broth Luria

Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar bacteriológico	15g
Agua destilada c.b.p.	1 L
pH= 7.0	

Esterilizar a 121°C/15 minutos.

##### Gelosa Mac Conkey

Peptona de caseína	1.50 g
Peptona de gelatina	17.0 g
Peptona de carne	1.50 g
Lactosa	10.0 g
Sales biliares	1.50 g
Cloruro de sodio	5.0 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001 g
Agua destilada c.b.p	1 L

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos.

##### Gelosa Sangre

Agar bacteriológico	40 g
Sangre desfibrinada	5 g
Agua destilada c.b.p	1 L

Esterilizar a 121°C durante 15 minutos. Cuando la temperatura del agar se encuentre entre 37°C y 40°C agregar la sangre poco a poco con una jeringa.

## MEDIOS PARA CULTIVO CELULAR

\*Medio McCoy (1X) c/SFB y c/Antb, a cada 100 mL se le adiciona:

L-glutamina	1 %
Bicarbonato de Sodio 7.5%	1 mL
Estreptomina (10,000 U/mL)/	
Penicilina (10,000 µg/mL)	1 mL
SFB	10 %
Regulador de HEPES 1 M	1 mL

\*Medio McCoy s/SFB y s/Antb, a cada 100 mL se le adiciona:

L-glutamina	1 %
Bicarbonato de Sodio 7.5%	1 mL
Regulador de HEPES 1 M	1 mL

\*MEM (medio mínimo esencial) c/SFB y c/Antb, a cada 100 mL se le adiciona:

MEM (10X)	10 mL
L-glutamina	1 %
Bicarbonato de Sodio 7.5%	1 mL
Estreptomina (10,000 U/mL)/	
Penicilina (10,000 µg/mL)	1 mL
SFB	10 %
Regulador de HEPES 1 M	1 mL
Agua desionizada estéril	90 mL

\*MEM (medio mínimo esencial) s/SFB y s/Antb, a cada 10 mL se le adiciona:

MEM (10X)	97 mL
L-glutamina	1 %
Bicarbonato de Sodio 7.5%	1 mL
Regulador de HEPES 1 M	1 mL

\*Filtrar y envasar en botellas de vidrio.

Medio para Congelar Células, a cada 30 mL de MEM (10X) ó McCoy

Dimetilsulfóxido (DMSO)	10 %
SFB	20 %

## SUPLEMENTOS

Acilamida-Bisacilamida

Acilamida	30 g
Bisacilamida	0.8 g
Agua desionizada estéril	100 mL

Filtrar

Amortiguador para Electroforesis (10X)

Tris-Base	50 mM
Glicina	380 mM g
SDS	2 %
Agua destilada c.b.p.	1 mL

Amortiguador de Laemmli (4X)

Tris-HCl pH 6.8	0.063 M
Glicerol	10 %
SDS	10 %
$\beta$ -mercaptoetanol	5 %
Azul de Bromofenol	0.05 g
Agua destilada c.b.p.	10 mL

Amortiguador de Transferencia (semiseco)

Tris-Base	50 mM
Glicina	380 mM
SDS	1 %
Alcohol Metílico	20 %
Agua destilada c.b.p.	1 mL

Giemsa (solución para teñir células)

Giemsa	1 g
Glicerol	62 mL
Alcohol Metílico	84 mL

Disolver el Giemsa en el glicerol en agitador magnético durante 2 horas. Agregar el alcohol metílico y filtrar. Envasar en frascos ámbar.

PBS Fisiológico (1X)

NaCl	8 g
KCl	0.2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1.44 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.24 g
Agua destilada c.b.p.	1 L
pH= 7.2	

Esterilizar a 121°C/15 minutos.

Solución Reveladora

Tris-Base 50 mM pH 7.6	20 mL
Cloronaphtol	200 $\mu$ L
Peróxido de Hidrógeno al 30%	20 mL

Mezclar el Tris-Base con el cloronaphtol, filtrar y agregar el peróxido de hidrógeno.