



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

**FACULTAD DE MEDICINA
BIOMEDICINA**

**CURLI DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÉNICA CONTRIBUYE A LA
ADHERENCIA E INVASIÓN A CÉLULAS DE VEJIGA HTB-5**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

VÉLEZ GONZÁLEZ MARÍA FERNANDA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MÉXICO, CD. MX., SEPTIEMBRE 2016



Universidad Nacional
Autónoma de México

Dirección General de Bibliotecas de la UNAM

Biblioteca Central



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.



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE MEDICINA

BIOMEDICINA

**CURLI DE *ESCHERICHIA COLI* UROPATOGÉNICA CONTRIBUYE A LA
ADHERENCIA E INVASIÓN A CÉLULAS DE VEJIGA HTB-5**

TESIS

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

VÉLEZ GONZÁLEZ MARÍA FERNANDA

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM.**

**COMITÉ TUTOR: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL
FACULTAD DE MEDICINA, UNAM**

**DRA. ROSA LAURA CAMARENA MEJÍA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOMÉDICAS, UNAM**

MÉXICO, CD. MX., SEPTIEMBRE 2016



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

Me permito informar a usted que el Subcomité de Biología Experimental y Biomedicina del Posgrado en Ciencias Biológicas, en su sesión ordinaria del día 20 de junio de 2016, aprobó el jurado para la presentación del examen para obtener el grado de **MAESTRA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** de la alumna **VÉLEZ GONZÁLEZ MARÍA FERNANDA** con número de cuenta **307289173**, con la tesis titulada **"CURLI DE *Escherichia coli* UROPATOGÉNICA CONTRIBUYE A LA ADHERENCIA E INVASIÓN A CÉLULAS DE VEJIGA HTB-5"**, realizada bajo la dirección del **DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES**:

Presidente: DR. CARLOS ALBERTO ESLAVA CAMPOS
Vocal: DRA. ARIADNA DEL CARMEN CRUZ CÓRDOVA
Secretario: DRA. LAURA CAMARENA MEJÍA
Suplente: DR. RIGOBERTO HERNÁNDEZ CASTRO
Suplente: DRA. YOLANDA LÓPEZ VIDAL

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

ATENTAMENTE
"POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU"
Cd. Universitaria, Cd. Mx., a 09 de agosto de 2016

DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA
COORDINADORA DEL PROGRAMA



AGRADECIMIENTOS

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM, por brindarme la oportunidad de entrar al programa de maestría, y por ser parte de mi formación académica permitiéndome obtener un logro académico y personal.

Al Consejo de Ciencia y Tecnología (CONACYT - No. Registro Becario: 330583) por el apoyo económico brindado durante la realización de la maestría.

Al Dr. Juan Xicohtencatl Cortes, por sus valiosos consejos y asesoría a lo largo de esta etapa de mi vida. Gracias por brindarme confianza, creer en mí y por su apoyo.

A mis tutoras, Laura Camarena y Yolanda López, por sus aportaciones, consejos, por su tiempo y por la calidez con la que me trataron.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México Federico Gómez y forma parte del proyecto de Fondos Federales HIM/2014/014 SSA. 1117 titulado: “Participación de la fimbria Curli en la formación de biopelículas y adherencia a cultivos celulares renales”

Agradezco a todos aquellos involucrados en la elaboración de ésta tesis que me prestaron el tiempo y la paciencia.

Al M. en C. Victor Manuel Luna Pineda por sus consejos, sus asesorías y su apoyo para la realización de éste trabajo.

A mi amigo Julio, que me ha hecho reír y con el que he hecho gran amistad.

Al grupo de UPEC, que me ha dado consejos y aportaciones para el desarrollo de este trabajo.

A Gerardo Escalona, por sus pláticas y consejos; a don Alejandro y el señor Ricardo por el café, su buen humor y su trabajo.

A todos mis compañeros del Laboratorio, que hicieron el ambiente musical en el laboratorio.

Al Dr. Oliver Villegas y Alejandra Levi, por su tiempo y paciencia buscando curli.

A Luis Antonio, que fue mi amigo desde el primer semestre de maestría y ahora es el amor de mi vida, gracias por acompañarme en esta etapa y gracias por ir al MEPSI... Te amo.

DEDICATORIA

A mí madre:

A tí, que con dedicación y esfuerzo me has apoyado en todo momento. Te agradezco todas las noches en vela cuidándome, tus besos, tus abrazos, tus atenciones, tus palabras de consuelo y hasta tus regaños.

Gracias por ser mi madre, mi ejemplo de vida, mi fortaleza y gracias por enseñarme a ser lo que soy.

Te amo

ÍNDICE

| | |
|---|-----------|
| ÍNDICE | |
| ABREVIATURAS | i |
| ÍNDICE DE FIGURAS | v |
| ÍNDICE DE TABLAS | vi |
| RESUMEN | 1 |
| ABSTRACT | 3 |
| INTRODUCCIÓN | 5 |
| <i>Escherichia coli</i> | 5 |
| Infecciones del tracto urinario | 7 |
| UPEC | 8 |
| Multirresistencia | 8 |
| Mecanismo de patogenicidad | 9 |
| Factores de virulencia | 11 |
| Factores de virulencia secretados | 12 |
| Factores de virulencia de superficie | 12 |
| <i>Pilus tipo 1</i> | 12 |
| <i>Pilus P</i> | 13 |
| <i>Fimbria curli</i> | 14 |
| OBJETIVOS | 15 |
| ANTECEDENTES | 16 |
| Biogénesis de curli | 16 |
| Curli en la formación de biopelículas | 18 |
| Curli asociado a una respuesta inmune | 19 |
| PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA | 20 |
| JUSTIFICACIÓN | 21 |
| HIPÓTESIS | 22 |
| DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO | 23 |
| MATERIAL Y MÉTODOS | 24 |

| | |
|---|-----------|
| 1.- Material biológico | 24 |
| 2.- Conservación de las cepas de UPEC y células HTB-5..... | 24 |
| 3. Plásmidos utilizados en este estudio | 25 |
| 4.- Extracción de ácidos nucleicos | 26 |
| 5.- Perfiles de sensibilidad de las cepas clínicas de UPEC..... | 27 |
| 6.- Identificación de genes de virulencia en cepas clínicas de UPEC..... | 28 |
| 7.- Identificación fenotípica de curli por rojo Congo | 29 |
| 8.- Visualización por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de curli en las cepas de UPEC | 30 |
| 9.- Ensayo de RT-PCR | 37 |
| 10.- Mutación del gen <i>csgA</i> por el método de λ -red | 31 |
| 11.- Restauración del gen <i>csgA</i> en cepas de UPEC CFT073 Δ <i>csgA</i> y 529U-0712 Δ <i>csgA</i> | 33 |
| 12.- Ensayos de adherencia e invasión | 37 |
| RESULTADOS | 40 |
| 1.- Selección de cepas bacterianas | 40 |
| 2.- Generación de mutantes en el gen <i>csgA</i> en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 | 41 |
| 3.- Complementación de mutantes en el gen <i>csgA</i> en las cepas de UPEC CFT073 Δ <i>csgA</i> y 529U-0712 Δ <i>csgA</i> | 42 |
| 4.- Análisis fenotípico de la fimbria curli por fijación de rojo Congo | 43 |
| 5.- Visualización de curli por MET | 45 |
| 6.- Transcripción de <i>csgA</i> en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 por RT-PCR..... | 47 |
| 7.- Ensayos de adherencia de cepas de UPEC a células de vejiga HTB-5 | 47 |
| 8.- Ensayos de invasión de cepas de UPEC a células de vejiga HTB-5..... | 49 |
| DISCUSIÓN | 54 |
| CONCLUSIÓN | 62 |
| LITERATURA CITADA | 63 |

ABREVIATURAS

HIMFG: Hospital Infantil de México Federico Gómez.

ITUs: Infecciones del Tracto Urinario.

ATCC: American Type Culture Collection.

UNAM: Universidad Nacional Autónoma de México.

IPN: Instituto Politécnico Nacional.

529U-0712: Cepa clínica de UPEC aislada de un paciente pediátrico con ITU no complicada.

CFT073: Cepa ATCC 700928 de UPEC, aislada de una paciente con pielonefritis aguda.

UTI89: Cepa de UPEC aislada de una paciente con cistitis.

TCC: Línea celular de carcinoma de células transicionales, por sus siglas en inglés.

HTB-5: Línea celular TCC de vejiga.

SFB: Suero Fetal Bovino.

LB: Luria-Bertani.

MH: Mueller-Hinton.

YESCA: Medio utilizado para la expresión de curli.

EMEM: Medio Eagle's Minimum Essential Medium, ATCC® 30-2003™.

Am: Ampicilina.

Cm: Cloranfenicol.

Km: Kanamicina.

Bdar: Morfotipo café, seco y rugoso.

Pdar: Morfotipo rosa, seco y rugoso.

Rdar: Morfotipo rojo, seco y rugoso.

Saw: Morfotipo blanco y cremoso.

BcsA: Celulosa.

bcsA: Gen que codifica para celulosa.

CNF-1: Factor de necrosis citotóxico-1.

cnf1: Gen que codifica para el factor de necrosis citotóxico-1.

csgA: Gen que codifica para la subunidad mayor (CsgA) de la fimbria curli.

CsgA: Subunidad mayor de la fimbria curli.

csgB: Gen que codifica para la subunidad menor (CsgB) de la fimbria curli.

CsgB: Subunidad menor de la fimbria curli.

csgBA: Operón que codifica para los genes *csgB* y *csgA* de la fimbria curli.

csgDEFG: Operón que codifica para los genes *csgD*, *csgE*, *csgF* y *csgG* de la fimbria curli.

FimH: Adhesina fimbrial del pilus tipo I.

fimH: Gen que codifica para la adhesina fimbrial FimH del pilus tipo I.

hlyA: Gen que codifica para la toxina alfa hemolisina HlyA.

HlyA: Toxina alfa hemolisina.

PapG: Adhesina fimbrial del pilus tipo P.

papG: Gen que codifica para la adhesina fimbrial PapG del pilus tipo P.

SatF: Toxina autotransportadora secretada Pic.

satF: Gen que codifica para la proteína autotransportadora Pic.

CFUs: Unidades Formadoras de Colonias.

CLSI: Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio, por sus siglas en inglés.

CMI: Concentración Mínima Inhibitoria.

CO₂: Dióxido de carbono.

DMSO: Dimetil sulfóxido.

DNA: Ácido desoxiribonucleico, por sus siglas en inglés.

RNA: Ácido ribonucleico, por sus siglas en inglés.

dNTP's: Deoxinucleótidos, por sus siglas en inglés.

EDTA: Ácido etilendiaminotetraacético, por sus siglas en inglés.

DAEC: *E. coli* de adherencia difusa, por sus siglas en inglés.

EAEC: *E. coli* enteroagregativa, por sus siglas en inglés.

EHEC: *E. coli* enterohemorrágica, por sus siglas en inglés.

EIEC: *E. coli* enteroinvasiva, por sus siglas en inglés.

EPEC: *E. coli* enteropatogénica, por sus siglas en inglés.

ETEC: *E. coli* enterotoxigénica, por sus siglas en inglés.

UPEC: *E. coli* uropatogénica, por sus siglas en inglés.

FN075: Compuesto curlicida.

FRT: Sitio de reconocimiento para la flipasa, por sus siglas en inglés.

IL-6: Interleucina 6.

IL-8: Interleucina 8.

TLR4: Toll Like Receptor 4.

TNF-alfa: Factor de necrosis tumoral alfa, por sus siglas en inglés.

kDa: kiloDaltones.

LPS: Lipopolisacáridos.

MDR: Multiresistentes, por sus siglas en inglés.

MET: Microscopía Electrónica de Transmisión.

MgCl₂: Cloruro de magnesio.

NMEC: *E. coli* causante de meningitis neonatal, por sus siglas en inglés.

PAI 1 y PAI 2: Islas de patogenicidad 1 y 2.

PBS: Solución amortiguadora de fosfatos, por sus siglas en inglés.

PCR: Reacción en cadena de la polimerasa, por sus siglas en inglés.

pGBA: Fragmento de complementación *csgBA* clonado en el vector pGEM®-T.

pGEM®-T: Vector linearizado para ligar productos de PCR.

pKD3: Vector de expresión con resistencia a Cm.

pKD4: Vector de expresión con resistencia a Km.

pKD46: Vector de recombinación con resistencia a Am.

pUC19: Vector de clonación de alto número de copias con resistencia a Am.

RC: Rojo Congo

Taq DNA Polymerase: DNA polimerasa recombinante termoestable, por sus siglas en inglés.

ÍNDICE DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1. Contribución de elementos genéticos móviles en la evolución de la patogenicidad de <i>E. coli</i> . | 5 |
| Figura 2. Diagrama del cuerpo humano mostrando los diferentes sitios de colonización de los patotipos de <i>E. coli</i> . | 6 |
| Figura 3. Modelo de patogénesis de UPEC en un modelo murino. | 10 |
| Figura 4. Diagrama que representa los principales factores de virulencia descritos en UPEC. | 11 |
| Figura 5. Modelo de biogénesis de curli. | 17 |
| Figura 6. Participación de curli de UPEC en el desarrollo de biopelículas. | 18 |
| Figura 7. Atenuación de la virulencia <i>in vivo</i> . | 19 |
| Figura 8. Verificación de mutantes del gen <i>csgA</i> por PCR punto final. | 43 |
| Figura 9. Fijación de rojo Congo para la identificación de curli en cepas de UPEC. | 44 |
| Figura 10. Identificación de curli por MET. | 47 |
| Figura 11. Evaluación de la transcripción del gen <i>csgA</i> por RT-PCR. | 48 |
| Figura 12. Análisis fenotípico de los ensayos de adherencia. | 51 |
| Figura 13. Análisis cuantitativo de los ensayos de adherencia. | 51 |
| Figura 14. Análisis fenotípico de los ensayos de invasión. | 53 |
| Figura 15. Análisis cuantitativo de los ensayos de invasión. | 53 |

ÍNDICE DE TABLAS

| | |
|---|----|
| Tabla 1. Plásmidos utilizados para la generación de mutantes y restauración del gen <i>csgA</i> en las cepas de UPEC. | 25 |
| Tabla 2. Valores de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano por Kirby-Bauer. | 27 |
| Tabla 3. Valores de corte equivalente a la CMI para enterobacterias. | 27 |
| Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los principales genes de virulencia en las cepas clínicas de UPEC. | 28 |
| Tabla 5. Condiciones de amplificación por PCR punto final para todos los genes de virulencia de UPEC. | 29 |
| Tabla 6. Temperatura óptima de alineamiento de los diferentes genes de virulencia de UPEC. | 29 |
| Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la generación y confirmación de las mutantes en el gen <i>csgA</i> de las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712. | 32 |
| Tabla 8. Condiciones de amplificación de los casetes de resistencia para la mutación de <i>csgA</i> . | 33 |
| Tabla 9. Condiciones de amplificación para la verificación de mutación en el gen <i>csgA</i> . | 33 |
| Tabla 10. Mezcla de reacción para doble digestión. | 35 |
| Tabla 11. Condiciones de amplificación para la verificación de la complementación en <i>trans</i> . | 36 |
| Tabla 12. Condiciones de amplificación para la verificación de complementación en <i>cis</i> . | 37 |
| Tabla 13. Resistencia antimicrobiana, tipificación y análisis fenotípico de las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712. | 41 |

RESUMEN

Introducción: Las infecciones del tracto urinario (ITUs) son la tercera causa de morbilidad en padecimientos de carácter transmisible en México. *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) es responsable del 80% de casos de las ITUs ambulatorias y del 50% de infecciones nosocomiales. **Antecedentes:** Diversos factores de virulencia como adhesinas fimbriales, le permiten a UPEC, colonizar y persistir en el tracto urinario. La fimbria curli está constituida principalmente por la proteína CsgA, que es codificada por el gen *csgA*; curli se caracteriza por presentar una estructura secundaria lámina beta amiloide. Éstas estructuras en bacterias Gram-negativas están involucradas en adhesión a superficies bióticas-abióticas, formación de biopelículas y en procesos inflamatorios. Sin embargo, la fimbria curli en UPEC, no ha sido totalmente descrita en los procesos de adherencia e invasión en células de vejiga. **Hipótesis:** Si la fimbria Curli se encuentra involucrada en el proceso de adherencia e invasión de UPEC al urotelio, entonces, la mutación del gen *csgA* que codifica para la adhesina CsgA disminuirá su adherencia e invasión a la línea celular HTB-5. **Objetivo:** Evaluar la participación de curli en la adherencia e invasión a células de vejiga HTB-5. **Metodología:** Para estudiar la participación de curli en la adherencia e invasión a la línea celular de vejiga HTB-5, se seleccionaron dos cepas de UPEC, la cepa CFT073 y una cepa clínica denominada 529U-0712. Estas cepas de UPEC se utilizaron para generar una mutación en el gen *csgA*, utilizando el método de λ -red. La cepa CFT073 Δ *csgA* fue reconstituida en el gen *csgA* mediante complementación en *trans* con el plásmido *pcsgBA*; mientras, la cepa 529U-0712 Δ *csgA* fue complementada en *cis* con el gen *csgA* mediante recombinación homóloga. La expresión cualitativa de curli en nuestro

conjunto de cepas (CFT073, 529U-0712, CFT073 Δ *csgA*, 529U-0712 Δ *csgA*, CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+}), se verificó por pruebas fenotípicas mediante la fijación con rojo Congo. La ausencia o presencia de producción de curli en el conjunto de cepas de UPEC generadas en este estudio, se visualizó por microscopía electrónica de transmisión (MET) y la transcripción del gen *csgA* por RT-PCR. **Resultados:** Los ensayos de adherencia e invasión con las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA* mostraron una reducción significativa ($p < 0.05$), comparado con las cepas isogénicas silvestres; mientras, las cepas complementadas mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de invasión, indicando una restauración apropiada y eficiente de la proteína CsgA y por lo tanto de curli. Los ensayos de invasión de la cepa CFT073*csgA*^{-/+} mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en su capacidad invasiva a las células HTB-5, comparado con la cepa silvestre; mientras, la cepa 529U-0712*csgA*^{-/+}, mostró una disminución significativa en los niveles de invasión. Las cepas CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+}, mostraron un incremento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de invasión. **Conclusiones:** La fimbria curli de UPEC participa en procesos de adherencia e invasión a células de vejiga HTB-5. La ausencia de curli en cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*, impacta en una disminución en la adherencia a células de vejiga; mientras, en la cepa 529U-0712 Δ *csgA*, genera una disminución en la invasión a células de vejiga HTB-5.

ABSTRACT

Background. Urinary tract infections (UTIs) are the third cause of morbidity in transmissible diseases in Mexico. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is responsible for almost 80% of the cases of ambulatory UTIs and 50% of nosocomial infections. Several virulence factors, such as fimbrial adhesion (Type 1 fimbriae, P fimbriae, and Curli) allow to UPEC, colonize and persist in the urinary tract. Curli fimbria is mainly constituted by the protein CsgA, coded in the gen *csgA* and forms a secondary structure beta amyloid. In Gram-negative bacteria, amyloid beta structures are involved in adhesion to biotic and abiotic surfaces, biofilm formation, and inflammatory processes. Curli fimbria role in the UPEC pathogenesis has not been completely described in the processes of adhesion and invasion to bladder cells.

Hypothesis: If the curli fimbriae of UPEC involved in the adhesion and invasion process to the urothelium, then, a mutation in the *csgA* gene will produce a reduction in adherence and invasion of UPEC to HTB-5 bladder cancer cell lines.

Aim. Evaluate the curli fimbriae role of UPEC during the adhesion and invasion process of UPEC to HTB-5 bladder cancer cells.

Methodology: To evaluate the curli role of UPEC during the adhesion and invasion process to HTB-5 bladder cells, two UPEC strains (CFT073 and 529U-0712) were selected. UPEC strains (CFT073 and 529U-0712) were used to generate a mutation in the *csgA* gen, using the λ -red method. CFT073 Δ *csgA* strain was complemented in *trans* with plasmid pcsgBA carrying the *csgA* gene; while, 529U-0712 Δ *csgA* strain was complemented in *cis* with *csgA* gene through of homologous recombination. Congo red binding assays as of

curli expression indicator in UPEC strains (CFT073, 529U-0712, CFT073 Δ *csgA*, 529U-0712 Δ *csgA*, CFT073*csgA*^{-/+}, and 529U-0712*csgA*^{-/+}) were performed in this study. The absences or presences of the curli production in UPEC strains were visualized by transmission electron microscopy (TEM) and transcription of the *csgA* gene by RT-PCR. Adherence and invasion assays using our set of ETEC strains generated in this study were qualitative and quantitative analyzed.

Results. UPEC strains CFT073 Δ *csgA* and 529U-0712 Δ *csgA* were generated by homologous recombination and complemented with the *csgA* gene in *trans* and *cis*, respectively. CFT073 Δ *csgA* and 529U-0712 Δ *csgA* strains showed a significant reduction ($p < 0.05$) of adherence to HTB-5 cells when compared with its wild-type strains; while, the complemented strains showed a significant increase ($p < 0.05$) of adherence and invasion to HTB-5 cells when compared with its wild-type strains. CFT073 Δ *csgA* strain showed a significant increase ($p < 0.05$) of invasion compared with the wild type strain; however, a significant reduction of invasion was observed in the 529U-0712 Δ *csgA* strains when compared with the wild-type strain.

Conclusions: Curli of UPEC is one fimbria that mediates the intimate interaction among the bacteria and HTB-5 bladder cells promoting the adherence and invasion.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli

Es una bacilo Gram negativo de la familia de las *Enterobacteriaceae* y coloniza el tracto gastrointestinal como parte de la microbiota (Mainil, 2013). *E. coli* tiene la capacidad de adquirir diversos atributos de virulencia por transferencia horizontal de elementos genéticos móviles como transposones, plásmidos, bacteriófagos e islas de patogenicidad (Bien, Sokolova, & Bozko, 2012). Estos elementos móviles han contribuido a la evolución de los diversos patotipos de *E. coli* para adaptarse a diferentes nichos ecológicos (Brzuszkiewicz *et al.* 2006; Kaper *et al.* 2004) (Figura 1).

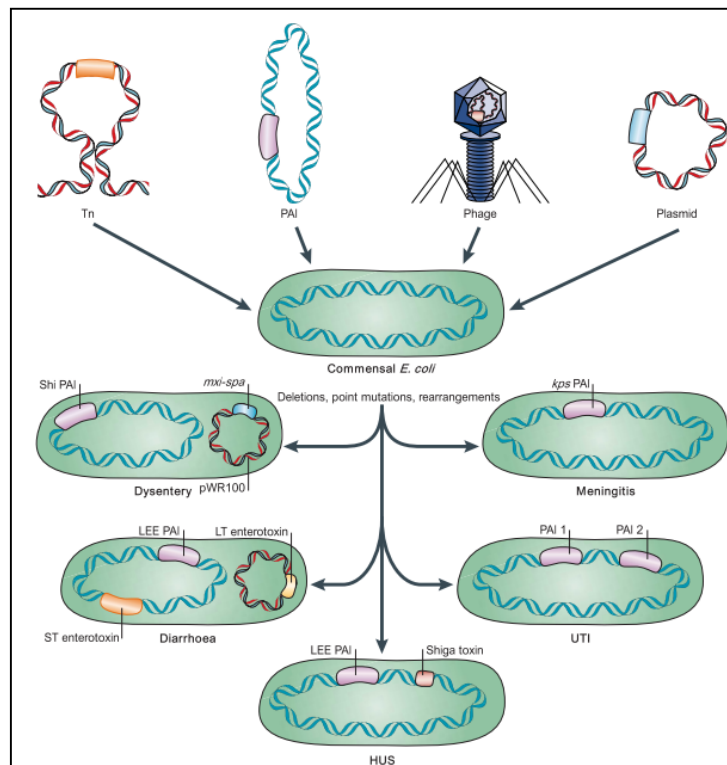


Figura 1. Contribución de elementos genéticos móviles en la evolución de la patogenicidad de *E. coli* (Kaper *et al.*, 2004).

E. coli se ha clasificado en dos patogrupos con base en sus factores de virulencia: (1) diarreogénicas o intestinales y (2) extraintestinales (Figura 2). Los patogrupos diarreogénicos incluyen a *E. coli* enteropatógena (EPEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enterohemorrágica (EHEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enterotoxigénica (ETEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enteroagregativa (EAEC, por sus siglas en inglés), *E. coli* enteroinvasiva (EIEC, por sus siglas en inglés) y *E. coli* de adherencia difusa (DAEC, por sus siglas en inglés) (Bien *et al.*, 2012). Los patotipos de *E. coli* extraintestinales incluyen a *E. coli* causante de meningitis neonatal (NMEC, por sus siglas en inglés) y *E. coli* uropatógena (UPEC, por sus siglas en inglés) (Antão, Wieler, & Ewers, 2009).

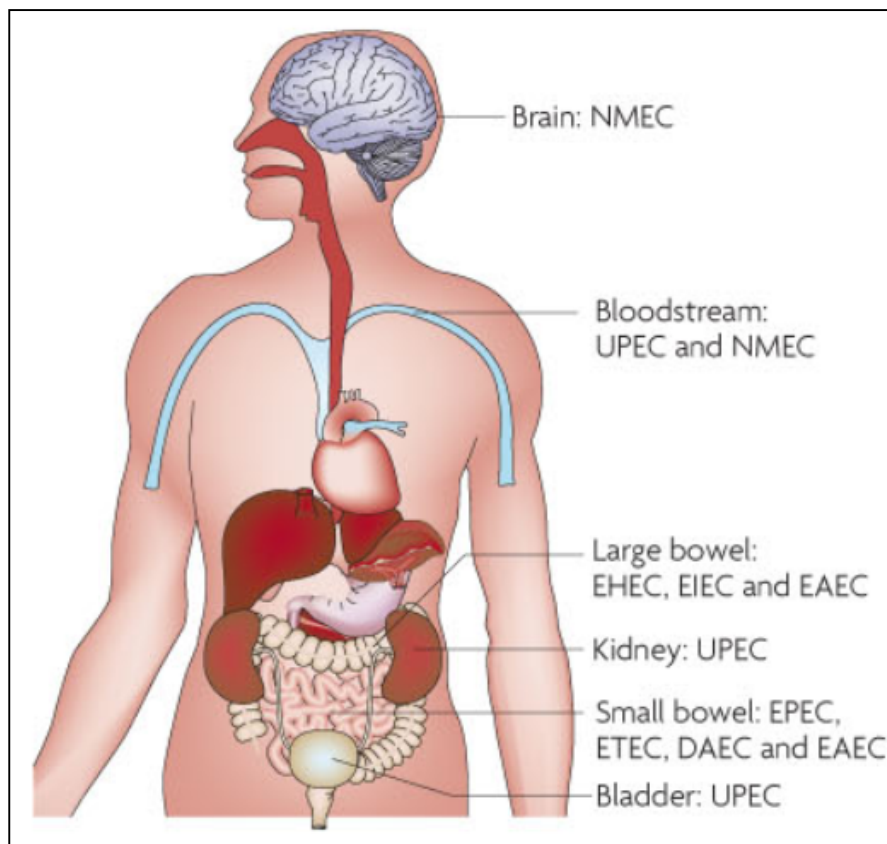


Figura 2. Diagrama del cuerpo humano mostrando los diferentes sitios de colonización de los patotipos de *E. coli* (Croxen & Finlay, 2010).

Infecciones del tracto urinario

En México, las infecciones del tracto urinario (ITUs) son un problema de salud pública generando un gasto anual de más 2 mil millones de pesos. Las ITUs por *E. coli* uropatogénica (UPEC) representan >80% de los casos de cistitis adquirida en la comunidad (más de 3 millones de casos), >70% de los casos de pielonefritis no complicada (2 millones de casos) y 3.6-12.6% de los casos de urosepsis (147-520 mil casos) (epidemiologia.salud.gob.mx/dgae/boletin/intd_boletin.html). Las ITUs son consideradas como la tercera causa de morbilidad en padecimientos de carácter transmisible y por razones anatómicas y fisiológicas las mujeres son más susceptibles de adquirir estas infecciones (Agarwal *et al.* 2012). Una alta persistencia, del 20 al 40% de las ITUs se ha observado en los primeros 6 meses posteriores a la infección inicial, en donde se ha identificado una misma cepa, sugiriendo que UPEC tiene mecanismos de evasión de la respuesta inmunológica del hospedero y del tratamiento antibiótico. En los primeros dos años de vida, las ITUs representan una causa importante de morbilidad y mortalidad, un 7% de incidencia se ha observado en niñas y aproximadamente 2% en niños (Adamus-Bialek, Zajac, Parniewski, & Kaca, 2013; López-Martínez *et al.*, 2013; SUIVE/DGE/SALUD/Información, 2011).

La frecuencia de las ITUS por UPEC en pacientes hospitalizados se ha atribuido a un incremento de cepas clínicas resistentes a los diferentes paneles de antibióticos, al déficit inmunológico de los pacientes y a las alteraciones estructurales u obstructivas del aparato urinario (López-Martínez *et al.*, 2013). Además, se ha descrito que cepas clínicas multiresistentes (MDR) han mostrado la capacidad para invadir el urotelio y formar depósitos intracelulares (Justice, Hunstad, Seed, & Hultgren, 2006).

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), se atienden por año entre el 60 - 65% de niños con enfermedades neoplásicas (principalmente leucemias y linfomas) que involucran un grado importante de inmunosupresión y por lo tanto, una susceptibilidad a múltiples infecciones como las urinarias (López-Martínez *et al.*, 2013).

UPEC

Esta bacteria es considerada un patógeno nosocomial caracterizado por colonizar el tracto urinario, desde la uretra hasta los riñones (Agarwal *et al.*, 2012). UPEC contiene dos islas de patogenicidad PAI 1 y PAI 2; las cuales son responsable de las diversas características de virulencia (Guyer, Henderson, Nataro, & Mobley, 2000). Así mismo, UPEC se caracteriza por presentar cuatro grupos filogenéticos, tales como: A; B1; B2 y D, diversos serotipos y perfiles de susceptibilidad antimicrobiana. La mayoría de las ITUs por UPEC se han asociado principalmente al grupo filogenético B2 y en menor frecuencia al grupo filogenético D. Por otro lado, se han descrito alrededor de 176 serogrupos en cepas clínicas de UPEC, siendo los antígenos más frecuentes O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75. Mientras, antígenos K y H han mostrado una baja definición de patrones para UPEC (Wiles, Kulesus, & Mulvey, 2008).

Multirresistencia

En los últimos años se ha observado un incremento en la resistencia en cepas clínicas de UPEC a un amplio espectro de antibióticos como cefalosporinas, fluoroquinonas y aminoglucósidos (Adamus-Bialek *et al.*, 2013). El incremento en la resistencia, es atribuida principalmente a una combinación de la presión selectiva por el uso indebido de antibióticos que favorecen la aceleración en la transmisión de diversos factores de

resistencia (Adamus-Bialek *et al.*, 2013; Lloyd, Rasko, & Mobley, 2007; López-Martínez *et al.*, 2013). Las cepas clínicas MDR, representan un problema ya que limita las opciones de tratamiento para pacientes con ITUs. Recientemente, en el Laboratorio de Bacteriología Intestinal del HIMFG, se ha observado que más del 70% de las cepas clínicas de UPEC son resistentes a β -lactámicos, más del 82% a tetraciclinas y más del 65 % a inhibidores de ácido fólico (Ochoa y cols., datos en proceso de publicación).

Mecanismo de patogenicidad

La interacción de UPEC a la superficie urotelial, es un evento crucial para el establecimiento de la infección; sin embargo, el mecanismo molecular que se lleva a cabo durante la etapa de infección en humanos aún no han sido descrito a detalle (Andersen *et al.*, 2012). Esta interacción favorece una serie de respuestas inmunológicas, involucradas en la activación de diversas cinasas, así como la reorganización del citoesqueleto; la cual, facilita la inmersión bacteriana al urotelio (Anderson *et al.* 2004; Justice *et al.* 2006; Zhou *et al.* 2001). Las bacterias en el citosol son replicadas rápidamente favoreciendo el desarrollo de comunidades bacterianas intracelulares con capacidad para producir una exfoliación o lisis del epitelio (Justice *et al.*, 2004). Como un mecanismo para eliminar comunidades bacterianas, el periodo de exfoliación de las células superficiales es producido en etapas tardías de la infección aguda después de 6 horas de colonización bacteriana. Después de la exfoliación, UPEC se establece en el urotelio (de transición) y forma depósitos crónicos para evadir la respuesta inmune y la respuesta a diversos fármacos (Justice *et al.*, 2004).

Por otro lado, durante la colonización, UPEC se organiza como estructuras filamentosas para aumentar su capacidad de persistencia o como un mecanismo de defensa

y/o sobrevivencia (Figura 3). La colonización de UPEC al urotelio es favorecido por la producción de un conjunto de factores de virulencia; los cuales, dependen de las condiciones físicas y químicas del ambiente de la vejiga (Andersen *et al.*, 2012; Justice *et al.*, 2006).

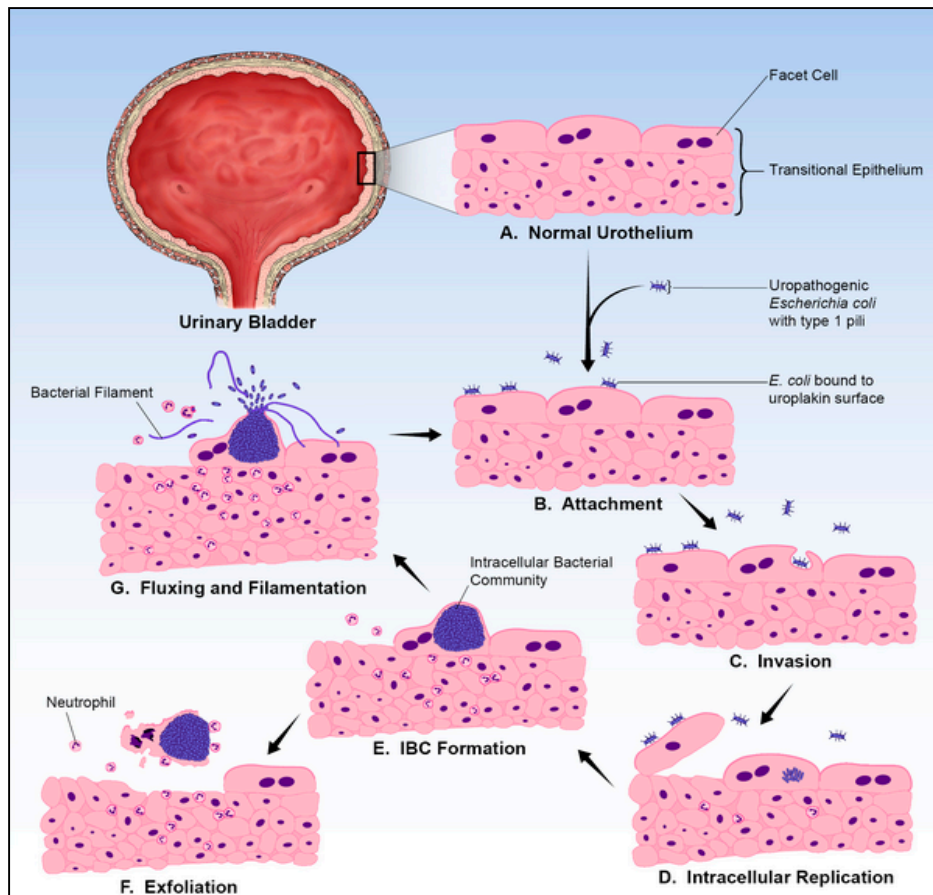


Figura 3. Modelo de patogénesis de UPEC en un modelo murino. A) El urotelio de la vejiga está recubierto con uroplaquina en la superficie apical formando una barrera impermeable. B) UPEC puede adherirse a la uroplaquina utilizando los pili tipo 1 para invadir (C), replicarse en citoplasma (D) y formar comunidades bacterianas intracelulares (E). Durante este proceso, las células infectadas pueden ser exfoliadas (F). UPEC puede adoptar una morfología de filamentación para incrementar su capacidad de adherencia favoreciendo la reiniciación del ciclo de infección (G). Pie de figura modificado de Rosen *et al.* 2007.

Factores de virulencia

Diversos factores de virulencia contribuyen para que UPEC pueda colonizar y persistir en el tracto urinario; los cuales, son reconocidos por receptores específicos localizados en diferentes sitios anatómicos a lo largo del tracto urinario (Asadi *et al.* 2014; Lloyd *et al.* 2007; López-Martínez *et al.* 2013; Oelschlaeger *et al.* 2002). Los factores de virulencia pueden ser proteínas secretadas a través de sistemas especializados y factores asociados a la superficie bacteriana (Bien *et al.*, 2012).

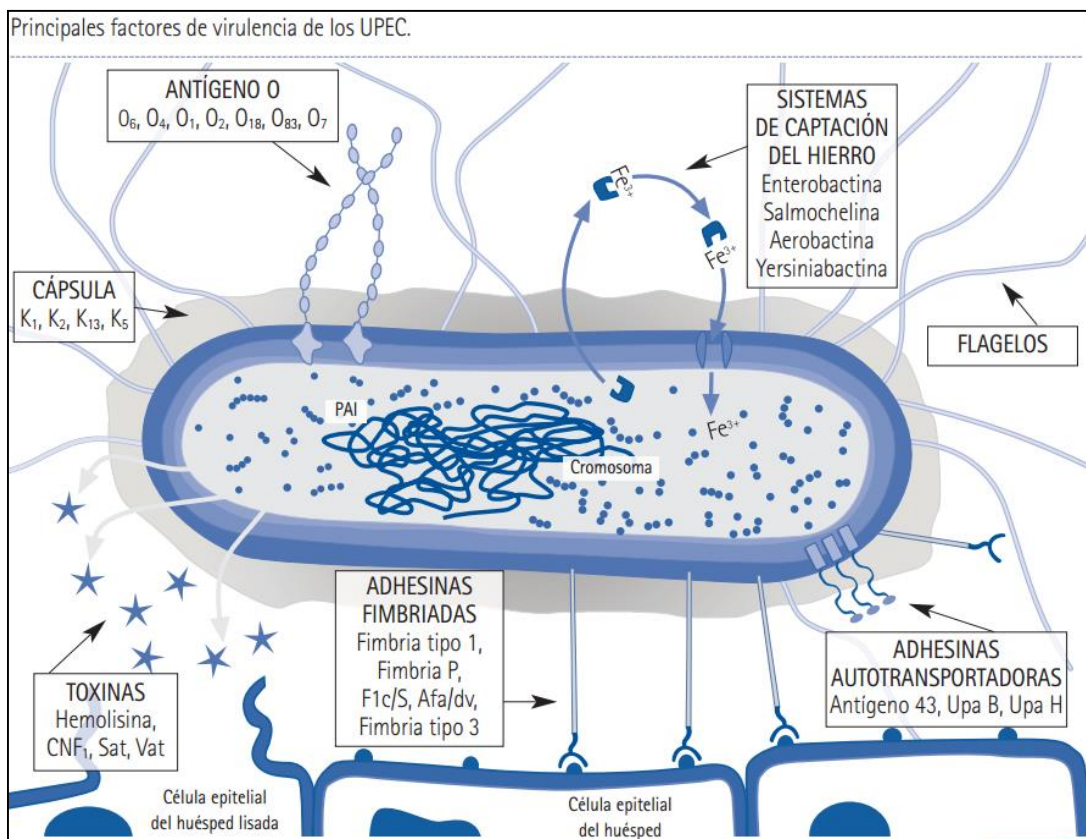


Figura 4. Diagrama que representa los principales factores de virulencia descritos en UPEC. Tomado de Pigrau, 2013.

Factores de virulencia secretados. En este grupo se incluyen toxinas que causan una respuesta inflamatoria como la toxina alfa hemolisina (HlyA), el factor de necrosis citotóxico-1 (CNF-1), la toxina autotransportadora secretada (SatF), la proteína autotransportadora Pic, el sideroforo aerobactina y el sideroforo yersinobactina (Bien *et al.*, 2012; Wiles *et al.*, 2008).

Factores de virulencia de superficie. Las adhesinas fimbriales, las adhesinas no fimbriales, la cápsula, los lipopolisacáridos (LPS) y el flagelo son los principales factores de virulencia que se han asociado con la superficie bacteriana de UPEC (Hadjifrangiskou & Hultgren, 2012). Las fimbrias son estructuras poliméricas y están constituidas por proteínas con propiedades aditivas para promover la colonización bacteriana a los tejidos del hospedero a través de diversos receptores específicos (Bien *et al.*, 2012; Fronzes, Remaut, & Waksman, 2008). Las condiciones nutricionales (medios sin sal, bajo contenido de nitrógeno, fosfato y hierro), ambientales (temperatura, osmolaridad, fase de crecimiento y pH) y el sitio de infección son factores que contribuyen a la expresión de las adhesinas fimbriales para promover la colonización y establecimiento de la infección bacteriana, un paso fundamental en el mecanismo de patogénesis (Fowler *et al.*, 2007).

Pilus tipo 1. Es uno de los principales factores de virulencia que se ha asociado a la colonización de UPEC al tracto urinario a través de la interacción con receptores específicos del epitelio de la vejiga. El mecanismo de ensamblaje del pilus tipo 1 es través de la vía “chaperona–acomodador” que organiza en el extremo distal a FimH, una proteína con propiedades de adhesión (Anderson *et al.*, 2004). La proteína FimH tiene la capacidad para interaccionar con moléculas de manosa de la vejiga a través del reconocimiento de los residuos manosilados en la uroplaquina, una proteína de 24 kDa que recubre el epitelio de la vejiga (Zhou *et al.*, 2001). Esta interacción promueve un evento de fosforilación

requerido para la estimulación de las vías de señalización, implicadas en la invasión y apoptosis. La interacción pilus tipo 1 con el urotelio puede estimular la liberación de citocinas involucradas en la exfoliación de las células epiteliales (Antão *et al.*, 2009; Thumbikat *et al.*, 2009). Durante este evento, el pilus tipo 1 puede presentar una variación de fase dependiente de las condiciones nutricionales y ambientales para expresar bacterias fimbriadas y/o afimbriadas; la cual, promueve la colonización de UPEC a diferentes sitios anatómicos (Anderson *et al.*, 2004).

Pilus P. El ensamblaje del pilus P involucra el operón *pap* con 11 genes asociados en su biogénesis a través del sistema de la vía “chaperona–acomodador” (Anderson *et al.*, 2004). En el extremo distal del pilus P se encuentra anclada la proteína PapG de 36 kDa, una molécula que media la adherencia a través de la interacción con glucoesfingolípidos renales alfa (1-4) galactosa del epitelio del riñón (Bien *et al.*, 2012). La interacción de UPEC a través de la expresión del pilus P a receptores específicos en el riñón ha sido causa frecuente de infecciones renales, ya que más del 80 % de las cepas clínicas han sido aisladas de pacientes con pielonefritis (Antão *et al.*, 2009; Mulvey, Schilling, & Hultgren, 2001). La unión de las fimbrias P a su receptor, conduce a la liberación de la ceramida, la cual actúa como un antagonista de TLR4 (receptor implicado en la activación de la respuesta inmune celular) produciendo un proceso inflamatorio (Bien *et al.*, 2012). En la adhesina PapG se han descrito tres variantes génicas denominadas PapGI, PapGII y PapGIII (Antão *et al.*, 2009). PapGI se ha identificado en cepas asociadas a infecciones en animales, PapGII se encuentra frecuentemente asociada a casos de pielonefritis y bacteriemia en seres humanos y PapGIII con cepas clínicas aisladas en mujeres y niños con cistitis (Antão *et al.*, 2009).

Fimbria curli. Es una fimbria que está constituida principalmente por la proteína CsgA de 15 kDa y se caracteriza por formar estructuras fibrilares en forma de rizos de 4 a 7 nm de diámetro; las cuales, emergen peritricamente de la superficie bacteriana (Barnhart & Chapman 2010). Estas estructuras son de tipo lámina beta con cinco repeticiones (R1-R5) y se caracterizan por formar un núcleo amiloide que favorece la interacción de la bacteria con proteínas de matriz extracelular como: fibronectina, laminina, plasminógeno, activador tisular del plasminógeno y H-cinínógeno (Antão *et al.*, 2009; Fronzes *et al.*, 2008; Hou *et al.*, 2014; Wang, Zhou, Ren, Hammer, & Chapman, 2010). Varios reportes han descrito que la fimbria curli en otros patotipos de *E. coli* y en *Salmonella ssp.*, participa en la adhesión a superficies bióticas y abióticas; además, curli promueve la agregación bacteriana, es determinante crítico en la formación de biopelículas y es inductor potente de inflamación (Barnhart & Chapman, 2010; Cegelski *et al.* 2010; Hammer *et al.* Schmidt *et al.* 2007).

Una de las principales características de curli es su capacidad de retención de colorantes, como el Rojo Congo, una molécula que se intercala entre las láminas beta de las fibras amiloideas mediante interacciones hidrofóbicas y electrostáticas (Khurana, Uversky, Nielsen, & Fink, 2001). En placas sólidas, bacterias productoras de curli presentan diferentes morfotipos coloniales cuando se cultivan en placas suplementadas con el colorante diazo rojo Congo como: 1) Morfotipo rojo, seco y rugoso (rdar, debido a fijación del colorante por curli y celulosa), 2) Morfotipo rosa, seco y rugoso (pdar, por la fijación del colorante por celulosa), 3) Morfotipo café, seco y rugoso (bdar, por la fijación del colorante por curli) y 4) Morfotipo blanco y cremoso (saw, ausencia de la fijación del colorante por la nula expresión de curli y celulosa).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Estudiar la participación de curli de UPEC de origen clínico en la adherencia y/o invasión a células de vejiga.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Seleccionar una cepa clínica productora de curli a partir de una colección de cepas clínicas de UPEC, con base en la expresión de esta fimbria y a su perfil de resistencia a antibióticos.
2. Realizar la mutación y restauración en el gen *csgA* en las cepas de UPEC CFT073 y una cepa clínica de UPEC.
3. Caracterizar la función de curli en las cepas de UPEC CFT073 y una cepa clínica de UPEC, mutantes en el gen *csgA* y complementadas en el gen *csgA* a través de ensayos de adherencia y/o invasión a células de vejiga.

Biogénesis de curli

En el ensamblaje de curli participan al menos seis proteínas que son codificadas en dos operones (*csgBA* y *csgDEFG*) que se transcriben de manera divergente (Blanco *et al.*, 2012). En la Figura 5 se describe el mecanismo de ensamblaje de curli por la vía de nucleación-precipitación, un sistema independiente de ATP que se impulsa por la energía intrínseca obtenida de la liberación energética durante el plegamiento de las proteínas (Allen, Phan, & Waksman, 2012). CsgA es una proteína que es secretada de manera soluble y la interacción con la proteína CsgB induce su polimerización para formar fibras finas amiloides insolubles (Allen *et al.*, 2012; Barnhart & Chapman, 2010; Blanco *et al.*, 2012; Fronzes *et al.*, 2008). Aunado esto, la proteína CsgD ha sido descrita como un regulador transcripcional positivo del operón *csg*, responsable de codificar para la mayoría de las proteínas involucradas en la biogénesis de curli; sin embargo, a excepción de CsgD, todas las proteínas contienen una secuencia señal para su translocación en el periplasma (Barnhart & Chapman, 2010). La proteína CsgG localizada en la membrana externa es responsable de la secreción de las dos subunidades estructurales de curli, CsgA y CsgB; mientras, las proteínas CsgE y CsgF son necesarias para el ensamblaje eficiente de curli, aunque su función no ha sido descrita a detalle (Wang *et al.* 2010; Fronzes *et al.* 2008).

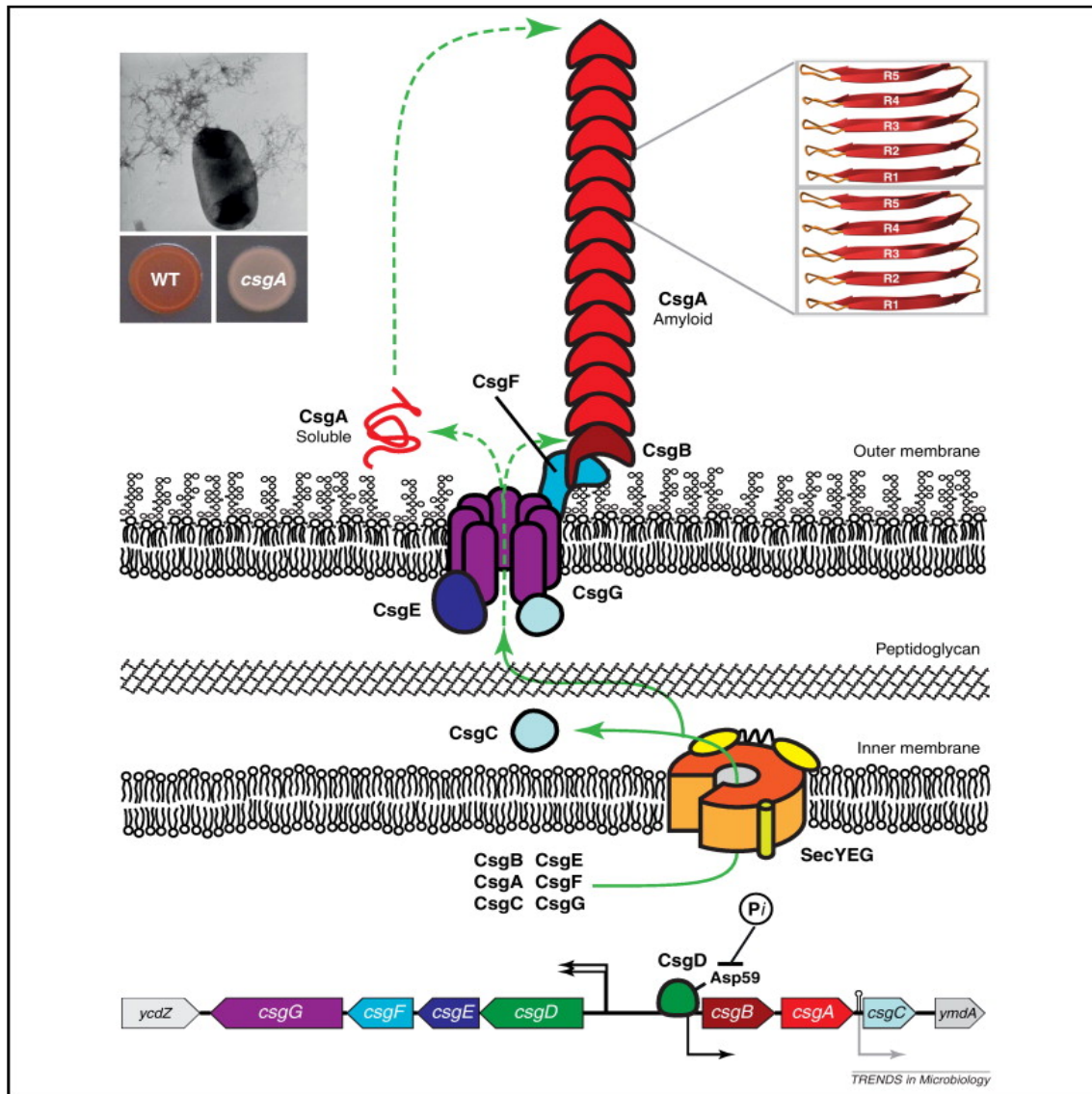


Figura 5. Modelo de biogénesis de curli. Tomado y modificado de Blanco et al. 2012.

La regulación de la expresión génica de curli es extraordinariamente compleja y sensible a muchas señales ambientales. Una de las primeras condiciones para promover la expresión de curli es a través de su crecimiento a temperaturas por debajo de los 30°C; sin embargo, en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del HIMFG, se ha observado que cepas clínicas de UPEC también expresan curli a 37°C (Hung et al. 2014 y datos en proceso de publicación). La expresión curli también está influenciado por su crecimiento en nutrientes mínimos y en diferentes fuentes de carbono, nitrógeno, fósforo y hierro (Barnhart & Chapman, 2010; Fowler et al., 2007; Hung et al., 2014). Además, la formación de biopelículas se ha relacionado con la expresión de curli cuando UPEC es cultivada en medio YESCA y con la expresión del pilus tipo 1 cuando UPEC es cultivada en medio Luria-Bertani (Cegelski et al., 2010).

Curli en la formación de biopelículas

Las biopelículas son comunidades bacterianas complejas que exhiben una baja sensibilidad a los diferentes grupos de antibióticos convencionales, a las defensas del hospedero y a factores externos como la desecación, concentración de sales y fuerzas mecánicas (Cegelski *et al.*, 2010). La expresión de curli en cepas de *E. coli* y *Salmonella Typhimurium* se ha asociado como un factor importante en el desarrollo de los diferentes estadios de las biopelículas (Barnhart & Chapman, 2010). Además, se ha demostrado que la presencia de curli en la cepa UTI89, le confiere fuerza y visco-elasticidad a las biopelículas como un sistema preliminar para favorecer la adhesión a células de mamíferos y vegetales; así como, la interacción con superficies inertes (Wu, Lim, Fuller, & Cegelski, 2012).

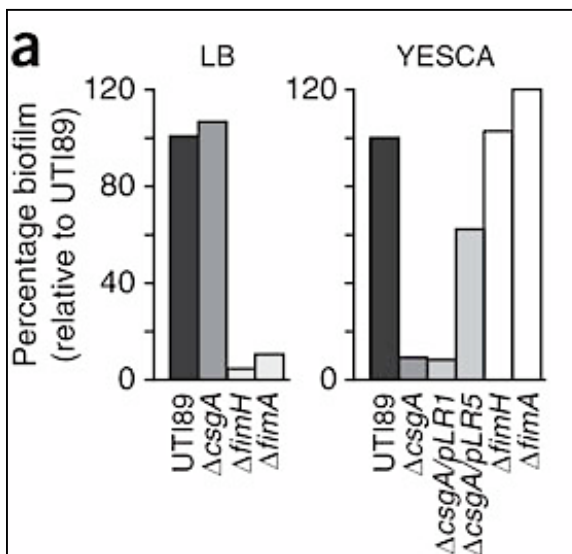


Figura 6. Participación de curli de UPEC en el desarrollo de biopelículas. Las cepas se cultivaron en medio LB donde la biopelícula es dependiente de pilus tipo 1 y en medio Yesca donde la biopelícula depende de curli. Datos interpretados de Cegelski *et al.* 2010.

Recientemente, se ha observado *in vivo* que deleciones en los genes *csgA* y *csgBG*, se reduce de manera significativa la capacidad de colonización de UPEC al urotelio de la vejiga, cuando es comparado con la cepa isogénica silvestre UTI89. Otros estudios, han

mostrado que el uso de curlicidas como FN075, afecta el ensamblaje de curli y por lo tanto, disminuye la adherencia e invasión a las células uroteliales (Cegelski *et al.*, 2010).

Curli asociado a una respuesta inmune

La fimbria curli de UPEC promueve el proceso de bacteriemia en una infección activa (Hung *et al.*, 2013; Hung *et al.*, 2014). Además, se ha demostrado que curli tiene dominios proteicos que interactúan con el complejo principal de histocompatibilidad clase I y que inducen la liberación de citocinas proinflamatorias, tales como TNF-alfa, IL-6 e IL-8 (Bian, Yan, Hansson, Thorén, & Normark, 2001).

Estos datos, sugieren que curli puede ser una adhesina fimbrial con una función importante en la respuesta inmunológica que genera el hospedero ante un shock séptico (Bian *et al.*, 2000; Fronzes *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2014; Johansson *et al.*, 2001).

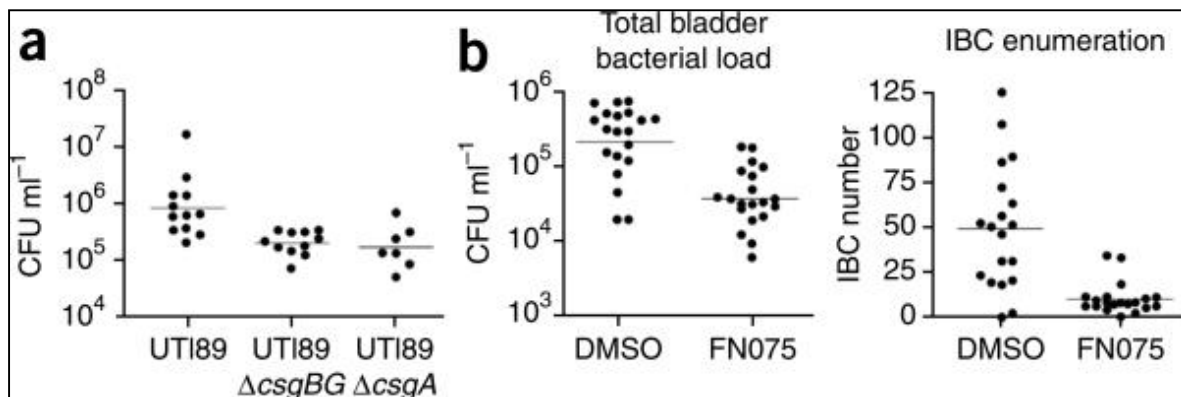


Figura 7. Atenuación de la virulencia *in vivo*. A) Cepas UTI89 mutantes en *csgA* y *csgBG*, muestran una reducción en la adherencia a células uroteliales comparado con la cepa silvestre. B) Tratamiento de la cepa silvestre UTI89 con FN075 mostró una disminución significativa en la adherencia al urotelio con respecto al tratamiento con DMSO; así mismo, se observó una disminución en la formación de las comunidades bacterianas intracelulares.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Los niños hospitalizados y ambulatorios del HIMFG han mostrado un incremento en la frecuencia de las ITUs en los últimos años, donde *E. coli* urinaria es el patógeno principal que coloniza el tracto urinario. Estas cepas clínicas de UPEC cuentan con un amplio repertorio de factores de virulencia y han mostrado un perfil de multirresistencia a diversos fármacos limitando las opciones de tratamiento. La fimbria curli se ha visto involucrada en la formación de biopelículas en superficies bióticas y abióticas además, el gen transcribible de la subunidad mayor de curli se ha encontrado en un 90% de las cepas clínicas de UPEC. En el Laboratorio de Bacteriología Intestinal, nos hemos enfocado en estudiar la caracterización estructural y funcional de la fimbria curli con la finalidad de estudiar posibles blancos terapéuticos.

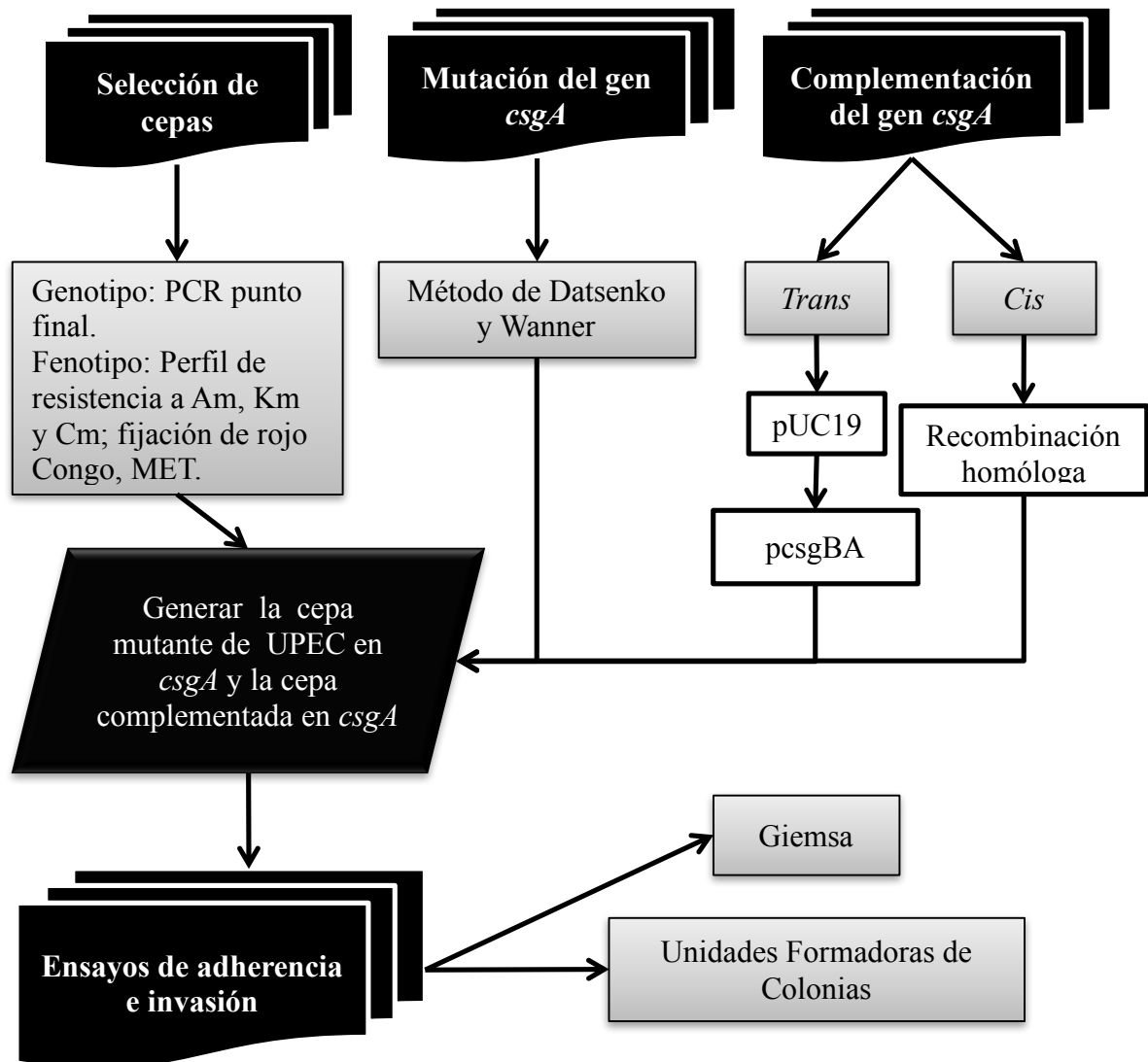
JUSTIFICACIÓN

Entender como la fimbria curli producida por UPEC media la adherencia a la superficie del urotelio, ayudará en la comprensión de la participación de esta fimbria en el mecanismo de colonización. Esta información será relevante para proponer a futuro un blanco terapéutico para el diseño de una vacuna potencial que permita reducir las infecciones de vías urinarias en pacientes pediátricos.

HIPÓTESIS

Si la fimbria Curli se encuentra involucrada en el proceso de adherencia e invasión de UPEC al urotelio, entonces, la mutación del gen *csgA* que codifica para la adhesina CsgA disminuirá su adherencia e invasión a la línea celular de vejiga HTB-5.

DIAGRAMA GENERAL DE TRABAJO



MATERIAL Y MÉTODOS

1.- Material biológico

La cepa de UPEC CFT073 de la casa comercial American Type Culture Collection (ATCC) con código de acceso 700928 se utilizó para evaluar la producción de la fimbria curli. La cepa tipo *E. coli* ATCC con el código de acceso 25922™) se utilizó para evaluar los ensayos de sensibilidad antimicrobiana. La cepa clínica 529U – 0712 aislada de un paciente pediátrico en el HIMFG, fue seleccionada en base a su perfil de sensibilidad a antibióticos β -lactámicos, aminoglucósidos, cefalosporinas y la producción de curli. La cepa de *E. coli* K12, se utilizó para la clonación. La línea celular de carcinoma de células transicionales (TCC, por sus siglas en inglés) de vejiga con el código ATCC® HTB-5™ se utilizó para realizar los ensayos de adherencia e invasión.

2.- Conservación de las cepas de UPEC y células HTB-5

Las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712, se cultivaron rutinariamente en caldo y/o agar LB (Luria-Bertani; New York, USA) y la conservación se realizó en caldo LB con 20% de glicerol (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA). El caldo/agar Mueller-Hinton (MH; BD, Heidelberg, Germany) se utilizó para realizar las pruebas de sensibilidad antimicrobiana; caldo YESCA, se utilizó para promover la expresión de curli y el agar YESCA suplementado con el 3% rojo Congo (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) para determinar cualitativamente la expresión de curli en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712.

La línea celular ATCC® HTB-5™ se cultivó rutinariamente y se conservó utilizando el medio Eagle's Minimum Essential Medium ATCC® 30-2003™ (EMEM; Manassas, VA, USA) suplementado con 10% de suero fetal bovino (SFB).

3. Plásmidos utilizados en este estudio

La función de curli en cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712, se realizó a través de la mutación y restauración (complementación) del gen *csgA*. Para estos estudios se incluyeron diversos plásmidos, tales como: plásmidos para la generación de las mutantes en el gen *csgA* y plásmidos de alto número de copias para la restauración del gen *csgA* en las cepas mutantes (Tabla 1).

Tabla 1. Plásmidos utilizados para la generación de mutantes y restauración del gen *csgA* en las cepas de UPEC.

| Plásmido | Descripción | Referencia |
|----------|---|--------------------------|
| pKD46 | Vector de recombinación. Codifica para las recombinasas γ y β y un inhibidor de exonucleasas <i>exo</i> . Contiene un casete de resistencia a ampicilina y es inducible con arabinosa. | Datsenko y Wanner, 2000. |
| pKD3 | Vector de expresión. Codifica para un casete de resistencia a cloranfenicol flanqueado con sitios FRT ¹ . | |
| pKD4 | Vector de expresión. Codifica para un casete de resistencia a kanamicina flanqueado con sitios FRT ¹ . | |
| pGEM®-T | Vector linearizado con una timidina terminal en el extremo 3'. Plásmido utilizado para ligar productos de PCR con una deoxiadenosina en el extremo 3'. | Promega; Madison, USA. |
| pUC19 | Vector de clonación de alto número de copias, con 13 diferentes sitios de restricción de endonucleasas. Contiene un casete de resistencia a ampicilina. | Yanisch-Perron, 1985. |

¹Sitio de reconocimiento para la flipasa (FRT, por sus siglas en inglés), usada para eliminar el casete de resistencia antibiótica en las cepas mutantes.

4.- Extracción de ácidos nucleicos

La extracción de DNA genómico y plasmídico de las cepas de UPEC se realizó utilizando el Kit de extracción Promega, como se describe en el manual Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Madison, WI, USA) y el Kit de extracción Promega PureYield™ Plasmid Miniprep System (Madison, WI, USA), respectivamente. La purificación y precipitación de los productos de PCR o plásmidos se realizó utilizando glicógeno de acuerdo al manual técnico Glycogen, molecular biology grade (Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA, USA). La extracción de RNA total se realizó utilizando el kit de extracción Quiagen, de acuerdo al manual RNA Isolation Kit: RNeasy Mini Kit - QIAGEN (Qiagen; Austin, Texas, USA). Previamente, las muestras se trataron con RNAprotect® Bacteria Reagent, de acuerdo con el manual técnico (Qiagen; Austin, Texas, USA). La cuantificación de los ácidos nucleicos se realizó determinando la absorbancia a 230, 260 y 280 nm utilizando el equipo NanoDrop 2000 (Thermo Scientific; Waltham, MA, USA). La relación de absorbancia 260/280 con valores entre 1.8 y 2.0 indicaron el grado de pureza del DNA y valores entre 2.0 y 2.2 indicaron el grado de pureza del RNA; mientras, valores menores a estos rangos indicaron la presencia de proteínas, solventes u otros restos celulares que absorben alrededor de 280 nm. La relación 260/230 con valores entre 2.0 y 2.2 indicaron la presencia de contaminantes como carbohidratos o EDTA en el DNA o RNA. Los productos de DNA se sometieron a corrimientos electroforéticos en geles de agarosa al 1.0% y los productos de RNA en geles al 2.0%. En ambos casos, el DNA o RNA se visualizaron en un fotodocumentador Chemi doc (BioRad; Milan, Italia).

5.- Perfiles de sensibilidad de las cepas clínicas de UPEC

La sensibilidad antimicrobiana de las cepas clínicas de UPEC se realizó utilizando la metodología de difusión en agar por el método de Kirby-Bauer y se confirmó por concentración mínima inhibitoria (CMI), de acuerdo al Instituto de Estándares Clínicos y de Laboratorio (CLSI, por sus siglas en inglés), 2015.

Método semi-cuantitativo por Kirby-Bauer. Brevemente, el método semi-cuantitativo consistió en utilizar sensidiscos con los antibióticos ampicilina (10 µg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA), kanamicina (30 µg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA) y cloranfenicol (30 µg) (Sigma-Aldrich, St. Louis, Missouri, USA). Los resultados se interpretaron dependiendo del halo de inhibición en el crecimiento bacteriano como lo indica la CLSI, 2015 (Tabla 2).

Tabla 2. Valores de los halos de inhibición del crecimiento bacteriano por Kirby-Bauer.

| Antimicrobianos | Carga del disco (µg) | Diámetro del halo de inhibición (mm) | | | |
|-----------------|----------------------|--------------------------------------|------------|----------|------------|
| | | Resistente | Intermedia | Sensible | ATCC 28922 |
| Ampicilina | 10 | <13 | 14-16 | >17 | 16-22 |
| Kanamicina | 30 | <13 | 14-17 | >18 | 17-25 |
| Cloranfenicol | 30 | <12 | 13-17 | >18 | 21-27 |

Elaborado con datos de la CLSI, 2015. La cepa ATCC 28922 se utilizó como control de calidad.

Método cuantitativo por CMI. Brevemente, para los ensayos de CMI las cepas clínicas de UPEC se incubaron a 37°C, por 24 h y con diferentes diluciones de los antibióticos ampicilina, kanamicina y cloranfenicol. La CMI fue considerada como la concentración mínima del antibiótico capaz de inhibir el crecimiento bacteriano de 1×10^7 bacterias/mL, de acuerdo a la CLSI, 2015 (Tabla 3).

Tabla 3. Valores de corte equivalente a la CMI para enterobacterias.

| Antimicrobiano | Punto de corte equivalente a la CMI (µg/mL) | | | |
|----------------|---|------------|----------|------------|
| | Resistente | Intermedia | Sensible | ATCC 28922 |
| Ampicilina | >32 | 16 | <8 | 2-8 |
| Kanamicina | >64 | 32 | <16 | 1-4 |
| Cloranfenicol | >32 | 16 | <8 | 2-8 |

Elaborado con datos de la CLSI, 2015.

6.- Identificación de genes de virulencia en cepas clínicas de UPEC

La presencia de los principales genes que codifican para los (CsgA, FimH, BcsA, PapF, HlyA, CNF-1 y SatF) característicos en cepas de clínicas de UPEC fue determinada por PCR punto final utilizando oligonucleótidos específicos (Tabla 4). La mezcla de reacción se realizó de acuerdo a las indicaciones del manual técnico PCR Master Mix (Promega; Madison, WI, USA). Brevemente, se utilizaron 3 μ L de agua, 5 μ L de Master Mix, 0.5 μ L de cada oligonucleótido (10 pM cada uno) y 1 μ L DNA genómico (20 ng/ μ L).

Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la identificación de los principales genes de virulencia en las cepas clínicas de UPEC.

| Genes | Nombre | Secuencia 5'-3' | Fragmento (bp) | Ref. |
|-------------|-----------|--|----------------|------|
| <i>csgA</i> | csgA-F | GGCGGATCCATGGACATGAAACTTTTAAAAGTAGCAGC | 461 | 1 |
| | csgA-R | CGCGAGCTCTTAGTACTGATGAGCGGTCG | | |
| | RT-csgA-R | GACTCAGCGTGGTTTCGGCAACAGC | 185 | |
| <i>fimH</i> | fimH-F | CGGCGGATCCATGGAGATGATTGTAATGAAACGAG | 960 | 1 |
| | fimH-R | GCGCGAGCTCTTATTGATAAAACAAAAGTCACGCC | | |
| <i>bcsA</i> | bcsA-F | CCCGAATTCGTGTAGTAATAAATCAGCC | 2700 | 2 |
| | bcsA-R | CCCAAGCTTCCCTGTTTCTTTAATACAG | | |
| <i>papF</i> | papF-F | GTTTTCTGTACCGCTCTCCG | 500 | 1 |
| | papF-R | CATGCTCATACTGGCCGTG | | |
| <i>hlyA</i> | hlyA-F | AACAAGGATAAGCACTGTTCTGGCT | 1177 | 3 |
| | hlyA-R | ACCATATAAGCGGTCATTCCCCTCA | | |
| <i>cnfI</i> | cnfI-F | GAACTATTAAGGATAGT | 543 | 3 |
| | cnfI-R | CATTATTTATAACGCTG | | |
| <i>satF</i> | satF-F | GTTGTCTCTGGCTGTIGC | 501 | 4 |
| | satF-R | AATGATGTTCCCTCCAGAGC | | |
| <i>mdoG</i> | mdoG-F | GCAAAGATAAAAACGATGAAATCG | 167 | 1 |
| | mdoG-R | GCTCGATCCAGAACTCTTGAAGC | | |

1) Oligonucleótidos generados en este estudio. 2) Oligonucleótidos obtenidos de la referencia de Saldaña *cols.*, 2009. 3) Oligonucleótidos obtenidos de la referencia de Tiba *cols.*, 2008. 4) Oligonucleótidos obtenidos de la referencia de Ananias *cols.*, 2008.

Las condiciones finales de los ensayos de PCR punto final (Tabla 5) se estandarizaron para cada uno de los genes de virulencia de las cepas de UPEC consideradas en este estudio. La temperatura de alineamiento fue optimizada para cada uno de los

oligonucleótidos específicos para los diferentes genes de virulencia (Tabla 6). Los amplicones fueron separados en geles de agarosa al 2.0%, teñidos con bromuro de etidio al 0.05 µg/mL y visualizados en un fotodocumentador Chemi doc.

Tabla 5. Condiciones de amplificación por PCR punto final para todos los genes de virulencia de UPEC.

| Condición | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|---------------------------|------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94 | 10 |
| 25 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94 | 1 |
| Alineamiento | *Ver tabla 6. | 1 |
| Extensión | 72 | 2 |
| Extensión final | 72 | 8 |

Tabla 6. Temperatura óptima de alineamiento de los diferentes genes de virulencia de UPEC.

| Genes | <i>csgA</i> | <i>fimH</i> | <i>bcsA</i> | <i>papF</i> | <i>hlyA</i> | <i>cnfI</i> | <i>satF</i> |
|---------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|
| Ta (°C) | 59 | 59 | 59 | 59 | 68 | 49 | 56 |

Ta: temperatura de alineamiento.

7.- Identificación fenotípica de curli por rojo Congo

Las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 fueron cultivadas en placas de agar YESCA suplementadas con rojo Congo al 3% (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) por 72 h, para determinar cualitativamente la expresión de curli. Los diferentes morfotipos coloniales producidos por las dos cepas de UPEC fueron clasificados de acuerdo a Barnhart & Chapman, 2010. A continuación se describen las características de los diferentes morfotipos que se han descrito en UPEC:

- a) Colonias rojizas, rugosas y secas: indican expresión de curli y celulosa.
- b) Colonias rosas, secas y rugosas: indican expresión de celulosa.
- c) Colonias cafés, secas y rugosas: indican la expresión de curli.
- d) Colonias blanquecinas, lisas y cremosas: indican la ausencia de la expresión de curli y celulosa.

8.- Visualización por Microscopía Electrónica de Transmisión (MET) de curli en las cepas de UPEC

La visualización de la fimbria curli se realizó por MET con el Dr. Oliver López Villegas, Jefe de la Central de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, del Instituto Politécnico Nacional (IPN). La preparación de las muestras se realizó siguiendo protocolos bien establecidos en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del HIMFG y con modificaciones sugeridas por el Dr. López. Previamente, las cepas bacterianas se cultivaron en medio YESCA por tres días a temperatura ambiente y sin agitación para promover la expresión de curli. Las rejillas de cobre (Gilder Grids Standard Square Mesh, Electron Microscopy Science; Hatfield, PA, USA) fueron recubiertas con una capa de formvar (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) de aproximadamente 60 nm, un polímero altamente adherente para poblaciones bacterianas. Brevemente, una gota de un cultivo bacteriano fue colocada sobre las rejillas por 5 min, removiendo el excedente y lavando las muestras con agua destilada. Inmediatamente, las muestras fueron teñidas negativamente con ácido fosfotúngstico al 1% (pH 7) (EMS; PA, USA) por 1 min para su visualización en un microscopio electrónico de transmisión JEM-1010 (JEOL, Tokyo, Japón) a 60 kV.

Es importante hacer énfasis que la visualización de curli por MET fue realizada en las cepas de UPEC CFT073, 529U-0712 y en las generadas en este estudio (CFT073 Δ *csgA*, CFT073*csgA*^{-/+}, 529U-0712 Δ *csgA*, 529U-0712*csgA*^{-/+}). El procedimiento empleado para la generación de las mutaciones en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 y su complementación se describe más adelante.

9.- Mutación del gen *csgA* por el método de λ -red

La mutación del gen *csgA* en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 se realizó empleando la metodología de λ -red; el cual, consiste en reemplazar el gen *csgA* con un casete de resistencia antibiótica (kanamicina o cloranfenicol) propuesto por Datsenko y Wanner, 2000. Las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 fueron transformadas primeramente con el plásmido accesorio pKD46 por electroporación a 1800 V por 5 milisegundos, utilizando el equipo ECM® 399 Electroporation System, BTX™ (Harvard Apparatus; Holliston, MA, USA). El plásmido pKD46 contiene un casete de resistencia a ampicilina y codifica para dos recombinasas (γ y β) y un inhibidor de exonucleasas (*exo*).

Por otro lado, se diseñaron oligonucleótidos específicos (M-*csgA*-F y M-*csgA*-R) con 50 bases homologas a las regiones adyacentes del gen *csgA* (Tabla 7). Estos oligonucleótidos reconocen los sitios FRT de los plásmidos pKD3 y pKD4 que contienen los casetes de resistencia a cloranfenicol y kanamicina, respectivamente. La mezcla de reacción [37 μ L de agua, 50 μ L de Master Mix, 5 μ L de cada oligonucleótido (10 pM cada uno) y 3 μ L de DNA plasmídico (100 ng/ μ L de pKD3 para casete de cloranfenicol o pKD4 para casete de kanamicina)] se realizó de acuerdo a las indicaciones del manual técnico PCR Master Mix y las condiciones de reacción para la PCR punto final se describen en la tabla 8.

Tabla 7. Oligonucleótidos empleados para la generación y confirmación de las mutantes en el gen *csgA* de las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712.

| Genes | Nombre | Secuencia 5'-3' | Fragmento (bp) | Antibiótico |
|-------------|----------|--|----------------|---------------|
| <i>csgA</i> | M-csgA-F | GTTTTACATGAAACTTTTAAAAGTAGCAGCAATTGC AGCAATCGTATTTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC | 1700 1400 | Kanamicina |
| | M-csgA-R | GCGCCCTGTTTCTTTCATACTGATGATGTATTAGTA CTGATGAGCGGTCGCATATGAATATCCTCCTTAG | | Cloranfenicol |
| <i>csgA</i> | vCsgA-F | GCCAGTATTTTCGCAAGGTGC | 788 | - |
| | vCsgA-R | GGTGTACATATCCCCTTGCTGG | | - |
| | csgBA | CGCGCGCAAGCTTTTATTAATAAATATTTCCGC | 1082 | - |
| * | M13-F | CGCCAGGGTTTTCCCAGTCACGAC | 1178 | - |
| | M13-R | TCACACAGGAAACAGCTATGAC | | - |

Oligonucleótidos generados en este estudio. *Oligonucleótidos que reconocen los sitios de la secuencia N-terminal del gen *lacZ* en los vectores pUC.

Los amplicones fueron separados en geles de agarosa al 2.0%, teñidos con bromuro de etidio al 0.05 µg/mL y visualizados en un fotodocumentador Chemi doc. Posteriormente, el DNA metilado (plásmidos) fue eliminado por digestión utilizando la enzima Dpn1 de acuerdo con el protocolo descrito en el manual técnico (Dpn1, Thermo Fisher Scientific; Waltham, MA, USA). Las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 con el plásmido pKD46 fueron crecidas en medio LB, con arabinosa 1mM y fueron transformadas con el casete cloranfenicol o kanamicina por electroporación a 1800 V por 5 milisegundos, utilizando el equipo ECM® 399 Electroporation System, BTX™. La verificación de la mutación del gen *csgA* en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712, se realizó por PCR punto final, utilizando los oligonucleótidos específicos (vCsgA-F y vCsgA-R) que flanquean al casete de resistencia, cloranfenicol o kanamicina (Tabla 7). La mezcla de reacción [3 µL de agua, 5 µL de Master Mix, 0.5 µL de cada oligonucleótido (10 pM cada uno) y 1 µL DNA genómico (20 ng/µL)] se realizó de acuerdo a las indicaciones del manual técnico PCR Master Mix. La verificación de la mutación del gen *csgA* en ambas cepas de UPEC, fue realizada por PCR punto final bajo las condiciones que se describen en

la tabla 9. Los productos generados fueron sometidos en geles de agarosa al 2.0%, teñidas con bromuro de etidio al 0.05 µg/mL y visualizados con el fotodocumentador Chemi doc.

Tabla 8. Condiciones de amplificación de los casetes de resistencia para la mutación de *csgA*.

| Condición | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|---------------------------|------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94 | 2 |
| 5 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94 | 0.5 |
| Alineamiento | 42 | 1 |
| Extensión | 72 | 2 |
| 30 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94 | 2 |
| Alineamiento | 63 | 1 |
| Extensión | 72 | 2 |
| Extensión final | 72 | 5 |

Tabla 9. Condiciones de amplificación para la verificación de mutación en el gen *csgA*.

| Condición | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|---------------------------|------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94 | 10 |
| 30 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94 | 1 |
| Alineamiento | 52 | 0.5 |
| Extensión | 72 | 2 |
| Extensión final | 72 | 7 |

10.- Restauración del gen *csgA* en cepas de UPEC CFT073Δ*csgA* y 529U-0712Δ*csgA*

La restauración del gen *csgA* en la cepa de UPEC CFT073Δ*csgA* se realizó por complementación en *trans*, utilizando el vector pUC19 clonado con el fragmento *csgBA* (pcsgBA). Primero, el fragmento *csgBA* se obtuvo a partir de la cepa de UPEC CFT073, amplificando por PCR punto final con una polimerasa recombinante (Taq DNA Polymerase, recombinant, Invitrogen; Waltham, MA USA) y usando oligonucleótidos específicos (*csgBA* y *csgAR*) que agregaron los sitios de corte para *SacI* en 5' y para *HindIII* en 3'. La mezcla de reacción [19.6 µL de agua, 5 µL de amortiguador 10X, 1.5 µL de MgCl₂, 1 µL de dNTP's (10mM cada uno) 1.2 µL de cada oligonucleótido (10 pM cada

uno), 0.5 μL *Taq* DNA polimerasa (5 U/ μL) y 20 μL DNA genómico (50 pg – 1 ug)] y las condiciones de amplificación para el ensayo de PCR se realizaron de acuerdo al manual técnico de la *Taq* DNA Polimerasa recombinante. Los amplicones obtenidos fueron teñidos con bromuro de etidio al 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y verificados en un gel de agarosa al 2.0%. Posteriormente, el fragmento de complementación *csgBA*, se purificó con glicógeno y se clonó en el vector pGEM®-T (Promega; Madison, USA), siguiendo las instrucciones del manual técnico Glycogen, molecular biology grade (Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA, USA). El plásmido resultante se denominó pGBA y fue incorporado en una cepa de *E. coli* K12 por electroporación utilizando el equipo ECM® 399 Electroporation System, BTX™, a 1800 V por 5 milisegundos. Posteriormente, para subclonar el fragmento *csgBA* en el vector de clonación pUC19, se realizó una doble digestión del pGBA y del pUC19 con las enzimas de restricción *SacI* y *HindIII*. El vector pUC19 se desfosforiló con la fosfatasa alcalina, CIAP, siguiendo las especificaciones del manual técnico (Alkaline Phosphatase, Calf Intestinal (CIAP) – Promega; Madison, USA). Para verificar las digestiones, se corrieron en geles de agarosa al 0.7% y se purificaron las bandas con el kit Zymoclean TM siguiendo el manual técnico de Zymoclean Gel DNA Recovery Kit (Zymo Research, Murphy; CA, USA). Los productos purificados se ligaron con ligasa T4 siguiendo el manual técnico Ligation Protocol with T4 DNA Ligase (Ipswich, USA). La mezcla de reacción para la doble digestión, se resume en la tabla 10.

Tabla 10. Mezcla de reacción para doble digestión.

| Reactivo | Volumen (μL) |
|---------------------------|---------------------------|
| Agua | 4 |
| Amortiguador 10X | 1 |
| <i>HindIII</i> | 2 |
| <i>SacI</i> | 1 |
| pGEM®-T o producto de PCR | 2 |

| | |
|-------|----|
| TOTAL | 10 |
|-------|----|

El plásmido resultante se denominó p*csgBA* y se transformó en la cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA* por electroporación utilizando el equipo ECM® 399 Electroporation System, BTX™, a 1800 V por 5 milisegundos. La verificación de la transformación se realizó por PCR punto final con los oligonucleótidos específicos M13 (Tabla 7), que flanquean el sitio de clonación múltiple del pUC19. La mezcla de reacción [3 μ L de agua, 5 μ L de Master Mix, 0.5 μ L de cada oligonucleótido (10 pm cada uno) y 1 μ L DNA genómico (20 ng/ μ L)] se realizó según las indicaciones del manual técnico PCR Master Mix. Las condiciones finales de los ensayos de PCR fueron estandarizadas para la verificación de la complementación y se muestran en la tabla 11. Los amplicones fueron teñidos con bromuro de etidio 0.05 μ g/mL y se verificaron en un gel de agarosa al 0.7%.

Tabla 11. Condiciones de amplificación para la verificación de la complementación en *trans*.

| Condición | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|---------------------------|------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94 | 10 |
| 30 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94 | 0.5 |
| Alineamiento | 56 | 1 |
| Extensión | 72 | 3 |
| Extensión final | 72 | 6 |

La restauración del gen *csgA* en la cepa clínica 529U-0712 Δ *csgA* se realizó por complementación en *cis*, utilizando el fragmento del gen *csgA* con 100 bp río arriba y 100 bp río abajo, utilizando una polimerasa de alta fidelidad (*Pfu* DNA Polymerase, Thermo

Scientific; Waltham, MA USA). La mezcla de reacción de PCR [25 μ L de agua, 5 μ L de amortiguador 10X *Pfu* sin MgSO₄, 8 μ L de MgSO₄, 5 μ L de dNTP's (2 mM cada uno) 2 μ L de cada oligonucleótido (10 μ M cada uno), 1 μ L *Pfu* DNA polimerasa (2.5 U) y 2 μ L DNA genómico (50 pg – 1 ug)] y las condiciones de amplificación se realizaron de acuerdo a las indicaciones del manual técnico de *Pfu* DNA Polimerasa. Los amplicones obtenidos fueron separados en un gel de agarosa al 2.0%, teñidos con bromuro de etidio al 0.05 μ g/mL y visualizados en el fotodocumentador Chemi doc. El producto de PCR fue purificado utilizando glicógeno (Glycogen, molecular biology grade, Thermo Fisher Scientific; Carlsbad, CA, USA) y fue utilizado para realizar la transformación de la cepa clínica de UPEC 529U - 0712 Δ *csgA*. En esta cepa se incorporó el plásmido pKD46 por electroporación utilizando el equipo ECM® 399 Electroporation System, BTX™, a 1800 V por 5 milisegundos. La verificación de la complementación de la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA*, se realizó aislando colonias puras en placas suplementadas con rojo Congo (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) y con ampicilina. Las colonias obtenidas con el morfotipo rojo y rugoso se verificaron por PCR de punto final, utilizando una mezcla de reacción [4 μ L de agua, 5 μ L de Master Mix, 0.5 μ L de cada oligonucleótido (10 μ M cada uno) y 1 colonia bacteriana] de acuerdo a las indicaciones del manual técnico PCR Master Mix (Tabla 7). Mientras, las condiciones finales de los ensayos de PCR fueron estandarizadas para la verificación óptima (Tabla 12). Los amplicones fueron teñidos con bromuro de etidio 0.05 μ g/mL y se verificaron en un gel de agarosa al 0.7%.

Tabla 12. Condiciones de amplificación para la verificación de complementación en *cis*.

| Condición | Temperatura (°C) | Tiempo (min) |
|---------------------------|------------------|--------------|
| Desnaturalización inicial | 94 | 10 |

| | | |
|-------------------|----|-----|
| 30 ciclos de: | | |
| Desnaturalización | 94 | 0.5 |
| Alineamiento | 56 | 1 |
| Extensión | 72 | 3 |
| Extensión final | 72 | 6 |

11.- Ensayo de RT-PCR

Las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 fueron cultivadas en medio YESCA por tres días a temperatura ambiente y sin agitación. La transcripción del gen *csgA* se verificó por ensayos de RT-PCR, utilizando oligonucleótidos específicos (RT-CsgA y CsgA-R) (Tabla 7). La mezcla de reacción de RT-PCR y las condiciones de amplificación se realizaron siguiendo las indicaciones del manual técnico de QIAGEN OneStep RT-PCR Kit (Qiagen; Austin, Texas, USA). Brevemente, se usó la siguiente mezcla de reacción: 15 µL de agua, 5 µL de amortiguador 5X QIAGEN OneStep RT-PCR, 1 µL de mix de dNTP's, 0.5 µL de cada oligonucleótido (10 pM cada uno), 1 µL de mix de QIAGEN OneStep RT-PCR Enzyme Mix y 1-2 µL DNA genómico (60 ng). Los productos generados se sometieron en geles de agarosa al 2.0%, se tiñieron con bromuro de etidio al 0.05 µg/mL y se visualizaron con el fotodocumentador Chemi doc.

12.- Ensayos de adherencia e invasión

La línea celular de vejiga ATCC® HTB-5 se utilizó para realizar los ensayos de adherencia e invasión. Las células de vejiga se cultivaron en medio EMEM suplementado con 10 % de SFB en frascos para cultivo celular (Corning; NY, USA).

Ensayos de adherencia: Las células de vejiga HTB-5 se propagaron en placas de 24 pozos hasta alcanzar un confluencia del 80%. El medio EMEM fue retirado de las monocapas de las células, lavadas tres veces suavemente con PBS 1X e infectadas con 1×10^8 bacterias en

medio EMEM fresco sin suero fetal bovino. Previamente, las cepas de UPEC fueron cultivadas en medio Yesca por 3 días sin agitación para promover la expresión de curli. Las monocapas contenidas a las cepas de UPEC se incubaron a 37°C por 3 h con 5% de CO₂. Después de este tiempo de infección las monocapas de células conteniendo al crecimiento bacteriano de nuestro conjunto de cepas, se lavaron tres veces suavemente con PBS 1X y se emplearon para su análisis cuali- y cuantitativo.

Análisis cualitativo. Las monocapas de células HTB-5 se propagaron sobre cubreobjetos contenidos en una placa de 24 pozos (Corning; NY, USA), se infectaron con el conjunto de cepas de UPEC y se fijaron con formol al 4% (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) durante toda la noche. El fijador se removió de las monocapas infectadas, se lavaron tres veces con PBS 1X y se tiñeron con Giemsa al 1% (Sigma-Aldrich; Saint Louis, MO, USA) por una hora. Posteriormente, los cubreobjetos conteniendo las monocapas infectadas y teñidas se montaron con resina (Cytoseal™ XYL, Richard-Allan Scientific™, Waltham, MA USA) sobre portaobjetos. Los patrones de adherencia potenciales se visualizaron y analizaron utilizando un microscopio Microscopio Axio Imager.M2 (Carl Zeiss, GER).

Análisis cuantitativo. Para este análisis se utilizó el mismo procedimiento que en el análisis cualitativo aunque con algunas modificaciones. La propagación de las células HTB-5 se realizó en placas de 24 pozos sin cubreobjetos, la infección se realizó por tres horas, se lavaron tres veces con PBS estéril y se recuperaron adicionando en cada pozo 1mL de PBS con tritón X-100 al 0.1% por 10 min. Las células se homogeneizaron y diluciones seriadas 1:10 en PBS estéril se realizaron para cultivar 10 µL de cada dilución en placas de LB por triplicado a 37°C durante toda la noche. Las unidades formadoras de colonias (CFUs) se analizaron con el software GraphPad Prism 6, mediante la prueba t de Student y las

diferencias estadísticas se consideraron significativas para $p < 0.05$. Los ensayos de adherencia se realizaron por triplicado en tres tiempos diferentes.

Ensayos de invasión: Los ensayos de invasión se realizaron de acuerdo al mismo procedimiento que se empleó en los ensayos de adherencia. Brevemente, las células de vejiga fueron infectadas con 1×10^8 bacterias en medio EMEM fresco sin suero fetal bovino y con un tiempo de incubación de 3 horas a 37°C en 5% de CO_2 . Las monocapas de células conteniendo al crecimiento bacteriano se lavaron tres veces suavemente con PBS 1X, se trataron con 1mL de Gentamicina (Schering-Plough Pharmaceuticals, Kenilworth, NJ, USA) 50 mg/mL e incubaron a 37°C por 1 h en 5% de CO_2 . La Gentamicina se removió de las monocapas y se lavaron tres veces nuevamente con PBS estéril para su análisis cuali- y cuantitativo como se ha descrito en la sección de los ensayos de adherencia.

RESULTADOS

1.- Selección de cepas bacterianas

En el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del HIMFG, se ha seleccionado un conjunto de cepas clínicas de UPEC aisladas de pacientes con ITUs, caracterizadas por presentar un perfil de multiresistencia a varios grupos de antibióticos (Datos no publicados). A partir del perfil de sensibilidad de una colección de 200 cepas clínicas de UPEC, se seleccionaron cepas sensibles a tres antibióticos: ampicilina, kanamicina y cloranfenicol. La finalidad de seleccionar cepas clínicas de UPEC con estas características, es porque el sistema de mutación implementado en este estudio, utiliza plásmidos de recombinación con resistencia a ampicilina, kanamicina y cloranfenicol; por lo tanto, cepas clínicas de UPEC resistentes a estos antibióticos, no serían cepas candidatas para realizar la mutación del gen *csgA* por el sistema λ -red. Es importante hacer énfasis, que el conjunto de cepas clínicas de UPEC mostraron un perfil de multiresistencia a un amplio grupo de antibióticos: betalactámicos, cefalosporinas de primera generación, quinolonas y tetraciclinas. Bajo este criterio, únicamente identificamos a dos cepas clínicas de UPEC (529U-0712 y 63U2-0512) sensibles a ampicilina, cloranfenicol y kanamicina. La cepa clínica de UPEC 529U-0712 fue seleccionada y se utilizó para determinar la función de curli en un sistema *in vitro* empleando células HTB-5 debido a que presentó mayor expresión de curli respecto a la cepa 63U2-0512. Así mismo, la cepa de UPEC CFT073 O6:K2:H1 también se utilizó para evaluar y comparar la participación de curli a través de ensayos de adherencia e invasión a células HTB-5. Previamente, se determinó la presencia de siete genes de virulencia (*csgA*, *fimH*, *papG*, *bcsA*, *hlyA*, *cnfI* y *satF*) en las cepas de

UPEC 529U-0712 y CFT073 por ensayos de PCR punto final. En la tabla 13 se muestra un resumen de la presencia de la distribución de los diversos genes en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 que fueron incluidos en este estudio.

Tabla 13. Resistencia antimicrobiana, tipificación y análisis fenotípico de las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712.

| Cepa | Antimicrobianos | | | Genes de UPEC | | | | | | Producción de curli | | |
|------------------|-----------------|----|----|---------------|-------------|-------------|-------------|-------------|-------------|---------------------|-----|-----|
| | Am | Cm | Km | <i>csgA</i> | <i>fimH</i> | <i>papG</i> | <i>bcsA</i> | <i>hlyA</i> | <i>cnfI</i> | <i>SatF</i> | RC | MET |
| CFT073 | S | S | S | + | + | + | + | + | - | + | + | + |
| 529U-0712 | S | S | S | + | + | + | + | - | - | - | +++ | +++ |

S: Sensible Am: Ampicilina Cm: Cloranfenicol Km: Kanamicina MET: Microscopía Electrónica de Transmisión

+: Baja fijación de rojo Congo (RC) y baja presencia de fibras amiloideas.

+++ : Alta fijación de RC y presencia de abundantes fibras amiloideas.

Brevemente, la cepa de UPEC CFT073 mostró la presencia únicamente de seis genes (*csgA*, *fimH*, *papG*, *bcsA*, *hlyA* y *satF*) y la ausencia del gen *cnfI*; mientras, la cepa clínica de UPEC 529U-0712, mostró la presencia de cuatro genes (*csgA*, *fimH*, *papG* y *bcsA*) y la ausencia de tres genes (*hlyA*, *cnfI* y *satF*), como se describe en la tabla 13.

2.- Generación de mutantes en el gen *csgA* en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712

La mutación por reemplazo con el casete que codifica para la resistencia a un antibiótico del gen *csgA* en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712, se realizó por recombinación homóloga de acuerdo al método descrito por Datsenko & Wanner en el año 2000. El reemplazamiento del gen *csgA* en la cepa de UPEC CFT073 por el casete de kanamicina mostró un producto de 1.7 Kb y en la cepa clínica de UPEC 529U-0712 el reemplazamiento por el casete de cloranfenicol mostró un producto de 1.2 Kb (Figura 8). Las mutantes

generadas fueron verificadas por PCR punto final utilizando oligonucleótidos específicos. Es importante hacer énfasis, que la mutación del gen *csgA* se realizó varias veces con los casetes de cloranfenicol y/o kanamicina; por esta razón, las dos mutantes generadas en este estudio mostraron distintas resistencias antimicrobianas; la cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA* resistencia a kanamicina y la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA* resistencia a cloranfenicol.

3.- Complementación de mutantes en el gen *csgA* en las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*

La complementación de las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*, fue complicada; sin embargo, se emplearon dos métodos para la restauración del gen *csgA*, con el plásmido *pcsgBA* para la cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA* y a nivel de cromosoma para la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA*. Para restaurar la función de curli en la cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA*, se incorporó el plásmido *pcsgBA*; incluyendo el promotor mínimo localizado en el inicio del operón *scgBAC*. La cepa de UPEC CFT073 complementada se denominó como CFT073*csgA*^{-/+}. La cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA*, con el plásmido *pcsgBA* incorporado, no mostró restauración de las fibras de curli, posiblemente debido a incompatibilidad entre plásmidos. La segunda estrategia para complementación de la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA*, fue insertar el gen (fragmento) *csgA* a nivel de cromosoma a través de la amplificación por PCR y por recombinación homóloga. Bajo este sistema se obtuvo exitosamente la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA* complementada con el gen *csgA*. Posteriormente, la restauración de *csgA* se corroboró por PCR punto final, utilizando oligonucleótidos específicos (Figura 8). La cepa clínica de UPEC 529U-0712 complementada se denominó como 529U-0712*csgA*^{-/+}.

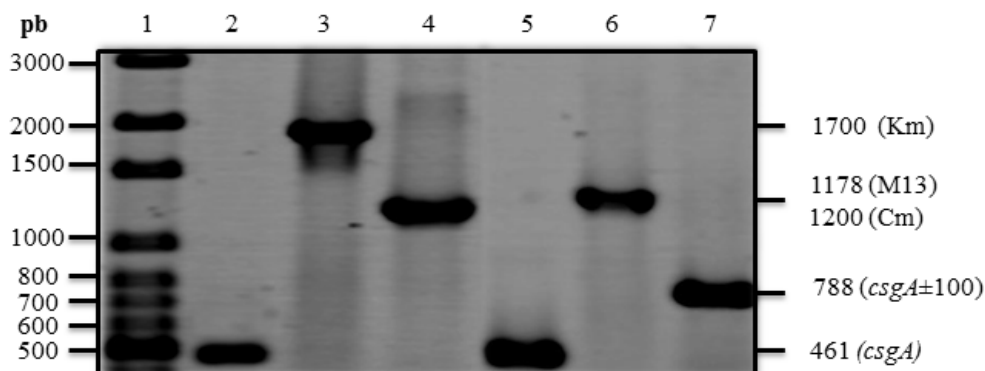


Figura 8. Verificación de mutantes del gen *csgA* por PCR punto final: Carril 1: marcador de peso molecular (MPM). 2) Amplicón del gen *csgA* de la cepa de UPEC CFT073. 3) Amplicón del casete de kanamicina en la cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA*. 4) Amplicón del gen *csgA* con oligonucleótidos M13 en la cepa de UPEC CFT073*csgA*^{-/+}. 5) Amplicón del gen *csgA* de la cepa clínica de UPEC 529U-0712. 6) Amplicón del casete de cloranfenicol en la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA*. 7) Amplicón del gen *csgA* con oligonucleótidos *vcsgA* en la cepa clínica de UPEC 529U-0712*csgA*^{-/+}.

4.- Análisis fenotípico de la fimbria curli por fijación de rojo Congo

Para la expresión fenotípica de la fimbria curli, el conjunto de cepas generadas y seleccionadas en este estudio se cultivaron en placas de YESCA suplementadas con rojo Congo al 3%. La cepa de UPEC CFT073 a pesar de conservar el gen de *csgA*, mostró una baja fijación de rojo Congo, con un crecimiento de colonias rosas y poco rugosas; sugiriendo, una baja expresión de curli. La cepa clínica de UPEC 529U-0712 mostró una alta fijación de rojo Congo, visualizada como colonias rojas, rugosas y secas; sugiriendo, una alta expresión de curli. Las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA* produjeron colonias blanquecinas, lisas y brillosas debido a la ausencia de las fibras amiloideas. Por otro lado, las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+}, mostraron un morfotipo colonial rojo, rugoso y seco; el cual, indica la restauración de la fimbria curli (Figura 9).

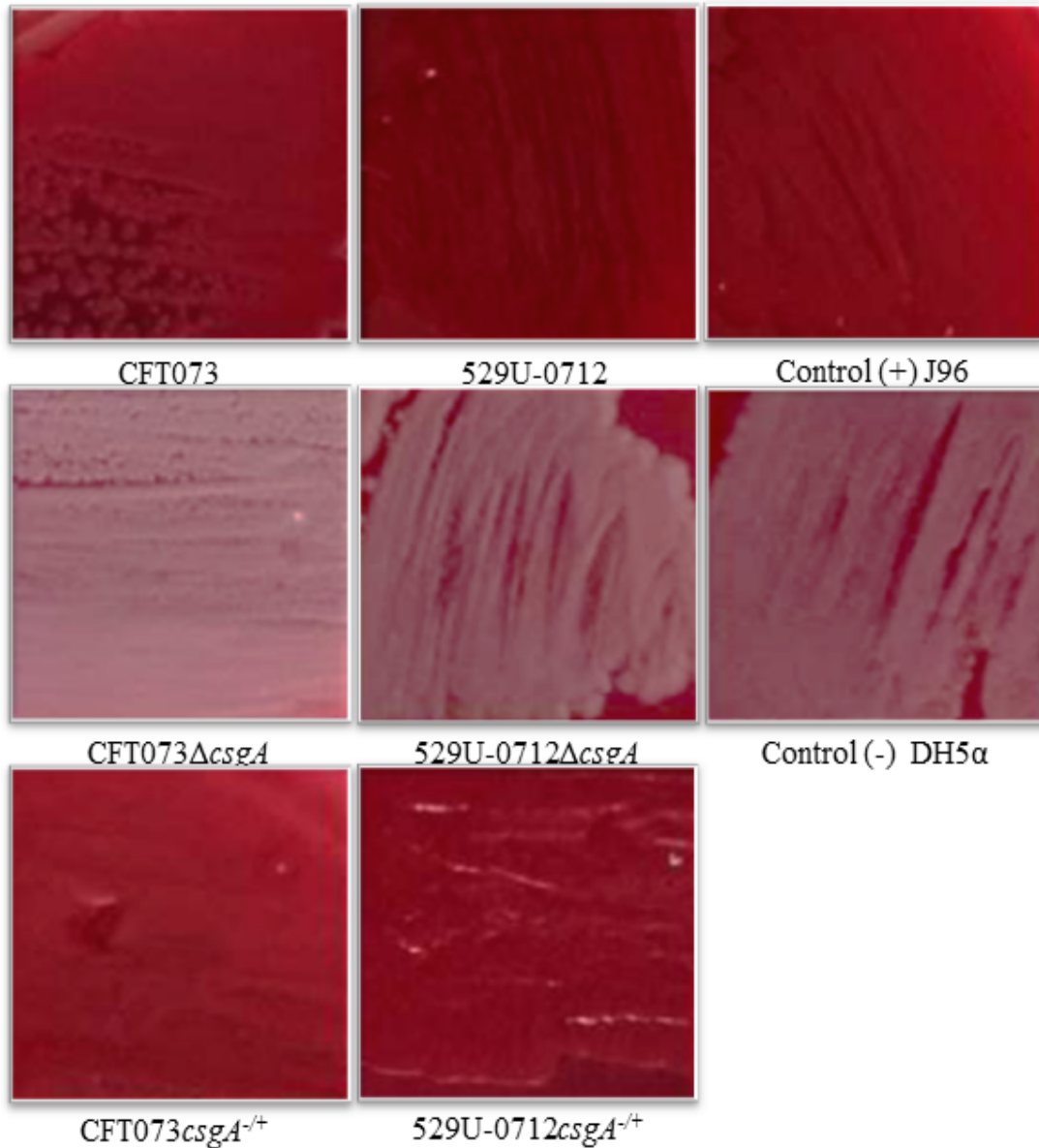
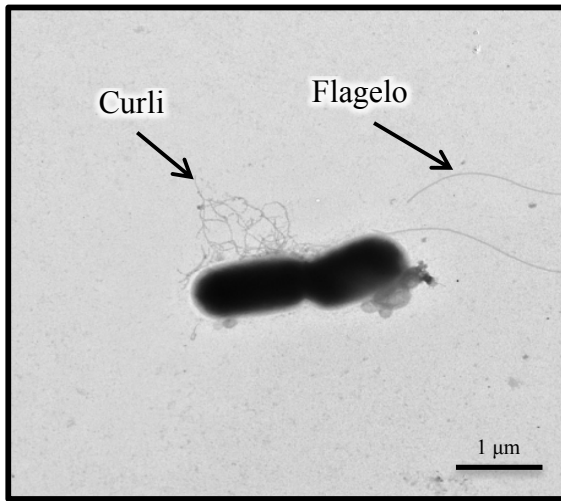


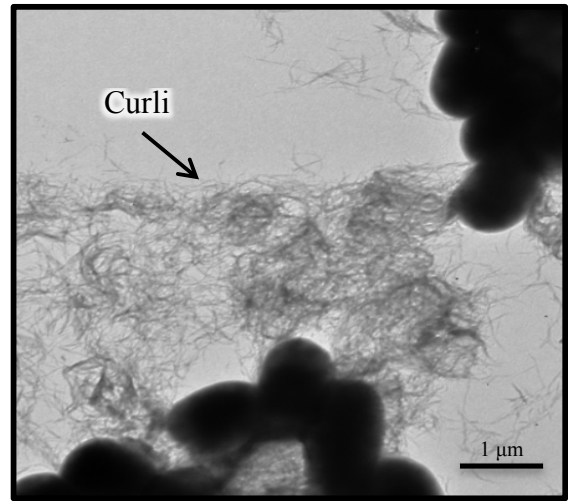
Figura 9. Fijación de rojo Congo para la identificación de curli en cepas de UPEC. La cepa de UPEC CFT073 mostró una coloración rosada débil, indicando una baja expresión de curli. La cepa clínica de UPEC 529U-0712 mostró una tonalidad rojiza oscura, indicando una alta producción de curli. Las cepas de UPEC CFT073ΔcsgA y 529U-0712ΔcsgA mostraron un morfotipo colonial blanquecino, liso y brillante; el cual, es indicativo de la ausencia de curli. Las cepas de UPEC CFT073csgA^{-/+} y 529U-0712csgA^{-/+}, mostraron colonias rojas, rugosas y secas; las cuales, indican la restauración del gen *csgA* y por lo tanto, la producción de las fibras amiloideas.

5.- Visualización de curli por MET

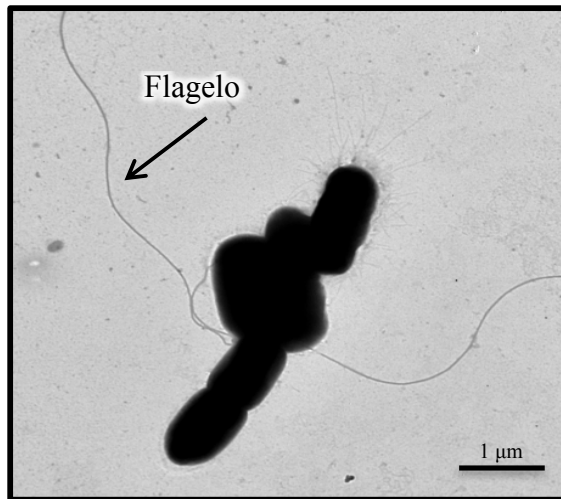
Para la visualización de curli por MET, primero las cepas fueron cultivadas bajo condiciones nutricionales donde esta fimbria es expresada. Es importante hacer énfasis, que se probaron diversas condiciones nutricionales de crecimiento para la expresión de curli, tales como: cultivo bacteriano en caldo YESCA por 12 h. a 37°C con baja producción de curli; crecimiento bacteriano en medio precondicionado por tres días a 37°C con una nula expresión de curli y crecimiento bacteriano en monocapa de células HTB-5 por tres días a 37°C, con 5% de CO₂ con una nula expresión de las fibras de curli. Interesantemente, se obtuvo una alta producción de curli cuando las cepas se cultivaron en caldo YESCA por 3 días, sin agitación y a temperatura ambiente. Estas condiciones fueron importantes para el crecimiento bacteriano y la visualización de curli por ensayos de MET; así como, para la realización de los ensayos de adherencia e invasión. Las micrografías obtenidas de la cepa de UPEC CFT073, mostraron una baja presencia de curli; mientras, la cepa clínica de UPEC 529U-0712 mostró abundantes fibras rizoides, estructuras características de curli (Figura 10). Las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA* no mostraron una producción de estructuras finas y en forma de rizos; por lo tanto, la ausencia de las estructuras fibrilares de curli. Mientras, las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+} mostraron estructuras en forma de rizos, finas y amorfas, indicando la producción de la fimbria curli. Con estos estudios confirmamos la restauración del gen *csgA* en las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA* (Figura 10).



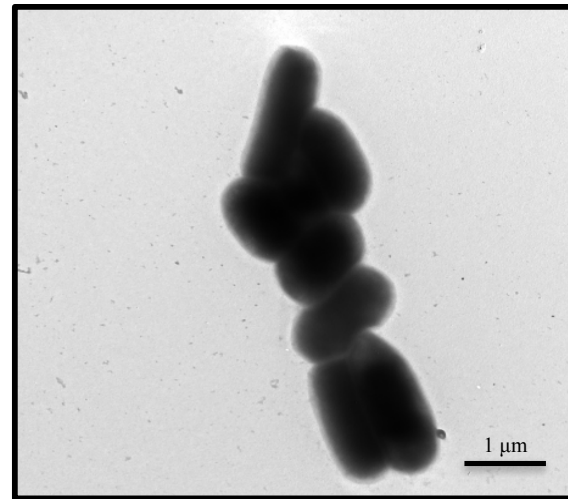
CFT073



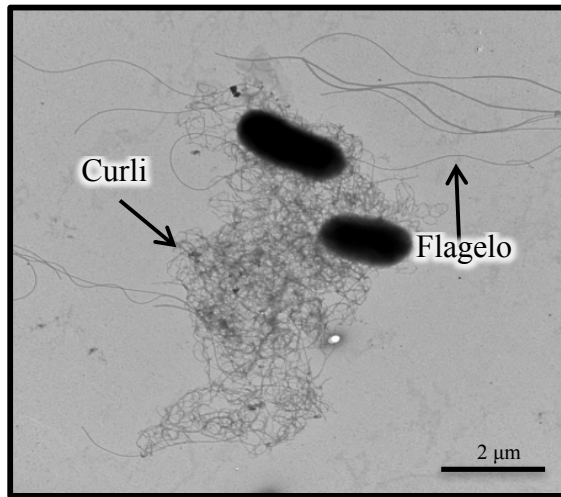
529U-0712



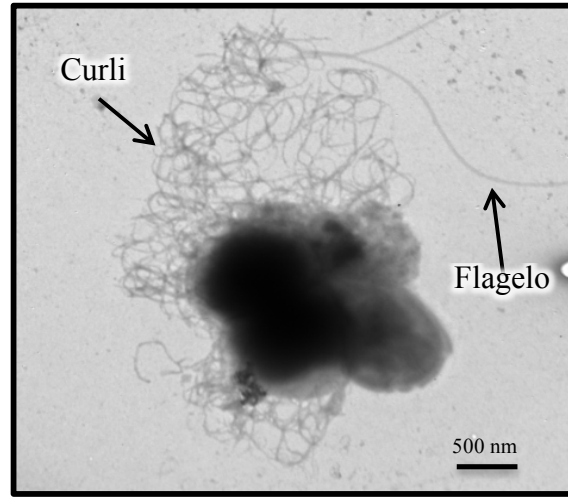
CFT073Δ*csgA*



529U-0712Δ*csgA*



CFT073*csgA*^{-/-}



529U-0712*csgA*^{-/+}

Figura 10. Identificación de curli por MET. La cepa de UPEC CFT073 mostró una baja cantidad de fibras rizoides; mientras, la cepa clínica de UPEC 529U-0712 mostró abundantes estructuras fibrilares finas y delgadas sugiriendo la presencia de curli. Las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA* no mostraron fimbrias delgadas y finas; sugiriendo la ausencia de curli. Las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+} mostraron nuevamente la presencia de fibras amiloideas y delgadas características de curli; estos datos indican la restauración de la fimbria curli. Las micrografías de las cepas de UPEC CFT073, 529U-0712, CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA* se tomaron a 20000X. La cepa de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} se tomó a 12000X y la cepa clínica de UPEC 529U-0712*csgA*^{-/+} a 30000X.

6.- Transcripción de *csgA* en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 por RT-PCR

La presencia o ausencia del gen *csgA* en la colección de cepas seleccionadas y generadas, se verificó por ensayos de RT-PCR. El gen constitutivo *mdoG* que participa en la síntesis de la pared celular se utilizó como control de transcripción. La presencia de mRNA que codifica para *csgA* se identificó en las cepas de UPEC CFT073, CFT073*csgA*^{-/+}, 529U-0712 y 529U-0712*csgA*^{-/+}; mientras, una ausencia de mRNA se observó en las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*. El gen *mdoG* de 167pb se identificó en todas las cepas, mostrando diferentes niveles de transcripción. Los controles negativos, se utilizaron para corroborar que el RNA extraído de las diferentes cepas estaban libres de DNA genómico (Figura 11).

7.- Ensayos de adherencia de cepas de UPEC a células de vejiga HTB-5

Los ensayos de adherencia analizados cualitativamente a las tres horas de infección en células de vejiga HTB-5, mostraron que la cepa clínica de UPEC 529U-0712 presentó una mayor adherencia comparada con la cepa de UPEC CFT073. Las fotografías mostraron cúmulos de bacterias en las células HTB-5 infectadas con la cepa clínica de UPEC 529U-0712; mientras, las células HTB-5 infectadas con la cepa de UPEC CFT073 mostraron

bacterias dispersas. Las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*, mostraron una disminución en los niveles de adherencia, comparando con las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712, respectivamente. Interesantemente, las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+} mostraron una restauración en los niveles de adherencia, similar a la adherencia observada en las cepas silvestres. Las fotografías mostraron nuevamente cúmulos de bacterias alrededor de las células, siendo aún más abundantes en la cepa clínica de UPEC 529U-0712*csgA*^{-/+}. Es importante mencionar, que las células HTB-5 infectadas con las cepas clínicas de UPEC 529U-0712 y 529U-0712*csgA*^{-/+}, mostraron pérdida del citoplasma celular; mientras, las células HTB-5 infectadas con la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA* no presentaron esta pérdida o disminución de citoplasma (Figura 12). Para corroborar estos resultados, se realizó el análisis cuantitativo a través del conteo de UFCs; el cual, mostró que los cambios en los niveles de adherencia son estadísticamente significativos ($p < 0.05$) (Figura 13).

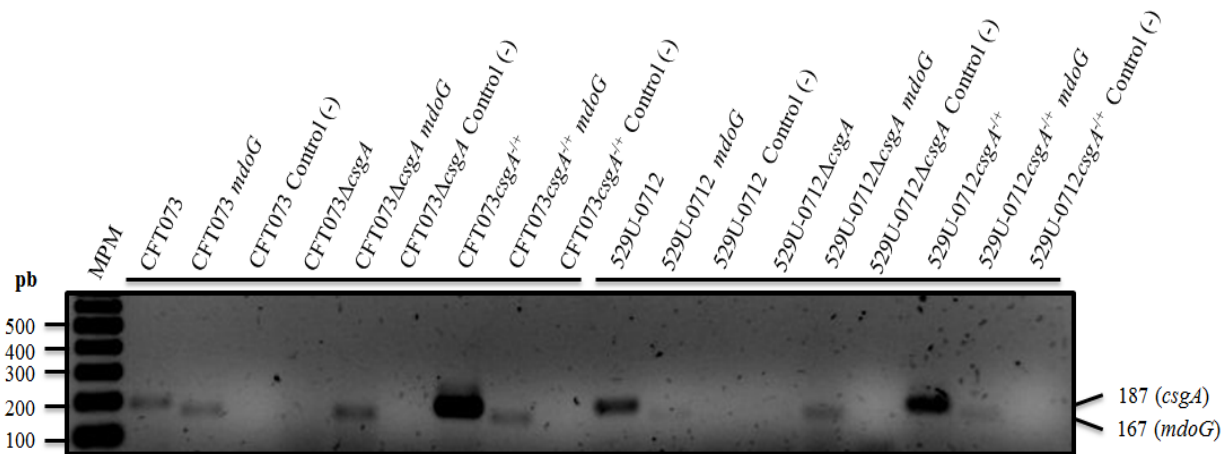


Figura 11. Evaluación de la transcripción del gen *csgA* por RT-PCR. El mRNA que codifica para *csgA* se identificó en las cepas de UPEC CFT073, CFT073*csgA*^{-/+}, 529U-0712 y 529U-0712*csgA*^{-/+}. Mientras, el gen *csgA* estuvo ausente en las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*. El mRNA que codifica para *mdoG*, se presentó en

todas las cepas con diferentes niveles de transcripción. Los controles negativos, corroboraron que el RNA extraído no contenía de DNA genómico.

8.- Ensayos de invasión de cepas de UPEC a células de vejiga HTB-5

Los resultados del análisis cualitativo de los ensayos de invasión en células de vejiga HTB-5, mostraron una mayor capacidad de invasión de la cepa clínica de UPEC 529U-0712 comparando con la cepa de UPEC CFT073. Por otro lado, la cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA* presentó una mayor cantidad de bacterias adheridas, comparando con la cepa isogénica silvestre; mientras, la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA* mostró una disminución significativa en la capacidad de invasividad. Las fotografías tomadas por microscopía de luz de las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+} indicaron una restauración en los niveles de invasión, similar al proceso de invasión que se observó en las cepas silvestres (Figura 14). El análisis cuantitativo se realizó a través del conteo de UFCs; el cual, mostró que las diferencias observadas en el análisis cualitativo, son estadísticamente significativas (Figura 15).

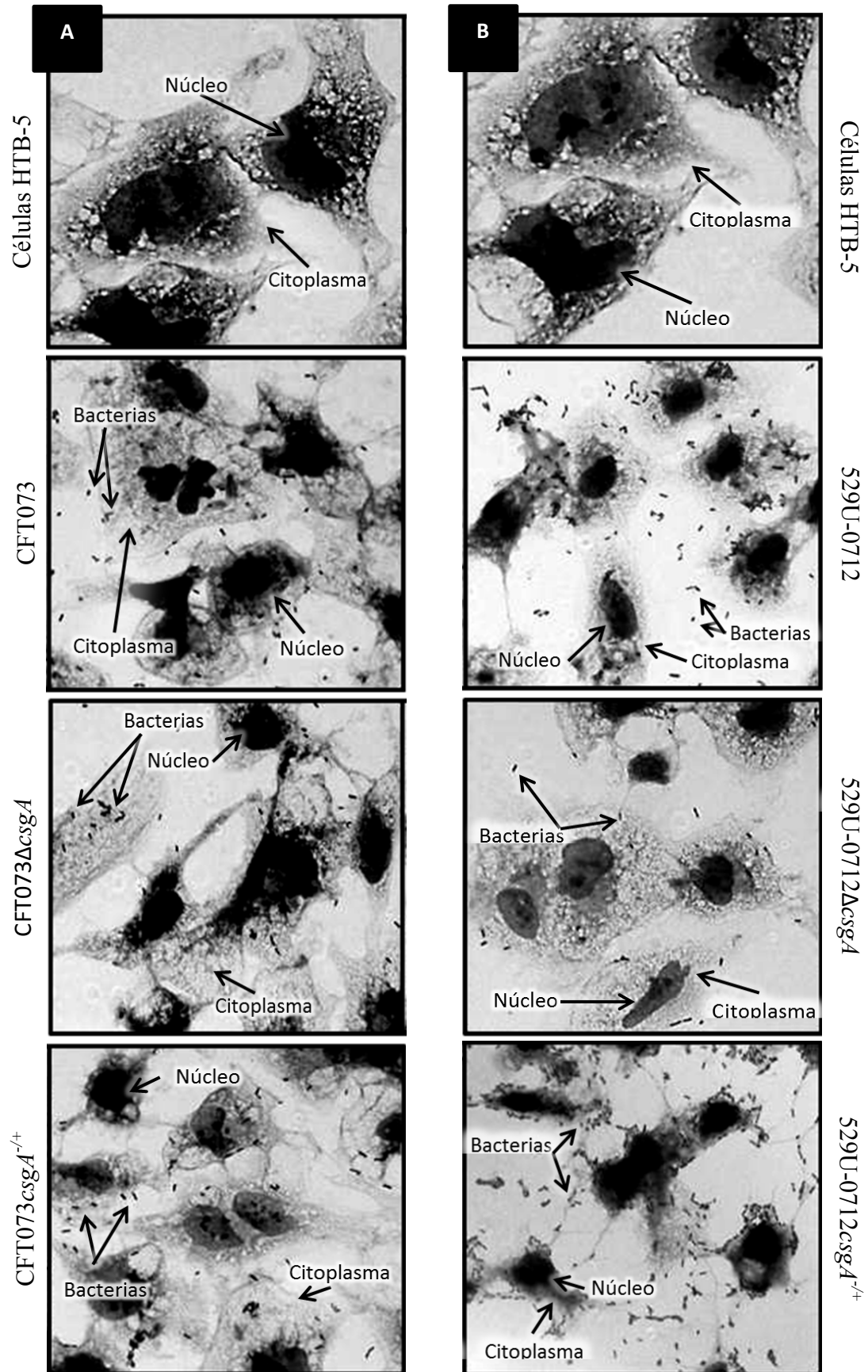


Figura 12. Análisis fenotípico de los ensayos de adherencia. Después de tres horas de infección, las células conteniendo nuestra colección de cepas se tiñieron con Giemsa al 1%. A) Control de células HTB-5 sin infectar, CFT073, CFT073 Δ *csgA* y CFT073*csgA*^{-/+}. B) Control de células HTB-5 sin infectar, 529U-0712, 529U-0712 Δ *csgA* y 529U-0712*csgA*^{-/+}. Las muestras se visualizaron por microscopía de luz a 63X.

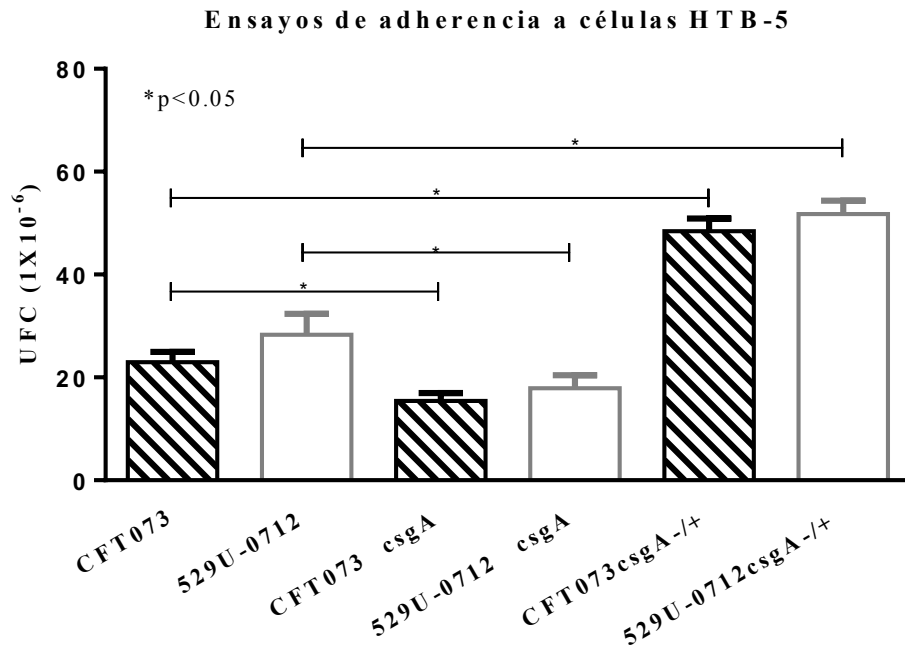


Figura 13. Análisis cuantitativo de los ensayos de adherencia. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba paramétrica *t* de student, considerando un valor de $p < 0.05$ como un valor significativo. Una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) se observó en los niveles de adherencia en las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*, con respecto a las cepas silvestres. Las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+} mostraron una restauración del fenotipo, con incremento significativo ($p < 0.05$) en los niveles de adherencia cuando se comparan con los valores de las cepas silvestres.

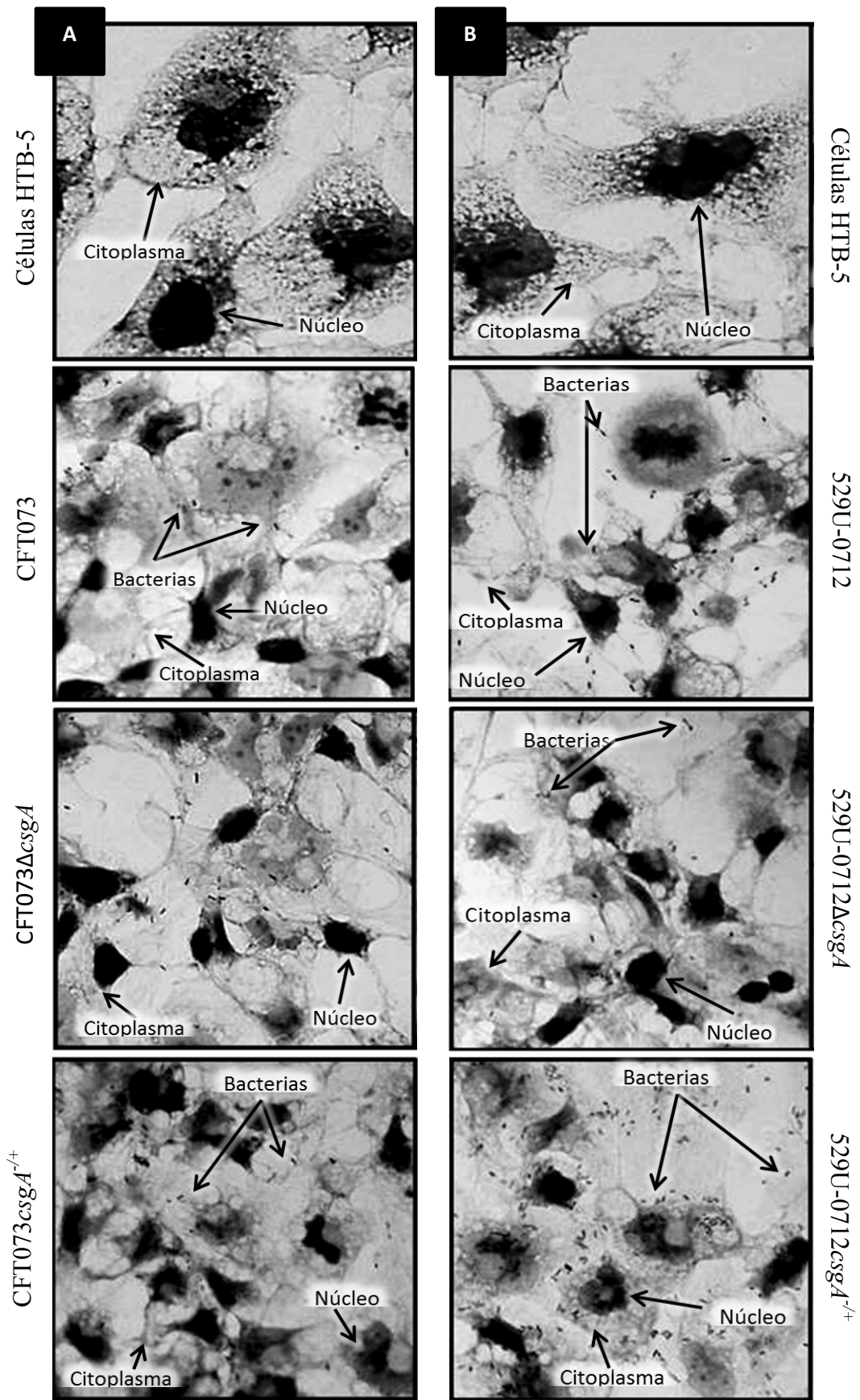


Figura 14. Análisis fenotípico de los ensayos de invasión. Después de tres horas de infección, las células conteniendo nuestra colección de cepas se tiñieron con Giemsa al 1%. A) Control de células HTB-5 sin infectar, CFT073, CFT073 Δ *csgA*, CFT073*csgA*^{-/+}. B) Control de células HTB-5 sin infectar, 529U-0712, 529U-0712 Δ *csgA*, 529U-0712*csgA*^{-/+}. Las muestras se visualizaron por microscopía de luz a 63X.

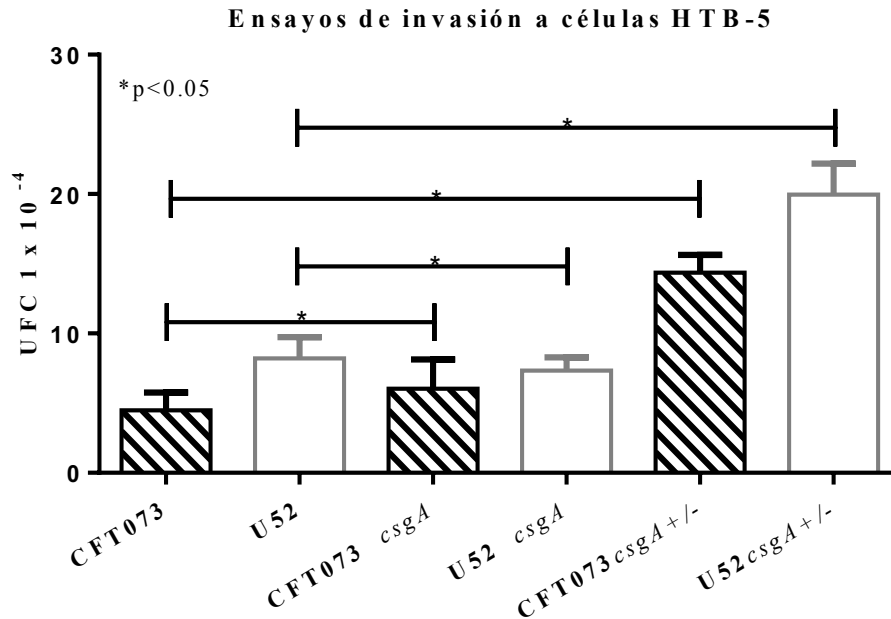


Figura 15. Análisis cuantitativo de los ensayos de invasión. El análisis de los datos se realizó mediante la prueba paramétrica *t* de student, considerando un valor de $p < 0.05$ como un valor significativo. La cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA* mostró un incremento estadísticamente significativo ($p < 0.05$) en los niveles de invasión con respecto a la cepa silvestre; mientras, la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA* mostró una disminución estadísticamente significativa ($p < 0.05$) en los niveles de invasión con respecto a su silvestre isogénica. Las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+} mostraron una restauración del fenotipo, incrementado significativamente ($p < 0.05$) el proceso de invasión comparando con los niveles de invasión observados en las cepas silvestres.

DISCUSIÓN

E. coli uropatogénica es un patógeno nosocomial de gran importancia, y en el HIMFG se ha considerado como el segundo patógeno más aislado (después de *Staphylococcus coagulasa* negativo) en muestras de orina, sangre y otros fluidos biológicos (López-Martínez *et al.* 2013). UPEC ha sido identificado en más del 80% en aislados de urocultivos (López-Martínez *et al.* 2013). En los últimos años, cepas clínicas de UPEC han mostrado un incremento en la resistencia a diversos grupos de antibióticos, perfil de multirresistencia comúnmente llamado “MDR” (Adamus-Bialek *et al.* 2013; Lloyd *et al.* 2007; López-Martínez *et al.* 2013). Las cepas clínicas de UPEC MDR, representan un problema de salud de gran relevancia, ya que limita las opciones de tratamiento para pacientes con ITUs.

Este estudio se enfocó en elucidar como UPEC a través de la expresión de curli coloniza a células HTB-5 (Lim *et al.* 2014; Barnhart & Chapman 2010; Johansson *et al.* 2001). Para evaluar la función de curli como una adhesina, se realizó una mutación por reemplazamiento por un casete de kanamicina y/o cloranfenicol utilizando el plásmido pKD46 (contiene el casete de ampicilina) mediante el sistema λ -red. Es importante hacer énfasis, que el Laboratorio de Bacteriología Intestinal del HIMFG, se ha enfocado en caracterizar los perfiles de multirresistencia de un conjunto de cepas clínicas de UPEC, aisladas de pacientes pediátricos con ITUs. Datos preliminares, han mostrado un perfil de MDR a un amplio grupo de antibióticos: <70% de las cepas clínicas de UPEC son resistentes a β -lactámicos, <82% a tetraciclinas y <65 % a inhibidores de ácido fólico (Ochoa *et al.* datos en proceso de publicación). La presencia de un perfil alto de MDR en cepas clínicas fue una barrera importante para seleccionar cepas sensibles de UPEC a

kanamicina, cloranfenicol y ampicilina. Bajo este criterio, únicamente se identificaron dos cepas clínicas de UPEC, 529U-0712 y 63U2-0512. En 2013, se reportó un incremento en la resistencia a un amplio grupo de cefalosporinas, fluoroquinonas y aminoglucósidos en cepas clínicas de UPEC aisladas en la Universidad Médica de Lodz, Polonia (Adamus-Bialek *et al.* 2013). En 2011, otro estudio describió que 30.2% de cepas de UPEC aisladas de hospitales de la ciudad de México presentaron multiresistencia a diversos antibióticos, como: ampicilina, fluoroquinonas, piperaciclina y trimetoprima /sulfametoxazol (Molina-López *et al.* 2011).

La transferencia horizontal de genes, ha diversificado la presencia de diversos factores de virulencia en las cepas clínicas de UPEC, confiriéndole la capacidad de colonizar y persistir en el tracto urinario (Asadi *et al.* 2014; Lloyd *et al.* 2007; López-Martínez *et al.* 2013; Oelschlaeger *et al.* 2002). Varios factores de virulencia se han descrito en UPEC, tales como: adhesinas fimbriales (FimH, PapG y CsgA), autotransportadores (SatF) y toxinas (HlyA). El análisis genotípico de la cepa clínica de UPEC 529U-0712 (aislada de un paciente pediátrico con ITU no complicada) incluida en este estudio, presentó los genes que codifican para las proteínas BcsA, FimH, PapG y CsgA. La presencia de varios factores de virulencia en cepas de UPEC contribuyen a la permanencia y virulencia bacteriana para colonizar diferentes sitios anatómicos (Zdziarski *et al.* 2008; Paul *et al.* 2013; Mabbett *et al.* 2009). Las fimbrias pili tipo I y pilus P son estructuras poliméricas de gran relevancia en cepas de UPEC.

La fimbria tipo I, en su extremo distal se encuentra anclada la adhesina fimbrial FimH; mientras, pilus P expresa la adhesina fimbrial PapG; ambas promueven la colonización bacteriana en células de vejiga y riñón respectivamente, mediante receptores

específicos (Bien *et al.* 2012; Fronzes *et al.* 2008). La fimbria curli está constituida principalmente por la proteína CsgA, una proteína de 15 kDa codificada por el gen *csgA* (Antão *et al.* 2009). En otras *E. coli*, curli se ha descrito como una de las principales fimbrias asociadas a su patogenesis; sin embargo, en UPEC no se ha descrito a detalle su participación en la adherencia a células de vejiga (Hung *et al.* 2014; Cegelski *et al.* 2010; Barnhart & Chapman 2010) (Antão *et al.* 2009). Varios reportes han descrito que curli expresado en cepas de *E. coli* y *Salmonella ssp.*, participa en la adhesión a superficies bióticas y abióticas y promueve la agregación bacteriana (Barnhart & Chapman 2010; Hung *et al.* 2013; Cegelski *et al.* 2010; Hammer *et al.* 2007; Lim *et al.* 2014). También, curli se ha descrito como un factor importante en el desarrollo de los diferentes estadios de las biopelículas y en la cepa UTI89, favorece la adhesión a células de mamíferos y vegetales; así como, a la interacción con superficies inertes (Wu *et al.* 2012; Barnhart & Chapman 2010).

Para describir la participación de curli en el mecanismo de adhesión e invasión a células de vejiga HTB-5, se obtuvieron las cepas CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA* mediante el sistema λ -red; además, se restauró la función de estas cepas mutante a través de la complementación con el gen *csgA*. La cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA* fue complementada en *trans* con el plásmido pcsgBA (de alto número de copias) y se denominó CFT073*csgA*^{-/+}, mientras que la cepa 529U-0712 Δ *csgA* fue complementada directamente en cromosoma, y se denominó 529U-0712*csgA*^{-/+}. Las cepas clínicas de UPEC CFT073 y 529U-0712, mostraron la presencia del gen *csgA*, expresaron la proteína CsgA y ensamblaron a la fimbria curli. La retención de rojo Congo es una prueba fenotípica, que nos indicó que curli es expresada en cepas de UPEC bajo condiciones nutricionales

controladas. Es importante mencionar que la expresión de curli, está altamente regulada por condiciones ambientales (temperatura, pH), nutricionales (concentración de sales) y el sitio de infección (Oelschlaeger *et al.* 2002; Hadjifrangiskou & Hultgren 2012; Barnhart & Chapman 2010). Además, la expresión de curli en otras *E. coli*, puede presentarse simultáneamente con celulosa; la cual, además tiene la capacidad de fijar o retener rojo Congo (Khurana *et al.* 2001; Barnhart & Chapman 2010). La cepa de UPEC CFT073, crecida en placas suplementadas con rojo Congo, mostró una ligera coloración rojiza, debido a una baja expresión de la fimbria curli; adicionalmente, mediante ensayos de MET se observaron escasas fibras rizoides. La cepa clínica de UPEC 529U-0712 mostró colonias rojizas, rugosas y secas; así mismo, mediante MET se observaron abundantes estructuras fibrilares en forma de rizos, indicando una alta expresión de curli. Es importante mencionar, que las cepas clínicas de UPEC, al ser aislados recientes de pacientes con ITUs, los genes que codifican para los principales factores de virulencia son expresados eficientemente. *E. coli* aislada de pacientes con ITUs agudas han mostrado la expresión de curli y 74% de las cepas clínicas aisladas de orina de pacientes con bacteriemia expresan curli; mientras, el 33% de las cepas aisladas de orina de pacientes sin bacteriemia expresan a la fimbria curli (Hung *et al.* 2014). Por otro lado, datos de los ensayos de RT-PCR del gen *csgA* en la cepa de clínica de UPEC 529U-0712, mostró una mayor transcripción del gen *csgA* a comparación de la cepa de UPEC CFT073.

Las cepas de UPEC CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*, crecidas en placas de rojo Congo, mostraron pérdida de la capacidad para fijar el colorante, observado con un crecimiento de colonias blanquecinas, lisas y brillosas, indicando la ausencia de curli. Las imágenes de MET, mostraron la ausencia de las fibras amiloideas y los datos por RT-PCR

no mostraron la transcripción del gen *csgA*. Estos resultados demostraron que la ausencia del gen *csgA*, afecta el ensamblaje de curli en las cepas CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*. Cabe mencionar que en la micrografía de MET con la cepa de UPEC CFT073 Δ *csgA*, se observaron estructuras finas y rectas adosadas en la superficie bacteriana; las cuales, por su estructura sugieren que son fimbrias tipo I. Las fimbrias tipo 1, son orgánulos filamentosos rectos y rígidos anclados a la membrana externa, miden 1-2 μ m de largo y 4-8 nm de diámetro y se han descrito en más del 70% de las cepas de UPEC (Hadjifrangiskou & Hultgren 2012; Rangel *et al.* 2013; Marschall *et al.* 2012). Otros autores han descrito, que algunas mutaciones como una compensación a la delección de curli, activan la expresión de genes para mantener la virulencia y supervivencia de la bacteria (Baba *et al.* 2006).

Las cepas CFT073*csgA*^{+/+} y 529U-0712*csgA*^{+/+} mostraron una morfología de colonias rojizas-marrón, rugosas y secas; la cual, indica la presencia de fibras amiloideas en la bacteria. Las micrografías por MET, mostraron fibras rizoides características de curli y el análisis de RT-PCR la transcripción del gen *csgA*; por lo tanto, se confirmó la restauración eficiente de curli. La cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA*, no incorporó el plásmido de complementación *pcsgBA*, probablemente por incompatibilidad entre el plásmido de complementación y los plásmidos presentes en el genoma de la cepa clínica de UPEC 529U-0712 (Rocha *et al.*, 2001). El fragmento *csgA* amplificado por PCR utilizando el sistema λ -red, se utilizó como un método alternativo para complementar la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA*. La cepa complementada 529U-0712*csgA*^{+/+} mostró restauración de curli por retención de rojo Congo, MET y RT-PCR. Estudios recientes, describieron que la cepa clínica UTI89 mutante en el gen *csgA* y restaurada en *trans* utilizando el vector de clonación pLR5, mostró la restauración del fenotipo de curli; sin embargo, las diferencias

en el contenido genético de la cepa UTI89 con la cepa clínica de UPEC 529U-0712 aún no ha sido descritas (Cegelski *et al.* 2010).

La colección de cepas generadas a partir de las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712, se emplearon para realizar los ensayos de adherencia a células de vejiga HTB-5. Los resultados obtenidos con las cepas CFT073 Δ *csgA* y 529U-0712 Δ *csgA*, mostraron una disminución significativa ($p < 0.05$) en la adhesión a células de vejiga HTB-5, comparando con las cepas silvestres. Estos datos, sugieren a curli como una adhesina que media la unión íntima entre la bacteria a las células de vejiga. Otros autores, han descrito que una cepa de clínica de UPEC mutante en el gen *csgA*, disminuye los niveles de adherencia en células de vejiga HTB-9, sin embargo no muestran resultados con la cepa reconstituida en el gen *csgA*, que confirme la restauración del fenotipo (Cordeiro *et al.* 2016). Por otro lado, la cepa UTI89 mutante en el gen *csgA* mostró pérdida de la capacidad para adherirse e invadir a células de vejiga (Wright *et al.* 2007). En un modelo experimental de ITU, en ratón, observaron una disminución en los niveles de adherencia e invasión de la cepa tipo UTI89 mutante en el gen *csgA* y en la cepa tratada con el curlicida FN075 (Cegelski *et al.* 2010). Ensayos de inhibición de curli en *E. coli* productora de toxina Shiga, mostraron una inhibición significativa ($p < 0,001$) de la adherencia a células de colon Caco-2, comparado con la cepa silvestre (Rosser *et al.* 2008).

Las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{+/+} y 529U-0712*csgA*^{+/+} mostraron incrementos significativos ($p < 0.05$) en los niveles de adherencia comparado con las cepas silvestres CFT073 y 529U-0712, respectivamente. El incremento exacerbado en la adherencia de la cepa de UPEC CFT073*csgA*^{+/+} comparado con la cepa silvestre CFT073 se debe posiblemente a la sobreexpresión del gen *csgA* por emplear un plásmido de alto número de

copias. De manera similar, la cepa clínica de UPEC 529U-0712*csgA*^{-/+}, mostró un incremento en el perfil de adherencia con respecto a la cepa silvestre; interesantemente, la restauración del gen *csgA* se realizó directamente en cromosoma. Las posibles explicaciones relacionadas con estos incrementos exacerbados de la adherencia en la cepa clínica 529U-0712*csgA*^{-/+}, son las siguientes: aumento en la expresión del operón *csgBAC*, inserción del fragmento *csgA* en tándem o menos probable, una inserción en varios sitios distintos dentro del cromosoma, generando una sobreexpresión del gen *csgA* y por lo tanto, de curli. El incremento en la expresión de curli a través de la regulación positiva del operon *csgBAC* (vía *csgD* o algún otro regulador del operon), incrementa significativamente los niveles de adherencia en cepas de *E. coli* productoras de toxina Shiga a células intestinales Caco-2; bajo este contexto, la fimbria curli puede ser considerada como el principal factor responsable de la adherencia a células Caco-2 (Rosser *et al.* 2008).

Las cepas de UPEC, son capaces de invadir las células epiteliales de vejiga, considerándose un mecanismo crítico para establecer una infección persistente (Justice *et al.* 2004; Andersen *et al.* 2012). Los resultados de invasión realizados en la cepa de UPEC CFT073Δ*csgA*, mostraron un incremento significativo en la capacidad invasiva, comparado con la cepa CFT073. Sin embargo, la cepa clínica de UPEC 529U-0712Δ*csgA*, mostró una disminución significativa en los niveles de invasión, posiblemente por la ausencia de curli. Las cepas de UPEC CFT073*csgA*^{-/+} y 529U-0712*csgA*^{-/+}, restauraron su capacidad invasiva, con incrementos significativos de $p < 0.05$, comprado con las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712, respectivamente. El incremento de invasividad en la cepa CFT073*csgA*^{-/+}, se debe probablemente porque la complementación del gen *csgA*, se realizó con un plásmido de alto número de copias; mientras, el incremento de invasividad en la

cepa 529U-0712*csgA*^{-/+}, se debe probablemente a la inserción del fragmento *csgA* en tándem o a una inserción en varios sitios distintos dentro del cromosoma. *Salmonella* spp., produce fibras de curli implicadas en el proceso de invasión del huésped a través de la activación de receptores de enzimas extracelulares de remodelación de la matriz (Fowler *et al.* 2007; Fronzes *et al.* 2008). Por otro lado, ensayos *in vitro* con *E. coli* causante de septicemia aviar, mostraron que curli es esencial para la internalización de las bacterias (Antão *et al.* 2009). Los resultados obtenidos, sugieren que curli de UPEC participa en los procesos de adherencia e invasión en células de vejiga HTB-5. La sobreexpresión de curli en las cepas de UPEC complementadas, también incrementa su capacidad para invadir células de vejiga HTB-5. La disminución en los niveles de adherencia e invasión fue significativa, sin embargo, curli no es la única fimbria involucrada en estos procesos. Los pili tipo I de UPEC también están asociados a la adherencia e invasión, y este proceso puede ser bloqueado utilizando manosa (ligando soluble de FimH), una molécula que interacciona con la adhesina FimH; así mismo, también se puede generar una segunda mutante en el gen *fimH* para eliminar la adherencia mediada por los pili tipo I. Varios estudios han demostrado que los pili tipo 1, son estructuras esenciales para la unión al epitelio de la vejiga. Además, cepas mutantes en el gen *fimH* han mostrado uniones defectuosas durante la colonización a la vejiga (Anderson *et al.* 2004). Los pili tipo 1 en UPEC median también los procesos de adherencia e invasión a células epiteliales de vejiga HTB-9. La generación de una mutante en *fimH* o por inhibición de pili tipo 1 con manosa, causaría que la bacteria pierda capacidad de adherirse e invadir eficientemente a su hospedero (Martinez *et al.* 2000).

Es importante hacer énfasis que se obtuvo la mutante en el gen *fimH* de la cepa CFT073 y una doble mutante FimH+CsgA; sin embargo, la generación de estas mutantes no fueron incluidas en este estudio. Además, se ha logrado obtener una cepa 529U-0712 complementada en *trans* mediante la subclonación del fragmento *csgA* en otro vector de clonación (Datos no mostrados). Éste estudio, sugiere que curli participa en la adherencia a células de vejiga HTB-5 en condiciones donde curli es expresado. En cepas de UPEC mutantes en el gen *csgA*, se mostró una disminución significativa en los niveles de adherencia, mientras que, en las cepas complementadas que sobreexpresan curli se observa un incremento en la capacidad de adherencia a células HTB-5. Por otro lado, la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA* mostró una disminución en la capacidad de invasión; mientras, la cepa CFT073 Δ *csgA* mostró un incremento significativo en los niveles de invasividad, posiblemente debido a la expresión de otros tipos de fimbrias que favorecen éste proceso. Para corroborar éstos resultados, se ha planteado realizar ensayos de adherencia e invasión con las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 mutantes en el gen *fimH* y/o tratadas con manosa para inhibir la función de los pili tipo 1. Además, corroborar la complementación en *cis* de la cepa clínica de UPEC 529U-0712 Δ *csgA* y/o realizar ensayos con la cepa complementada en *trans*.

CONCLUSIÓN

La ausencia de curli en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712 mutantes en el gen *csgA*, genera una reducción significativa en la adherencia a células de vejiga HTB-5.

La sobreexpresión de curli en las cepas de UPEC CFT073 y 529U-0712, promueve un incremento exacerbado en la adherencia e invasión a células de vejiga HTB-5.

La fimbria curli es un factor de virulencia importante en la patogenicidad de las cepas de UPEC, bajo condiciones de estrés, por los cambios de nutrientes, temperatura y pH.

La fimbria curli forma parte de un sistema multifactorial involucrado en procesos de colonización como parte importante de la patogénesis de UPEC.

LITERATURA CITADA

Adamus-Bialek, W., Zajac, E., Parniewski, P., & Kaca, W. (2013). Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains. *Molecular Biology Reports*, 40(4), 3429–35.

- Allen, W. J., Phan, G., & Waksman, G. (2012). Pilus biogenesis at the outer membrane of Gram-negative bacterial pathogens. *Current Opinion in Structural Biology*, 22(4), 500–6.
- Andersen, T. E., Khandige, S., Madelung, M., Brewer, J., Kolmos, H. J., & Møller-Jensen, J. (2012). Escherichia coli uropathogenesis in vitro: invasion, cellular escape, and secondary infection analyzed in a human bladder cell infection model. *Infection and Immunity*, 80(5), 1858–67.
- Anderson, G. G., Dodson, K. W., Hooton, T. M., & Hultgren, S. J. (2004). Intracellular bacterial communities of uropathogenic Escherichia coli in urinary tract pathogenesis. *Trends in Microbiology*, 12(9), 424–30.
- Antão, E.-M., Wieler, L. H., & Ewers, C. (2009). Adhesive threads of extraintestinal pathogenic Escherichia coli. *Gut Pathogens*, 1(1), 22.
- Asadi, S., Kargar, M., Solhjoo, K., Najafi, A., & Ghorbani-Dalini, S. (2014). The Association of Virulence Determinants of Uropathogenic Escherichia coli With Antibiotic Resistance. *Jundishapur Journal of Microbiology*, 7(5), e9936.
- Baba, T. et al., 2006. Construction of Escherichia coli K-12 in-frame, single-gene knockout mutants: the Keio collection. *Molecular systems biology*, 2, p.2006.0008.
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2010). Curli Biogenesis and Function. NIH Public Access, 131–147.
- Bian, Z., Brauner, a, Li, Y., & Normark, S. (2000). Expression of and cytokine activation by Escherichia coli curli fibers in human sepsis. *The Journal of Infectious Diseases*, 181(2), 602–12.
- Bian, Z., Yan, Z. Q., Hansson, G. K., Thorén, P., & Normark, S. (2001). Activation of inducible nitric oxide synthase/nitric oxide by curli fibers leads to a fall in blood pressure during systemic Escherichia coli infection in mice. *The Journal of Infectious Diseases*, 183(4), 612–9.
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage.

International Journal of Nephrology, 2012, 681473.

- Blanco, L. P., Evans, M. L., Smith, D. R., Badtke, M. P., & Chapman, M. R. (2012). Diversity, biogenesis and function of microbial amyloids. *Trends in Microbiology*, 20(2), 66–73.
- Brzuszkiewicz, E., Brüggemann, H., Liesegang, H., Emmerth, M., Olschläger, T., Nagy, G., ... Dobrindt, U. (2006). How to become a uropathogen: comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(34), 12879–84.
- Cegelski, L., Pinkner, J. S., Hammer, N. D., Cusumano, C. K., Hung, S., Chorell, E., ... Hultgren, S. J. (2010). Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *NIH Public Access*, 5(12), 913–919.
- Cordeiro, M.A. et al., 2016. Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Brazilian Journal of Microbiology*, 47(2), pp.414–416.
- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanism of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010 Jan;8(1):26-38.
- Fowler, D. M., Koulov, A. V, Balch, W. E., & Kelly, J. W. (2007). Functional amyloid--from bacteria to humans. *Trends in Biochemical Sciences*, 32(5), 217–24.
- Fronzes, R., Remaut, H., & Waksman, G. (2008). Architectures and biogenesis of non-flagellar protein appendages in Gram-negative bacteria. *The EMBO Journal*, 27(17), 2271–80.
- Guyer, D. M., Henderson, I. R., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2000). Identification of sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 38(1), 53–66.
- Hadjifrangiskou, M., & Hultgren, S. J. (2012). What does it take to stick around? Molecular insights into biofilm formation by uropathogenic *Escherichia coli*. *Virulence*, 3(3), 231–3.
- Hammer, N. D., Schmidt, J. C., & Chapman, M. R. (2007). The curli nucleator protein, CsgB, contains an amyloidogenic domain that directs CsgA polymerization. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*,

104(30), 12494–9.

Hou, B., Meng, X.-R., Zhang, L.-Y., Tan, C., Jin, H., Zhou, R., ... Li, S.-W. (2014). TolC promotes ExPEC biofilm formation and curli production in response to medium osmolarity. *BioMed Research International*, 2014, 574274.

Hung C, Zhou Y, Pinkner JS, Dodson KW, Crowley JR, Heuser J, C. M., & Hadjifrangiskou M, Henderson JP, H. S. (2013). Escherichia coli Biofilms Have an Organized and Complex. *MBio.*, 4(5), 1–10.

Hung, C., Marschall, J., Burnham, C.-A. D., Byun, A. S., & Henderson, J. P. (2014). The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. *PloS One*, 9(1), e86009.

Johansson, C., Nilsson, T., Olsén, a, & Wick, M. J. (2001). The influence of curli, a MHC-I-binding bacterial surface structure, on macrophage-T cell interactions. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 30(1), 21–9.

Justice, S. S., Hung, C., Theriot, J. a, Fletcher, D. a, Anderson, G. G., Footer, M. J., & Hultgren, S. J. (2004). Differentiation and developmental pathways of uropathogenic Escherichia coli in urinary tract pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 101(5), 1333–8.

Justice, S. S., Hunstad, D. a, Seed, P. C., & Hultgren, S. J. (2006). Filamentation by Escherichia coli subverts innate defenses during urinary tract infection. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(52), 19884–9.

Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic Escherichia coli. *Nature Reviews. Microbiology*, 2(2), 123–40.

Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L., & Fink, a L. (2001). Is Congo red an amyloid-specific dye? *The Journal of Biological Chemistry*, 276(25), 22715–21.

Lim, J. Y., Pinkner, J. S., & Cegelski, L. (2014). Community behavior and amyloid-associated phenotypes among a panel of uropathogenic E. coli. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 443(2), 345–50.

Lloyd, A. L., Rasko, D. a, & Mobley, H. L. T. (2007). Defining genomic islands and

- uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, 189(9), 3532–46.
- López-Banda, D. a, Carrillo-Casas, E. M., Leyva-Leyva, M., Orozco-Hoyuela, G., Manjarrez-Hernández, Á. H., Arroyo-Escalante, S., ... Hernández-Castro, R. (2014). Identification of virulence factors genes in *Escherichia coli* isolates from women with urinary tract infection in Mexico. *BioMed Research International*, 2014, 959206.
- López-Martínez, B., Alcázar-lópez, V., Castellanos-cruz, M. C., Franco-hernández, M. I., Jiménez-tapia, Y., León-ham, A. De, ... Calderón-jaimés, E. (2013). Vigilancia institucional de la susceptibilidad antimicrobiana en patógenos de interés clínico, 70(3), 222–229.
- Mainil, J. (2013). *Escherichia coli* virulence factors. *Veterinary Immunology and Immunopathology*, 152(1-2), 2–12.
- Marschall, J. et al., 2012. Both host and pathogen factors predispose to *Escherichia coli* urinary-source bacteremia in hospitalized patients. *Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America*, 54(12), pp.1692–8.
- Martinez, J.J. et al., 2000. Type 1 pilus-mediated bacterial invasion of bladder epithelial cells. , 19(12), pp.2803–2812.
- Molina-lópez, J. et al., Original Article Drug resistance , serotypes , and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City.
- Mulvey, M. a, Schilling, J. D., & Hultgren, S. J. (2001). Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infection and Immunity*, 69(7), 4572–9.
- Oelschlaeger, T. A., Dobrindt, U., & Hacker, J. (2002). Pathogenicity islands of uropathogenic *E. coli* and the evolution of virulence. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 19(6), 517–521.
- Paul, S. et al., 2013. Role of homologous recombination in adaptive diversification of extraintestinal *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 195(2), pp.231–42.
- Rangel, D.E. et al., 2013. Observation of bacterial type I pili extension and contraction

- under fluid flow. *PloS one*, 8(6), p.e65563.
- Rosen, D. a, Hooton, T. M., Stamm, W. E., Humphrey, P. a, & Hultgren, S. J. (2007). Detection of intracellular bacterial communities in human urinary tract infection. *PLoS Medicine*, 4(12), e329.
- Rosser, T. et al., 2008. Pathogenic potential of emergent sorbitol-fermenting *Escherichia coli* O157:NM. *Infection and Immunity*, 76(12), pp.5598–5607.
- SUIVE/DGE/SALUD/Información. (2011). *Información Epidemiológica de Morbilidad*.
- Thumbikat, P., Berry, R. E., Zhou, G., Billips, B. K., Yaggie, R. E., Zaichuk, T., ... Klumpp, D. J. (2009). Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLoS Pathogens*, 5(5), e1000415.
- Tiba, M. R., Yano, T., & Leite, D. D. S. (2008). Genotypic characterization of virulence factors in *Escherichia coli* strains from patients with cystitis. *Revista Do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, 50(5), 255–60.
- Wang, X., Zhou, Y., Ren, J.-J., Hammer, N. D., & Chapman, M. R. (2010). Gatekeeper residues in the major curlin subunit modulate bacterial amyloid fiber biogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 107(1), 163–8.
- Wiles, T. J., Kulesus, R. R., & Mulvey, M. a. (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology*, 85(1), 11–9.
- Wright, K.J., Seed, P.C. & Hultgren, S.J., 2007. Development of intracellular bacterial communities of uropathogenic *Escherichia coli* depends on type 1 pili. *Cellular microbiology*, 9(9), pp.2230–41.
- Wu, C., Lim, J. Y., Fuller, G. G., & Cegelski, L. (2012). Quantitative analysis of amyloid-integrated biofilms formed by uropathogenic *Escherichia coli* at the air-liquid interface. *Biophysical Journal*, 103(3), 464–71.
- Zdziarski, J. et al., 2008. Molecular basis of commensalism in the urinary tract: low virulence or virulence attenuation? *Infection and immunity*, 76(2), pp.695–703.
- Zhou, G., Mo, W. J., Sebbel, P., Min, G., Neubert, T. a, Glockshuber, R., ... Kong, X. P.

(2001). Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic Escherichia coli: evidence from in vitro FimH binding. *Journal of Cell Science*, 114(Pt 22), 4095–103.