



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO
FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN**

**“Respuesta protectora del bioconjugado HIM_2.0 contra las infecciones
del tracto urinario en modelo murino”**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
LICENCIADA EN BIOQUÍMICA DIAGNÓSTICA**

**PRESENTA:
MEXTLI YOALI BERMEJO HARO**

**ASESOR EXTERNO:
DR. VICTOR MANUEL LUNA PINEDA**

**COASESOR EXTERNO:
DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES**

**COASESOR INTERNO:
M.C. ANDREA BECERRIL OSNAYA**

Cuautilán Izcalli, Estado de México, 2019



Universidad Nacional
Autónoma de México



UNAM – Dirección General de Bibliotecas
Tesis Digitales
Restricciones de uso

DERECHOS RESERVADOS ©
PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

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

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



UNIVERSIDAD NACIONAL
AUTÓNOMA DE
MÉXICO

FACULTAD DE ESTUDIOS SUPERIORES CUAUTITLÁN
SECRETARÍA GENERAL
DEPARTAMENTO DE EXÁMENES PROFESIONALES

ASUNTO: VOTO APROBATORIO

M. en C. JORGE ALFREDO CUÉLLAR ORDAZ
DIRECTOR DE LA FES CUAUTITLÁN
PRESENTE

ATN: I.A. LAURA MARGARITA CORTÁZAR FIGUEROA
Jefa del Departamento de Exámenes Profesionales
de la FES Cuautitlán.

Con base en el Reglamento General de Exámenes, y la Dirección de la Facultad, nos permitimos comunicar a usted que revisamos el: Trabajo de Tesis.

Respuesta protectora del bioconjugado HIM_2.0 contra las infecciones del tracto urinario en modelo murino.

Que presenta la pasante: Mextli Yoali Bermejo Haro

Con número de cuenta: 311033432 para obtener el Título de la carrera: Licenciatura en Bioquímica Diagnóstica

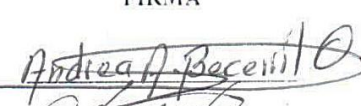
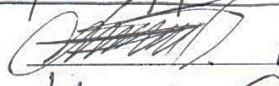
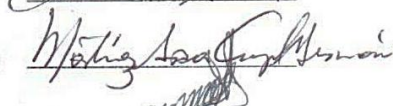
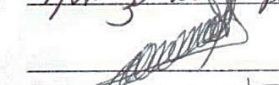
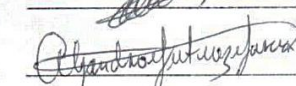
Considerando que dicho trabajo reúne los requisitos necesarios para ser discutido en el EXAMEN PROFESIONAL correspondiente, otorgamos nuestro VOTO APROBATORIO.

ATENTAMENTE

“POR MI RAZA HABLARÁ EL ESPÍRITU”

Cuautitlán Izcalli, Méx. a 19 de Marzo de 2019.

PROFESORES QUE INTEGRAN EL JURADO

	NOMBRE	FIRMA
PRESIDENTE	M. en C. Andrea A. Becerril Osnaya	
VOCAL	Dra. Leticia Moreno Fierros	
SECRETARIO	M.V.Z. Angel Germán Martínez Sosa	
1er. SUPLENTE	M. en C. Alberto Natahliel Soto Guevara	
2do. SUPLENTE	Q.F.B. Alejandro Gutiérrez García	

NOTA: los sinodales suplentes están obligados a presentarse el día y hora del Examen Profesional (art. 127).

LMCF/cga*

Dedicatoria

A todos los que a pesar de las adversidades nunca se rinden. A esas personas que me han enseñado con su ejemplo que a pesar de la crueldad que vivimos hay que poner un granito de arena, ir contra corriente si es necesario y defender los valores. Espero reflejar en mí la fuerza y voluntad que tienen. A todos aquellos que me ofrecieron su paciencia y un sabio consejo ante mis errores.

Para la Luna del pasado: **No tengas miedo**, sí se pudo. Para la Luna del futuro: **Eres muy capaz**, atrévete.

¿Quién fue? ; ¡Vivos se los llevaron, vivos los queremos! ; ¡Ni una más! Queremos paz.

Agradecimientos

Gordos: "Perdón" es una palabra que se queda corta para reparar el daño. El no rendirse conmigo amerita más que un simple "Gracias". Son mi Yin y yang. **Papá:** Eres amor infinito que me ha alimentado el alma y la panza. Eres mi compinche: Fui yo. ¡No, fui yo! **Mamá:** Eres la fuerza que me ha sabido alinear y guiar cuando más perdida estaba. Eres mi recordatorio constante: ¡Deja de hacerte p*****! Los amo. "...Siembra tu tierra y ponte a trabajar,...trata de ser feliz con lo que tienes, vive la vida inmensamente" 🎵🎵.

Chelita: How can you be different persons at the same time? For me, you're my little annoying sister. You're my best friend, my secret keeper, my teacher, my twin and much more. I couldn't be the mature sister that you needed. I'm so sorry. You have always been protecting me. I admire you. You were right, you're my Grace. "...I know you carry us. And it was such a fucking mess. I don't say it enough. Ixchel, you are so loved" 🎵🎵.

Biti: Admiro como a pesar de las situaciones difíciles trata de tener una sonrisa, un detalle o un cafecito para compartir. Esta vida está llena de alegrías y deseo que nunca más deje pasar las oportunidades. La amamos, a pesar de que no podemos completarla, jamás la dejaremos sola a usted ni a Lalo. **Lalo, Uziel y tías de la Avasco:** Gracias por recibirnos siempre en la casa de la abuela, hemos creado muy buenos recuerdos en ella. Los quiero.

Nana Irene: No es coincidencia que la vida nos haya cruzado. Soy afortunada de tener aún su cariño y atención maternal. No somos perfectos pero para eso estamos para apoyarnos. Gracias a usted y mi **tío Juancho** he sido doblemente amada por unos segundos padres. Los quiero.

Familia Bermejo Mora y Haro García: Por estar ahí para alimentar mis raíces con anécdotas. Por el apoyo e interés contante en mi trayectoria académica.

Soy afortunada de haber pertenecido a la **UNAM** y convivir con profesionistas que con su humilde y difícil labor me han ayudado a construir mi propio camino, principalmente a la **FES-C** por brindarme los mejores años de estudio.

M. Andrea, M.V.Z Ángel, P. Ladislao, M. Alberto: Sus enseñanzas me han inspirado a ir por más. Gracias por plantar día a día semillas que poco a poco germinan.

Agradezco al **LIBI** por su aceptación en el equipo de trabajo. **Dr. Víctor:** Gracias por la confianza, la paciencia a pesar de mis errores, el compartir sus conocimientos y las risas. **M. Viz:** Gracias por la compañía diaria y la ayuda continua. A ambos les agradezco las porras para superarme y no rendirme. **Dr. Juan:** Tiene un excelente equipo de trabajo, de todos he aprendido. Agradezco la aceptación y el constantemente recordatorio de la superación profesional. **D,F,S,L:** Gracias por sacar a relucir constantes risas que siempre hacen más felices los días.

De igual manera, agradezco al Laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la **FES-I** por aceptarme. **M. Damaris y Dra. Leticia:** Agradezco todo el apoyo y las enseñanzas profesionales y personales. Son mujeres poderosas. Soy afortunada de haber aprendido a su lado.

No podría olvidar a la **Danza**. Era necesaria para mí vida la guía de los profesores y aquellas personas especiales con las que llegué a compartir escenario (**D,D**). Que esto sea un recordatorio contante que **lo bien bailado nadie me lo quita, ni me lo quitará**.

Qué sería la escuela sin amigos con los que compartir las aventuras, enojos, desilusiones y chisme. **Yacky, Brenda, Azu:** Gracias por permanecer a pesar del tiempo, soy su fan por su gran fuerza para imponerse a las adversidades. **Rojo:** "...If I turn into another, dig me up from under what is covering the better part of me" 🎵🎵. Gracias por las aventuras. **Abejorro:** Es una persona llena de sueños y ánimos, gracias por contagiarlos. **Richi, Fer y los chicos del árbol:** Gracias por siempre aceptarme e incluirme en sus risas, juegos y momentos. **Ana y Mitch:** No son una simple coincidencia, gracias por compartir la magia que tienen. **Gordito (Alain):** Eres el hermano mayor que siempre quise tener, gracias por las horas de estudio, risas y secretos. **Zorro:** Gracias por recordar que el alma se alimenta haciendo lo que más amamos.

A los del cielo: Abuelos, prima, Víctor. En su momento ustedes contribuyeron a este logro.

Todos somos genios. Pero si juzgas a un pez por su habilidad para trepar árboles, vivirá toda su vida pensando que es un inútil. Albert Einstein



Hospital Infantil de México “Dr. Federico Gómez”

Lugar de realización

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del HIMFG en colaboración del Laboratorio de Inmunidad en Mucosas de la FES-I y el Laboratorio de Bacteriología de la FES-C de la UNAM.



Financiamientos y apoyos económicos

Este trabajo fue financiado por CONACyT-Problemas Nacionales (2016) con el número de cuenta 1764 y por fondos federales del HIMFG con los registros HIM/2016/027 SSA.1240, HIM/2017/002 SSA.1298 y HIM/2018/136 SSA 1456.

1. Índice

1. Índice	7
2. Índice de figuras y tabla	9
3. Glosario	10
4. Resumen	12
4.1 Abstract	13
5. Introducción	14
5.1 Epidemiología de las ITU: Morbilidad y costos económicos	14
5.2 Factores de virulencia y aptitud asociados al mecanismo de patogenicidad de UPEC	14
5.3 Biogénesis de las principales fimbrias de UPEC	16
5.4 Antecedentes	18
6. Planteamiento del problema	23
7. Hipótesis	23
8. Objetivos	24
8.1 General	24
8.2 Particulares	24
9. Metodología	24

9.1 Verificación y purificación de los componentes del bioconjugado HIM_2.0	24
9.2 Inmunización IN e IM de ratones C57BL/6	27
9.3 Modelo de infección murino de ITU	27
9.4 Obtención de suero, orina y lavados vaginales posterior a la inmunización	28
9.5 Determinación de anticuerpos por ELISA	28
9.6 Diagramas de trabajo	30
9.7 Análisis estadístico	32
10. Resultados.....	32
10.1 Purificación y verificación de los componentes del bioconjugado HIM_2.0.....	32
10.2 Esquema de inmunización, recolección de muestras biológicas y reto	35
10.3 La inmunización IN genera una protección eficiente contra la colonización de UPEC	38
10.4 El bioconjugado HIM_2.0 como un candidato a vacuna contra las ITU.....	39
10.5 La protección generada por el bioconjugado HIM_2.0 es mediada por anticuerpos IgG	41
11. Discusión	44
12. Conclusión.....	49
13. Perspectivas	50
14. Referencias	50

2. Índice de figuras y tabla

Figura 1 Los principales factores de aptitud y virulencia que UPEC.....	15
Figura 2 Mecanismo de patogenicidad de UPEC.....	16
Figura 3 Esquema representativo de las principales fimbrias de UPEC.	17
Figura 4 Distribución de los principales genes de virulencia y de aptitud.	18
Figura 5 Reducción de la adherencia bacteriana en presencia de anticuerpos policlonales.	22
Figura 6 Metodología general para verificar y purificar los componentes del bioconjugado HIM_2.0.	30
Figura 7 Metodología general de inmunización e infección para evaluar la respuesta protectora del bioconjugado. HIM_2.0.....	31
Figura 8 Verificación de las cepas transformantes pLATE-papG y pLATE-fc.....	33
Figura 9 Purificación de las proteínas PapG y FC en condiciones desnaturalizantes.	34
Figura 10 Verificación de las proteínas PapG y FC purificadas.	35
Figura 11 Esquema de inmunización.	37
Figura 12 Evaluación de la capacidad protectora del bioconjugado HIM_2.0 en modelo murino.....	39
Figura 13 Análisis comparativo de la protección inducida por el bioconjugado y las fimbrias de UPEC.....	40
Tabla 1 Determinación de anticuerpos en muestras biológicas.....	41
Figura 14 Identificación de anticuerpos anti-PapG en muestras biológicas de ratones inmunizados.....	43
Figura 15 Identificación de anticuerpos anti-FC en muestras biológicas de ratones inmunizados.....	44
Figura 16 Esquema representativo de la protección inducida por el bioconjugado HIM_2.0.	49

3. Glosario

HIMFG: Hospital Infantil de México “Federico Gómez”

LIBI: Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal

ITU: Infecciones del tracto urinario

UPEC: *Escherichia coli* uropatogénica, por sus siglas en inglés

PapG: Adhesina de la fimbria P de UPEC

FimH: Adhesina de la fimbria tipo 1 de UPEC

CsgA: Proteína estructural de la fimbria curli de UPEC

FC: Fusión de las adhesinas FimH y CsgA (proteína dimérica)

FCP: Fusión de las adhesinas FimH, CsgA y PapG (proteína trimérica)

Bioconjugado HIM_2.0: Mezcla de las proteínas recombinantes PapG y FC

MDR: Multidrogo resistente.

EDR: Extremodrogo resistente.

ABU: Bacteriuria asintomática, por sus singlas en inglés.

ITUca: ITU complicada asociadas a catéter

IBC: Comunidades bacterianas intracelulares, por sus siglas en inglés.

QIR: Reservorios intracelulares quiescentes, por sus siglas en inglés.

CMIS: Sistema inmune común de mucosa, por sus siglas en inglés.

NALT: Tejido linfoide asociado a nasofaríngeo, por sus siglas en ingles.

IN: Inmunización intranasal.

IM: Inmunización muscular.

Ni-NTA: Cromatografía de afinidad a Niquel, por sus siglas en inglés.

HClGnd: Hidroxicloruro de guanidina, por sus siglas en inglés.

SDS-PAGE: Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico, por sus siglas en inglés.

UFC/mL: Unidades formadoras de colonia por mililitro

LB: Luria Bertani

Abs: absorbancia

IPTG: isopropil- β -D-1-tiogalactopiranosido

rpm: revoluciones por minuto

DO₆₀₀: Densidad óptica a 600 nanómetros

PMSF: Fluoruro de fenilmetilsulfonilo

PBS: Búffer fosfato salino

ELISA: ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima, por sus siglas en inglés

pb: Pares de bases

kDa: Kilodalton

n: número de ratones

CDs: Células dendríticas

PC: Células B plasmáticas

4. Resumen

En México, las infecciones del tracto urinario (ITU) son un problema de salud pública, causando más de 4 millones de casos anualmente. *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC, por sus siglas en inglés) es el principal agente causal de estas infecciones y es caracterizada por el aumento de su resistencia a diversos antibióticos. Una vacuna eficaz que disminuya la alta morbilidad y que plantee una alternativa al tratamiento con antibióticos no ha sido descrita. En un estudio previo, las adhesinas de las principales fimbrias fueron utilizadas para la generación de una nueva alternativa contra las ITU por UPEC. Las adhesinas FimH de la fimbria tipo 1, PapG de la fimbria P y CsgA de curli fueron fusionadas para formar proteínas diméricas y triméricas. Los anticuerpos generados contra el monómero PapG y la proteína dimérica FimH-CsgA (FC) inhibieron principalmente la adherencia de UPEC a células de vejiga. En este proyecto estas dos proteínas fueron los componentes de un bioconjugado definido como HIM_2.0, el cual es una propuesta a vacuna potencial contra las ITU. **Objetivo.** Evaluar la respuesta protectora del bioconjugado HIM_2.0 en un modelo murino de infección del tracto urinario. **Material y métodos.** La estrategia metodológica fue dividida en dos partes. La primera fue obtener los componentes proteicos del bioconjugado HIM_2.0, siguiendo los protocolos establecidos por Luna-Pineda y cols (2016). Finalmente, una respuesta protectora inducida por inmunización del bioconjugado HIM_2.0 fue evaluado usando un modelo murino de infección con ratones C57BL/6. **Resultados.** Los componentes del bioconjugado HIM_2.0 fueron generados con adecuada integridad y concentración para las administraciones. La inmunización intranasal (IN) de este bioconjugado a ratones indujo la mayor disminución de unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC/mL) en vejiga y riñón cuando se comparó con una vía parenteral como la intramuscular (IM). Bajo las mismas condiciones de inmunización IN, el bioconjugado indujo la mayor protección cuando fue comparado con la administración de sus respectivas fimbrias completas. Adicionalmente, la administración IN en los ratones indujo altos niveles de anticuerpos IgG anti-PapG y anti-FC en orina comparados con otras muestras biológicas, tales como suero y lavados vaginales. La administración IM solo indujo anticuerpos IgG contra estas proteínas en suero y lavados vaginales de estos ratones. **Conclusión.** La administración IN del bioconjugado HIM_2.0 en ratones mostró una alta capacidad protectora contra la infección transuretral de UPEC. Probablemente por una respuesta humoral específica de IgG detectada en las orinas de los ratones.

4.1 Abstract

In Mexico, urinary tract infections (UTI) are a public health problem with more than 4 million of cases each year. Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main agent of these infections and is characterized for the increased in its resistance to various antibiotics. An effective vaccine that can decrease the high morbidity and at the same time can be an alternative to antibiotic treatment has not been described. In a previous study, the adhesins of the main fimbria were used for the generation of a new alternative against UTIs by UPEC. FimH adhesin from type 1 fimbriae, PapG from P fimbriae and CsgA from curli fibers were fused to form dimeric and trimeric proteins. The antibodies generated against the PapG monomer and the FimH-CsgA (FC) dimeric protein mainly inhibited the adherence of UPEC to bladder cells. In this project, these two proteins were the components of a bioconjugate called as HIM_2.0, which is a new proposal potential vaccine against UTIs. **Objective.** Evaluate the protective response of the HIM_2.0 bioconjugate in a murine model of urinary tract infection. **Material and methods.** The methodological strategy was divided in two parts: the first part was to obtain the HIM_2.0 bioconjugate protein components, following the protocols established by Luna-Pineda and Cols (2016). Finally, a protective response induced by immunization of the HIM_2.0 bioconjugate was evaluated using a murine model of infection with C57BL/6 mice. **Results.** The HIM_2.0 bioconjugate components were generated with adequate integrity and concentration for the administrations. Intranasal (IN) administration of this bioconjugate to mice induced the greatest decrease of colony forming units per milliliter (UFC/mL) in the bladder and kidney, when was compared it with a parenteral route such as intramuscular (IM). Under the same IN immunization conditions, the bioconjugate induced the highest rates of protection when it was compared with the administration of their respective complete fimbria. Additionally, IN administration of bioconjugate in mice induced high levels of anti-PapG and anti-FC IgG antibodies in urine, when was compared it to other biological samples, such as serum and vaginal washings. The IM immunization only induced IgG antibodies against these proteins in serum and vaginal washes of these mice, however, these antibodies cannot protect against UPEC colonization. **Conclusion.** The IN administration of the HIM_2.0 bioconjugate in mice showed a high protective capacity against UPEC transurethral infection. Probably, it was due to a specific humoral IgG response detected in the urine of the mice.

5. Introducción

5.1 Epidemiología de las ITU: Morbilidad y costos económicos

Las ITU son un problema de salud pública debido a la alta morbilidad con más de cuatro millones de casos reportados por año en México [1]. El gasto anual de consulta y medicación por las ITU se calcula en 18,000,000,000 de pesos mexicanos, el cual fue estimado con base en estudios realizados en otros países [2]. El sexo femenino tiene una predisposición a adquirir una ITU, siendo dos millones de casos reportados anualmente [3]. Además, se infiere que el 20% de esta población presenta una segunda ITU, la cual puede cursar con recurrencia en el 30% de estas mujeres [4]. La población infantil tiene una baja prevalencia de estas infecciones, sin embargo, está asociada a factores que complican el curso de la infección, tales como: malformaciones en el tracto urinario, inmunodeficiencias, cáncer y leucemia [5].

5.2 Factores de virulencia y aptitud asociados al mecanismo de patogenicidad de UPEC

Escherichia coli uropatogénica (UPEC, por sus siglas en inglés) es una bacteria de origen intestinal que ha adquirido la capacidad de colonizar el tracto urinario usando factores de aptitud y virulencia, incluyendo toxinas, fimbrias, sistemas de adquisición de hierro, proteínas autotransportadoras, flagelo, lipopolisacarido (LPS) y cápsula (**Figura 1**) [6–8]. Estos factores adquiridos por transferencia horizontal de genes se relacionan con el mecanismo de patogenicidad en esta bacteria [9].

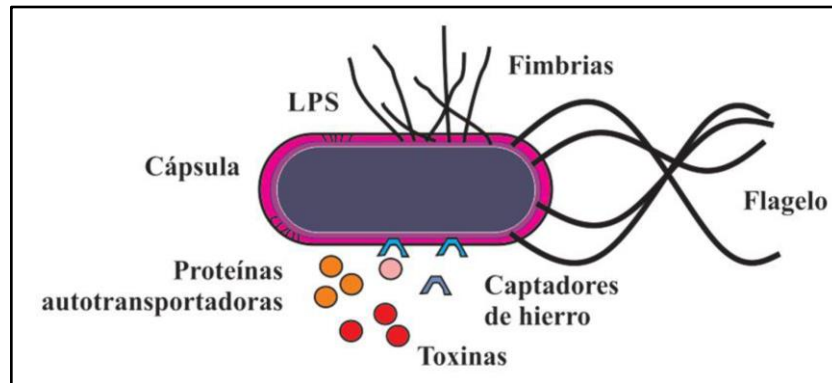


Figura 1 Los principales factores de aptitud y virulencia que UPEC. Este uropatógeno adquirió genes de virulencia y aptitud por transferencia horizontal y se dividen en: toxinas (hemolisina, CNF1 (Factor necrotizante citotóxico 1)), así como la secreción de toxinas autotransportadoras Sat, Pic y Tsh), adquisición de hierro (mediante sideroforos: Aerobactina, enterobactina, salmochelin y yersiniabactin), lipopolisacárido (LPS, reclutamiento de células polimorfonucleares para inducir una respuesta inflamatoria aguda), motilidad (mediante el uso del flagelo, que es considerado como un factor de aptitud), adhesinas (con fimbrias como la tipo 1, P, curli, FIC, Dr, Auf, S y M) y cápsula [7].

Este mecanismo de UPEC es descrito en la **figura 2** y se divide en los siguientes pasos: (1) La adherencia al uroepitelio, un proceso considerado como el primer paso para la colonización, es mediado por las fimbrias de UPEC. (2) La unión de esta bacteria promueve el reordenamiento de la actina, internalizándose en la célula del hospedero; (3) una vez en el ambiente intracelular UPEC puede multiplicarse y formar comunidades bacterianas intracelulares (IBC). (4) Además, un estado oxidativo genera la filamentación y el eflujo de UPEC fuera de la célula del hospedero; (5) finalmente, una vez afuera de la célula, esta bacteria puede infectar nuevamente y en algunos casos establecerse como reservorios intracelulares quiescentes (QIR) [7].

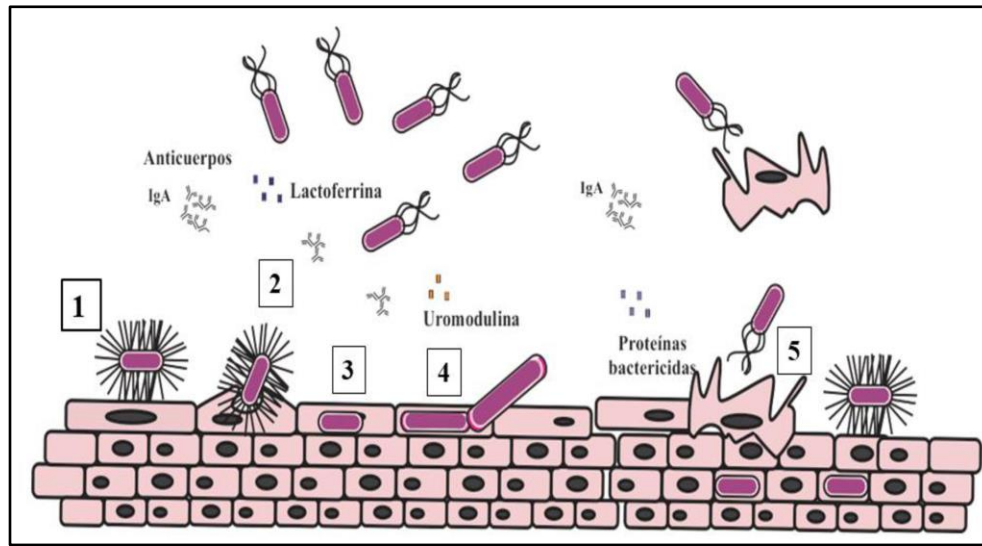


Figura 2 Mecanismo de patogenicidad de UPEC. UPEC es el principal agente causante de las ITU con diversos factores de virulencia y aptitud que le permiten colonizar a su hospedero. (1) UPEC inicia su patogenia al adherirse a las células superficiales de la vejiga, (2) activando un proceso de invasión, (3) el cual permite a la bacteria permanecer intracelularmente para formar IBCs. (4) La interacción de UPEC con la célula promueve un estado de oxidación intracelular, promoviendo la filamentación de la bacteria y su posterior eflujo, lisando a la célula del uroepitelio. Esta bacteria puede reinfectar y permanecer como un QIR. UPEC coloniza nuevamente para un nuevo ciclo de infección o dirigirse a un nuevo sitio blanco como el riñón.

5.3 Biogénesis de las principales fimbrias de UPEC

Las fimbrias son estructuras poliméricas ensambladas en la superficie de UPEC, las cuales principalmente promueven la adherencia de la bacteria al tracto urinario [10]. Estas fimbrias contienen una molécula adhesiva (adhesinas) en su parte apical del heteropolímero o es la proteína estructural del homopolímero de algunas de estas (**Figura 3**) [11–13]. Las principales fimbrias de UPEC son la tipo1 y P, que se caracterizan por su biogénesis mediada por la vía de chaperona-acomodador. Este proceso de ensamble es mediado principalmente por dos proteínas, una periplásmica (chaperona) y otra de membrana

externa (acomodador). Las subunidades de la fimbria P son: PapC, PapH, PapG (adhesina), PapF, 5 a 10 repeticiones de PapE y PapK, además de 1,000 repeticiones de PapA. Homólogamente, la fimbria tipo 1, después de su adhesina FimH se une la proteína FimG, seguido de FimF y de 1,000 repeticiones de FimA, mientras FimD es localizada en la membrana externa [14]. Por otro lado, la biogénesis de la fimbria curli esta mediada por el sistema de traslocón-Sec en el periplasma y a su vez por el sistema de transporte extramembranal de nucleación-precipitación de la proteína estructural CsgA [12]. Esta fimbria está constituida principalmente por la subunidad CsgA codificada por el operón *csgBAC*. El ensamblaje de curli es promovido por la polimerización de CsgA apoyada por la proteína nucleadora CsgB. Los genes *csgD*, *csgE*, *csgF* y *csgG* se transcriben en la orientación opuesta al operón *csgBAC* y codifican para la proteína reguladora CsgD, mientras las proteínas CsgE, CsgF y CsgG son los componentes secretorios [12].

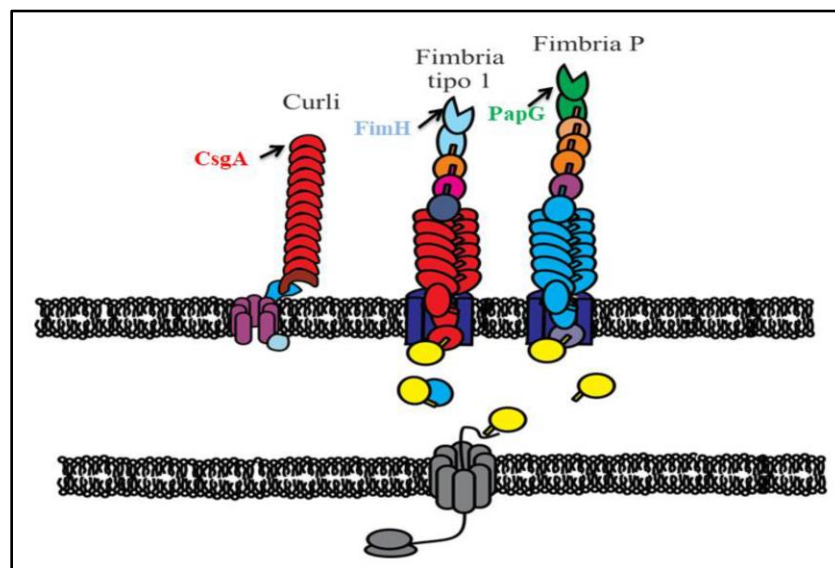


Figura 3 Esquema representativo de las principales fimbrias de UPEC. Las principales fimbrias de UPEC son la tipo1 y P, que se caracterizan por su biogénesis mediada por la vía de chaperona-acomodador. [14]. Por

otro lado, la biogénesis de la fimbria curli esta mediada por el sistema de traslocón-Sec en el periplasma y a su vez por el sistema de transporte extramembranal de nucleación-precipitación de la proteína estructural CsgA [12].

5.4 Antecedentes

Estudios previos mostraron una alta distribución en las adhesinas FimH de la fimbria tipo 1 y CsgA de curli en cepas de UPEC aisladas de niños pediátricos [15,16]. Mientras, la adhesina PapG de la fimbria P también fue ampliamente distribuida en aislados de UPEC con relevancia clínica (**Figura 4**) [16].

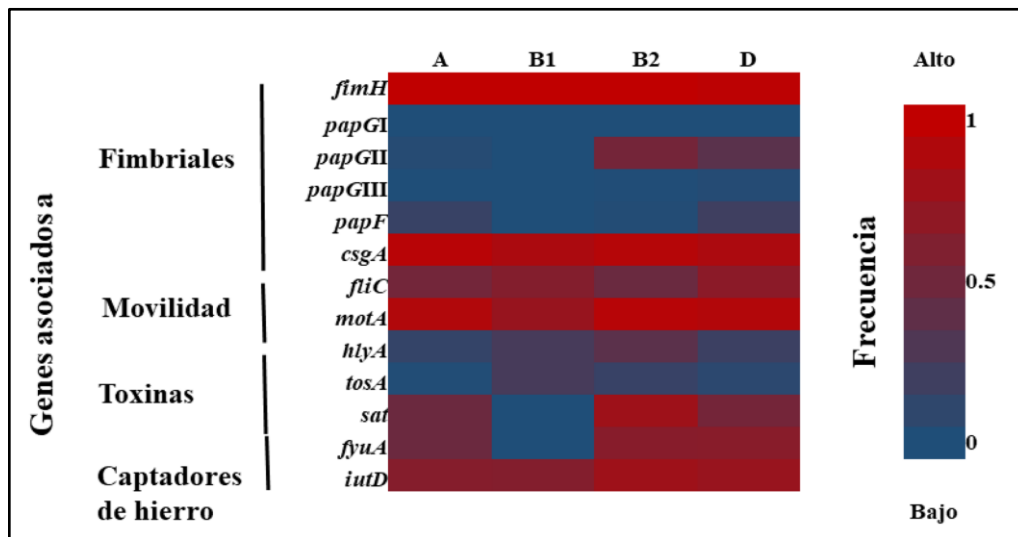


Figura 4 Distribución de los principales genes de virulencia y de aptitud. La evaluación por PCR de los genes de virulencia y aptitud en una colección de aislados clínicos de UPEC mostró una amplia distribución de las fimbrias, tales como: Fimbria tipo, P y curli. Adicionalmente, estas fimbrias fueron asociadas a los grupo filogenético B2 y D principalmente [16].

La adhesina FimH de la fimbria tipo 1 ha sido ampliamente utilizada como una vacuna en modelo animal. El suero de ratones C3H/HeJ inmunizados con FimH y la fimbria tipo 1 inhibe la adherencia a células humanas de vejiga [17]. El dominio de unión a manosa de FimH, la proteína completa y en asociación con FimC (flagelina y chaperona), reducen significativamente la adherencia en vejiga y riñón de ratones, incluyendo monos *cynomolgus*. Estos datos sugieren que los anticuerpos específicos anti-FimH inhiben la colonización de UPEC [18–21].

La proteína recombinante FimH fusionada con FliC, induce un aumento de la respuesta inmune celular y humoral contra las ITU en modelo murino. Estos estudios, mostraron niveles altos de inmunoglobulinas (IgG1 e IgG2a) y la liberación de citocinas (INF γ : interferón gamma e IL4: interleucina 4) por células T (Th1 y Th2), los cuales fueron identificados después de una inmunización subcutánea [22]. La proteína de fusión de FimH (UPEC) y MrpH (*Proteus mirabilis*), induce significativamente la liberación de anticuerpos IgG e IgA en diversas muestras de ratón (suero, orina, lavado nasal y vaginal) después de la inmunización IN. La inmunidad celular tipo Th1 y Th2 generada por las proteínas FimH/MrpH con o sin adyuvante MPL, sugiere que una de estas proteínas funcionan como una molécula adyuvante [23]. Adicionalmente, se observó que la proteína FimH interacciona con el TLR4 a través de un correceptor α -manosilado, que favorece la activación de células epiteliales CD4⁺ mediante la vía Tirap-MyD88 para el reclutamiento de neutrófilos en la mucosa [24,25].

Datos preliminares han mostrado que la proteína CsgA funciona como una adhesina accesoria que contribuye a la adherencia de UPEC a células de vejiga. Estudios más finos son requeridos para determinar la función específica de CsgA de UPEC en un proceso de

colonización [26]. Otro estudio mostró niveles altos de anticuerpos anti-CsgA en sueros de pacientes convalecientes de sepsis, sugiriendo que la proteína CsgA es expresada *in vivo*; sin embargo, la inmunogenicidad de esta proteína no fue evaluada en este estudio. La fimbria curli en otras *E. coli* induce significativamente la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF α , IL-6 e IL-8) en células de macrófagos [27]. La proteína recombinante CsgA de *Salmonella* y la fimbria curli de *E. coli* MC4100, participan en la liberación de IL-8 en células de macrófagos de humano THP-1 a través de la interacción cooperativa de TLR1 y TLR2 [28]. La proteína CsgA también ha sido considerada como un PAMP (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, por sus siglas en inglés), responsable de generar una respuesta de IL-6 e IL1 β mediante la vía del inflamosoma (NLRP3) [29,30].

La adhesina PapG de UPEC ha sido involucrada en procesos de pielonefritis en humanos [31]. La interacción de PapG con un correceptor del TLR4 con características de esfingolípido, activa la secreción de IL-6 e IL-8 [24,32]. La inmunización intraperitoneal de la fimbria P completa con la chaperona PapD genera una protección contra la inflamación del riñón e induce una producción de anticuerpos específicos en sueros de ratón y mono *cynomolgus* [33,34]. Sin embargo, una diferencia no significativa fue observada entre el número de bacterias recuperadas en orina y el grupo control, probablemente por la expresión de otras fimbrias que contribuyen en la colonización bacteriana [34].

En un estudio previo, las adhesinas PapG, CsgA y FimH de las fimbrias antes mencionadas fueron fusionadas con la secuencia EAAAK con el siguiente orden: *fimH-csgA-papG-fimH-csgA*. Esta plantilla permitió la clonación de los diferentes genes diméricos y triméricos para su posterior expresión y purificación a partir de cultivos de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Los genes de fusión *fc* (*fimH-csgA*) y *fcp* (*fimH-csgA-papG*)

mostraron una alta estabilidad como moléculas de fusión. Así mismo, el análisis bioinformático realizado en las proteínas de fusión FC (FimH-CsgA) y FCP (FimH-CsgA-PapG) mostró una adecuada estabilidad estructural con los epítomos expuestos y con péptidos de unión al complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHCII). Estas proteínas de fusión generadas fueron funcionales al ser evaluada en cultivo celular, siendo su capacidad de activar la liberación de IL-6 de 464.79 pg/mL para la proteína FC y de 521.24 pg/mL para la proteína FCP. La liberación de IL-8 mostró un valor de 398.52 pg/mL para la proteína FC y de 450.40 pg/mL para la proteína FCP. Las proteínas de fusión también reaccionaron con sueros pacientes con ITU; pero la proteína FC fue la molécula de mayor capacidad antigénica para interactuar con los anticuerpos IgA con una DO_{450} de 2.216 y de IgG con una DO_{450} de 0.837. La identificación de anticuerpos también en las orinas mostró valores de 0.950 de DO_{450} contra IgA y de 0.444 contra IgG. La adherencia de la cepa CFT073 a células de vejiga fue reducida hasta el 73% con anticuerpos anti-FC y del 46% con anti-FCP (**Figura 5**).

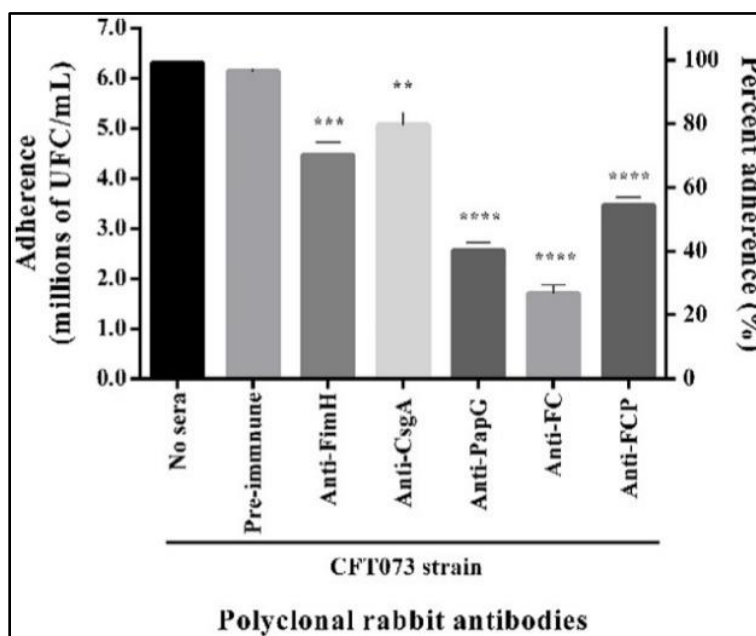


Figura 5 Reducción de la adherencia bacteriana en presencia de anticuerpos policlonales. La cepa *E. coli* CFT073 fue incubada con suero de conejos inmunizados con las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC, FCP (1:1) y células de vejiga HTB5 (MOI 1:100) por 2 h. Los anticuerpos policlonales de conejo favorecieron la reducción en la adherencia bacteriana (CFU/mL y porcentaje) comparado con la adherencia basal de la cepa CFT073 y con un pool de sueros pre-inmune. Las barras representan el promedio \pm D.E de tres experimentos independientes. ** $p = 0.0011$, *** $p = 0.0002$, and **** $p < 0.0001$ (Tomado de: Luna-Pineda et al., 2016)

Estos datos sugieren que estas proteínas de fusión tienen una capacidad protectora. En conclusión, las proteínas FC y FCP fueron las biomoléculas de mayor funcionalidad por su capacidad para liberar citocinas y por su alta expresión *in vivo* de acuerdo a los anticuerpos presentes en muestras de orina y suero de pacientes con ITU. Estas proteínas de fusión pueden ser consideradas viables para el diseño de una vacuna contra las ITU por su capacidad de protección contra la adherencia de UPEC a células de vejiga.

6. Planteamiento del problema

Las ITU son la tercera causa de morbilidad en México, sin embargo, una vacuna viable para esta enfermedad no ha sido desarrollada. Estas infecciones no solo impactan en el estilo de vida de las personas, si no, generan un alto costo en los tratamientos con antibióticos. UPEC, el principal agente causal de las ITU, ha incrementado su resistencia a diferentes grupos de antibióticos. El 20% de un conjunto de aislados clínicos de UPEC entre 2010 y 2011 mostraron un perfil de resistencia MDR(multidrogoresistente), sin embargo, un aumento considerable del 66.3% en otra colección de aislados clínicos fue obtenido entre el 2012 y 2013 [15,16]. El tratamiento de elección en pediátricos, como en el HIMFG, es trimetoprim-sulfametoxazol, ciprofloxacina y ampicilina, pero la resistencia a estos antibióticos es reportada en estas colecciones de aislados clínicos MDR de UPEC. En el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal (LIBI) se diseñó y generó proteínas de fusión diméricas y triméricas con las principales adhesinas de UPEC. Los anticuerpos generados contra la proteína dimérica FC inhibió la adherencia de la cepa de UPEC a una línea celular de vejiga humana. Además, la proteína monomérica PapG también mostró niveles altos de inhibición bajo las mismas condiciones [35].

7. Hipótesis

Si, los anticuerpos contra las proteínas PapG y FC protegen contra la adherencia de UPEC a una línea celular de vejiga; entonces, la inmunización de estas dos proteínas como un bioconjugado (HIM_2.0) a ratones C57BL/6 generará una respuesta protectora contra la infección. Los datos generados establecerán a este bioconjugado como una vacuna potencial contra estas infecciones por UPEC.

8. Objetivos

8.1 General

Evaluar la respuesta protectora del bioconjugado HIM_2.0 en un modelo murino de infección del tracto urinario

8.2 Particulares

- Obtener los componentes proteicos del bioconjugado HIM_2.0
- Determinar la capacidad protectora del bioconjugado HIM_2.0

9. Metodología

9.1 Verificación y purificación de los componentes del bioconjugado HIM_2.0

Los vectores de expresión pLATE-*papG* y pLATE-*fc* fueron clonados y transformados en la cepa de *E. coli* BL21 por Luna-Pineda y cols., 2016 [35]. Estas bacterias transformadas con su correspondiente vector de expresión fueron verificadas por reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) la amplificación de los genes *papG* y *fc*. Las condiciones de PCR fueron también establecidas por Luna-Pineda y cols., mientras los iniciadores específicos descritos en el manual de aLICator LIC Cloning and Expression (Thermo Scientific) fueron utilizados para la amplificación. La expresión de los genes fue realizada por *colony blotting* usando anticuerpos 6X his tag de ABCAM (ab137839; CB, UK) y los ensayos de solubilidad de las proteínas fueron realizados con los protocolos

establecidos en el manual The QIAexpressionist (Qiagen, St, Germany). La purificación de las proteínas PapG y FC fue realizada por cromatografía de afinidad a Ni-NTA en condiciones desnaturalizantes usando el método establecido por Luna-Pineda y cols., 2016. Brevemente, la cepa *E. coli* BL21 transformada con el vector de expresión pLATE-*papG* y pLATE-*fc* fueron cultivadas en 10 ml agar LB (Luria Bertani) suplementado con 100µg/mL de ampicilina (LB; Becton-Dickinson, Franklin Lakes, Nueva Jersey, EE. UU.) a 37 °C durante 16 horas. A partir del precultivo, una alícuota de 1 mL fue utilizada para inocular en 500 mL de medio LB suplementado con 100µg/mL de ampicilina y cultivado a 37 °C hasta alcanzar una densidad óptica a 600 nm (DO_{600}) de 0.5 a 0.7 de absorbancia (Abs). El cultivo ajustado fue suplementado con isopropil-β-D-1-tiogalactopiranosido (IPTG, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) a una concentración de 1 M e incubado a 30°C durante 5 horas, permitiendo la inducción de la expresión de las proteínas. Posterior esta inducción, las células bacterianas fueron recuperadas por centrifugación a 5,000 rpm (revoluciones por minuto) durante 10 minutos, los cuales, fueron resuspendidos en búffer de fosfato (K_2HPO_4 10 mM, pH 7.4, NaCl 150 mM y EDTA 1 mM) suplementado con fluoruro de fenilmetilsulfonilo (PMSF; Sigma-Aldrich Corp., St. Louis, MO, EE. UU.). Esta suspensión bacteriana fue lisada usando sonicación (Sonics Materials VCX-130PB Ultrasonic Processor, Thermo Fisher Scientific, MA, USA) con amplificación del 80% con pulsos de 10 segundos y 10 segundos en frío hasta obtener una suspensión aclarada. Esta suspensión fue centrifugada a 40,000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante fue descartado.

El paquete insoluble fue resuspendido en búffer desnaturalizante (Guanidina 8 M, NaCl 100 mM y K_2HPO_4 100 mM, pH 8) e incubado durante 3 días a temperatura ambiente. La suspensión insoluble tratada con el agente caotrópico fue centrifugada a 40,000 rpm durante 20 minutos y el sobrenadante fue recuperado. Este sobrenadante fue incubado a 4°C con resina de ácido níquel-nitrilotriacético-agarosa (Ni-NTA) (Qiagen) durante 1 h, empaquetado en una columna de vidrio de 50 x 600 mm (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Una vez empaquetada en la columna, la suspensión solubilizada con hidroxiclورو de guanidina (HClGnd) fue eluida y la resina con las proteínas unidas fue lavada con búffer A (Urea 8.5 M, Tris 20 mM, pH 7.5, NaCl 160 mM e imidazol 20 mM). Finalmente, las proteínas fueron eluidas con búffer B (Urea 8 M, Na_2HPO_4 50 mM, pH 8, NaCl 100 mM e imidazol 500 mM) en 10 mL. Las proteínas recuperadas se encuentran desnaturalizadas y su replegamiento fue realizado mediante diálisis utilizando un gradiente de urea de 7 a 1 M en búfer de fosfatos a 4°C. Las proteínas de fusión replegadas fueron almacenadas en buffer C a -70°C para todos los ensayos [35].

La verificación de estas proteínas fue realizada con electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico (SDS-PAGE, por sus siglas en inglés) al 12% y Western blotting con cuatro anticuerpos distintos: anti-PapG, anti-FCP, anti-FimH y anti-FC [35]. La cuantificación de endotoxina fue realizada con el ensayo de lisado de amebocitos de *Limulus* (Thermo Fisher Scientific, MA, USA). Las proteínas con concentraciones mayores a 0.1 EU/mL fueron tratadas con 50 µg / ml de polimixina B (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) a 4°C durante 12 horas. La cuantificación de las proteínas fue realizada con el kit 2D Quant (GE Healthcare Life Sciences, PA, USA)

siguiendo los protocolos ya establecidos por el fabricante. Adicionalmente, la fimbria tipo 1, P fueron purificadas por precipitación y centrifugación, siguiendo los protocolos establecidos por Douglas y Eisenstein [36]. Mientras curli fue purificada usando los métodos establecidos por Saldaña y cols., 2009 [37].

9.2 Inmunización IN e IM de ratones C57BL/6

Ratones hembra C57BL/6 entre 10-12 semanas fueron obtenidos del bioterio de la FES-Iztacala y su manipulación se realizó bajo la norma de “Especificaciones técnicas para la producción, cuidado y uso de los animales de laboratorio” NOM-62-ZOO-199. Los grupos de ratones fueron divididos en dos vías de inmunización IN e IM y subdivididos en: búffer fosfato salino (PBS) (NaCl 138mM, KCl 3 mM, Na₂HPO₄ 8.1 mM, KH₂PO₄ 1.5 mM) como control negativo, bioconjugado HIM_2.0 y fimbrias. La administración IN involucró el uso de una micropipeta de 1-10µL, ayudando a colocar gota por gota su respectiva solución en cada una de las narinas de los ratones. La administración IM fue realizada con jeringas de insulina (BD, Franklin Lakes, NJ, USA) para administrar en el musculo, en la región inferiores de la extremidad izquierda de los ratones. Las inmunizaciones, refuerzos y dosis usadas fueron estandarizadas y se muestran en resultados.

9.3 Modelo de infección murino de ITU

Los ratones C57BL/6 inmunizados fueron retados por inoculación transuretral de la cepa de UPEC 529U-0712, usando los protocolos establecidos en el laboratorio por Luna-Pineda y colaboradores (2018). La cepa de UPEC fue cultivada en placas de agar LB a 37°C durante toda la noche. Las colonias obtenidas fueron recuperadas en 1 mL de PBS y ajustadas hasta

obtener la Abs de 1.0 (1×10^9 bacterias). Los grupos de ratones fueron anestesiados con una solución 1:10 de Pentobarbital y posteriormente inoculadas transuretral con 100 μ L de PBS conteniendo 1×10^8 células bacterianas. A las 48 horas posterior a la infección, los ratones fueron sacrificados para colectar la vejiga y los riñones. Los órganos fueron colocados en 1 mL de PBS adicionados con 0.01% de Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp) y estos fueron homogenizados mecánicamente. La cuantificación de las UFC/mL por órgano fue realizado por microdilución en placa, sembrados en placas de agar MacConkey e incubados toda la noche para el conteo de colonias.

9.4 Obtención de suero, orina y lavados vaginales posterior a la inmunización

Las muestras biológicas obtenidas a partir de los ratones inmunizados fueron suero, lavados vaginales y orinas. La sangre total de los ratones fue obtenida por incisión en la base de la cola de cada ratón y esta fue centrifugada a 3,000 rpm durante 10 minutos. El suero fue separado en un tubo para microcentrifuga y resguardado a -70°C hasta su uso. Las muestras de vagina fueron obtenidas a partir de cuatro lavados consecutivos con 50 μ L de PBS para cada uno. Estos lavados vaginales fueron centrifugados a 3,000 rpm durante 10 minutos y almacenando el sobrenadante a -70°C hasta su uso. Las muestras de orina fueron obtenidas manipulando a los ratones con presiones mecánica a nivel abdominal, mientras la muestra obtenida fue recolectada durante tres días consecutivos y resguardada a -70°C hasta su uso.

9.5 Determinación de anticuerpos por ELISA

Los anticuerpos de la clase IgG e IgA fueron identificados en la orina, lavados vaginales y suero mediante el ensayo de inmunoabsorción ligado a enzima (ELISA, por sus

siglas en inglés). Las proteínas PapG y FC fueron diluidas en amortiguador de carbonatos (Na_2CO_3 / NaHCO_3 50 mM, pH 9.6) hasta obtener una concentración de 5 ng/ μL y placas de poliestireno fueron sensibilizadas con estas proteínas con una incubación a 4°C durante 12 horas. Las placas de poliestireno sensibilizadas fueron lavadas tres veces con PBS suplementado 0.05% Tween 20. El bloqueo en las placas fue realizado con PBS suplementado con leche semidescremada al 5% e incubadas a 20°C durante 2 horas. Las muestras de orina fueron incubadas directamente y los lavados vaginales fueron diluidas 1:2 en PBS, mientras los sueros fueron diluidos 1:100 en PBS. La incubación de las muestras fue realizada a 4°C durante 12 horas. Posterior a tres lavados, el anticuerpo anti-IgG de Abcam (ab197767; CB, UK) y anti-IgA de Sigma Aldrich (MO, USA), ambos acoplado a HRP, fueron utilizados como anticuerpo secundario. Estos anticuerpos secundarios fueron incubados a temperatura ambiente durante 1 hora y posterior lavado por 5 veces. El revelado fue realizado por colorimétrica con el kit de revelado OptEIA de la marca Becton Dickinson y Compañía (NJ, USA). Las lecturas de absorbancia fueron realizada a una longitud de onda de 450 nm, usando el lector de ELISA de Thermo Fisher Scientific (Multiskan Fc, MA, USA).

9.6 Diagramas de trabajo

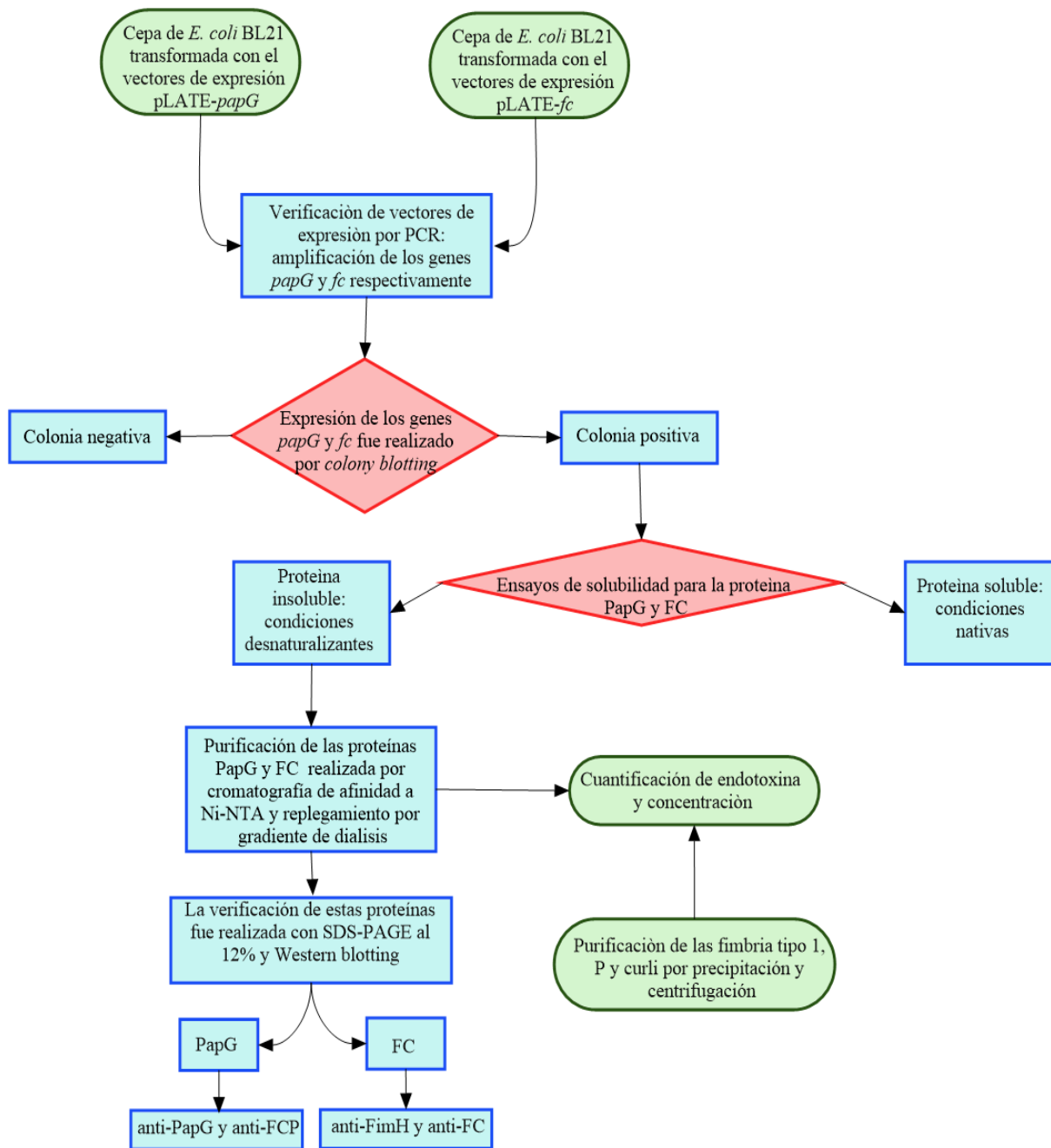


Figura 6 Metodología general para verificar y purificar los componentes del bioconjugado HIM_2.0. La verificación del vector de expresión pLATE-*papG* y pLATE-*fc* permite llevar a cabo el proceso de selección de cepas de *E. coli* BL21 capaces de expresar los genes *papG* y *fc* para la posterior purificación en condiciones desnaturalizantes y verificación de las proteínas PapG y FC.

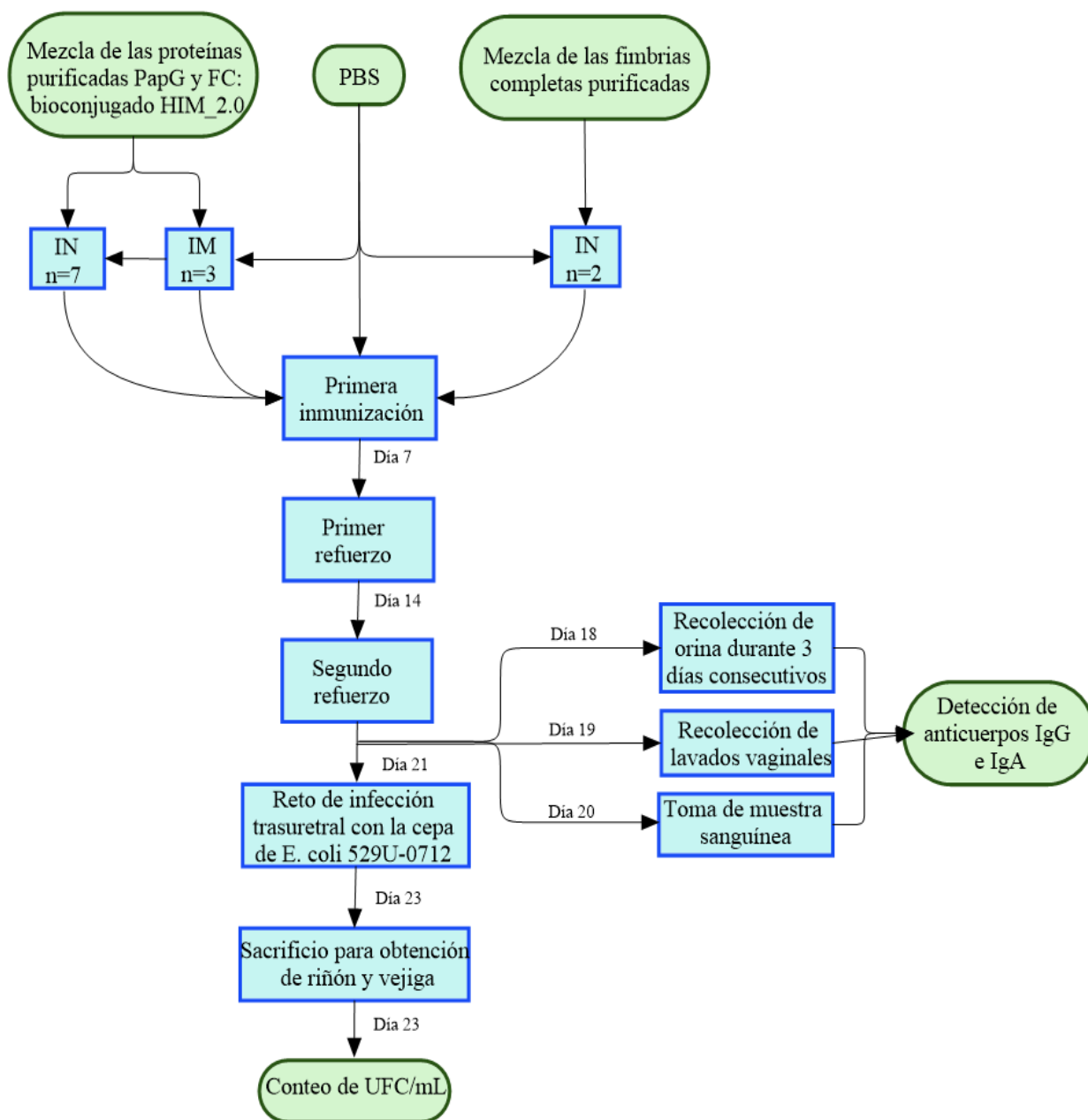


Figura 7 Metodología general de inmunización e infección para evaluar la respuesta protectora del bioconjugado HIM_2.0. El esquema de inmunización IN e IM se inicia a partir de la previa purificación y evaluación de las proteínas PapG y FC. La toma de muestras y el reto de infección transuretral son esenciales para la evaluación de la respuesta protectora del bioconjugado HIM_2.0.

9.7 Análisis estadístico

Las diferencias entre medias fueron realizadas usando las pruebas de *t* de student y de ANOVA de dos vías. Las diferencias entre medianas fueron realizadas con la prueba de U de Mann-Whitney y una $p \leq 0.01$ fue considerada como estadísticamente significativa para todos los resultados. Las gráficas y el análisis estadístico fueron realizadas con el programa GraphPad Prism versión 7.

10.Resultados

10.1 Purificación y verificación de los componentes del bioconjugado HIM_2.0

Los vectores de expresión pLATE-*papG* y pLATE-*fc* fueron obtenidos de un estudio previo; los cuales fueron transformados en la cepa de *E. coli* BL21 [35]. Ambos vectores de expresión contienen una secuencia específica para los iniciadores de secuenciación incluidos en el sistema de aLICator (Thermo Scientific; MA, USA). Estos iniciadores fueron utilizados para la verificación de una correcta inserción de los genes *papG* y *fc*. Las cepas de *E. coli* BL21 del 1 al 5 (C1 al C5) mostraron un fragmento amplificado de 1,139 pb (pares de bases) que corresponde a la clonación de *papG*, mientras las cepas C6 al C8 mostraron un amplicón característico a la clonación de *fc*, incluyendo la cepa C10, con 1442 pb (**Figura 8A**). Las cepas de *E. coli* BL21 de la C1 a C10 también fueron analizadas por *colony blotting* usando anticuerpos anti 6X his tag de ABCAM (ab137839; CB, UK) para determinar la expresión de las proteínas PapG y FC. La cepa C2 expresó eficientemente la proteína PapG, mientras la cepa C7 expresó la proteína FC (**Figura 8B**).

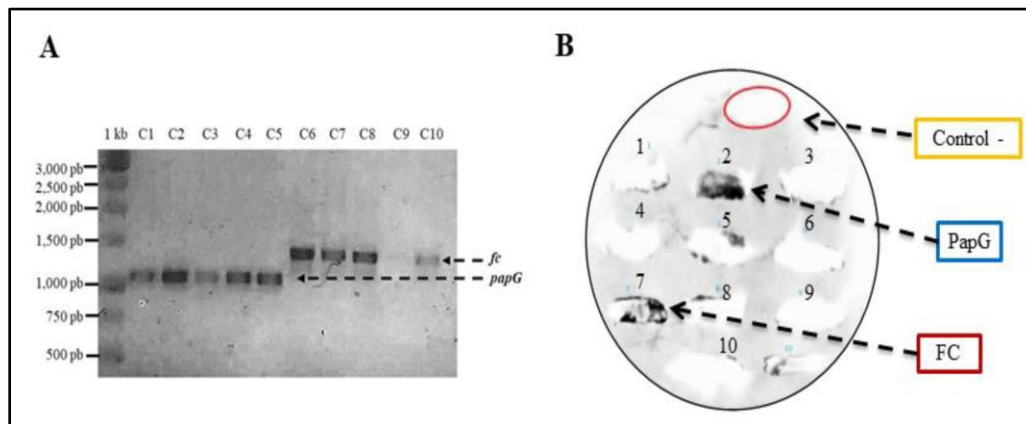


Figura 8 Verificación de las cepas transformantes pLATE-papG y pLATE-fc. La amplificación por PCR de los fragmentos 1,139 pb (*papG*) y 1,442 pb (*fc*) fue resuelta en un gel de agarosa al 0.7% y posterior tinción con bromuro de etidio. El marcador de peso molecular de 1 kb fue utilizado para verificar el tamaño de cada fragmento amplificado. La amplificación de un fragmento de 1,139 pb en cinco colonias fue identificada y correspondió a la correcta inserción de *papG*. Mientras, un fragmento de 1,442 pb fue identificado en cuatro colonias y correspondió a la inserto del gen *fc* (A). La técnica de *colony blotting* es una forma rápida de analizar la expresión de las proteínas del bioconjugado. Una réplica de las colonias de C1 a C10 fue realizada en una membrana de nitrocelulosa. La proteína PapG fue identificada en la cepa C2 y para la proteína FC fue identificada en la cepa C7. Los anticuerpos utilizados fueron: anti 6XHis dilución 1:5,000, anti IgG-HRP dilución 1:10,000; mientras el revelado por quimioluminiscencia fue realizado con los sustratos de *luminol* y peróxido de Immobilon y el análisis fue realizado con el transiluminador Fusion Xpress (B).

La cepa C2 fue utilizada para la purificación de la proteína PapG, mientras la cepa C7 para FC. El análisis de la solubilidad de estas proteínas mostró su localización de ambas en la fracción insoluble, posterior al análisis por SDS-PAGE al 12% teñido con azul de Coomassie (datos no mostrados). Las proteínas PapG y FC fueron purificadas por cromatografía de afinidad a Ni-NTA (QIAGEN, Hilden, DEU) en condiciones desnaturizantes con HClGnd de Sigma-Aldrich (MS, USA). La visualización en un SDS-PAGE al 12% mostró la proteína PapG de ~33.9 kDa (Kilodalton) en la fracción de la elución, sin embargo, bandas de diferente peso molecular fueron también visualizadas.

Probablemente por la formación de oligómeros por la proteína y su asociación a la alta concentración de esta (**Figura 9A**). Bajo las mismas condiciones, la proteína FC fue identificada con una banda de ~44.9 kDa y esta mostró una disminución de oligómeros (**Figura 9B**).

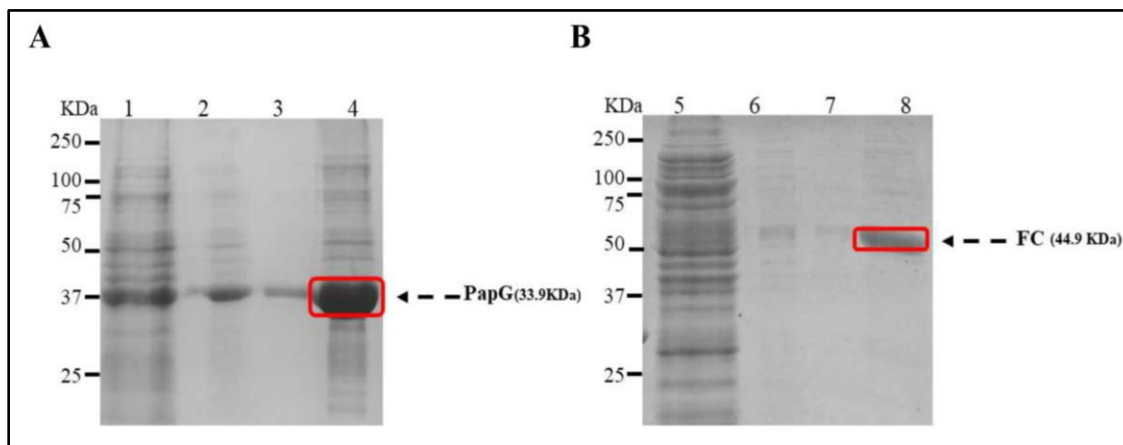


Figura 9 Purificación de las proteínas PapG y FC en condiciones desnaturizantes. Los pasos de purificación por cromatografía de afinidad a Ni-NTA fueron visualizados posterior al SDS-PAGE al 12% teñido con Coomassie. Los carriles 1 y 5 correspondieron a la fracción obtenida posterior al contacto con la resina Ni-NTA de PapG y FC respectivamente. Los carriles 2 y 3 correspondieron a la fracción obtenida posterior a los lavados de la proteína PapG y los carriles 6 y 7 corresponden a los lavados de FC. Los carriles 4 y 8 son las eluciones de las proteínas. La proteína PapG de ~33.9 kDa fue localizada en los carriles del 2 y 3, sin embargo, en el carril 4 se encontró enriquecida (A). La proteína FC de ~44.9 kDa fue identificada principalmente en el carril 8 (B).

La verificación de las proteínas PapG y FC fue realizada con anticuerpos específicos anti PapG, anti-FimH, anti-FC y anti-FCP por *Western blotting*. La detección de una banda de ~33.9 kDa confirmó específicamente la presencia de la proteína PapG, mientras una banda de ~44.9 kDa correspondió a la proteína FC (**Figura 10**). La cuantificación de las proteínas mostró para PapG 1.75 mg/mL y para FC 1.16 mg/mL. Los

niveles de endotoxina mostraron valores para PapG de 0.61 UI/mL y para FC de 0.27 UI/mL, por este motivo las proteínas fueron tratadas con 50 µg/mL de polimixina B (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) y fueron guardadas a -20°C hasta su uso.

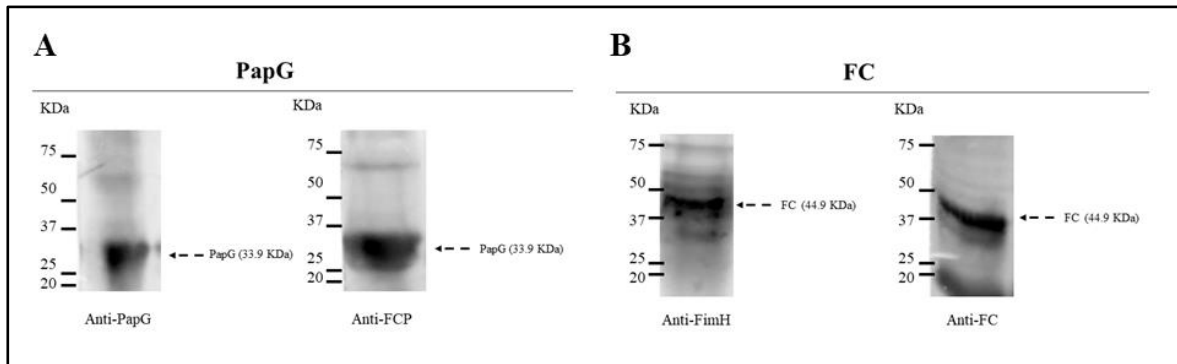


Figura 10 Verificación de las proteínas PapG y FC purificadas. *Western blotting* fue utilizado para la verificación de las proteínas con anticuerpos anti-PapG, anti-FimH, anti-FC y anti-FCP, según sea el caso. Los anticuerpos anti PapG y anti FCP identificaron específicamente a la proteína PapG de ~33.9 kDa (A). Mientras, los anticuerpos anti-FimH y anti-FC identificaron específicamente a la proteína FC de ~44.9 kDa (B).

10.2 Esquema de inmunización, recolección de muestras biológicas y reto

La vía de inmunización y la concentración del bioconjugado fueron establecidas en ratones C57BL/6 hembra de 10 a 12 semanas de vida (**Figura 11**). Brevemente, los ratones fueron administrados IN, los cuales fueron divididos en tres grupos: amortiguador de fosfatos (PBS, control negativo) con un número (n) de ratones de 7 y la administración del bioconjugado HIM_2.0 fue con una n = 7; mientras un grupo de fimbrias purificadas (fimbria tipo 1, P y curli) fue incluido en este estudio, pero con una n = 3. Los tiempos de inmunización y concentración de antígeno fueron estandarizados de la siguiente manera: la primera administración (día 0) fue realizada con 50 µg de cada uno de los componentes

(100 µg de proteína total), mientras la mezcla de fimbrias fue realizada con 33.3 µg de cada de estas (100 µg de proteína total). Todos los antígenos estuvieron contenidos en 40 µL de PBS y dividido en 20 µL para cada narina de los ratones. Adicionalmente, dos refuerzos en los días 7 y 14 fueron administrados con 25 µg de cada componente del bioconjugado (50 µg de proteína total), mientras la mezcla de fimbrias fue realizada con 16.6 µg de cada una (50 µg de proteína total), usando un volumen final de 20 µL de PBS (10 µL por narina). Por otro lado, se evaluó una vía de administración parenteral, tal como la inmunización IM. Estos ratones fueron divididos en dos grupos: PBS (control negativo) con una n = 3 y la administración del bioconjugado HIM_2.0 fue con la misma n = 7. Los tiempos de inmunización IM fueron los mismos a los estandarizados en la vía IN, pero la concentración de antígeno fue de la siguiente manera: la primera administración (día 0) fue realizada con 50 µg de cada uno de los componentes (100 µg de proteína total), mientras los dos refuerzos en los días 7 y 14 fueron administrados con 25 µg de cada componente del bioconjugado (50 µg de proteína total). El volumen para la administración IM de todos los grupos de ratones fueron en 300 µL de PBS.

En cada grupo, las muestras biológicas de suero, orina y lavados vaginales fueron recolectadas en los días 18, 19 y 20. En el día 21 se generó la infección del tracto urinario con la cepa clínica de UPEC 529U-0712 en los ratones antes inmunizados (**Figura 11**). La cepa de UPEC fue crecida en agar LB toda la noche a 37°C. La bacteria fue cosechada y suspendida en PBS hasta obtener una Abs igual a 1. A partir de la suspensión de bacterias se tomó 100 µL que contienen 1×10^8 células para la infección transuretral. El número de bacterias de UPEC y el modelo de ITU en ratón fueron estandarizados en un

estudio previo. A las 48 horas después de la infección (día 23), los ratones fueron sacrificados para obtener las vejigas y riñones. Los órganos fueron homogenizados mecánicamente en condiciones de esterilidad y resuspendidos en 1 mL de PBS adicionado con Triton-100X al 0.01 %. La cuantificación de UFC/mL se determinó por dilución en microplaca y siembra por gota en agar MacConkey por triplicado (**Figura 11**).

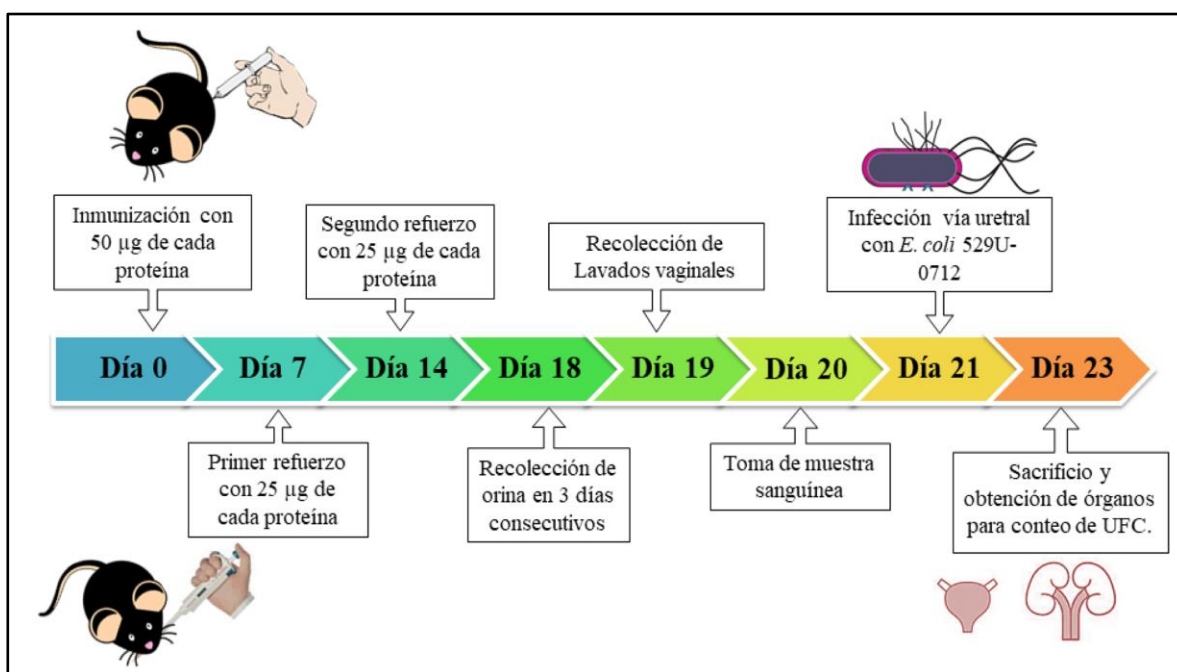


Figura 11 Esquema de inmunización. Ratones hembra C57BL/6 entre 10-12 semanas fueron inmunizados por primera vez con 100 µg del bioconjugado. Los refuerzos fueron realizados con 50 µg de bioconjugado en los días 7 y 14. Las muestras biológicas fueron recolectadas en los días 18, 19 y 20, tales como suero, orina y lavados vaginales. En el día 21 se generó la infección del tracto urinario con la cepa clínica de UPEC 529U-0712 y el día 23 fueron sacrificados para obtener la vejiga y los riñones.

10.3 La inmunización IN genera una protección eficiente contra la colonización de UPEC

El tracto urinario es considerado una mucosa, sin embargo la administración de antígenos en esta puede ser un proceso complicado y con efectos secundarios [38]. La inmunización IN es ampliamente utilizada para generar una respuesta en otra mucosa lejana, tal como la mucosa urogenital [39]. Sin embargo, no se descarta la posibilidad de utilizar una vía parenteral como la administración IM del bioconjugado. La administración IN con PBS mostró un valor de mediana de 1.6×10^7 UFC/mL, mientras la administración del bioconjugado HIM_2.0 mostró una disminución significativa ($p = 0.0005$) con un valor de mediana de 1.0×10^3 UFC/mL en la vejiga. En el riñón, la administración IN con el control mostró un valor de mediana de 7.0×10^5 UFC/mL y una disminución significativa ($p = 0.0005$) cuando fue comparado con la administración del bioconjugado con 2.0×10^3 UFC/mL (**Figura 12**). La inmunización IM no mostró diferencias significativas bajo las mismas condiciones en ambos órganos (**Figura 12**).

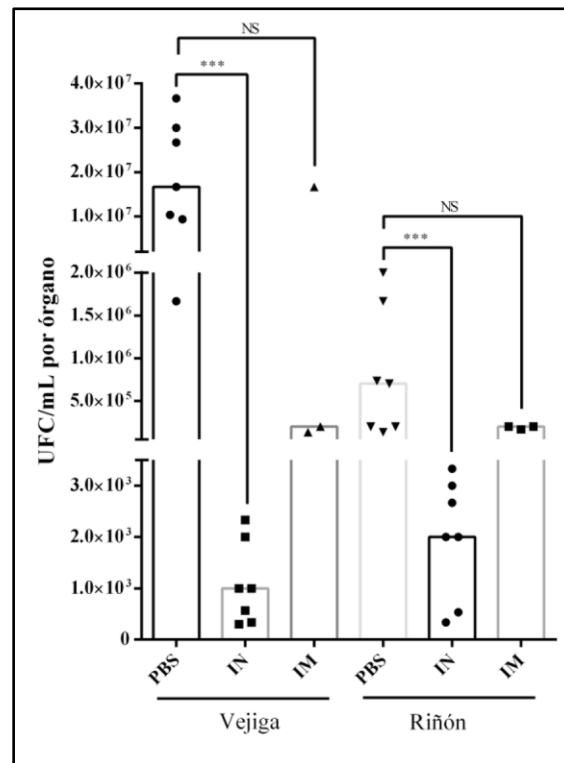


Figura 12 Evaluación de la capacidad protectora del bioconjugado HIM_2.0 en modelo murino. Siete ratones C57BL/6 inmunizados bajo el esquema establecido en este estudio fueron retados con la cepa clínica de UPEC 529U-0712 en el día 21. Posterior a 48 horas de infección, los ratones fueron sacrificados y la cuantificación de las UFC/mL fue realizada en las vejigas y riñones de cada uno. El control de PBS fue considerado como el 100% de la colonización para ambas inmunizaciones (IM e IN). Las diferencias significativas entre las medianas fueron consideradas como: NS = no significativo ($p > 0.5$); * = 0.05-0.01; ** = 0.01-0.001; *** = <0.001.

10.4 El bioconjugado HIM_2.0 como un candidato a vacuna contra las ITU

La inmunización IN generó una mayor respuesta protectora en el modelo murino de ITU. Los componentes del bioconjugado HIM_2.0 es la adhesina PapG de la fimbria P y la proteína dimérica FC contiene las adhesinas FimH y CsgA de la fimbria tipo 1 y curli, respectivamente. La inmunización IN de una mezcla de estas fimbrias mostró un valor de mediana de 1.3×10^8 UFC/mL, pero una diferencia significativa ($p = 0.055$) no se encontró

cuando se comparó con el control de PBS con un valor de 7.0×10^5 UFC/mL (**Figura 13**).

Sin embargo, una diferencia significativa ($p = 0.0005$) fue identificada cuando se comparó con la inmunización del bioconjugado en ambos órganos (**Figura 13**).

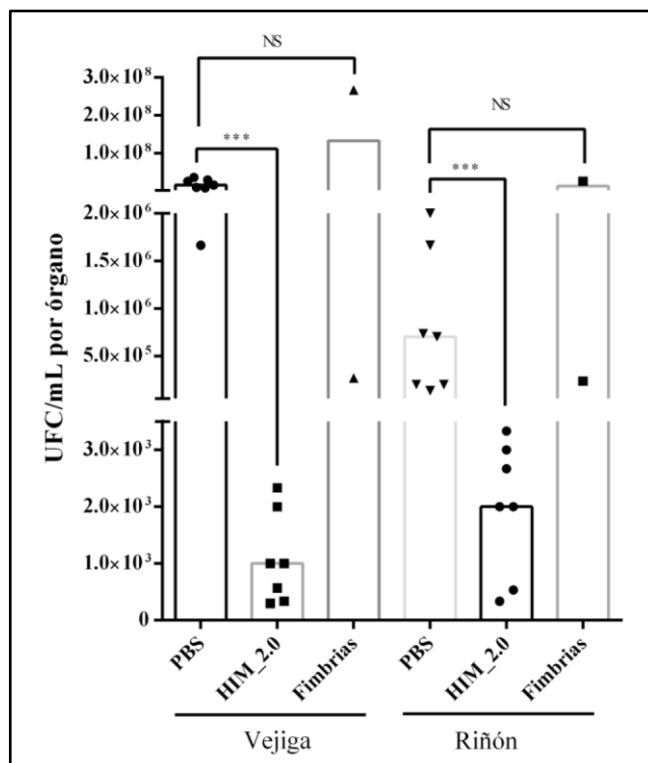


Figura 13 Análisis comparativo de la protección inducida por el bioconjugado y las fimbrias de UPEC. Siete ratones C57BL/6 inmunizados IN con el HIM_2.0 y las principales fimbrias (tipo 1, P y curli) fueron retados con la cepa clínica de UPEC 529U-0712 en el día 21. Posterior a 48 horas de infección, los ratones fueron sacrificados y la cuantificación de las UFC/mL fue realizada en las vejigas y riñones de cada uno. El control de PBS fue considerado como el 100% de la colonización. Las diferencias significativas entre las medianas fueron consideradas como: NS = no significativo ($p > 0.5$); * = 0.05-0.01; ** = 0.01-0.001; *** = <0.001 .

10.5 La protección generada por el bioconjugado HIM_2.0 es mediada por anticuerpos IgG

Una respuesta mediada por anticuerpos puede ser la principal vía para la disminución de la colonización de UPEC al tracto urinario; la cual bloquea específicamente la adherencia de UPEC durante la infección. Los anticuerpos específicos (IgG e IgA) anti-PapG y anti-FC fueron determinados posterior a las administraciones con el bioconjugado en distintas muestras biológicas, tales como: sueros, lavados vaginales y orinas. Los valores de Abs (450 nm) por debajo a los obtenidos por la administración a ratones con PBS fueron considerados como anticuerpos (IgA e IgG) basales o inespecíficos. Estos anticuerpos de la clase IgA contra ambas proteínas (PapG y FC) tuvieron una $Abs \leq 0.075$, contrariamente a lo esperado, solo un aumento mínimo en el valor de Abs contra la proteína FC fueron determinados en orina en ambas inmunizaciones (IN e IM). Mientras, los anticuerpos de la clase IgG tuvieron una $Abs \leq 0.072$ basal y/o de inespecificidad contra la proteína PapG y una $Abs \leq 0.069$ contra el dímero FC (**Figura 14 y 15**). La administración IN del bioconjugado generó la mayor respuesta de anticuerpos IgG en orina con una $Abs = 0.425$ contra la proteína PapG y una $Abs = 0.508$ contra el dímero FC. Bajo el mismo esquema, una $Abs = 0.176$ de anticuerpos IgG en suero fue determinada solo contra la proteína PapG, pero no cuando se evaluó las muestras de lavado vaginal contra ambas proteínas. La administración IM del bioconjugado generó la mayor respuesta en suero de anticuerpos IgG contra ambas proteínas con valores de $Abs = 0.987$ (PapG) y 1.471 (FC), mientras una $Abs = 0.195$ contra la proteína PapG y una $Abs = 0.289$ contra el dímero FC fueron determinados en lavados vaginales (**Figura 14 y 15**). La inmunización IN generó una

respuesta humoral favorable en el tracto urinario, mientras la inmunización IM generó una respuesta en suero y la mucosa vaginal, posterior al análisis estadístico (**Tabla 1**).

	IgG		IgA	
	anti-PapG	anti-FC	anti-PapG	anti-FC
Orina (PBS) vs. Orina (IN)	<0.0001	<0.0001	0.8093	0.0341
Orina (PBS) vs. Orina (IM)	>0.9999	0.1656	0.7237	0.0257
Suero (PBS) vs. Suero (IN)	0.0009	0.9935	0.9933	0.981
Suero (PBS) vs. Suero (IM)	<0.0001	<0.0001	0.9848	0.9989
Lavado vaginal (PBS) vs. Lavado vaginal (IN)	>0.9999	0.2944	0.9982	0.8941
Lavado vaginal (PBS) vs. Lavado vaginal (IM)	<0.0001	<0.0001	0.9998	0.9315
Orina (IN) vs. Orina (IM)	<0.0001	<0.0001	>0.9999	>0.9999
Suero (IN) vs. Suero (IM)	<0.0001	<0.0001	>0.9999	>0.9999
Lavado vaginal (IN) vs. Lavado vaginal (IM)	<0.0001	0.0001	0.9348	>0.9999

Tabla 1 Determinación de anticuerpos en muestras biológicas. Resultados del análisis estadístico de ANOVA de dos vías. Comparación de las Abs de los anticuerpos anti-PapG y anti-FC obtenidas entre los diferentes grupos empleados. Se resalta con negritas aquellos valores que muestran ser significativos.

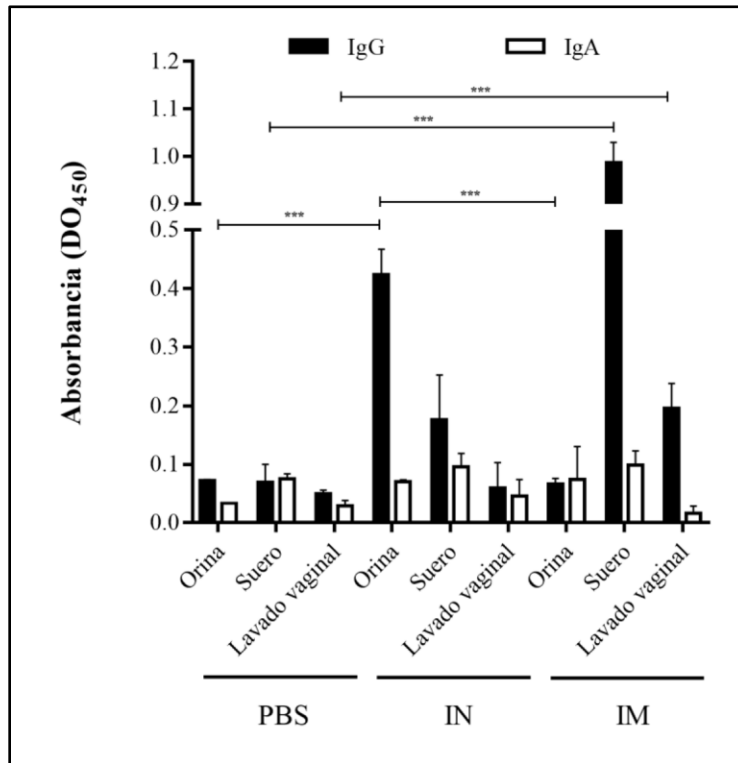


Figura 134 Identificación de anticuerpos anti-PapG en muestras biológicas de ratones inmunizados. Las orinas, sueros y lavados vaginales fueron obtenidos a partir de ratones C57BL/6 inmunizados vía IN e IM con el bioconjugado HIM_2.0. La inmunización con PBS en los diferentes grupos fue considerado como la basal de anticuerpos en los ratones. Los anticuerpos específicos anti-PapG fueron evaluados mediante ELISA con las siguientes diluciones de las muestras: directo para las muestras de orina, 1:100 para suero y 1:2 para los lavados vaginales. Los isotipos determinados para estas muestras biológicas fueron IgG e IgA. Las diferencias significativas entre las medianas fueron consideradas como: NS = no significativo ($p > 0.5$); * = 0.05-0.01; ** = 0.01-0.001; *** = < 0.001 .

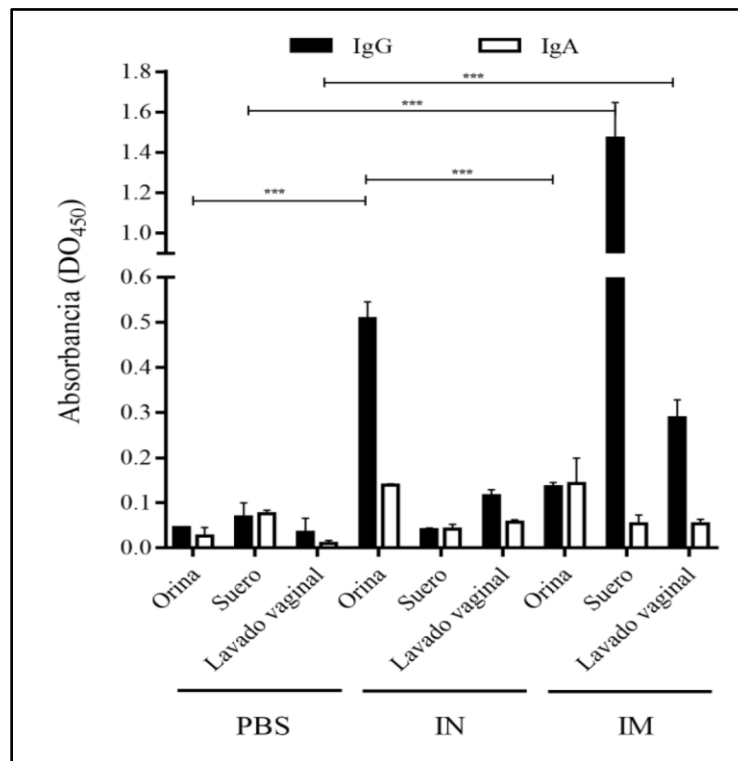


Figura 145 Identificación de anticuerpos anti-FC en muestras biológicas de ratones inmunizados. Las orinas, sueros y lavados vaginales fueron obtenidos a partir de ratones C57BL/6 inmunizados vía IN e IM con el bioconjugado HIM_2.0. La inmunización con PBS en los diferentes grupos fue considerado como la basal de anticuerpos en los ratones. Los anticuerpos específicos anti-FC fueron evaluados mediante ELISA con las siguientes diluciones de las muestras: directo para las muestras de orina, 1:100 para suero y 1:2 para los lavados vaginales. Los isotipos determinados para estas muestras biológicas fueron IgG e IgA. Las diferencias significativas entre las medianas fueron consideradas como: NS = no significativo ($p > 0.5$); * = 0.05-0.01; ** = 0.01-0.001; *** = <0.001 .

11. Discusión

Las adhesinas fimbriales de UPEC son consideradas biomoléculas viables para la generación de una vacuna eficaz; las cuales funcionan como antígenos que estimulen una respuesta inmune contra las ITU. Previamente, se diseñaron y generaron proteínas de fusión basadas en las adhesinas FimH, CsgA y PapG de las principales fimbrias de UPEC. Estas proteínas fueron evaluadas como biomoléculas capaces de generar protección contra la

adherencia de UPEC a una línea celular de vejiga. Interesantemente la proteína PapG y el dímero FC tuvieron la mayor inhibición de la adherencia de UPEC a esta línea celular [35]. En este estudio, estas dos proteínas fueron mezcladas para formar un bioconjugado definido como HIM_2.0 y un modelo murino fue utilizado para probar su capacidad protectora contra la colonización de UPEC. La cepa de ratones C57BL/6 es considerado un modelo para el estudio de las ITU por UPEC. Estos ratones tienen características genéticas que le permiten generar un ITU con un leve proceso inflamatorio y una moderada persistencia a la infección [40]. El número de bacteria requeridas para generar una eficiente infección esta entre 10^7 a 10^9 de células de UPEC, sin embargo, en este estudio el inóculo fue estandarizado a 10^8 células contenidas en 100 μL [40]. Las cepa bacteriana es comúnmente contenida en un volumen entre 25 a 50 μL , evitando reflujos vesicouretrales; mientras un volumen de 100 μL genera un proceso efectivo de pielonefritis [40]. La cepa de ratón C57BL/6 muestra poca variabilidad cuando es infectada y la cuantificación de UFC/mL se mantiene constante durante el curso de esta [41]. Estos datos en el modelo de ITU con la cepa C57BL/6 permitió la estandarización de 48 horas de infección con un resultado homogéneo.

La integridad de las proteínas PapG y FC purificadas fue evaluada y la concentración fue determinada para realizar una mezcla equimolar del bioconjugado HIM_2.0. Otros estudios con proteínas recombinantes y de fusión utilizan concentraciones entre 10 y 50 μg de cada una de estas para la primera inmunización en modelo murino y los refuerzos fueron establecidos entre 2.5 y 25 μg [23,42–44]. Sin embargo, la concentración del bioconjugado fue de 100 μg en 40 μL de PBS (50 μg de cada una) para la primera administración a los ratones C57BL/6; mientras los refuerzos fueron establecidos con 50 μg

del bioconjugado (25 µg de cada uno) en 20 µL de PBS. En un estudio, la cepa clínica UPEC 529U-0712 fue caracterizada su resistencia y epidemiología molecular, incluyendo genes de virulencia y de aptitud [15]. Esta cepa clínica MDR fue seleccionada para la generación de la infección durante los restos posterior a la inmunización.

Las vacunas disponibles actualmente para combatir las ITU son dirigidas principalmente a la respuesta inmune sistémica, debido a la dificultad de estimular la inmunidad de la mucosa. No obstante, se ha se ha demostrado la existencia de un sistema inmune común de mucosa en humanos y animales, el cual incluye la mucosa genitourinaria [45]. La administración oral no fue considerada en este proyecto por su efecto adverso como la tolerancia inmunológica ante las proteínas del bioconjugado [46]. Además, otra vía de administración no considerada fue la intravaginal, debido a la irritación e inflamación reportada por esta inmunización [47]. El bioconjugado fue administrado IM como una vía parenteral, sin embargo, la administración IN fue considerada en este estudio como la posible vía mucosal efectiva para inducir protección. La inmunogenicidad en la mucosa es inducida eficazmente por la administración de antígenos vía IN, intravaginal y oral; mientras, con la administración parenteral se obtiene una respuesta poco eficiente [48]. La estimulación en la mucosa IN generó una mejor respuesta protectora en el modelo de ratones C56BL/6 de ITU, cuando fue comparada con la administración IM. Las mucosas en los animales, tal como el sistema inmune común de mucosa (NALT) (nasofaringe) están funcionalmente conectadas como sistema inmune común de mucosa (CMIS), con un sitio inductor (células T y B inactivas) y un sitio efector (células T y B efectoras) [45,49]. El NALT genera una respuesta específica en la mucosa del tracto urinario, posterior a la inmunización con diversos antígenos [39]. El antígeno O, FimCH [FimH unida a la

chaperona FimC], PapDG [PapG unida a la chaperona PapD], HlyA y IroN) han sido evaluados después de la inmunización parenteral en modelos animales, generando una respuesta específica a nivel sistémico y no en mucosa [19,34,50,51]. Interesantemente, la inmunización IN con el bioconjugado tuvo una mayor respuesta protectora comparada con las fimbrias tipo 1, P y curli purificadas de UPEC. La vacuna SolcoUrovac® (lisados de uropatógenos) administrada vía mucosa vaginal tiene una limitada protección contra una ITU [52]. La administración vía vaginal de esta vacuna con compuestos con mayor complejidad que las subunidades proteicas mostró reacciones adversas manifestadas por dolor e irritación del epitelio vaginal [47]. La administración oral del inmunomodulador Urostim, estimula una respuesta celular y humoral; pero sin generar una protección contra la infección [53]. Mientras, la administración vía oral diaria de OM-89/Uro-Vaxom® genera una reducción en las ITU recurrentes; sin embargo, también genera tolerancia inmunológica y manifestaciones a nivel gastrointestinal [54]. La inmunización vía transuretral a ratones con cepas de UPEC atenuadas no son persistentes en el tracto urinario y favorecen una protección inespecífica [55].

La inmunización IN de diferentes antígenos de UPEC (ChuA, Hma, Iha, IreA, IroN, IutA y FimH) activan la liberación de altas concentraciones de IgA en saliva, vagina y orina [42,56]. En este estudio, se obtuvo orina, suero y lavados vaginales de los ratones inmunizados IN e IM para determinar anticuerpos específicos anti-PapG y anti-FC de la clase IgG e IgA. La principal inmunoglobulina fue de la clase IgG para ambas inmunizaciones con el bioconjugado y las diferentes muestras biológicas. Interesantemente, las muestras de orinas obtenidas de la inmunización IN se identificó la mayor distribución de IgG específica para ambos componentes del bioconjugado y la ausencia de IgA. Estos

datos demuestran una protección mediada por IgG dirigidos contra las principales fimbrias de UPEC, disminuyendo la colonización de esta bacteria en el tracto urinario. Interesantemente, la ausencia de IgG específicas a los componentes del bioconjugado no fue identificada en suero, indicando la activación de la respuesta humoral probablemente en el bazo y/o en los nódulos linfáticos cercanos al tracto urinario. Las células dendríticas (CDs) activadas por antígeno migran a los nódulos linfáticos del mediastino posterior a la inmunización IN, mientras un bajo número de células B son localizadas en estos nódulos [57]. En los nódulos del mediastino se da la presentación del antígeno entre las CDs y las células T, seguida de su activación y migración al sitio efector [57]. El bazo y los nódulos del mesentérico son los tejidos linfoides donde migran estas células T activadas, donde las células T CD4⁺ son la principal clona identificada en este tejido [57]. Estos datos confirman la ausencia de anticuerpos en suero generados por el bioconjugado HIM_2.0, probablemente por una respuesta inmune adaptativa tipo Th2 en mucosa del tracto urinario, como en otros estudios [58]. La vagina es otra mucosa donde se ha demostrado la presencia de anticuerpos IgG, cuando se inmuniza IN [59], sin embargo, la presencia de esta clase de inmunoglobulina solo fue identificada posterior a la inmunización IM del bioconjugado. La lámina propia está localizada por debajo de la mucosa del uroepitelio, contiene células plasmáticas que secretan IgM e IgA, incluso existe una baja expresión de IgG [34]. Sin embargo, los anticuerpos protectores que predominaron al inmunizar IN a los ratones fueron de la clase IgG, lo que es contrastante ya que en mucosas se encuentra en bajas concentraciones. Las células plasmáticas generan cambio de isotipo IgG, como se ha demostrado al administrar IN de una vacuna (partículas virales) contra el virus del papiloma humano [59].

12. Conclusión

El bioconjugado HIM_2.0 inmunizado IN generó una eficiente protección contra la colonización de UPEC en un modelo murino de ITU, además este es un mejor candidato a vacuna que las fimbrias completas incluidas en este estudio. El probable mecanismo de protección generado por el bioconjugado es mediado por la migración de CDs a los nódulos linfáticos del mediastino, donde se da la activación de células T. Estas células T activadas migran a bazo y nódulos linfáticos mesentéricos, donde pueden generar la proliferación de células B productoras de IgG específicos de antígeno (**Figura 16**).

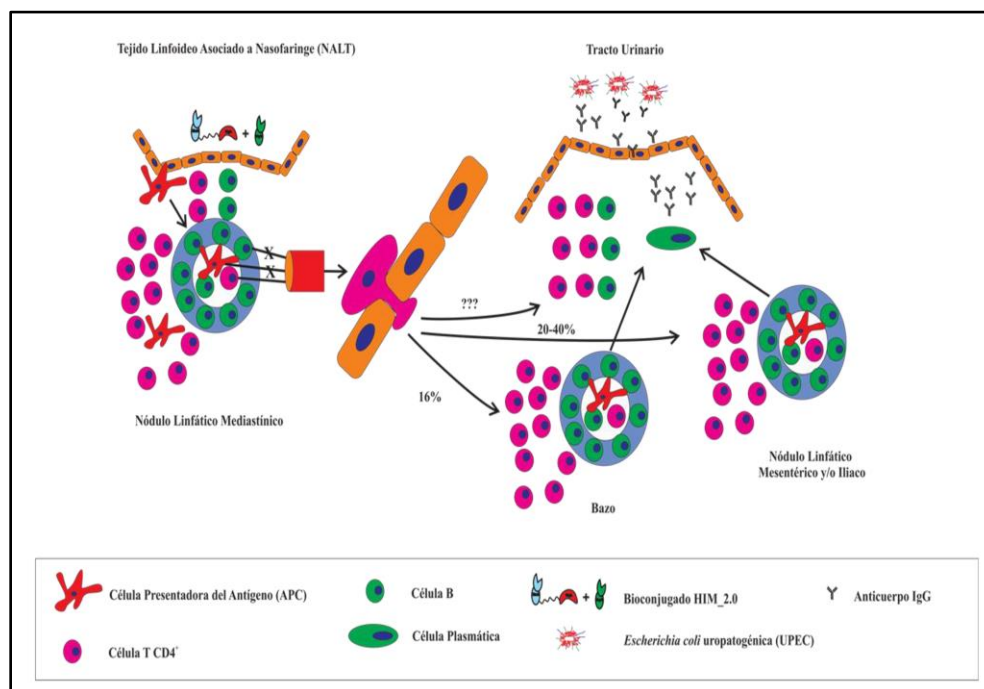


Figura 156 Esquema representativo de la protección inducida por el bioconjugado HIM_2.0. El NALT es considerado con el sitio inductor, donde el bioconjugado es procesado y son activadas las células presentadoras del antígeno (APC). El tracto urinario es considerado como el sitio efector, cercano a este se encuentran los tejidos linfoides distales, tales como: bazo y los nódulos linfoides mesentérico e iliaco. En estos tejidos las células T CD4⁺ activan a células B a plasmáticas (PC) productoras de inmunoglobulinas de la

clase IgG. Estos anticuerpos son capaces de extravasarse del uroepitelio a la luz de la vejiga, bloqueando la adherencia de UPEC durante la infección.

13. Perspectivas

Los datos obtenidos en este proyecto con el bioconjugado HIM_2.0 sugieren una capacidad protectora mediada por anticuerpos IgG, posterior a la administración IN. La viabilidad de este bioconjugado requiere de un estudio utilizando una muestra con mayor número de ratones; mientras para el registro de este compuesto como una vacuna requiere de un tercero autorizado por Comisión Federal para la Protección contra Riesgos Sanitarios (COFEPRIS). Por este motivo, un análisis exploratorio en un laboratorio, tal como: eficacia, inmunogenicidad, toxicidad y seguridad, que permita realizar medicina traslacional debe ser realizado; el cual sea avalado por la Entidad Mexicana de Acreditación, A.C. (EMA).

14. Referencias

- [1] Secretaria de Salud, Anuario de Morbilidad 1984 - 2016, (2016). http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/html/morbilidad_nacional.html.
- [2] P. Whiting, M. Westwood, L. Bojke, S. Palmer, G. Richardson, J. Cooper, I. Watt, J. Glanville, M. Sculpher, J. Kleijnen, Clinical effectiveness and cost-effectiveness of tests for the diagnosis and investigation of urinary tract infection in children: a systematic review and economic model, *Health Technol. Assess. Winch. Engl.* 10 (2006) iii–iv, xi–xiii, 1–154.
- [3] Secretaria de Salud, Panorama epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México 2003-2008, [Http://Www.Epidemiologia.Salud.Gob.Mx/Anuario/2015/Morbilidad/Grupo/Veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.Pdf](http://www.Epidemiologia.Salud.Gob.Mx/Anuario/2015/Morbilidad/Grupo/Veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.Pdf). (2015). http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/grupo/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf.
- [4] A.R. Brumbaugh, H.L.T. Mobley, Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine, *Expert Rev. Vaccines*. 11 (2012) 663–676. doi:10.1586/erv.12.36.

- [5] López-Martínez B, Alcázar-López V, Castellanos-Cruz M, Franco-Hernández M, Jiménez-Tapia Y, De León-Ham A, Mejía-Albarrán ME, Pichardo-Villalón L, Tapia-Madrigal ML, Moreno-Espinosa S, Calderón-Jaimes E, Institutional vigilance of antimicrobial susceptibility in pathogens of clinical interest, *Bol Med Hosp Infant Mex.* 70 (2013) 222–229.
- [6] S. Subashchandrabose, H.L.T. Mobley, Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*, *Microbiol. Spectr.* 3 (2015). doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.
- [7] V.M. Luna-Pineda, S. Ochoa, A. Cruz-Córdova, V. Cázares-Domínguez, F. Vélez-González, R. Hernández-Castro, J. Xicohtencatl-Cortes, Urinary tract infections, immunity, and vaccination, *Bol. Med. Hosp. Infant. Mex.* 75 (2018) 67–78. doi:10.24875/BMHIM.M18000011.
- [8] G.R. Nielubowicz, H.L.T. Mobley, Host-pathogen interactions in urinary tract infection, *Nat. Rev. Urol.* 7 (2010) 430–441. doi:10.1038/nrurol.2010.101.
- [9] J. Agarwal, S. Srivastava, M. Singh, Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*, *Indian J. Med. Microbiol.* 30 (2012) 141–149. doi:10.4103/0255-0857.96657.
- [10] E.-M. Antão, L.H. Wieler, C. Ewers, Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*, *Gut Pathog.* 1 (2009) 22. doi:10.1186/1757-4749-1-22.
- [11] I. Connell, W. Agace, P. Klemm, M. Schembri, S. Mårild, C. Svanborg, Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93 (1996) 9827–9832.
- [12] M.M. Barnhart, M.R. Chapman, Curli biogenesis and function, *Annu. Rev. Microbiol.* 60 (2006) 131–147. doi:10.1146/annurev.micro.60.080805.142106.
- [13] C.N. Spaulding, S.J. Hultgren, Adhesive Pili in UTI Pathogenesis and Drug Development, *Pathog. Basel Switz.* 5 (2016). doi:10.3390/pathogens5010030.
- [14] J. Lillington, S. Geibel, G. Waksman, Biogenesis and adhesion of type 1 and P pili, *Biochim. Biophys. Acta.* 1840 (2014) 2783–2793. doi:10.1016/j.bbagen.2014.04.021.
- [15] S.A. Ochoa, A. Cruz-Córdova, V.M. Luna-Pineda, J.P. Reyes-Grajeda, V. Cázares-Domínguez, G. Escalona, M.E. Sepúlveda-González, F. López-Montiel, J. Arellano-Galindo, B. López-Martínez, I. Parra-Ortega, S. Giono-Cerezo, R. Hernández-Castro, D. de la Rosa-Zamboni, J. Xicohtencatl-Cortes, Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Strains: Phylogenetic Groups Widely Associated with Integrons Maintain High Genetic Diversity, *Front. Microbiol.* 7 (2016) 2042. doi:10.3389/fmicb.2016.02042.
- [16] V.M. Luna-Pineda, S.A. Ochoa, A. Cruz-Córdova, V. Cázares-Domínguez, J.P. Reyes-Grajeda, M.A. Flores-Oropeza, J. Arellano-Galindo, R. Castro-Hernández, M. Flores-Encarnación, A. Ramírez-Vargas, H.J. Flores-García, L. Moreno-Fierros, J. Xicohtencatl-Cortes, Features of urinary *Escherichia coli* isolated from children with complicated and uncomplicated urinary tract infections in Mexico, *PloS One.* 13 (2018) e0204934. doi:10.1371/journal.pone.0204934.
- [17] S. Langermann, S. Palaszynski, M. Barnhart, G. Auguste, J.S. Pinkner, J. Burlein, P. Barren, S. Koenig, S. Leath, C.H. Jones, S.J. Hultgren, Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination, *Science.* 276 (1997) 607–611.

- [18] K. Thankavel, B. Madison, T. Ikeda, R. Malaviya, A.H. Shah, P.M. Arumugam, S.N. Abraham, Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection, *J. Clin. Invest.* 100 (1997) 1123–1136. doi:10.1172/JCI119623.
- [19] S. Langermann, R. Möllby, J.E. Burlein, S.R. Palaszynski, C.G. Auguste, A. DeFusco, R. Strouse, M.A. Schenerman, S.J. Hultgren, J.S. Pinkner, J. Winberg, L. Guldevall, M. Söderhäll, K. Ishikawa, S. Normark, S. Koenig, Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*, *J. Infect. Dis.* 181 (2000) 774–778. doi:10.1086/315258.
- [20] S. Langermann, W.R. Ballou, Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infections, *J. Infect. Dis.* 183 Suppl 1 (2001) S84–86. doi:10.1086/318857.
- [21] S. Langermann, W.R. Ballou, Development of a recombinant FimCH vaccine for urinary tract infections, *Adv. Exp. Med. Biol.* 539 (2003) 635–648.
- [22] M.R. Asadi Karam, M. Oloomi, M. Mahdavi, M. Habibi, S. Bouzari, Vaccination with recombinant FimH fused with flagellin enhances cellular and humoral immunity against urinary tract infection in mice, *Vaccine.* 31 (2013) 1210–1216. doi:10.1016/j.vaccine.2012.12.059.
- [23] M. Habibi, M.R. Asadi Karam, M.A. Shokrgozar, M. Oloomi, A. Jafari, S. Bouzari, Intranasal immunization with fusion protein MrpH·FimH and MPL adjuvant confers protection against urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*, *Mol. Immunol.* 64 (2015) 285–294. doi:10.1016/j.molimm.2014.12.008.
- [24] H. Fischer, M. Yamamoto, S. Akira, B. Beutler, C. Svanborg, Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 267–277. doi:10.1002/eji.200535149.
- [25] P. Samuelsson, L. Hang, B. Wullt, H. Irjala, C. Svanborg, Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa, *Infect. Immun.* 72 (2004) 3179–3186. doi:10.1128/IAI.72.6.3179-3186.2004.
- [26] M.A. Cordeiro, C.H. Werle, G.P. Milanez, T. Yano, Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis, *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* 47 (2016) 414–416. doi:10.1016/j.bjm.2016.01.024.
- [27] Z. Bian, A. Brauner, Y. Li, S. Normark, Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis, *J. Infect. Dis.* 181 (2000) 602–612. doi:10.1086/315233.
- [28] C. Tükel, J.H. Nishimori, R.P. Wilson, M.G. Winter, A.M. Kestra, J.P.M. van Putten, A.J. Bäumlér, Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms, *Cell. Microbiol.* 12 (2010) 1495–1505. doi:10.1111/j.1462-5822.2010.01485.x.
- [29] Z. Bian, Z.Q. Yan, G.K. Hansson, P. Thorén, S. Normark, 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, *J. Infect. Dis.* 183 (2001) 612–619. doi:10.1086/318528.

- [30] G.J. Rapsinski, M.A. Wynosky-Dolfi, G.O. Oppong, S.A. Tursi, R.P. Wilson, I.E. Brodsky, Ç. Tükel, Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli, *Infect. Immun.* 83 (2015) 693–701. doi:10.1128/IAI.02370-14.
- [31] M.C. Lane, H.L.T. Mobley, Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney, *Kidney Int.* 72 (2007) 19–25. doi:10.1038/sj.ki.5002230.
- [32] B. Freundéus, C. Wachtler, M. Hedlund, H. Fischer, P. Samuelsson, M. Svensson, C. Svanborg, *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation, *Mol. Microbiol.* 40 (2001) 37–51.
- [33] B. Pecha, D. Low, P. O’Hanley, Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by piliated *Escherichia coli* in a murine model. Single-component Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by homologous and heterologous piliated *E. coli* strains, *J. Clin. Invest.* 83 (1989) 2102–2108. doi:10.1172/JCI114123.
- [34] J.A. Roberts, M.B. Kaack, G. Baskin, M.R. Chapman, D.A. Hunstad, J.S. Pinkner, S.J. Hultgren, Antibody responses and protection from pyelonephritis following vaccination with purified *Escherichia coli* PapDG protein, *J. Urol.* 171 (2004) 1682–1685. doi:10.1097/01.ju.0000116123.05160.43.
- [35] V.M. Luna-Pineda, J.P. Reyes-Grajeda, A. Cruz-Córdova, Z. Saldaña-Ahuactzi, S.A. Ochoa, C. Maldonado-Bernal, V. Cázares-Domínguez, L. Moreno-Fierros, J. Arellano-Galindo, R. Hernández-Castro, J. Xicohtencatl-Cortes, Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli*, *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6 (2016) 135. doi:10.3389/fcimb.2016.00135.
- [36] D.C. Dodd, B.I. Eisenstein, Antigenic quantitation of type 1 fimbriae on the surface of *Escherichia coli* cells by an enzyme-linked immunosorbent inhibition assay, *Infect. Immun.* 38 (1982) 764–773.
- [37] Z. Saldaña, J. Xicohtencatl-Cortes, F. Avelino, A.D. Phillips, J.B. Kaper, J.L. Puente, J.A. Girón, Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli, *Environ. Microbiol.* 11 (2009) 992–1006. doi:10.1111/j.1462-2920.2008.01824.x.
- [38] F.X. Keane, Mucosal histology following prolonged use of the Urovac: a suction operated urinal, *Paraplegia.* 19 (1981) 22–24. doi:10.1038/sc.1981.7.
- [39] R. Pabst, Mucosal vaccination by the intranasal route. Nose-associated lymphoid tissue (NALT)-Structure, function and species differences, *Vaccine.* 33 (2015) 4406–4413. doi:10.1016/j.vaccine.2015.07.022.
- [40] A.J. Carey, C.K. Tan, D.S. Ipe, M.J. Sullivan, A.W. Cripps, M.A. Schembri, G.C. Ulett, Urinary tract infection of mice to model human disease: Practicalities, implications and limitations, *Crit. Rev. Microbiol.* 42 (2016) 780–799. doi:10.3109/1040841X.2015.1028885.
- [41] W.J. Hopkins, A. Gendron-Fitzpatrick, E. Balish, D.T. Uehling, Time course and host responses to *Escherichia coli* urinary tract infection in genetically distinct mouse strains, *Infect. Immun.* 66 (1998) 2798–2802.
- [42] L.A. Mike, S.N. Smith, C.A. Sumner, K.A. Eaton, H.L.T. Mobley, Siderophore vaccine conjugates protect against uropathogenic *Escherichia coli* urinary tract

- infection, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113 (2016) 13468–13473. doi:10.1073/pnas.1606324113.
- [43] M.R.A. Karam, M. Oloomi, M. Mahdavi, M. Habibi, S. Bouzari, Assessment of immune responses of the flagellin (FliC) fused to FimH adhesin of Uropathogenic *Escherichia coli*, *Mol. Immunol.* 54 (2013) 32–39. doi:10.1016/j.molimm.2012.11.002.
- [44] A. Wieser, E. Romann, G. Magistro, C. Hoffmann, D. Nörenberg, K. Weinert, S. Schubert, A multiepitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in mice, *Infect. Immun.* 78 (2010) 3432–3442. doi:10.1128/IAI.00174-10.
- [45] J.R. McGhee, K. Fujihashi, Inside the mucosal immune system, *PLoS Biol.* 10 (2012) e1001397. doi:10.1371/journal.pbio.1001397.
- [46] P. Brandtzaeg, Mucosal immunity: induction, dissemination, and effector functions, *Scand. J. Immunol.* 70 (2009) 505–515. doi:10.1111/j.1365-3083.2009.02319.x.
- [47] W.J. Hopkins, J. Elkahwaji, L.M. Beierle, G.E. Levenson, D.T. Uehling, Vaginal mucosal vaccine for recurrent urinary tract infections in women: results of a phase 2 clinical trial, *J. Urol.* 177 (2007) 1349–1353; quiz 1591. doi:10.1016/j.juro.2006.11.093.
- [48] M.M. Levine, Immunization against bacterial diseases of the intestine, *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* 31 (2000) 336–355.
- [49] P.A. Kozlowski, S.B. Williams, R.M. Lynch, T.P. Flanigan, R.R. Patterson, S. Cu-Uvin, M.R. Neutra, Differential induction of mucosal and systemic antibody responses in women after nasal, rectal, or vaginal immunization: influence of the menstrual cycle, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 169 (2002) 566–574.
- [50] T.A. Russo, C.D. McFadden, U.B. Carlino-MacDonald, J.M. Beanan, R. Olson, G.E. Wilding, The Siderophore receptor IroN of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a potential vaccine candidate, *Infect. Immun.* 71 (2003) 7164–7169.
- [51] P. O’Hanley, G. Lalonde, G. Ji, Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of piliated digalactoside-binding *Escherichia coli* in the kidney: efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis, *Infect. Immun.* 59 (1991) 1153–1161.
- [52] D. Kochiashvili, A. Khuskivadze, G. Kochiashvili, G. Koberidze, V. Kvakhajelidze, Role of the bacterial vaccine Solco-Urovac® in treatment and prevention of recurrent urinary tract infections of bacterial origin, *Georgian Med. News.* (2014) 11–16.
- [53] S. Marinova, P. Nenkov, R. Markova, S. Nikolaeva, R. Kostadinova, I. Mitov, M. Vretenarska, Cellular and humoral systemic and mucosal immune responses stimulated by an oral polybacterial immunomodulator in patients with chronic urinary tract infections, *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* 18 (2005) 457–473. doi:10.1177/039463200501800306.
- [54] H.W. Bauer, S. Alloussi, G. Egger, H.-M. Blümlein, G. Cozma, C.C. Schulman, Multicenter UTI Study Group, A long-term, multicenter, double-blind study of an *Escherichia coli* extract (OM-89) in female patients with recurrent urinary tract infections, *Eur. Urol.* 47 (2005) 542–548; discussion 548. doi:10.1016/j.eururo.2004.12.009.

- [55] B.K. Billips, R.E. Yaggie, J.P. Cashy, A.J. Schaeffer, D.J. Klumpp, A live-attenuated vaccine for the treatment of urinary tract infection by uropathogenic *Escherichia coli*, *J. Infect. Dis.* 200 (2009) 263–272. doi:10.1086/599839.
- [56] C.J. Alteri, E.C. Hagan, K.E. Sivick, S.N. Smith, H.L.T. Mobley, Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection, *PLoS Pathog.* 5 (2009) e1000586. doi:10.1371/journal.ppat.1000586.
- [57] A. Ciabattini, E. Pettini, F. Fiorino, G. Prota, G. Pozzi, D. Medaglini, Distribution of primed T cells and antigen-loaded antigen presenting cells following intranasal immunization in mice, *PloS One.* 6 (2011) e19346. doi:10.1371/journal.pone.0019346.
- [58] P. Thumbikat, C. Waltenbaugh, A.J. Schaeffer, D.J. Klumpp, Antigen-specific responses accelerate bacterial clearance in the bladder, *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 176 (2006) 3080–3086.
- [59] X.S. Liu, I. Abdul-Jabbar, Y.M. Qi, I.H. Frazer, J. Zhou, Mucosal immunisation with papillomavirus virus-like particles elicits systemic and mucosal immunity in mice, *Virology.* 252 (1998) 39–45. doi:10.1006/viro.1998.9442.