



UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

FACULTAD DE QUÍMICA

**PROTEÍNAS DE MEMBRANA EXTERNA RECEPTORES DE
HIERRO EN CEPAS DE *Escherichia coli* UROPATÓGENA**

T E S I S

**QUE PARA OBTENER EL TÍTULO DE:
QUÍMICA FARMACÉUTICA BIÓLOGA**

P R E S E N T A

GRISELDA VÉLEZ AGUILERA



MÉXICO, D.F.

2010



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.

JURADO ASIGNADO

PRESIDENTE	Profra. María del Carmen Cortés Decuir
VOCAL	Profra. Ruth Edith Martín Fuentes
SECRETARIO	Prof. Hipólito Ángel Manjarrez Hernández
1er. SUPLENTE	Prof. Luciano Hernández Gómez
2do. SUPLENTE	Prof. José Ignacio Páramo Ramírez

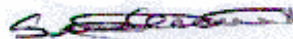
SITIO DONDE SE DESARROLLÓ EL TEMA: Laboratorio de Patogénesis Bacteriana.
Departamento de Salud Pública. Facultad de Medicina, UNAM.

ASESOR DEL TEMA



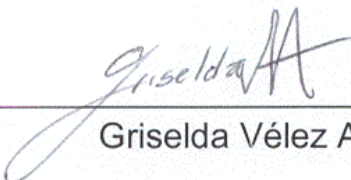
Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández

SUPERVISOR TÉCNICO



M. en C. Sandra Gavilanes Parra

SUSTENTANTE



Griselda Vélez Aguilera

Agradecimiento especial

*Al Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el financiamiento del proyecto **CONACyT-Salud-2008-87586** otorgado al Dr. Rigoberto Hernández Castro, para la realización de la Tesis de Licenciatura.*

Dr. H. Ángel Manjarrez Hernández por depositar su confianza en mi y darme la oportunidad de participar en este proyecto y ser parte del grupo de trabajo, por todo el apoyo brindado, consejos, conocimientos y sobre todo por su asesoría en el presente Proyecto. Espero que en un futuro pueda volver a colaborar con ustedes.

M. en C. Sandra Gavilanes Parra por tener la paciencia necesaria para enseñarme las técnicas, por todo su apoyo, su co-asesoría, su calidad humana y porque definitivamente sin su ayuda no se hubieran logrado los objetivos planteados.

Dr. José Molina López por su apoyo durante mi estancia en el laboratorio, por permitirme aprender de él y por su aportación de conocimientos.

Bióloga María Elena Chávez Berrocal por su valioso apoyo técnico y por la serotipificación de las cepas de estudio.

Dr. Rigoberto Hernández Castro gracias por todas sus atenciones, por permitirme formar parte del proyecto y considerarme para que se me otorgara la beca de CONACyT.

A las Profesoras María del Carmen Cortés Decuir y Ruth Edith Martín Fuentes por el tiempo dedicado y su paciencia en la revisión de la Tesis, por sus valiosas observaciones y sugerencias que sin duda contribuyeron a mejorar el presente trabajo.

A todas aquellas personas que contribuyeron de alguna forma para la realización del presente trabajo muchas gracias.

A todos mis Profesores por ser parte indispensable de mi desarrollo profesional durante la carrera, ya que sin su ayuda y sus conocimientos no estaría en donde me encuentro ahora.

Y principalmente gracias a la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) y a la Facultad de Química por darme la dicha de realizar mis estudios profesionales. “Por mi Raza Hablará el Espíritu”.

***A mis padres, hermanos, familia y amigos
a los cuales debo parte de este triunfo.***

*A mis amados **Padres:** por darme la vida, una maravillosa formación, por ser mi auténtico ejemplo a seguir, por su trabajo extraordinario que han realizado como padres, por todo su amor, cariño y comprensión y por contagiarme de sus mayores fortalezas. En cada paso los llevo conmigo. Definitivamente no hubiera podido llegar hasta aquí sino fuera por ustedes. Me siento orgullosa de ser su hija, los amo.*

*A mi mamá **María del Consuelo Aguilera Herrera:** por ser la mejor mamá, compañera y amiga, por saber guiarme en todo momento, por su eterna paciencia, por decir que soy una ternura, por ser tan atenta con mis amigos, porque me has dado muchísimo más de lo que una hija puede pedir.*

*A mi padre **Carlos Vélez Sánchez:** porque siempre te has dado tiempo para escucharme, convivir, interesarte en todo lo que me gusta, apoyarme en todo momento, por enseñarme que a base de esfuerzo y de dedicación uno es capaz de realizar sus sueños, y porque sin duda eres un excelente y único padre.*

*A mis hermanos **Carmen, Carlos y Diana:** por creer en mí, por ser de mis más grandes apoyos, me siento muy afortunada de tener unos hermanos tan maravillosos como ustedes sé del talento que posee cada uno y estoy segura que llegarán muy lejos, los amo y quiero que sepan que su felicidad también es la mía.*

*A mi **abuelita Carmelita:** por ser la abuelita más consentidora del mundo, por tu nobleza, por todo el amor que me has dado, por estar siempre al pendiente de mí, porque esta meta también es tuya y estoy segura que mi abuelito y mi tía Chata también estarían felices.*

*A mi **tía Lupita:** por ser la primera persona en preguntarme ¿qué es lo que más te gusta de tu carrera? Ahora te puedo decir tía que es el simple hecho de sentirme feliz con todo lo que he aprendido y la verdad es que no me imagino estudiando otra carrera. Si algo me enseñaste es tener absoluta vocación, sin duda eres un ejemplo a seguir, una persona maravillosa que siempre obsequió su amor incondicional a todo aquél que lo rodeara. Mil gracias por estar al pendiente de mí en todo momento, por quererme tanto, por ser mi angelito, siempre te recordaré y estás en mi corazón.*

*A mis **tíos y primos:** por todo el cariño que me han dado, por tantos momentos familiares que siempre tendré presentes, por compartir conmigo las diferentes etapas de mi vida y principalmente por hacerme sentir que tengo un gran apoyo en cada uno de ustedes.*

*A mi **tío Héctor:** por regalarme las batas del laboratorio, por apoyarme en todo momento, por ser tan consentidor con tus sobrinos y por todo tu valioso cariño que me has brindado.*

*A **María:** por ser mi nana gracias por quererme tanto y siempre estar al pendiente de mí.*

“Un verdadero amigo es quien te toma de la mano y te toca el corazón”

Gabriel García Márquez

No puedo olvidarme de agradecer a todos mis amigos principalmente por dejarme disfrutar de la vida a su lado, los adoro.

A mis niñas Azalia y Paloma me siento muy afortunada de tenerlas ya que definitivamente mi estancia en la Facultad de Química no hubiera sido la misma sin ustedes, porque transformaron mi vida al permitirme formar parte de su familia y su mundo, por hacer de mi mundo también el suyo y porque esta amistad me ha dado tantas cosas que ni siquiera había imaginado.

***Azalia:** me sigue sorprendiendo la forma en la que has llegado a conocerme, gracias por todos tus consejos, por la confianza que me tienes, por todos los momentos vividos aquí y en Tixtla, por hacer la fiesta en la que más me he divertido, por ser mi aprendiz, por todo lo que has hecho por mí, sabes que te deseo lo mejor y estoy segura que en la Maestría nos irá de maravilla.*

***Paloma:** porque a partir del segundo día de clases surgió esta inigualable amistad, gracias por todo ese apoyo incondicional, confianza y cariño que me has dado, por toda esa nobleza que te caracteriza, por todas las cosas que me has enseñado, por haberme dado tu hombro para llorar como nunca lo había hecho, por hacer de la marcha de los pingüinos algo único y porque estoy completamente segura que a dónde quiera que vayas vas a lograr cosas grandes.*

*A todos los de la **BARDA** Paulina, Aurora, María, Karla, Chucho, David, Pancho, Odín, Roberto, Arizmendi, Mota, Oscar: ya que hicieron que disfrutara aún más mi estancia en la Facultad por todos los momentos compartidos, por acordarse de mí cuando ven un bubulubú, por su confianza, por estar en las buenas y en las malas y porque sin duda serán mis colegas pero sobre todo mis amigos.*

***José:** porque a pesar de que te conocí al final de la carrera te considero un gran amigo y una excelente persona capaz de lograr lo que se proponga, gracias por estar ahí en todo momento.*

*A mis amigos de la **Prepa:** por ofrecerme una amistad eterna y sincera, por ser tan diferentes y tener un corazón enorme, por ser las personas más simples y porque sin duda mi vida no sería lo mismo sin ustedes (no tendría tantos apodos), gracias por todos esos momentos de alegría que me han dado y por todo el apoyo y confianza que han depositado en mí.*

***Babalú** por darme uno de los mejores regalos que me han dado cuando más lo necesitaba, por toda tu sinceridad, por todas las desveladas, por ser mi odontóloga de pesadilla.*

***Leticia** por tener la capacidad de ver la vida de otra forma, por todas tus ocurrencias pero sobre todo por ser el mejor Equipísimo y mi experta en telecomunicaciones.*

***Hugo** porque la universidad me permitió conocerte como la gran persona y amigo incondicional que eres, gracias por todo lo que has hecho por mí.*

Nath por todos esos detalles que has tenido conmigo, por dejarme conocerte más y formar parte de tu vida, porque eres una niña muy linda.

Juan Carlos porque sé que contigo puedo contar en todo momento, compartir intereses y tantas anécdotas.

A mis amigos de la **secundaria** que les puedo decir tantos años de conocernos y siguen sorprendiéndome con todos sus detalles, porque sé que cuando estoy con ustedes me olvido de todo y simple y sencillamente me transportan a otro mundo, y finalmente porque cada triunfo mío también es suyo.

Regina simple y sencillamente por ser tú, cambiaste mi vida desde que te conocí y no existen palabras suficientes para agradecer todo lo que tú y tus papás han hecho por mí y lo fundamental que es tu amistad en mi vida.

Viri por todos los momentos vividos porque sabes que eres una amiga invaluable, por toda tu confianza y cariño, y porque me has demostrado que la amistad va más allá de todo.

Jimena por ser una ternurita, por recibirme en tu casa cuando olvidaba mis llaves y porque sé que siempre vas a estar cuando te necesite.

Jessica por la confianza que has depositado en mí, por ser tan dedicada con lo que haces y porque sé que cuando se trata de ser fanática ahí estás tú para tus amigos.

Araceli porque a pesar de que no nos veamos tan seguido sé que tu amistad siempre la voy a tener, así como tú también la mía y me encanta compartir contigo los momentos importantes.

Davo porque si alguien dice las cosas como son ese eres tú, el señor Zimmy, por tu forma de ver las cosas que me han enseñado a valorar más la vida.

Héctor por ser un gran amigo esa nobleza y fortaleza que te caracterizan hace que las personas te quieran incluso más, por siempre dar todo sin pedir nada a cambio.

Emilio porque sé que está de más buscar una razón por la cual somos amigos, gracias por todos los momentos vividos, porque sé que sin duda puedo contar contigo, por considerarme en los momentos más importantes de tu vida.

ÍNDICE

	Página
ABREVIATURAS	i
LISTA DE FIGURAS	iii
LISTA DE TABLAS	iv
RESUMEN	v
1. INTRODUCCIÓN	1
2. MARCO TEÓRICO	3
2.1 Generalidades de <i>Escherichia coli</i>	3
2.2 <i>Escherichia coli</i> uropatógena	9
2.3 Epidemiología	9
2.4 Patogénesis	11
2.4.1 Factores de virulencia UPEC	13
2.5 Mecanismos de captación de hierro en bacterias Gram negativas	15
2.6 Regulación de la expresión de los genes implicados en la captación de hierro	20
2.7 Sistemas de adquisición de hierro en UPEC	20
2.7.1 Proteínas de membrana externa receptores de hierro	21
2.7.2 Sistemas de transporte de ferrisideróforos de <i>Escherichia coli</i>	23
3. JUSTIFICACIÓN	25
4. HIPÓTESIS	26
5. OBJETIVOS	26
5.1 Objetivo general	26
5.2 Objetivos particulares	26

6. DISEÑO EXPERIMENTAL	27
7. MATERIALES Y MÉTODOS	28
7.1 Aparatos	28
7.2 Materiales	29
7.2.1 Reactivos	29
7.2.2 Cepas bacterianas de estudio	29
7.2.3 Cepas de referencia	30
7.2.4 Medios de cultivo	31
7.3 Métodos	31
7.3.1 Cultivo bacteriano	31
7.3.2 Extracción de hierro del medio de cultivo	31
7.3.3 Condiciones de crecimiento bacteriano	32
7.3.4 Obtención de proteínas de membrana externa	32
7.3.5 Electroforesis con gel de poliacrilamida en duodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE)	33
7.3.6 Obtención de ADN bacteriano	34
7.3.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)	34
7.3.8 Electroforesis de ADN en geles de agarosa	36
8. RESULTADOS	37
8.1 Proteínas de Membrana Externa (OMPs) de la bacteria, que son expresadas en condiciones mínimas de hierro.	37
8.2 Distribución de genes que codifican sistemas de adquisición de hierro en cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de ITU.	39
8.3 Serotipificación.	46

9. DISCUSIÓN	47
9.1 Proteínas de Membrana Externa (OMPs) de la bacteria, que son expresadas en condiciones mínimas de hierro.	47
9.2 Sistemas de adquisición de hierro y genes implicados.	49
9.3 Serogrupos y serotipos de cepas de <i>Escherichia coli</i> aisladas de ITU.	55
10. CONCLUSIONES	57
11. PERSPECTIVAS	58
12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	59
13. APÉNDICE	71

ABREVIATURAS

AAF	Fimbria de Adherencia Agregativa	ExPEC	Patógeno Extraintestinal de <i>Escherichia coli</i>
ADN	Ácido Desoxiribonucleico	EAST	Toxina Estable al Calor de EAEC
AMP	Adenosin monofosfato	EDTA	Ácido etilendiamina tetraacético
APEC	<i>Escherichia coli</i> patogénica aviar	Esp	Proteína secretora efectora
ATTC	Colección Americana de Cultivos Tipo	Fe²⁺	Ion Ferroso
BFP	Conjunto Formador de Pili	Fe³⁺	Ion Férrico
°C	Grados Centígrado	FecA	Receptor de Dicitrato férrico
CFAs	Factores de colonización antigénicos	FepA	Receptor de Enterobactina
ChuA	Receptor de grupo hemo	FhuA	Receptor de Ferricromo
CirA	Receptor de catecolatos	H:	Antígeno Flagelar
CNF1	Factor Citotóxico Necrosante 1	HEPES	Ácido N-[2-hidroxietil] piperazine-N'-[2etanosulfónico]
DAF	Factor Acelerador de Consumo		
DAEC	<i>Escherichia coli</i> de Adherencia Difusa	HlyA	α-Hemolisina
EAEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroadherente	IreA	Iron Responsive Element
EHEC	<i>Escherichia coli</i> Enterohemorrágica	IroN	Receptor de Salmochelina
EIEC	<i>Escherichia coli</i> Enteroinvasiva	ITU	Infección del Tracto Urinario
EPEC	<i>Escherichia coli</i> Enteropatógena	IU	Infección Urinaria
ETEC	<i>Escherichia coli</i> Enterotoxigénica	K:	Antígeno Capsular
		K⁺	Ion Potasio

ABREVIATURAS

Kef	Potassium Efflux Protein	PMSF	Phenylmethanesulfonyl fluoride
LB	Medio Luria Bertani	Sat	Toxina Autotransportadora Secretada
LPF	Fimbria Polar Larga	SDS-PAGE	Electroforesis en Geles de Poliacrilamida en Dodecil Sulfato de Sodio
LPS	Lipopolisacárido	ShET	Enterotoxina <i>Shigella</i>
LT	Enterotoxina Termolábil	ST	Enterotoxina Termoestable
Map	Proteína de Daño a la Mitocondria	Stx	Toxina Shiga
NM	No Móvil	TAE	Buffer Tris-Acetato-EDTA
O:	Antígeno Somático	Tir	Receptor de Intimina Translocado
O?:	No tipificable	TRIS-HCl	Trishidroximetilaminometano-ácido clorhídrico
OR:	Rugoso	TU	Tracto Urinario
OMPs	Proteínas de Membrana Externa	UFC	Unidad Formadora de Colonia
PAIs	Islas Asociadas de Patogenicidad	UPEC	<i>Escherichia coli</i> Uropatógena
PCR	Reacción en Cadena de la Polimerasa	Vat	Toxina Autotransportadora Vacuolizante
Pet	Toxina Codificada en el Plásmido	X g	Fuerza Centrifuga
Pic	Proteína involucrada en la Colonización Intestinal		

LISTA DE FIGURAS

		Página
Fig. 1	Contribución de los elementos genéticos móviles en la evolución de especies patógenas de <i>Escherichia coli</i> .	5
Fig. 2	Esquemas patogénicos de las seis categorías de <i>Escherichia coli</i> causantes de diarrea.	6
Fig. 3	Mecanismos de captación de hierro en bacterias Gram negativas.	18
Fig. 4	Estructura tridimensional de receptores de ferri-sideróforos de <i>Escherichia coli</i> .	22
Fig. 5	Estructura química de algunos sideróforos producidos por <i>Escherichia coli</i> .	23
Fig. 6	Algunos sistemas de transporte de Fe ³⁺ -sideróforos en UPEC.	24
Fig. 7	Perfil de proteínas de membrana externa (OMPs) de la cepa uropatógena 1162 crecida en: medio quelado (Q) y no quelado (NQ).	38

LISTA DE TABLAS

	Página
Tabla 1 Características de cepas patogénicas de <i>Escherichia coli</i> de importancia clínica en humanos.	7
Tabla 2 Factores de virulencia de <i>Escherichia coli</i> uropatógena asociadas a infecciones del tracto urinario.	14
Tabla 3 Proteínas de membrana externa receptores de hierro en UPEC.	22
Tabla 4 Mezcla de amplificación empleadas en la PCR para una muestra.	33
Tabla 5 Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento usados durante la amplificación de los genes que codifican para proteínas de membrana externa receptoras de hierro en cepas de <i>Escherichia coli</i> .	34
Tabla 6 Distribución de genes que codifican sistemas de adquisición de hierro en cepas de <i>Escherichia coli</i> uropatógenas que tienen serogrupos no asociados a ITU.	41
Tabla 7 Distribución de genes que codifican sistemas de adquisición de hierro en cepas de <i>Escherichia coli</i> uropatógenas que tienen serogrupos asociados a ITU.	42
Tabla 8 Distribución de genes que codifican sistemas de adquisición de hierro en cepas fecales/comensales de <i>Escherichia coli</i> .	43
Tabla 9 Comparación sobre la prevalencia de genes de adquisición de hierro entre cepas de <i>Escherichia coli</i> uropatógenas con serogrupos asociados a ITU y cepas fecales/comensales.	44

RESUMEN

El hierro (Fe^{2+}) es un micronutriente esencial para el crecimiento normal de la gran mayoría de microorganismos, siendo los sistemas de captación de este catión divalente elemento fundamental para que las bacterias patógenas sean capaces de promover un proceso infeccioso. Las proteínas receptoras de compuestos de hierro se localizan en la membrana externa de las *Escherichia coli*, y son candidatas potenciales a ser empleadas para la elaboración de una vacuna contra *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), el microorganismo aislado con mayor frecuencia de pacientes con infección del tracto urinario (ITU). Por lo tanto, es fundamental la identificación de nuevas proteínas bacterianas receptoras de hierro. El propósito del presente estudio fue buscar la presencia y prevalencia de 8 genes que codifican para receptores de hierro (*chuA*, *cirA*, *fecA*, *fepA*, *fhuA*, *ireA*, *iroN* e *iutA*) y un gen involucrado en función osmoreguladora a través de los iones K^+ (*kefA*) en 51 cepas de *Escherichia coli* aisladas de pacientes de una población mexicana con ITU, mediante la técnica de PCR.

Para esto, se aisló una cepa de una paciente con infección recurrente del tracto urinario y se cultivó en diferentes medios deficientes en hierro (quelados con dypiridil), incluyendo orina humana, finalmente se extrajeron las proteínas de membrana externa (OMPs) de los botones bacterianos y se analizaron mediante electroforesis (SDS-PAGE). La orina humana y el medio M9 resultaron los más apropiados para la expresión de receptoras de compuestos de hierro, las cuales se observaron en el gel en un rango de masa molecular aproximado de 70 a 85 kDa, mientras que los mismos medios pero suplementados con FeSO_4 no indujeron la expresión de dichos receptores. Se aislaron las bandas proteicas, por personal del laboratorio, y se enviaron a identificar mediante la secuenciación de sus aminoácidos. Se identificaron seis proteínas que correspondieron a: los receptores de compuestos de hierro ChuA, CirA, FepA, IutA; al transporte de citrato férrico: FecA; y a una proteína de canales mecanosensitivos que liberan iones K^+ : KefA. Posteriormente, se buscó la presencia y prevalencia de estos 6 genes y de otros 3 genes más que se han reportado como receptores de hierro importantes en cepas UPEC. Los genes *chuA* y *kefA*, se encontraron significativamente ($P < 0.01$) con mayor frecuencia (83 y 94%) entre las cepas UPEC con respecto a las cepas fecales de *Escherichia coli* (25 y 38%). Estos resultados indican que al ser el grupo hemo la fuente de hierro más abundante *in vivo*, la presencia de un sistema de transporte del grupo hemo, como es el caso de ChuA, en las cepas de UPEC puede ser fundamental para la adquisición de hierro a partir de la hemoglobina. En cuanto a KefA, aún no existen reportes que indiquen su papel en la adquisición de hierro ni en la patogénesis, sin embargo nuestros resultados sugieren que el gen *kefA* puede ser importante en el establecimiento de la infección de cepas uropatógenas. El serogrupo más frecuente en el presente estudio fue el O25, el cual es diferente a los reportados en otros países, en donde serogrupos O6 y O2 son los más representativos entre las cepas UPEC.

1. INTRODUCCIÓN

Escherichia coli es un miembro importante de la microflora intestinal normal de humanos y otros mamíferos. Sin embargo, algunas cepas de *Escherichia coli* son capaces de causar diversas enfermedades, en consecuencia, estas cepas patógenas de *Escherichia coli* se han dividido en dos subgrupos; 1) Intestinales, causantes de enfermedades diarreicas/entéricas y 2) Extraintestinales, causantes de infecciones en el tracto urinario y meningitis/sepsis (Kaper *et al.*, 2004).

Las infecciones en el tracto urinario (ITU) son unas de las infecciones bacterianas más comunes en humanos, mas del 80% de estas infecciones son causadas por *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) (Warren, 1996). Una vez dentro del tracto urinario, UPEC preferentemente coloniza la vejiga y causa cistitis, pero también puede ascender a través de los uréteres dentro de los riñones, causando pielonefritis. Esta bacteria posee múltiples factores de virulencia que facilitan la colonización y permanencia en el tracto urinario a pesar de las condiciones desfavorables que presenta (Johnson, 1991).

Entre estos factores de virulencia se encuentran los mecanismos de captación de hierro, el cual es un elemento esencial para el crecimiento de las bacterias y su disponibilidad dentro del hospedero es muy escasa. Debido a esto los microorganismos patógenos han desarrollado estrategias para captar hierro de las diferentes fuentes disponibles en el hospedero. Así se ha reconocido la asociación del hierro con la virulencia de diversas bacterias patógenas incluyendo *Escherichia coli*. Estos sistemas de captación se pueden clasificar en 2 grupos: el primero involucra el contacto directo

entre la bacteria y las fuentes exógenas de hierro/hemo. El segundo mecanismo se basa en moléculas (sideróforos y hemóforos) que son producidas y sintetizadas por las bacterias en el medio extracelular, dichas moléculas van a ser las encargadas de capturar el hierro o el grupo hemo de diversas fuentes (Wandersman *et al.*, 2004).

Estudios recientes basados en la secuenciación del genoma completo de una cepa de *Escherichia coli* uropatógena (Welch *et al.*, 2002) y análisis comparativo de hibridación genómica de *Escherichia coli* uropatógena/comensal indican claramente que muchos de los factores de urovirulencia no han sido aun identificados (Molloy *et al.*, 2000; Snyder *et al.*, 2004). Estos estudios predicen que cepas uropatógenas poseen un gran número de sistemas de adquisición de hierro en comparación con las cepas fecales/comensales, lo cual es un reflejo de la adaptación al ambiente del tracto urinario que es limitante en hierro.

Un ejemplo de esto, es la cepa de *Escherichia coli* uropatógena CFT073 (aislada de pielonefritis), en la cual, se han encontrado al menos 12 receptores de sideróforos de membrana externa (CirA, FecA, FepA, FhuA, FhuE, FitA, Fiu, FyuA, Iha, IutA, IreA y IroN) y dos receptores de grupo hemo (ChuA y Hma) (Hagan y Mobley, 2009; Hantke *et al.*, 2003; Léveillé *et al.*, 2003; Nikaido y Rosenberg, 1990; Ouyang e Isaacson, 2006; Russo *et al.*, 2001; Torres y Payne, 1997; Welch *et al.*, 2002). Debido a que los genes que codifican receptores para captar hierro han sido considerados como marcadores de virulencia en estudios de epidemiología molecular (Russo, *et al.*, 2002), el propósito de este proyecto es investigar la prevalencia de genes y proteínas receptoras de hierro en cepas de *Escherichia coli* uropatógena. La identificación de estas proteínas captadoras de hierro, prevalentes en cepas uropatógenas, pueden contribuir al diseño de una vacuna contra estos patógenos.

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Generalidades de *Escherichia coli*

Escherichia coli es un bacilo Gram negativo, anaerobio facultativo, de la familia *Enterobacteriaceae*, móvil o inmóvil, tiene la capacidad de fermentar rápidamente la lactosa y produce indol a partir de triptófano. Presenta en su superficie celular estructuras tales como: flagelos, pilis o fimbrias, proteínas de membrana externa (OMPs, por sus siglas en inglés) importantes en investigaciones epidemiológicas y lipopolisacárido (LPS) con actividad de endotoxina; además muchas de las cepas de *Escherichia coli* están cubiertas por una cápsula de polisacárido antifagocítica (Bahrani-Mougeot *et al.*, 2002).

Esta bacteria forma parte de la microbiota intestinal, suele aparecer poco después del nacimiento y juega un papel importante en el mantenimiento de la fisiología intestinal. Aunque las cepas de *Escherichia coli* son en gran medida consideradas como comensales, algunos aislados tienen el potencial para causar daño y producir enfermedad.

La capacidad única de *Escherichia coli* para colonizar diferentes sitios y de generar un grupo heterogéneo de enfermedades se debe, en parte, al genoma versátil que posee, debido a que es capaz de remodelar su genoma mediante la adquisición y pérdida de factores de virulencia. Por lo tanto, la transferencia horizontal de genes juega un papel importante en la adquisición o pérdida de ADN y por lo general contribuye a la evolución y adaptación de *Escherichia coli* a diferentes nichos (Ahmed *et al.*, 2008). Estos factores de virulencia son principalmente codificados en elementos genéticos móviles como son plásmidos, bacteriófagos, transposones e islas asociadas a la patogenicidad (PAIs, por sus siglas en inglés),

que pueden ser transferidos a las cepas para crear nuevas combinaciones de factores de virulencia (Figura 1). Sólo las combinaciones más exitosas de factores de virulencia han persistido hasta convertirse en patotipos específicos de *Escherichia coli*, los cuales son capaces de causar enfermedad en individuos sanos (Kaper *et al.*, 2004).

En general, tres síndromes clínicos pueden resultar de la infección con uno de estos patotipos: diarrea/entérica, infecciones del tracto urinario (ITU) y sepsis/meningitis (Tabla 1).

Actualmente, entre los patógenos intestinales existen seis categorías bien definidas: *Escherichia coli* enteropatógena (EPEC), *Escherichia coli* enterohemorrágica (EHEC), *Escherichia coli* enterotoxigénica (ETEC), *Escherichia coli* enteroagregativa (EAEC), *Escherichia coli* enteroinvasiva (EIEC) y *Escherichia coli* de adherencia difusa (DAEC) (Nataro y Kaper 1998); cada una de estas categorías tiene una forma característica de interactuar con las células del epitelio intestinal del hospedero a través de factores de virulencia como son: adhesinas, enterotoxinas y citotoxinas (Figura 2).

Dentro de los patógenos extraintestinales de *Escherichia coli* (ExPEC, por sus siglas en inglés) se encuentran las cepas que tiene la capacidad de diseminarse y colonizar otros nichos (sangre, sistema nervioso central y el tracto urinario). En este grupo se encuentran *Escherichia coli* uropatógena (UPEC, por sus siglas en inglés) que representa más del 80% de los casos de infecciones del tracto urinario (ITU) (Lloyd *et al.*, 2009; Wiles *et al.*, 2008), y las cepas de *Escherichia coli* asociadas a meningitis/sepsis neonatal (NMEC, por sus siglas en inglés) que son la segunda causa principal de dicho padecimiento (Kaper *et al.*, 2004).

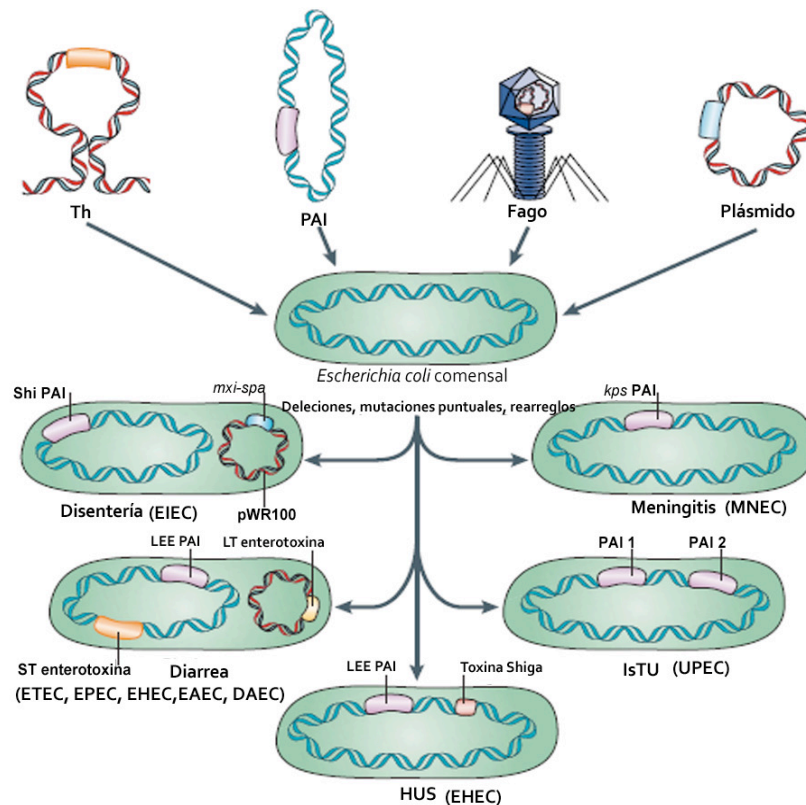


Figura 1. Contribución de los elementos genéticos móviles en la evolución de especies patógenas de *Escherichia coli*. Los factores de virulencia de *Escherichia coli* pueden ser codificados por varios elementos genéticos móviles como son: los transposones (Tn) (por ejemplo, la enterotoxina termoestable (ST) de ETEC), los plásmidos (por ejemplo, la enterotoxina termolábil (LT) de ETEC y los factores de invasión de EIEC), los bacteriófagos (por ejemplo, la toxina Shiga de EHEC) y las islas de patogenicidad (PAIs) [como es el caso del locus del esfacelamiento del enterocito (LEE) de EPEC/EHEC y de las PAIs I y II de UPEC]. Las cepas comensales de *Escherichia coli* también pueden sufrir delecciones resultantes de mutaciones puntuales, o reordenamientos de ADN que pueden contribuir a la virulencia. Estas adiciones, delecciones y otros cambios genéticos pueden dar lugar a formas patógenas de *Escherichia coli* capaces de causar diarrea (EPEC, EHEC, EAEC, DAEC), disentería (EIEC), el síndrome urémico hemolítico [HUS] (EHEC), infecciones del tracto urinario [ITU] (UPEC) y meningitis (MNEC). (Tomada y modificada de Kaper *et al.*, 2004).

Los diferentes patotipos de *Escherichia coli*, se caracterizan por compartir antígenos O (lipopolisacárido, LPS) y H (flagelar), que definen los serogrupos (antígeno O solamente) o serotipos (antígenos O y H) (Nataro y Kaper, 1998) (Tabla 1). Las cepas patógenas de *Escherichia coli* utilizan un esquema de múltiples pasos

de la patogénesis, que consiste en la colonización de un sitio de la mucosa, evasión del sistema inmune del hospedero, multiplicación y el daño al hospedero.

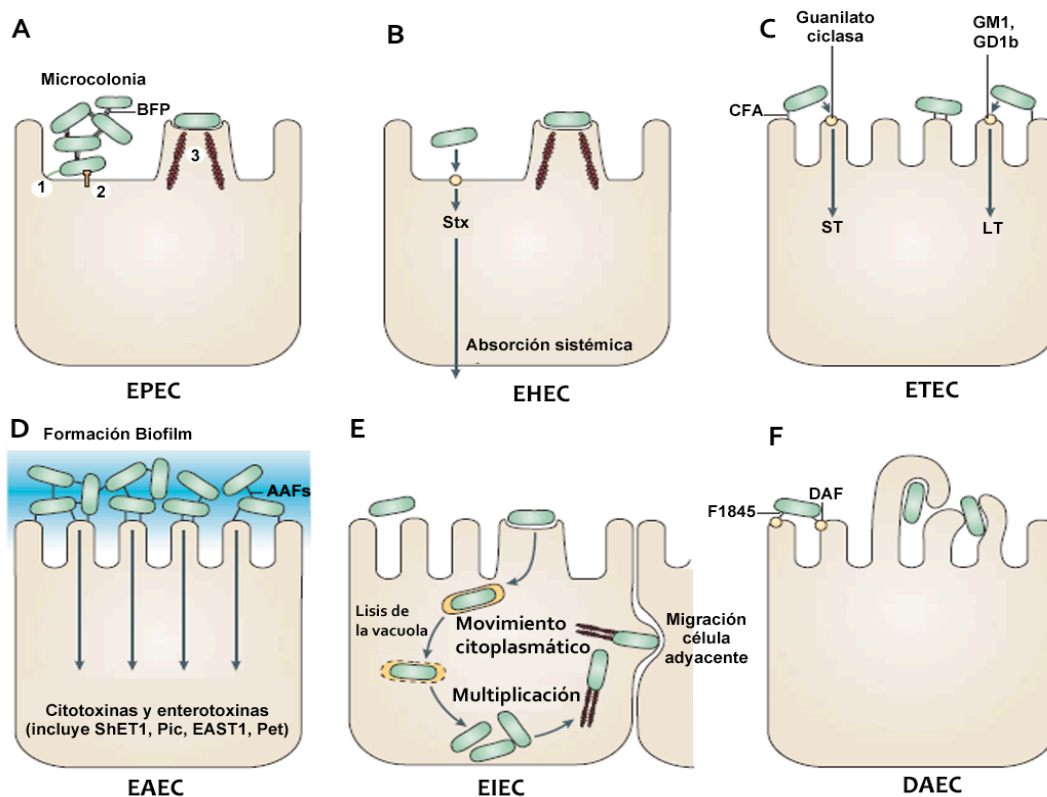


Figura 2. Esquemas patogénicos de las seis categorías de *Escherichia coli* causantes de diarrea. a. **EPEC** se adhieren al borde vellosos de las células del epitelio intestinal y causan una lesión celular específica denominada lesión de borrado (effacing lesion). Las alteraciones en el citoesqueleto producen una respuesta inflamatoria y diarrea. 1. Adherencia inicial, 2. Translocación de proteínas por el sistema de secreción tipo III, 3. Formación del pedestal.

b. **EHEC** también produce lesiones de borrado, pero en el colon. Su característica distintiva es la elaboración de la toxina shiga (Stx), y su absorción sistémica conlleva a complicaciones potencialmente mortales.

c. **ETEC** se adhiere a la célula a través de factores de colonización antigénicos (CFA) y secreta enterotoxinas termolábil (LT) y/o termoestable (ST). ST se une a un receptor glicoproteico que está acoplado a la guanilato ciclasa sobre la superficie de las células del epitelio intestinal. La activación de la guanilato ciclasa estimula la producción de monofosfato de guanosina cíclico (cGMP), lo que causa la secreción de electrolitos y de agua hacia la luz del intestino delgado, que se manifiesta en forma de una diarrea acuosa. LT se une a gangliósidos específicos (GM1, GD1b) sobre las células epiteliales y activa la adenilato ciclasa unida a la membrana, lo que produce un aumento de la producción de monofosfato de adenosina cíclico (cAMP), hipersecreción y diarrea acuosa.

d. **EAEC** se adhiere al epitelio del intestino delgado y grueso, forma biofilms (agregados de bacterias) a través de fimbrias de adherencia agregativa (AAFs) y elabora enterotoxinas y citotoxinas. e. **EIEC** invade las células epiteliales del colon, lisa el fagosoma, se multiplica en el interior de la célula y se mueve en el interior de la célula por nucleación de microfilamentos de actina. La bacteria puede moverse lateralmente a través del epitelio por la propagación directa de célula a célula o puede salir y volver a entrar en la membrana plasmática basolateral. f. **DAEC** provoca un efecto característico de transducción de señales en los enterocitos del intestino delgado que se manifiesta como el crecimiento de proyecciones celulares en forma de dedo, que se envuelven alrededor de la bacteria.

BFP conjunto formador de pili; DAF factor acelerador de decaimiento; EAST1 enterotoxina termoestable 1 de EAEC; Pet toxina codificada en el plásmido; Pic proteína involucrada en la colonización intestinal; ShET1 enterotoxina *Shigella* 1. (Tomada y modificada de Kaper *et al.*, 2004).

Tabla 1. Características de cepas patogénicas de *Escherichia coli* de importancia clínica en humanos

Patotipo	Serogrupos ^a	Serotipos ^b	Factores de virulencia			Enfermedad asociada
			Toxinas	Adhesinas	Adquisición de hierro	
<i>Escherichia coli</i> enteropatógena (EPEC)	O18, O26, O28 , O44, O55, O86, O91, O111, O114, O119 , O125ac, O126 , O127, O128 , O142, O158 y O159	O55:NM; O55:H6, O55:H7, O86:NM, O86:H34, O111:NM, O111:H2, O111:H12, O119:NM, O119:H6, 125ac:H21, O126:NM, O126:H2, O126:H27, O127:NM, O127:H6, O128:H2, O128:H12, O142:H6, O158:H23.	EspC EspF EspH Map Tir LifA/Efa Cif	Intimina Pili tipo 1 BFP pili tipo IV Paa LPF	lutA Aerobactina	Diarrea crónica y aguda en niños.
<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica (EHEC)	O26 , O46, O48, O55, O91, O98, O111ab, O113, O117, O118, O119, O125, O128 , O145, O157, O172	O26:NM, O26:H2, O26:H8, O26:H11, O26:H21, O26:H32, O55:H6, O55:H7, O91:H10, O91:H14, O91:H21, O98:H8, O111ab:NM, O111ab:H8, O113:H21, O117:H7, O117:H9, O117:H14, O118:H30, O119:NM, O119:H5, O128:H12, O145:H25, O157:H7, O172:NM.	Stx-1 Stx-2 EspF EspH EspP Tir Ureasa Map Cif StcE Ehx LifA/Efa	Intimina Pili tipo 1 Paa ToxB Efa-1/LifA LPF Saa OmpA	ChuA lutA Aerobactina	Diarrea sanguinolenta; colitis hemorrágica; Síndrome urémico hemolítico (HUS)
<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica (ETEC)	O6, O8 , O11, O15, O20, O25, O27, O63, O78, O80, O85, O115, O126, O128 , O148, O149, O159 , O173	O6:H16, O8:H9, O11:H27, O15:H11, O25:H42, O27:H7, O27:H20, O78:H11, O78:H12, O85:H7, O128:H7, O148:H28, O149:H4, O149:H10, O159:H20.	LT ST ShET2	CFAs Pili tipo 1	lutA Aerobactina	Diarrea acuosa

^a Los serogrupos compartidos se encuentra en negritas. ^b NM No móvil. Esp proteína secretada efectora; Map proteína de daño a la mitocondria; Tir receptor de intimina translocada; BFP conjunto formador de pili ; LPF fimbria polar larga; Cif factor inhibidor del ciclo; Stx toxina shiga; OmpA proteína de membrana externa A; LT enterotoxina termolábil; ST enterotoxina termoestable; ShET enterotoxina *Shigella*; CFAs factores de colonización antigénicos.

Tabla 1. Características de cepas patogénicas de *Escherichia coli* de importancia clínica en humanos (continuación)

Patotipo	Serogrupos ^a	Serotipos ^b	Factores de virulencia			Enfermedad asociada
			Toxinas	Adhesinas	Adquisición hierro	
<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva (EIEC)	O28ac, O29, O112ac, O124, O136, O143, O144, O152, O159, O164, O167	O28ac:NM, O29:NM, O112ac:NM, O124:NM, O124:H7, O124:H30, O136:NM, O143:NM, O144:NM, O152:NM, O159:NM, O159:H2, O164:NM, O167:NM, O167:H4, O167:H5.	ShET2 IpaA, IpaB IpaC, IpaH IpgD VirA	IcsA Pili tipo 1	IutA Aerobactina	Disentería
<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa (EAEC)	O3, O15, O44, O77, O86, O111, O126 , O127	O3:H2, O15:H18, O44:H18, O77:H18, O86:NM, O111:H21, O127:H2.	ShET1 Pet Pic EAST-1	Pili tipo 1 Fimbria de adherencia agregativa Dispersina (promueve la colonización y la penetración en la mucosa)	FyuA, IutA Aerobactina Yersiniabactina	Diarrea aguda y persistente.
<i>Escherichia coli</i> de adherencia difusa (DAEC)	O126	O126:H27		Dr Pili tipo 1	IutA Aerobactina	Diarrea aguda
<i>Escherichia coli</i> uropatógena (UPEC)	O1, O2, O4, O6 , O7, O8 , O16, O18 , O25 y O75	O1:NM, O1:H4, O1:H6 O1:H7, O2:NM, O2:H1, O4:NM O4:H5, O6:NM, O6:H1, O6:H31, O7:NM O7:H4 O7:H6, O18:NM, O18:H31, O25:NM, O25:H1, O25:H4, O75:H5.	HlyA CNF-1 Pic Sat Vat	Dr Pili P (Pap) Pili tipo 1 Pili F1C Pili S	ChuA, Fec, FhuA, FyuA, IutA, IreA, IroN Aerobactina Salmochelina Yersiniabactina	Infecciones del tracto urinario (cistitis, prostatitis, pielonefritis)
<i>Escherichia coli</i> asociada a meningitis neonatal (MNEC)	O8 , O9, O15, O18 , O20, O26, O35, O45, O78, O86, O101, O115, O117, O119.	O18:H7, O45:H7	CNF-1 CNF-2 Tsh	Pili tipo 1, Pili S, OmpA AsIA, IbeA, IbeB, IbeC (promueven la invasión) Cápsulas (>80 tipos de antígenos K)	ChuA, IroN Salmochelina	Meningitis/sepsis neonatal

^a Los serogrupos compartidos se encuentra en negritas. ^b NM No móvil. ShET enterotoxina *Shigella*; EAST-1 toxina estable al calor de EAEC; HlyA α -hemolisina; CNF factor citotóxico necrosante; Omp proteína de membrana externa; Pet toxina codificada en el plásmido; Pic proteína involucrada en la colonización intestinal; Sat toxina autotransportadora secretada; Vat toxina autotransportadora vacuolizante. (Adaptada de Falkow y Mekalanos, 1996; Kaper *et al.*, 2004; Nataro y Kaper, 1998; Okeke *et al.*, 2004; Torres *et al.*, 2001).

2.2 *Escherichia coli* uropatógena

Escherichia coli uropatógena (UPEC, por sus siglas en inglés), el principal agente causal de Infecciones del tracto urinario (ITU), es considerado un grupo genéticamente heterogéneo y puede variar en sus habilidades para colonizar, persistir y dañar el tracto urinario.

La secuencia genómica de la cepa uropatógena de *Escherichia coli* (UPEC) CFT073 ha aportado evidencia definitiva de que las UPEC forman una familia distinguible de otras *Escherichia coli* (Welch *et al.*, 2002). Por otro lado, la determinación del transcriptoma *in vivo* de UPEC destacó la importancia de la adherencia y la adquisición de hierro durante la infección del tracto urinario (ITU), debido a que los genes implicados en estos procesos fueron altamente regulados positivamente durante la infección experimental (Snyder *et al.*, 2004).

Se ha encontrado que la mitad de todos los aislados de UPEC no poseen, o sólo poseen uno de los factores de virulencia caracterizados hasta el momento; así que, se asume que otros factores bacterianos, aun no caracterizados, pueden ser importantes en la patogénesis de las ITU (Sorsa *et al.*, 2004).

2.3 Epidemiología

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU), comprenden una amplia variedad de cuadros clínicos cuyo denominador común es la proliferación de microorganismos en el tracto urinario (TU), al que involucran total o parcialmente. Son una de las infecciones bacterianas más frecuentes que afectan a una gran proporción de la población mundial

de ambos sexos, por lo que constituyen un problema importante de salud pública (Foxman, 2002).

El microorganismo aislado con mayor frecuencia es *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), el cual es el responsable del 90% de las ITU ambulatorias, del 73% de las ITU presentes en adultos mayores de 50 años, y del 25% de las ITU nosocomiales (Emori y Gaynes, 1993; Foxman, 2002; Zhang y Foxman, 2003).

Las poblaciones específicas con mayor riesgo de contraer ITU son neonatos, niños, mujeres sexualmente activas, mujeres embarazadas, adultos mayores y pacientes inmunosuprimidos (Bahrani-Mougeot, *et al.*, 2002b).

Aproximadamente el 60% de todas las mujeres y el 14% de los hombres experimentarán al menos una infección del tracto urinario durante su vida. El 27% de las mujeres experimentan una recurrencia 6 meses después de la infección y el 2.7% podría experimentar una recurrencia múltiple (Foxman, *et al.*, 2000; Foxman, 1990).

Las ITU afectan por arriba del 10% a la población infantil, y el rango de recurrencia es entre 30% y 40%, en donde la mayoría de las recurrencias se presentan en los primeros 12 meses después de la infección primaria (Finer y Landau, 2004).

En Estados Unidos, las ITU ocasionan anualmente alrededor de 7 millones de visitas al consultorio médico, de las cuales, un millón son conducidas a la sala de emergencia y 245,000 ameritan hospitalizaciones, lo que representa un costo anual de 3.5 billones de dólares, esto tan solo en Estados Unidos. (Foxman, 2002; Foxman *et al.*, 2000; Lloyd, *et al.*, 2009).

En los últimos años, la resistencia de las cepas UPEC a varias clases de antibióticos sigue aumentando cada año y se ha convertido en una preocupación importante tanto en los hospitales como en la comunidad (Gupta *et al.*, 1999 y 2001; Sahm *et al.*, 2001). En consecuencia, estas complicaciones representan un desafío enorme para el tratamiento de las ITU y sugieren que una vacuna podría prevenirlas, reduciendo significativamente la fuente de morbilidad y la carga económica (Alteri, *et al.*, 2009; Durant, 2007).

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

2.4 Patogénesis

El tracto gastrointestinal es el reservorio de *Escherichia coli* a partir del cual la bacteria origina una infección ascendente en el tracto urinario, en donde las bacterias a través de la uretra llegan a la vejiga, sino se trata, la infección puede ascender vía los uréteres hacia los riñones (Brumfitt, *et al.*, 1987) y en última instancia, puede resultar en insuficiencia renal y ser la puerta de entrada de bacteremias y sepsis con elevada tendencia a la morbimortalidad.

Las ITU se clasifican de acuerdo con el sitio de infección: cistitis (vejiga), uretritis (uretra), prostatitis (próstata), pielonefritis (riñón) y la bacteriuria (orina); y dependiendo de la gravedad del cuadro: en complicadas o no complicadas (Dimitri, *et al.*, 2008; Hooton, 2000; Roos, *et al.*, 2006).

Las cepas uropatógenas de *Escherichia coli* son genéticamente distintas a las cepas comensales/fecales de *Escherichia coli*, debido a que poseen genes que codifican para factores de virulencia específicos (Brzuszkiewicz *et al.*, 2006; Chen, *et al.*, 2006; Dobrindt, *et al.*, 2002 y 2003; Johnson, 1991), localizados en fragmentos de ADN denominados Islas de Patogenicidad (PAIs por sus siglas en inglés) (Hacker, 1999), que le permiten a UPEC colonizar la vejiga, sobrevivir en el tracto urinario y causar daño al tejido (Mulvey, 2002), a pesar de que las vías urinarias son normalmente estériles, gracias a una serie de mecanismos de defensa como son el flujo de orina, la afluencia de células inmunes efectoras y el desprendimiento de células epiteliales.

Las cepas UPEC corresponden a un número limitado de serogrupos O, entre los que se encuentran: O1, O2, O4, O6, O7, O8, O16, O18, O25 y O75 (Tabla 1); en donde cada uno de los factores de virulencia uropatógenos se asocian de manera significativa con estos serogrupos (Blanco *et al.*, 1995; Johnson *et al.*, 1994; Kurazono *et al.*, 2003).

Existen tres fases en la patogénesis de una típica ITU: colonización, crecimiento y generación de daño, las cuales son contiguas y se traslapan (Sussman y Gally, 1999). Para poder desarrollar dichas fases, UPEC posee factores de virulencia dentro de los que se encuentran principalmente: adhesinas, mecanismos de adquisición de hierro, toxinas, cápsula y proteasas (Zhang *et al.*, 2000).

2.4.1 Factores de virulencia UPEC

La capacidad de UPEC para causar una ITU sintomática, está asociada con la expresión de una variedad de factores de virulencia (Tabla 2) que facilitan la habilidad de colonizar, persistir, invadir y dañar el tracto urinario, evitar los mecanismos de defensa del hospedero, y competir por nutrientes limitantes, como el hierro (Johnson, 1991; Mysorekar *et. al.*, 2006). Esto indica que los factores de virulencia bacteriana son particularmente cruciales en la etiología de las ITU (Sussman y Gally, 1999).

Dentro de los principales factores de virulencia (Tabla 2) se encuentran: los factores de adherencia denominadas adhesinas fimbriales o pilis como son tipo 1, P, S y F1C, familia de adhesinas Dr; producción de toxinas como son la α -hemolisina, el factor citotóxico necrosante tipo 1, la toxina autotransportadora vacuolizante (Vat), la toxina autotransportadora secretada (Sat), y el autotransportador codificado por *picU*, cápsula, y LPS y sistemas de adquisición de hierro como son sideróforos (enterobactina, aerobactina, yersiniabactina, salmochelina) sus respectivos receptores de membrana externa TonB-dependientes (FepA, FyuA, FhuA, IroN, IutA); así como también la captación del grupo hemo a partir de los receptores ChuA y Hma (Johnson, 1991; Mulvey 2002; Wiles *et al.*, 2008).

Estudios han demostrado que la adquisición de hierro, mediada por receptores específicos de membrana externa, es fundamental para la colonización del tracto urinario por *Escherichia coli* uropatógena (Hagan y Mobley, 2007; Henderson *et al.*, 2009; Litwin *et al.*, 1993; Torres *et. al.*, 2001). Por lo que, el entendimiento de los sistemas de captura y transporte de hierro es importante para el diseño de agentes antimicrobianos y vacunas contra bacterias cuya virulencia está asociada a la captura de hierro, como es el caso de UPEC.

Tabla 2. Factores de virulencia de *Escherichia coli* uropatógena asociadas a infecciones del tracto urinario.

Factores de virulencia	Función	Enfermedad asociada	Referencia
Pili Tipo 1 (FimH)	Adhesión a células epiteliales de riñón, vejiga.	Cistitis, sepsis y meningitis	Connell, et al., 1996.
Pili Tipo P (PapG I,II y III)	Adhesión a células epiteliales de riñón e inducción de citocinas	Pielonefritis	Roberts et al., 1994.
Afa/Dr (F1845, Dr, Dr-II, Afa-1, Afa-2, Afa-3, Afa-4 y Nfa-I)	Adhesión a células epiteliales de vejiga. Colonización ascendente e invasividad.	Cistitis, pielonefritis, diarrea y sepsis	Goluszko et al., 1997.
Pilis Tipo S y F1C (SfaS, SfaH, SfaG, SfaA, FochH)	Adhesión a células epiteliales de riñón y endoteliales de vejiga. Diseminación	Cistitis, pielonefritis, sepsis y meningitis	Khan et al., 2000; Korhonen et al., 1986; Morschhauser et al., 1993.
CNF-1 (factor citotóxico necrosante)	Interferencia con fagocitosis y apoptosis. Necrosis celular y alteración del citoesqueleto. Invasividad	Cistitis, pielonefritis y prostatitis	Rippere-Lampe, et al., 2001.
α -hemolisina (HlyA)	Hemólisis de eritrocitos y leucocitos. Lisis celular.	Cistitis y pielonefritis	Welch et al., 1981.
Sat (toxina auto transportadora secretada)	Citotoxicidad y formación de vacuolas	Cistitis y pielonefritis	Guyer et al., 2000 y 2002.
Vat (toxina auto transportadora vacuolizante)	Citotoxicidad y formación de vacuolas	Cistitis y pielonefritis	Pariera y Giles, 2003.
OmpT	Proteasa de membrana externa	Infección del tracto urinario.	Kanamaru et al., 2003.
PicU	Proteasa de serina autotransportadora promueve la colonización.	Cistitis y pielonefritis.	Heimer et al., 2004; Parham et al., 2004.
Receptores de ferrisideróforos (FepA, FhuA, FecA, FyuA, IutA, IreA, IroN)	Captación de hierro	Infección del tracto urinario	Torres et al., 2001. Russo et al., 2002.
Receptores del grupo hemo (ChuA, Hma)	Captación de hierro	Cistitis y Pielonefritis	Hagan y Mobley, 2009
Sideróforos (aerobactina, enterobactina, salmochelina, yersiniabactina)	Captación de hierro	Infección del tracto urinario	Torres et al., 2001; Valdebenito et al., 2005
Cápsula	Antifagocítica. Evasión de la respuesta inmune.	Infección del tracto urinario	Kanamaru et al., 2003.

Adaptado de Marrs *et al.*, 2005; Mulvey, 2002 y Kaper *et al.*, 2004.

2.5 Mecanismos captación de hierro en bacterias Gram-negativas

Uno de los factores que desempeña un papel fundamental en la patogénesis bacteriana, es la adquisición de hierro (Schaible y Kaufmann, 2004). El hierro es necesario para casi todas las formas de vida, con la excepción de las bacterias del género *Lactobacillus* que utilizan preferentemente manganeso y cobalto como cofactores enzimáticos (Weinberg, 1997). Actúa como grupo prostético de enzimas (catalasas, oxidasas, citocromos, y ribonucleótido reductasas) que participan en numerosos procesos biológicos esenciales para las células como son: la fotosíntesis, ciclo de Krebs, respiración, fijación de nitrógeno, producción y consumo de H₂, transporte de oxígeno, regulación génica y biosíntesis del ADN (Andrews *et al.*, 2003; Miethke y Marahiel, 2007; Reyes *et al.*, 2005; Wandersman y Delepelaire, 2004).

El contenido de hierro libre en los fluidos biológicos del hospedero es muy bajo, puesto que la mayor parte está unida a proteínas y además en condiciones aerobias el hierro está presente en forma férrica (Fe³⁺), el cual es insoluble. Por lo tanto, la escasa disponibilidad de hierro hace que este elemento actúe como factor limitante para el crecimiento de la mayoría de microorganismos (Clarke *et al.*, 2001).

Como consecuencia, las bacterias han desarrollado varios mecanismos para contrarrestar la limitación de hierro (Figura 3), y estos se basan generalmente en las proteínas receptoras de membrana externa que se unen específicamente a una amplia gama de moléculas que contienen hierro (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003; Krewulak y Vogel, 2008) y comparten características comunes entre sí (Wandersman *et al.*, 2004).

Estos receptores requieren de energía derivada de la fuerza protón motriz, proporcionada por el complejo TonB presente en la membrana interna. La transducción de energía por el complejo TonB se basa en el reconocimiento de la “caja TonB”, una pequeña región de residuos de aminoácidos conservado en el receptor de Fe^{3+} de membrana externa (Braun y Endriß, 2007; Krieg *et al.*, 2009; Postle y Kadner, 2003), lo que induce cambios estructurales en el receptor, que resultan en la translocación de los compuestos de hierro/hemo al espacio periplásmico en donde las proteínas de unión periplásmicas (PBP) dirigen los compuestos hierro/hemo a transportadores ABC (del inglés ATP Binding Cassette) dependientes de ATP en la membrana interna para llevar a cabo su transporte hacia el citoplasma. Después de que el hierro ha entrado en la célula, se reduce a la forma ferrosa (Fe^{2+}) (Andrews *et al.*, 2003; Clarke *et al.*, 2001) (Figura 3). Los sistemas de adquisición de hierro/hemo en las bacterias se clasifican en dos mecanismos generales.

El **primer mecanismo**, involucra el **contacto directo** entre la bacteria y las fuentes exógenas de hierro/hemo o con las ferriproteínas/hemoproteínas del hospedero. Algunos microorganismos anaerobios, como *Clostridium perfringens*, son capaces de captar hierro creando a su alrededor un microambiente de pH más ácido. Este ambiente reductor, favorece la aparición de especies químicas más solubles, formadas por Fe^{2+} , lo que permite su difusión libre a través de las porinas presentes en la membrana externa (Faraldo-Gómez y Sansom, 2003; Ratledge y Dover, 2000), y posteriormente es importado por sistemas dependientes de energía como el FeoABC, descrito también en bacterias anaerobias facultativas como *Salmonella typhimurium* (Boyer *et al.*, 2002) y *Escherichia coli* (Ratledge y Dover, 2000) (Figura 3, f).

En *Neisseria meningitidis* y *Neisseria gonorrhoeae* el contacto directo con el Fe^{3+} unido a transferrina (Tf) o lactoferrina (Lf) está mediada por los receptores Tbp (transferrin binding protein) y Lbp (lactoferrin binding protein) ambos integrados por un complejo de proteínas TbpA y TbpB, LbpA y LbpB respectivamente (Braun y Killman, 1999; Cornelissen, 2003; Reyes *et al.*, 2005). Estos complejos Tbp/Lbp remueven el Fe^{3+} de las ferriproteínas y permite su transporte activo a través de la membrana externa hacia el espacio periplásmico mediante el complejo TonB. El transporte de Fe^{3+} a través del periplasma hacia el citoplasma, es dependiente de una proteína de unión periplásmica llamada Fbp (Ferric binding protein) y de un sistema ABC, con consumo de ATP. (Andrews, *et al.*, 2003; Faraldo-Gómez y Sansom, 2003) (Figura 3, **b**).

El grupo Hemo puede ser captado directamente por un receptor de membrana externa dependiente de TonB que libera el grupo hemo al periplasma para su transporte hacia el citoplasma, mediante un transportador de tipo ABC. En cepas de *Escherichia coli* patogénicas, la utilización de hemo está mediada por los genes del locus *chu*, que es homólogo al locus *shu* de la utilización de *Shigella dysenteriae* del grupo hemo (Burkhard y Wilks, 2008). ChuA es un receptor de membrana externa TonB de 69 kDa con una similitud del 99% a la proteína ShuA de *S. dysenteriae* (Torres y Payne, 1997). *chuTUV* codifica un transportador ABC se muestra para el transporte de hemo. (Figura 3, **c**) y el sistema ShuATUV en *Shigella dysenteriae* (Burkhard y Wilks, 2008). También el grupo Hemo puede ser captado de la hemoglobina (Hb) y el complejo hemoglobina-haptoglobina (Hb-Hp) por proteínas de membrana externa como HpuAB y HmbR en *Neisseria meningitidis* (Figura 3, **d**).

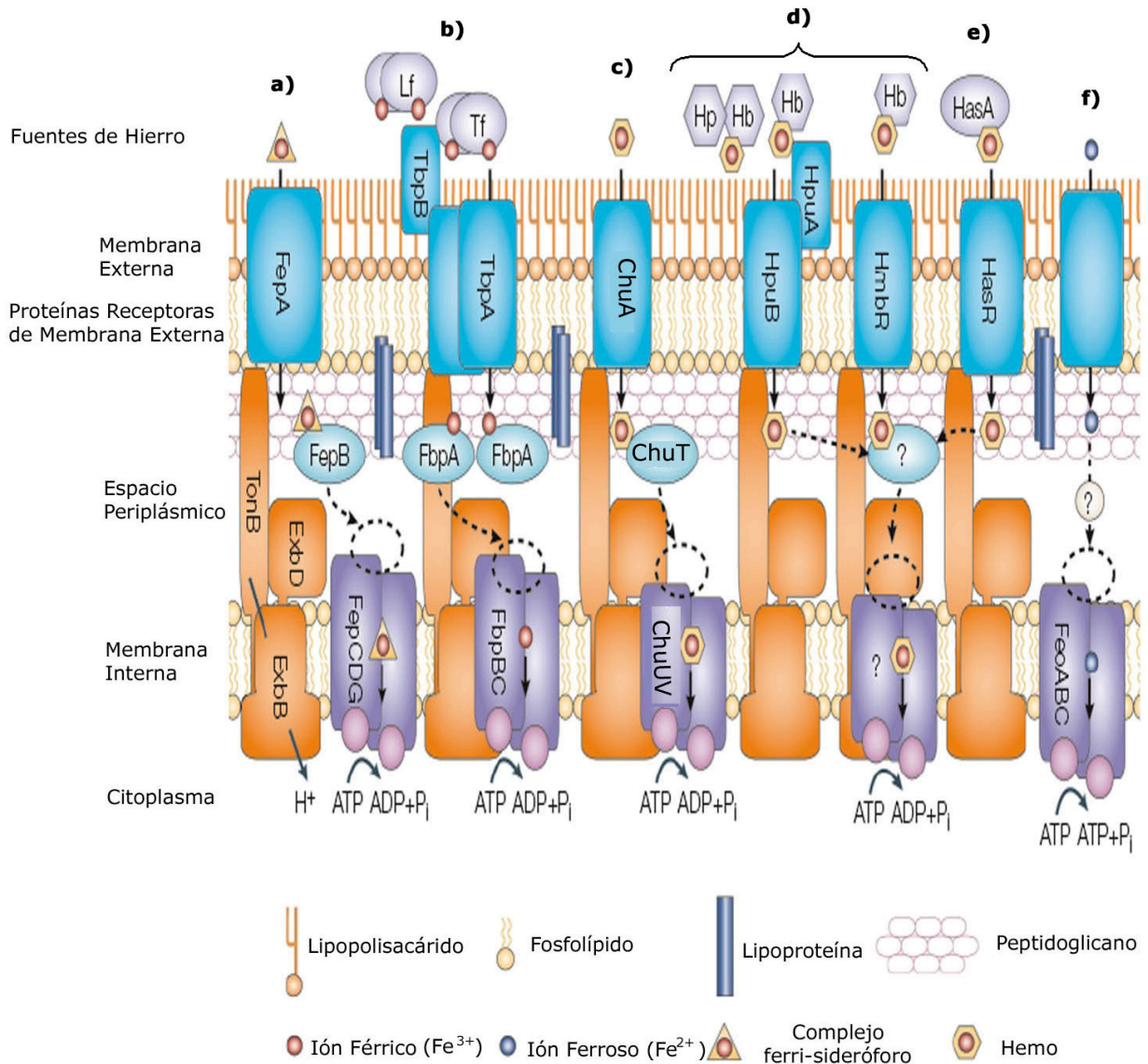


Figura 3. Mecanismos de captación de hierro en bacterias Gram negativas. En condiciones aerobias, las bacterias se basan en las proteínas receptoras de alta afinidad en la membrana externa (azul) que captan el Fe³⁺ de las ferriproteínas, complejos hierro-sideróforos o grupo hemo, y posteriormente, facilitan su desplazamiento en el espacio periplásmico. Este proceso es activado por el complejo TonB (TonB-ExbB-ExbD). Las proteínas de unión periplásmicas (azul claro) y los sistemas ABC (morado) que se encuentran en la membrana interna son los que se encargan de transportar la fuente de hierro hacia el citoplasma. **Mecanismos directos.** **b)** A través de ferriproteínas: transferrina (Tf) y lactoferrina (Lf); **c)** A través del grupo hemo **d)** Mediante hemoproteínas: hemoglobina (Hb), haptoglobina (Hp); **f)** Ión ferroso (Fe²⁺) por difusión pasiva a través de porinas. **Mecanismos indirectos.** **a)** Captación de Fe³⁺ a través de sideróforos; **e)** Captación de grupo hemo mediante hemóforos. (Tomada y modificada de Faraldo-Gómez y Sansom, 2003).

El **segundo mecanismo**, es mediante la síntesis de pequeñas moléculas denominadas sideróforos que poseen una alta afinidad por el Fe^{3+} ($k_{\text{aff}} > 10^{30}$), y son capaces de secuestrar el hierro presente en las proteínas del hospedero (transferrinas, lactoferrinas, ferritinas). Los sideróforos solubilizan el Fe^{3+} mediante quelación: un proceso en el que el ion metálico establece enlaces coordinados con dos átomos electronegativos de oxígeno o de nitrógeno. (Andrews *et al.*, 2003; Cescau, *et al.*, 2007; Faraldo-Gómez y Sansom, 2003; Miethke y Marahiel, 2007; Reyes *et al.*, 2005; Wandersman y Delepelaire, 2004).

Los sideróforos se clasifican en función de su naturaleza química, en tres grupos principales: hidroxamatos, catecolatos y carboxilatos; aunque en ocasiones es posible encontrar dos o incluso los tres grupos funcionales en el mismo sideróforo, éstos reciben el nombre de mixtos (Miethke y Marahiel, 2007). Un ejemplo es el sideróforo enterobactina producido por *Escherichia coli* y otras enterobacterias, que a través del sistema FepABCDG (Buchanan *et al.*, 1999; Thulasiraman *et al.*, 1998) es transportado al interior de la célula (Figura 3, a).

Debido a que los sideróforos no pueden extraer el hierro de las hemoproteínas, algunos microorganismos secretan compuestos llamados hemóforos que captan el grupo hemo presente en la hemoglobina, hemopexina y haptoglobina (Wandersman y Stojiljkovic, 2000).

En *Haemophilus influenzae* se ha descrito un hemóforo formado por la proteína HxuA implicado en la captación del hemo presente en la hemopexina (Cope, *et al.*, 1998) y lo presenta a HxuC, un receptor específico de membrana externa. Otro sistema

de captación de hemo a través de hemóforos se presenta en *Pseudomonas aeruginosa*, *Pseudomonas fluorescens*, *Yersinia pestis* y *Serratia marcescens*, llamados HasA (heme acquisition system) (Wandersman y Stojiljkovic, 2000) (Fig. 3, e).

2.6 Regulación de la expresión de los genes implicados en la captación de hierro

Muchas especies, incluyendo *Escherichia coli*, llevan a cabo la homeostasis del hierro a través de la acción de Fur (regulador de la captación de hierro), una proteína de unión al hierro encargada de regular la expresión de los genes implicados en la captación de hierro. Actúa como un represor que reconoce una secuencia de ADN, conocida como caja Fur, presente en la región operadora de los genes que pertenecen al regulón Fur y se une a ella bloqueando la transcripción de dichos genes. Este reconocimiento tiene lugar cuando la proteína Fur forma un complejo con el hierro, por lo cual la transcripción de estos genes sólo se bloquea en presencia de hierro. Por el contrario, cuando los niveles de hierro en la célula son bajos, Fur ya no se encuentra unido al hierro y se disocia del ADN, permitiendo así la transcripción de la maquinaria de genes involucrados en la adquisición de hierro (Hantke, 2001; Ochsner y Vasil, 1996).

2.7 Sistemas de adquisición de hierro en UPEC

Debido a que la adquisición de hierro es necesaria para la patogénesis bacteriana, y se sabe que las vías urinarias son un ambiente limitado de hierro, UPEC tiene un sistema de transporte sofisticado de Fe^{3+} -sideróforo y grupo hemo a través de proteínas receptoras específicas de membrana externa (Braun y Braun, 2002; Hagan y Mobley, 2009). Como reflejo de la importancia de la adquisición de hierro para la patogénesis de

UPEC, el genoma de la cepa uropatógena CFT073 con serotipo O6:K2:H1 (aislada de pielonefritis), codifica por lo menos 14 diferentes receptores de hierro de membrana externa (Tabla 3) y cuatro sistemas de biosíntesis de sideróforos que son: aerobactina, enterobactina, salmochelina y yersiniabactina (Valdebenito *et al.*, 2005; Welch *et al.*, 2002).

2.7.1 Proteínas de membrana externa receptores de hierro

La adquisición de hierro, mediada por receptores específicos de membrana externa, es fundamental para la colonización del tracto urinario por UPEC (Hagan y Mobley, 2009; Torres *et al.*, 2001). Dichas proteínas receptoras, con un peso molecular que va de 70 a 85 kDa (Tabla 3), adoptan una estructura β -barril incrustada en la membrana externa, con breves giros en el periplasma y bucles extracelulares, que están involucrados en la unión al ligando (Buchanan *et al.*, 1999; Chakraborty *et al.*, 2007).

La estructura atómica tridimensional de tres transportadores de ferri-sideróforos de *Escherichia coli*: FhuA (Ferguson *et al.*, 1998), FepA (Buchanan *et al.*, 1999) y FecA (Ferguson *et al.*, 2002), ha sido recientemente resuelta (Figura 4).

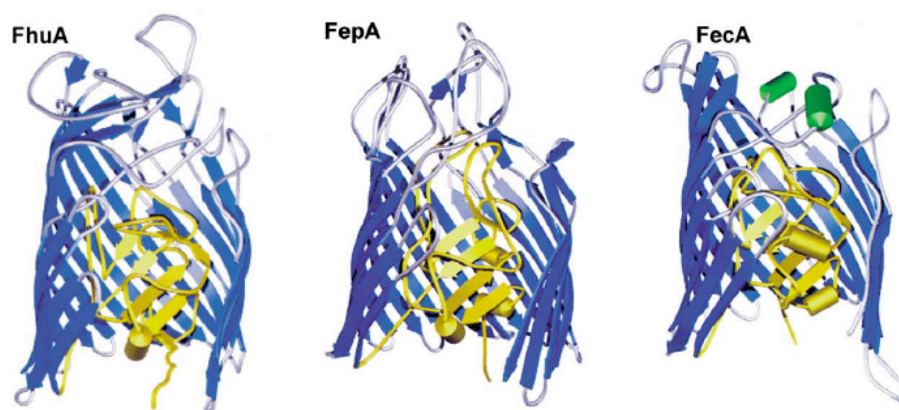


Figura 4. Estructura tridimensional de receptores de ferri-sideróforos de *Escherichia coli*. FhuA receptor de ferrocromo, FepA receptor de enterobactina y FecA receptor de dicitrato férrico. Estos receptores están compuestos por dos dominios funcionales claramente diferenciados. Un dominio en forma de β -barril (azul) estructurado por 22 láminas β transmembranales, hidrofóbicas y antiparalelas (β 1- β 22), interconectadas entre ellas por pequeñas vueltas en la cara periplasmática y por grandes bucles extracelulares; y un dominio globular (amarillo) formado por aproximadamente 150 residuos altamente conservados del extremo amino-terminal (Tomada y modificada de Braun y Braun, 2002).

Tabla 3. Proteínas de membrana externa receptoras de hierro en la cepa uropatógena de *Escherichia coli* CFT073 (O6:K2:H1).

Receptores de hierro de membrana externa	Peso Molecular (kDa)	Fuente de hierro
ChuA	69	Hemo/hemoglobina
CirA	70	Catecolatos
FecA	81.7	Dicitrato férrico
FepA	79.9	Enterobactina
FhuA	82.2	Ferricromo
FhuE	77.4	Coprógeno/Rodotorulato
FitA		Desconocido
Fiu	83	Catecolatos
FyuA	71.7	Yersiniabactina
Hma	79	Hemo/hemoglobina
Iha	76.5	Enterobactina
IreA	75.3	Desconocido
IroN	79.4	Salmochelina
IutA	84.1	Aerobactina

Adaptada de Alteri y Mobley, 2007; Molloy *et al.*, 2000 y van der Helm, 1998.

2.7.2 Sistemas de transporte de ferri-sideróforos de *Escherichia coli*

En el caso de *Escherichia coli* la mayoría de las cepas producen la enterobactina (sideróforo de tipo catecol), pero la producción de aerobactina (sideróforo mixto) como alternativa (Figura 5), ha demostrado que aumenta el potencial de virulencia en UPEC. La producción del sideróforo aerobactina ocurre más frecuentemente en cepas aisladas de pielonefritis que en las cepas fecales/comensales (70% vs. 42%) (Marrs *et al.*, 2002).

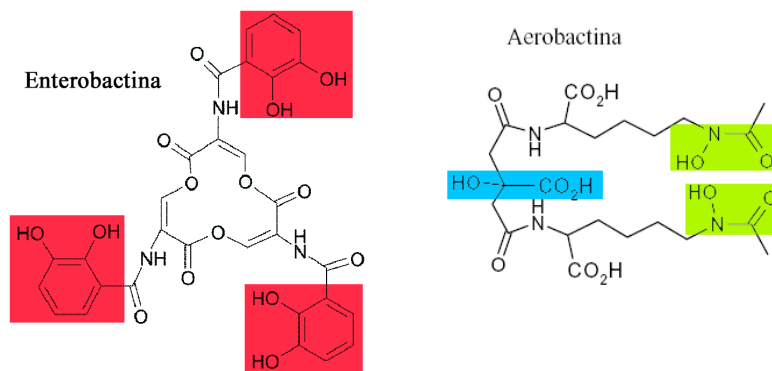


Figura 5. Estructura química de algunos sideróforos producidos por *Escherichia coli*.
Grupo catecol (rojo), hidroxamato (verde) y carboxilato (azul).

En la Figura 6, se muestran los tres sistemas transportadores de ferri-sideróforos, ABC dependientes de proteína de unión periplasmática, caracterizados en *Escherichia coli*: el sistema transportador de ferri-hidroxiatos, ferri-catecolatos y ferri-carboxilatos.

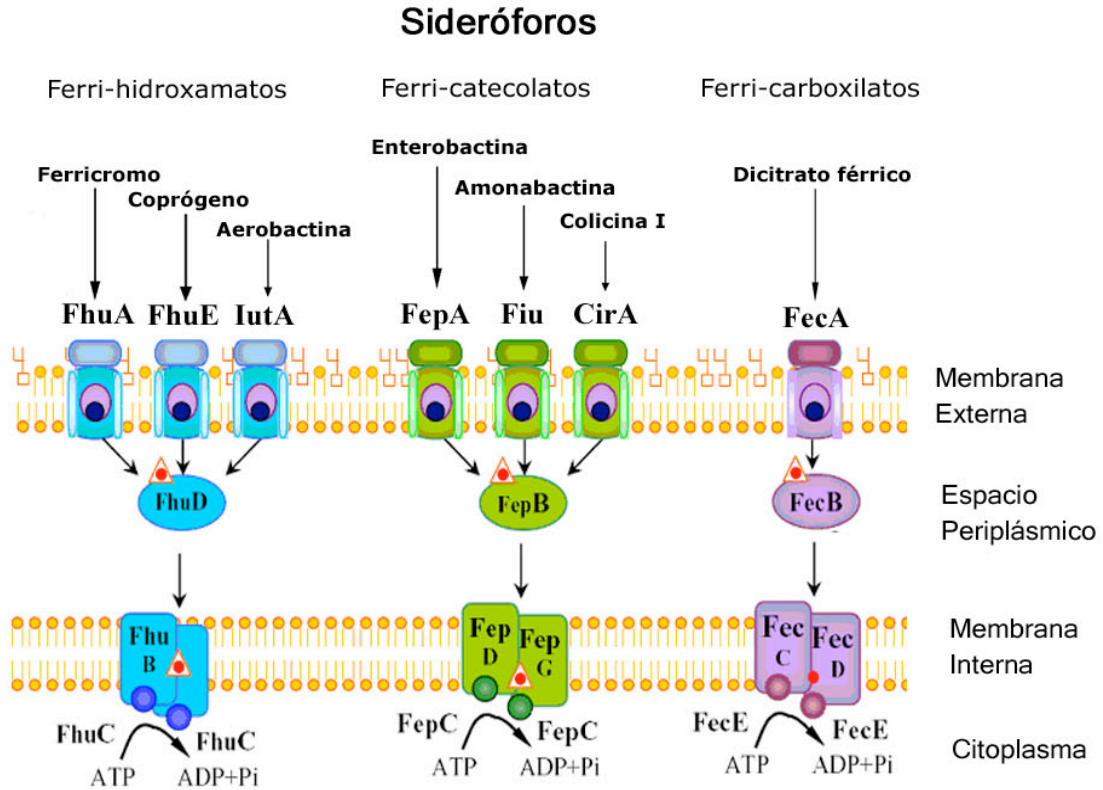


Figura 6. Algunos sistemas de transporte de Fe^{3+} -sideróforos en UPEC. Proteínas receptoras localizadas en la membrana externa (ME) se unen de forma específica a hidroxamatos férricos (FhuA, FhuE, IutA), catecolatos férricos (FepA, Fiu) y citrato férrico (FecA) en un proceso que es impulsado por el potencial de la membrana interna y mediado por el sistema de transducción de energía formado por las proteínas TonB-ExbB-ExbD presentes en el espacio periplásmico (no mostradas en la figura). Proteínas periplásmicas (FhuD, FepB, FecB) transportan los ferri-sideróforos desde los receptores de la ME a permeasas (FhuBC, FepCDG, FecCDE) de la membrana interna que internalizan el ferri-sideróforo con gasto de ATP (Tomada y modificada de Braun, 1995; Andrews *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITU) son consideradas como las infecciones bacterianas más comunes, que afectan a una gran proporción de la población mundial. *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), el principal agente causal de las ITU (>80%), es considerado un grupo genéticamente heterogéneo, el cual expresa una gran variedad de factores de virulencia específicos que facilitan la habilidad de dicho patógeno para colonizar, persistir y dañar el tracto urinario, evitar los mecanismos de defensa del hospedero y competir por nutrientes limitantes, como el hierro.

El hierro al participar en numerosos procesos biológicos como son: la fotosíntesis, respiración, ciclo de Krebs, transporte de oxígeno, biosíntesis del ADN, entre otros; desempeña un papel crítico tanto en el crecimiento como en la patogénesis bacteriana. En el caso de UPEC, la adquisición de hierro/hemo, mediada por receptores específicos de membrana externa es fundamental para la colonización y supervivencia en el tracto urinario, siendo algunos considerados como marcadores de virulencia en estudios de epidemiología molecular.

Poco se sabe respecto los factores de virulencia que portan las cepas de *Escherichia coli* causantes de ITU en la población mexicana. Como consecuencia, en el presente trabajo se determinó la presencia y prevalencia de genes que codifican para receptores de hierro en la membrana externa de cepas de *Escherichia coli* responsables de ITU aisladas de orina de pacientes de la ciudad de México.

La identificación de proteínas de membrana externa, como los receptores de hierro/hemo y factores de virulencia bacterianos nuevos permitirá entender mejor la patogénesis de las infecciones de tracto urinario y en consecuencia contribuir al diseño de nuevas alternativas terapéuticas, mejorar los agentes antimicrobianos y desarrollar una vacuna eficaz contra estas infecciones.

4. HIPÓTESIS

- Cepas uropatógenas de *Escherichia coli* tienen genes que codifican para diversas proteínas receptores de compuestos de hierro en contraste con cepas fecales de *Escherichia coli* aisladas de individuos aparentemente sanos.

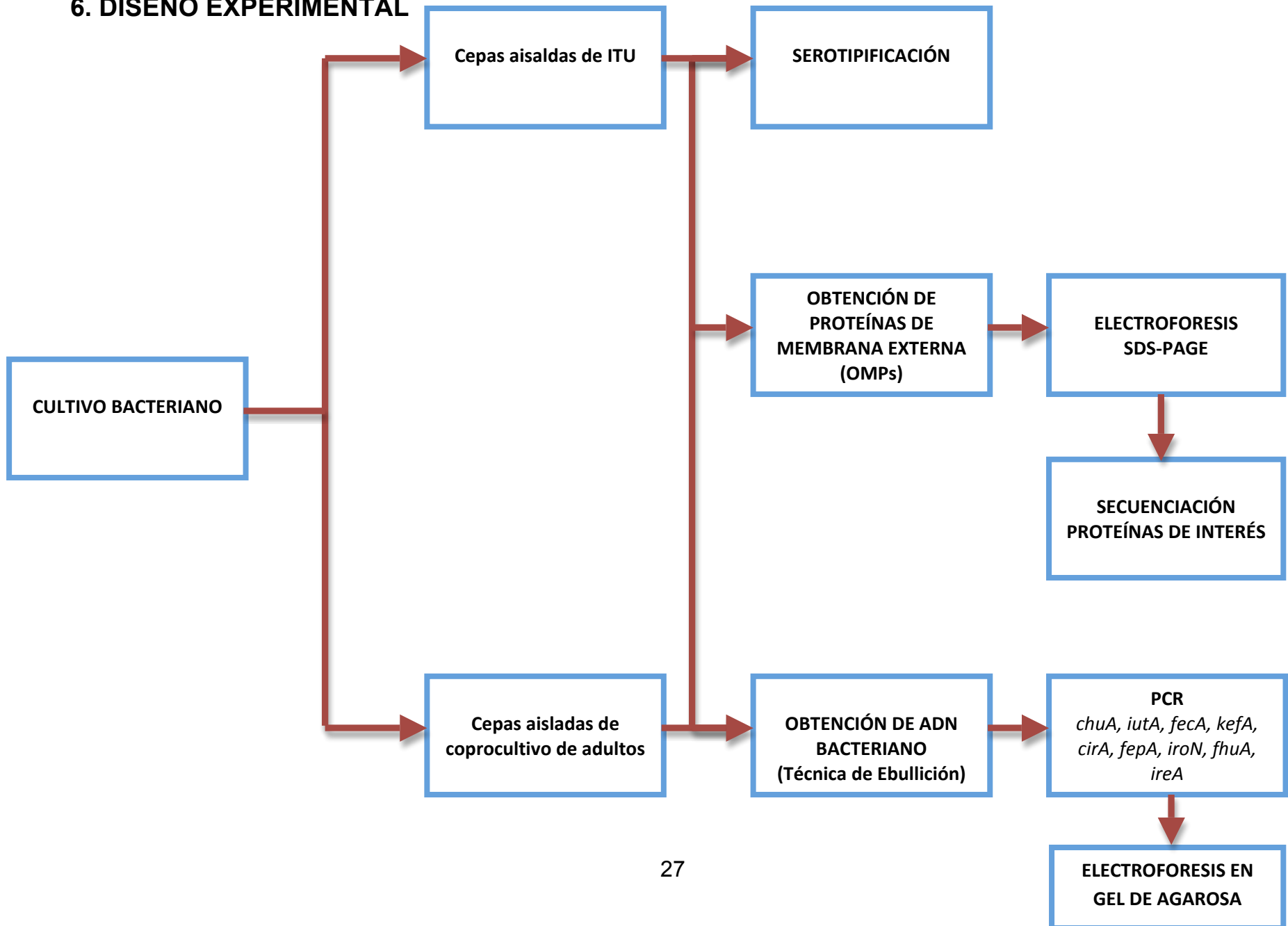
5. OBJETIVO GENERAL

- Investigar la presencia de genes que codifican para receptores de compuestos de hierro en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas.

5.1. Objetivos particulares

- Seleccionar medios de cultivo quelados (bajos en cantidades de hierro) que soporten tanto el crecimiento bacteriano como la expresión de proteínas receptoras de compuestos de hierro.
- Extraer las proteínas de membrana externa (receptores de hierro) de las bacterias y analizarlas por electroforesis.
- Seleccionar los genes de receptores de hierro bacterianos que se buscarán en las cepas uropatógenas.
- Determinar la prevalencia de ocho genes que codifican para receptores de compuestos de hierro en las cepas uropatógenas y las cepas fecales.
- Serotipificar las 51 cepas aisladas de pacientes con ITU y las 17 cepas fecales.

6. DISEÑO EXPERIMENTAL



7. MATERIALES Y MÉTODOS

7.1 Aparatos

Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR): Termociclador (icycler BIO-RAD Thermal Cycler).

Electroforesis en geles de agarosa: Cámara de electroforesis horizontal (Minicell Primo EC320). Fuente de poder (Pharmacia EPS 3500).

Electroforesis en geles de poliacrilamida: Cámara de electroforesis vertical (BIO-RAD Mini Protean II, Comb, 10 Well, 1.00mm, Teflón), Fuente de poder (Pharmacia EPS 3500).

Centrifugación: Centrifuga de mesa para tubos eppendorf (Sigma 1-15K), Centrifuga (Sorvall RC 5B Plus), Centrifuga (Sorvall RT 6000D), Ultracentrifuga (Sorvall RC M120EX).

Varios: Incubadora (Fisher, Modelo 230F), Incubadora (Baxter WJ301D Ultra Teach Scientific Products), Campana de flujo laminar (Forma Scientific Inc, Modelo 1839 S/N 15010-453), Vortex (Scientific Industries, Vortex-Genie 2), Transiluminador UV (UVP, Upland, CA 91786 USA), Balanza analítica digital (Adventurer Ohaus, Capacidad 310g, Serie No. AR3130), Balanza (Harvard Trip Ohaus, Capacidad 2kg-5lb, Serie No. AA62777), Sonicador (Vibra cell, High intensity ultrasonic processor, 50-Watt model, Sonics Materials Inc. Danbury, CT, USA) Refrigerador (Lab-line Instruments, Inc).

7.2 Materiales

7.2.1 Reactivos

Obtención de proteínas de membrana externa (OMPs): 2,2'-Dipiridil (Sigma-Aldrich, Inc. ST. Louis, USA). Sarkosyl (Sigma-Aldrich, Inc. ST. Louis, USA), HEPES (Merck), PMSF (Merck), EDTA (Merck).

SDS-Electroforesis en gel de poliacrilamida: Ácido tricloroacético, tris-base, acrilamida (Sigma-Aldrich, Inc. ST. Louis, USA), N,N'-metilen-bis-acrilamida (Sigma-Aldrich, Inc. ST. Louis, USA), TEMED (LKB), duodecil sulfato de sodio (Sigma-Aldrich, Inc. ST. Louis, USA), persulfato de amonio, amortiguador de Laemmli, β -mercaptoetanol (LKB), azul de Coomassie R-250 (GIBCO BRL), marcador de peso molecular (Prosieve color, Cambrex Bioscience Rockland, USA).

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR): dNTP's mix (Invitrogen), Taq DNA polimerasa (Invitrogen), $MgCl_2$ (Invitrogen), Buffer PCR 10X (Invitrogen), Marcador de peso molecular [Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas)], Oligonucleótidos (Invitrogen).

Electroforesis en geles de agarosa: agarosa (Bio-Whittaker), TAE (solución reguladora para electroforesis) 10X, buffer de corrimiento TAE 1X, bromuro de etidio (BIO-RAD), amortiguador de carga 10X.

7.2.2 Cepas bacterianas de estudio

51 cepas de *Escherichia coli* aisladas de la orina de pacientes con infecciones del tracto urinario, en el Hospital General "Dr. Gonzalo Castañeda Escobar", ISSSTE, de la

Ciudad de México. Los pacientes no tuvieron alteraciones morfológicas en el tracto urinario, no estaban embarazadas, y no padecían alguna enfermedad degenerativa grave.

16 cepas de *Escherichia coli* fecales aisladas de muestras de coprocultivo de adultos sanos.

A estas 67 cepas antes mencionadas, se les realizó la tipificación serológica con anterioridad a este trabajo, por parte del Laboratorio 35, Depto. Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. El procedimiento empleado fue de acuerdo a lo propuesto por la División de Patógenos Entéricos del Laboratorio Central de Salud Pública de Londres, y se emplearon 174 sueros somáticos y 56 sueros flagelares; y se siguieron los criterios de evaluación de la aglutinación establecidos por el Laboratorio de Serología de la Facultad de Medicina, UNAM.

7.2.3 Cepas de Referencia

Escherichia coli uropatógena CFT073 (O6:K2:H1) de la Colección Americana de Cultivos Tipo (ATCC, por sus siglas en inglés), aislada de la sangre de una mujer con pielonefritis aguda.

Escherichia coli 1162 (O25:H4), obtenida de la orina de una mujer con infección del tracto urinario recurrente.

7.2.4 Medios de cultivo

Se utilizaron los medios Agar MacConkey Marca DIFCO, Gelosa especial (para conservación de cepas), Luria-Bertani (LB) Broth (Gerhardt *et al.*, 1994) y el medio M9 (Miller JH, 1972) suplementado.

7.3 Métodos

7.3.1 Cultivo Bacteriano

Se verificó la pureza de las cepas sembrándolas en Agar MacConkey y se mantuvieron en Gelosa Especial para su ensayo posterior.

7.3.2 Extracción de hierro del Medio de Cultivo

Para capturar o quelar el hierro presente en los medios de cultivo se utilizó el agente quelante 2,2'- Dipiridil, que tiene la capacidad de unión a los iones ferrosos y disminuye el hierro disponible. Éste se adicionó a los medios y se dejó disolver en agitación por 1h hasta su completa disolución.

Los medios que se utilizaron como control positivo se les suplementó con sulfato de hierro (0.2mM). La orina solo se suplementó con la fuente de hierro en el caso del control positivo, después de su esterilización.

Una vez que los medios LB y M9 se quelaron y suplementaron, se esterilizaron en el autoclave (calor húmedo a 121°C y 1.5 Kg/cm² de presión) por 15 minutos.

7.3.3 Condiciones de crecimiento bacteriano

Las cepas fueron crecidas durante toda la noche en 1.0 mL de Luria Bertani (LB), y se incubaron por 18 horas a 37°C. Las células bacterianas se inocularon en los medios de cultivo (quelados, suplementados con hierro y sin quelar) a una dilución de 1:1000 y se incubaron a 37°C por 24 horas.

7.3.4 Obtención de Proteínas de Membrana Externa (OMPs)

La extracción de proteínas de membrana externa (OMPs) se llevó a cabo mediante el método modificado de Agin and Wolf, 1997; basado en la solubilidad de las membranas citoplasmáticas en presencia del detergente Lauril sarcosinato de sodio (Sarkosyl).

Las bacterias se crecieron durante toda la noche y se colectaron los botones bacterianos mediante centrifugación a 8,000 g por 20min a 4°C, se lavó el botón tres veces con HEPES 20mM a pH 7.2 y se centrifugo a 4,500 g por 15 minutos. El botón se resuspendió en 1.0 mL de la misma solución de HEPES y se le agrego 10µl de 100mM PMSF (inhibidor de proteasas) y 10 µl de EDTA 100 mM. La suspensión bacteriana se sonicó dos veces a 35 output por 1 minuto (cada sonicada) en un tubo eppendorf de 1.5 mL dentro de una cama de hielo, con dos minutos de descanso entre cada sonicada. Los restos celulares y células enteras se removieron por centrifugación a 8,000 g por 10 minutos a 4°C. Las membranas bacterianas se recolectaron por ultracentrifugación del sobrenadante a 45,000 g a 4°C por 1 hora. El botón de membranas se resuspendió en 500µl de HEPES 10 mM con 1% de Sarkosyl. Después se mantuvo en agitación vigorosa (vortex) por 1 hora a temperatura ambiente. Las

OMPs se colectaron por ultracentrifugación a 40,000 g por 30 minutos, y los botones se lavaron una vez (sin mezclar) en HEPES 20mM. La fracción del botón que contiene las OMPs se resuspendieron en HEPES 10mM y se almacenaron a -20°C para su análisis posterior mediante electroforesis. La fracción del sobrenadante contiene las proteínas de membrana interna de la bacteria.

7.3.5 Electroforesis con gel de poliacrilamida en Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE)

Las muestras proteicas se hirvieron por 5 minutos en solución de Laemmli para solubilizar las proteínas y liberarlas de la bicapa lipídica, reducir los puentes de cisteína y abrir o desdoblar las proteínas para la separación electroforética óptima. Las proteínas de membrana externa (OMPs) se separaron por el método descrito por Laemmli 1970, denominado electroforesis en geles de poliacilamida (al 10%) con 0.1% de Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE).

Para el análisis del perfil electroforético se colocaron en cada pozo del gel 20 μg de las OMPs. La electroforesis se realizó a un amperaje constante de 20mA para el gel concentrador y 40mA para el gel separador. Después de la separación electroforética, los geles se tiñeron con Azul de Coomassie R-250 (GIBCO BRL). El peso molecular de las proteínas se calculó por comparación con marcadores de peso molecular conocido (Prosieve color, Cambrex Bioscience Rockland, USA).

7.3.6 Obtención del ADN bacteriano.

Técnica de ebullición (Le Bouguenec C, *et al.*, 1992).

Las cepas bacterianas se sembraron en 1.5ml de medio Luria. Se incubaron por 18 horas a 37°C, posteriormente se centrifugaron a 8000Xg durante 10 minutos y el botón bacteriano se resuspendió en 500µl de agua desionizada estéril, y se hirvieron en baño maría por 10 minutos. Se centrifugo a 8000Xg durante 10 minutos. Finalmente, se colectó el sobrenadante que contiene el ADN bacteriano y se guardo a -20°C, hasta la realización de la PCR.

7.3.7 Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR)

Para amplificar los fragmentos de DNA se utilizó la mezcla de reacción que se indica en la Tabla 4.

Tabla 4. Mezcla de amplificación empleadas en la PCR para una muestra.

Reactivo	Volumen (µl)	Concentración final
H ₂ O desionizada y estéril	14.35	
dNTPs [10mM]	0.6	0.2mM
*Buffer 10X	3	1.0X
MgCl ₂ [50mM]	0.9	1.5mM
Taq DNA Polimerasa [5U/µl]	0.15	2.5U
Oligonucléotidos iniciadores [100µmol/ml] (sentido-antisentido)	3 de c/u	1µmol/mL
DNA bacteriano	5	100ng/25µl
Volumen total	30	

*El buffer PCR 10X contiene: KCl 500mM; Tris-HCl (pH 8.3) 100mM; MgCl₂ 15mM [las concentraciones finales de estos ingredientes en la mezcla de PCR son: KCl 50mM; Tris-HCl (pH 8.3) 10mM; MgCl₂ 1.5mM].

Para preparar la mezcla de amplificación se utilizaron las secuencias de oligonucleótidos que se muestran en la Tabla 5.

Tabla 5. Secuencias de oligonucleótidos y temperaturas de alineamiento usados durante la amplificación de los genes que codifican para proteínas de membrana externa receptoras de hierro en cepas de *Escherichia coli*.

Función	Gen	Secuencia de oligonucleótido	Tamaño amplificado (pb)	Temperatura alineamiento (°C)	Referencia
Receptor hemo/hemoglobina	<i>chuA</i>	1. GACGAACCAACGGTCAGGAT 2. TGCCGCCAGTACCAAAGACA	279	55	Bigen-Bidois <i>et al.</i> , 2002.
Receptor de Colicina I	<i>cirA</i>	1. CTCGTCCAGTCAGGGCTAAG 2. AACAAAAACCTGGCAACAG	395	60	PubMed, gi 26245917 Primer blast
Receptor de Dicitrato Férrico	<i>fecA</i>	1. AGGTTAATATCGCACCGGGATCG 2. ATGGCATCCATGTTGCCGAGC	565	68	Ons <i>et al.</i> , 2007.
Receptor de Enterobactina	<i>fepA</i>	1. AGCTGACTGACAGCACCATCG 2. CGGGATGATCGACAAACGGTCCG	554	56.5	Ons <i>et al.</i> , 2007.
Receptor de Ferricromo	<i>fhuA</i>	1. AGACACTATCACCGTTACCGCTG 2. GCCGCGAATGATCAGGTGGTC	265	64	Ons <i>et al.</i> , 2007.
Proteína de virulencia reguladora de hierro	<i>ireA</i>	1. TGGTCTTCAGCTATATGG 2. ATCTATGATTGTGTTGGT	415	55	Russo <i>et al.</i> , 2001.
Receptor de sideróforos de tipo catecol	<i>iroN</i>	1. AAGTCAAAGCAGGGGTTGCCCG 2. GACGCCGACATTAAGACGCAG	665	64	Johnson <i>et al.</i> , 2000.
Receptor de Aerobactina	<i>iutA</i>	1. CTGCAGTACTCCGATCGGCTG 2. TGTTGGAGGTAAAGCGCTCATG	470	64	Ons <i>et al.</i> , 2007.
Potassium efflux protein	<i>kefA</i>	1. ATTCTGAGCACGCTTTCGTT 2. CGAGGGGAGTGTGTTGTT	705	60	PubMed, gi 26246479 Primer blast

Los protocolos utilizados en el termociclador para realizar la PCR fueron los siguientes:

- *chuA*: 95°C por 2 minutos el primer ciclo, seguido de 30 ciclos de 94°C por 30s, 56°C por 30s y 72°C por 30s, finalizando con 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.
- *iutA*: 95°C por 1 minuto el primer ciclo, seguido de 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, finalizando con 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.

- *fecA* y *fhuA*: 95°C por 1 minuto el primer ciclo, seguido 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 67°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, finalizando con 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.
- *kefA* y *cirA*: 95°C por 1 minuto el primer ciclo, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 64°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, finalizando con 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.
- *fepA*: 95°C por 1 minuto el primer ciclo, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 56.5°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, finalizando con 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.
- *iroN*: 95°C por 1 minuto el primer ciclo, seguido por 30 ciclos de 94°C por 50s, 64°C por 50s y 72°C por 50s, finalizando con 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.
- *ireA*: 95°C por 1 minuto el primer ciclo, seguido por 30 ciclos de 94°C por 1 minuto, 55°C por 1 minuto y 72°C por 1 minuto, finalizando con 1 ciclo de 72°C por 7 minutos.

7.3.8 Electroforesis de ADN en geles de agarosa

Los productos de la PCR se corrieron en un gel de agarosa al 1.7%, que contenía 4µl de bromuro de etidio por cada 100ml de agarosa. El gel se colocó en una cámara horizontal para electroforesis; en cada pozo del gel se depositaron 5µl de la muestra previamente mezclada con el buffer de carga 6X. Al gel se le aplicó una corriente de 80 Volts durante 40 minutos. Los productos de amplificación se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (UV) y se comparó su tamaño con marcadores de peso molecular conocidos [Gene Ruler™ 100bp DNA Ladder (Fermentas)].

8. RESULTADOS

8.1 Proteínas de Membrana Externa (OMPs) de la bacteria, que son expresadas en condiciones mínimas de hierro.

En el presente trabajo se utilizó la cepa 1162 de *Escherichia coli* uropatógena para investigar la expresión de proteínas captadoras de hierro en la membrana externa bacteriana. La cepa se aisló de un urocultivo proveniente de una mujer de 40 años con infección recurrente del tracto urinario, la cual no padecía otra enfermedad ni anomalías anatómicas o fisiológicas en del tracto urinario.

La cepa se seleccionó para este estudio debido a la infección recurrente del tracto urinario que presentó el paciente durante casi dos años y, por las características específicas que presentó la cepa bacteriana; el serotipo de la bacteria es O25:H4, el cual pertenece a los serotipos clásicos de UPEC, además la bacteria resultó ser adherente e invasiva a células de T-24 (de vejiga humana) en los ensayos de adherencia e invasividad *in vitro* (Ibarra-López, 2007). Dichas características sugieren que la bacteria posee factores de virulencia que le permiten colonizar el tracto urinario del hospedero, incluyendo sistemas de captación de hierro.

Para poder observar las proteínas involucradas en la captación de hierro; se obtuvieron proteínas de membrana externa (OMPs) de la cepa uropatógena 1162, las cuales fueron sometidas a un análisis electroforético (SDS-PAGE), para esto, las bacterias fueron crecidas en medios de cultivo en condiciones de limitación de hierro.

Cuando la cepa 1162 se creció en medio mínimo M9, quelado con dipiridil, se observó en el gel cuatro bandas cuya masa molecular aproximada fue de 70 a 85 kDa (Figura 5, carril 3). Dichas bandas no se detectaron cuando las bacterias se crecieron en medio mínimo quelado suplementado con 2.0 mM de FeSO_4 (Fig. 7, carril 4). El medio mínimo M9 resultó apropiado para este tipo de estudios ya que permitió la expresión de proteínas bacterianas en bajas cantidades de hierro. Este medio permitió la expresión bacteriana de OMPs captadoras de compuestos de hierro, aún cuando el medio no se queló con dipiridil. Esto fue posible porque el medio se elaboró con agua desionizada. El perfil electroforético del medio M9 no-quelado fue similar al presentado con medio M9 quelado con las bandas proteicas de 70-85 kDa, aunque la intensidad de dichas bandas fue ligeramente menor (Fig. 7, carril 2). El medio Luria quelado o no-quelado no permitió la expresión de OMPs captadoras de compuestos de hierro a pesar de que el medio fue elaborado con agua desionizada y quelado con dipiridil (Fig.7, carril 5 y 6). También se creció la bacteria en orina humana quelada y sin quelar, y se encontró un patrón electroforético igual al del medio M9 (Fig. 7, carril 7). Para probar si las cepas comensales son capaces de producir proteínas captadoras de hierro bajo las mismas condiciones que la uropatógena, se creció la cepa de *Escherichia coli* comensal fecal (como control negativo) en medio M9 quelado y sin quelar, el resultado fue que no se observaron diferencias en el perfil de proteínas y no se produjeron OMPs adicionales (Fig. 7, carril 8).

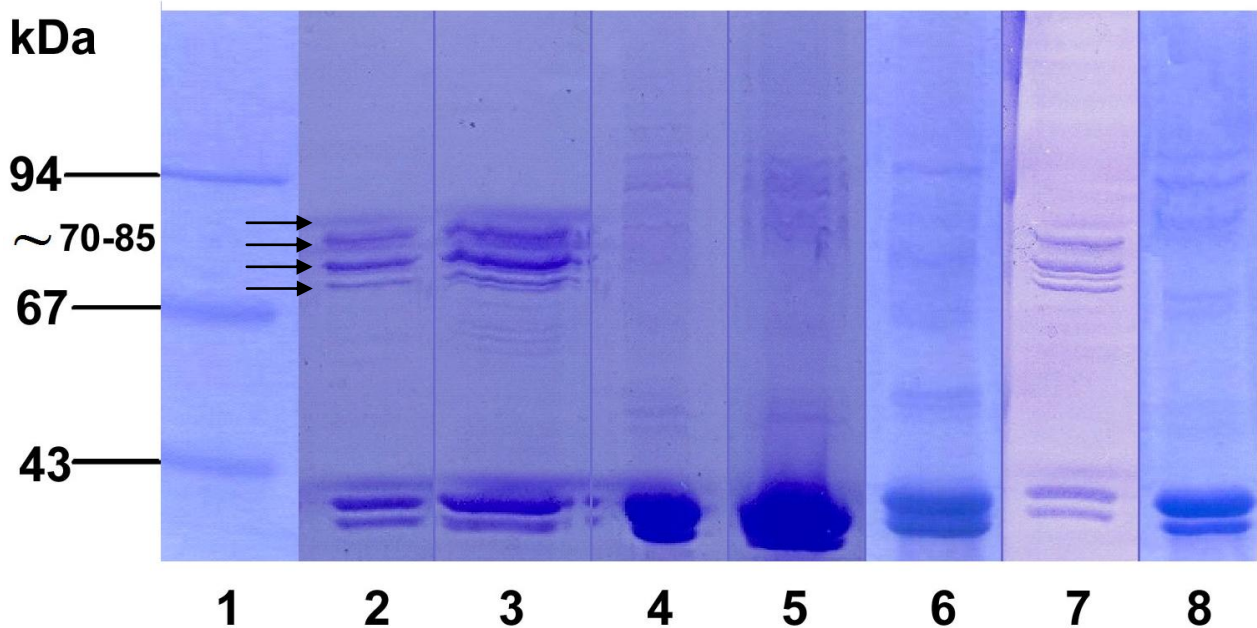


Figura 7. Perfil de proteínas de membrana externa (OMPs) de la cepa uropatógena 1162 crecida en: medio quelado (Q) y no quelado (NQ). Carril 1, marcador de peso molecular; carril 2, medio mínimo M9 (NQ); carril 3, medio mínimo M9 + Dipiridil (Q); carril 4, medio mínimo M9 suplementado con FeSO_4 ; carril 5, medio Luria + Dipiridil (Q); carril 6, Luria (NQ); carril 7, Orina humana (NQ) y carril 8, cepa fecal/comensal en medio mínimo M9 + Dipiridil (Q) (SDS-PAGE 10%).

8.2 Distribución de genes que codifican sistemas de adquisición de hierro en cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU

Se aislaron las proteínas de membrana externa de masa molecular aproximada entre 70-85 kDa a partir de la cepa uropatógena 1162. Para esto, dicha cepa fue crecida en bajas cantidades de hierro. Se identificaron seis proteínas mediante la secuenciación de sus aminoácidos, las cuales correspondieron a: ChuA, CirA, FecA, FepA, KefA, IutA. Estas proteínas son codificadas por genes que forman parte de diversos sistemas de adquisición de compuestos de hierro. Aparentemente algunos de estos genes contribuyen a que las bacterias crezcan en bajas cantidades de hierro, como es el caso de la orina humana. En consecuencia surgió la pregunta ¿Con que frecuencia se encuentran dichos genes en las cepas de *Escherichia coli* uropatógenas? Para

contestar esta pregunta se decidió analizar la presencia de dichos genes en los aislados de *Escherichia coli* de infecciones del tracto urinario y de cepas fecales/comensales. En estas cepas también se determinó la presencia de otros tres genes involucrados en la captación de compuestos de hierro; *ireA*, *iroN* y *fhuA*, estos genes han sido reportados como factores de virulencia importantes en el establecimiento de la infección del tracto urinario.

En total se determinó la presencia de nueve genes que codifican para proteínas de membrana externa, los cuales actúan como receptores de compuestos de hierro o grupos hemo en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas. Los genes que se detectaron mediante la técnica de PCR son: *chuA*, *cirA*, *fecA*, *fepA*, *fhuA*, *ireA*, *iroN*, *iutA* y *kefA*. También se investigó la presencia de estos genes en cepas fecales/comensales de *Escherichia coli*, esto con el fin de realizar un análisis comparativo y tener un punto de referencia.

Como control positivo se utilizó la cepa CFT073 (aislada de pielonefritis aguda). También se identificaron la presencia de estos 9 genes en la cepa 1162 dando positivo para todos los genes.

Para realizar un análisis de los resultados del presente estudio, las 51 cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU se dividieron en dos grupos: el primer grupo está compuesto por 33 cepas de *Escherichia coli* que no tienen serogrupos asociados a ITU (Tabla 6), y el segundo compuesto por 18 cepas que tienen serogrupos asociados a ITU (Tabla 7).

En el primer grupo (cepas con serogrupo no asociados a ITU), los genes que se encontraron en todas las cepas son *fepA* y *cirA*. Los genes *ireA* e *iroN* fueron los que se encontraron en menor porcentaje en estos aislados con 21% y 35% respectivamente. Al comparar la frecuencia de aparición de estos genes en el segundo grupo (cepas que tienen serogrupos asociados a ITU) encontramos que en general la mayoría de los genes investigados se presentan con mayor frecuencia en este grupo, con excepción de *fecA* que se encuentra en mayor porcentaje en los serogrupos no asociados a ITU (Tabla 6 y 7).

Con respecto al segundo grupo, correspondiente a las 18 cepas con serotipos clásicos de UPEC, los genes *cirA*, *fepA* y *fhuA* se expresaron en todas las cepas, seguidos por *kefA* en 17 cepas (94%), *chuA* en 15 cepas (83%), *iutA* y *fecA* se encontraron en 14 cepas (78%), y los dos genes que se encontraron en menor proporción fueron *iroN* presente en 6 cepas (33%) e *ireA* en 5 cepas (28%). Los resultados se encuentran descritos en la Tabla 7.

Tabla 6. Distribución de genes que codifican sistemas de adquisición de hierro en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas que tienen serogrupos no asociados a ITU.

Cepa	Serotipo ^a	<i>chuA</i> ^b 279pb ^c	<i>cirA</i> 395pb	<i>fecA</i> 565pb	<i>fepA</i> 554pb	<i>fhuA</i> 265pb	<i>ireA</i> 415pb	<i>iroN</i> 665pb	<i>iutA</i> 470pb	<i>kefA</i> 705pb
04	OR:NM	-	+	-	+	-	-	-	-	+
05	O103:NM	-	+	-	+	+	-	-	-	+
07	O12:NM	-	+	+	+	+	-	-	+	+
08	O11:NM	+	+	+	+	+	-	-	+	+
010	O53:H2	+	+	+	+	+	-	-	+	-
011	O164:NM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
012	O?:NM	-	+	+	+	+	-	-	-	-
013	O12:H2	-	+	+	+	+	-	-	+	+
014	O15:NM	-	+	+	+	+	-	-	-	+
017	OR:NM	+	+	+	+	+	+	-	+	+
018	OR:NM	-	+	+	+	-	+	-	+	+
021	O?:NM	-	+	+	+	+	+	+	+	+
023	O?:NM	-	+	+	+	+	-	-	-	+
025	O?:NM	-	+	+	+	+	-	-	+	+
026	O44:H18	-	+	+	+	+	+	-	+	-
027	OR:H28	+	+	+	+	+	+	-	-	-
028	OR:NM	-	+	+	+	-	+	-	-	+
029	O?:NM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
030	O100:NM	-	+	+	+	+	-	-	+	+
032	OR:H6	-	+	-	+	-	+	-	+	-
033	O90:NM	-	+	+	+	+	-	-	+	-
034	O?:NM	-	+	+	+	+	-	+	+	+
035	O9:NM	+	+	+	+	+	+	+	+	+
036	OR:NM	-	+	+	+	+	+	-	+	+
037	O166:NM	+	+	-	+	+	-	+	+	+
038	O37:H10	+	+	+	+	+	-	-	+	+
042	OR:NM	-	+	+	+	+	+	-	+	+
046	O101:NM	+	+	+	+	+	-	-	+	+
047	OR:H6	+	+	-	+	+	-	-	+	+
049	OR:NM	+	+	+	+	+	-	-	+	+
050	O?:H10	+	+	+	+	+	-	-	+	+
052	OR:NM	+	+	+	+	+	-	-	+	+
054	O?:NM	+	+	+	+	+	-	+	+	+
Total (33)		15	33	28	33	29	13	7	25	27
%		45	100	85	100	88	35	21	76	82

^a Cepas que no fueron tipificables con los antisueros O utilizados (OR y O?)

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

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

NM No móvil

^b Presencia (+) o ausencia (-) del gen.

^c Tamaño del amplificado expresado en pares de bases (pb)

Tabla 7. Distribución de genes que codifican sistemas de adquisición de hierro en cepas de *Escherichia coli* uropatógenas que tienen serogrupos asociados a ITU.

Cepa	Serotipo ^a UPEC	<i>chuA</i> ^b 279pb ^c	<i>cirA</i> 395pb	<i>fecA</i> 565pb	<i>fepA</i> 554pb	<i>fhuA</i> 265pb	<i>ireA</i> 415pb	<i>iroN</i> 665pb	<i>iutA</i> 470pb	<i>kefA</i> 705pb
01	O7:NM	+	+	+	+	+	-	-	+	+
02	O18:H31	+	+	+	+	+	-	-	-	+
03	O6:H31	+	+	+	+	+	-	+	-	+
06	O25:H4	+	+	-	+	+	-	-	+	+
09	O25:NM	+	+	-	+	+	-	-	+	+
015	O18:NM	-	+	+	+	+	+	-	+	+
020	O8:NM	-	+	+	+	+	+	-	-	+
022	O4:NM	+	+	+	+	+	+	+	+	-
024	O75:H5	-	+	+	+	+	+	-	+	+
039	O6:NM	+	+	+	+	+	+	+	-	+
040	O25:NM	+	+	+	+	+	-	-	+	+
041	O6:NM	+	+	-	+	+	-	+	+	+
043	O25:H4	+	+	+	+	+	-	-	+	+
045	O2:NM	+	+	+	+	+	-	+	+	+
051	O25:H4	+	+	+	+	+	-	-	+	+
053	O25:NM	+	+	+	+	+	-	-	+	+
056	O25:NM	+	+	+	+	+	-	-	+	+
057	O6:NM	+	+	-	+	+	-	+	+	+
Total (18)		15	18	14	18	18	5	6	14	17
Porcentaje (%)		83	100	78	100	100	28	33	78	94

^a Serogrupo O25 es el de mayor frecuencia (7 cepas).

NM No móvil

^b Presencia (+) o ausencia (-) del gen.

^c Tamaño del amplificado expresado en pares de bases (pb)

Finalmente, para tener un patrón de comparación se buscó la presencia de dichos genes en 16 cepas aisladas de coprocultivo de adultos sanos, los genes que se encontraron en todas las cepas fueron *cirA* y *fhuA*, seguidos por *fecA* (88%), *fepA* (81%), *iutA* (75%), mientras que los genes *kefA*, *chuA*, *ireA* e *iroN* se encontraron en menos de la mitad de los aislados (Tabla 8).

Tabla 8. Distribución de genes que codifican sistemas de adquisición de hierro en cepas fecales/comensales de *Escherichia coli*.

Cepa	Serotipo	<i>chuA</i> ^b 279pb ^c	<i>cirA</i> 395pb	<i>fecA</i> 565pb	<i>fepA</i> 554pb	<i>fhuA</i> 265pb	<i>ireA</i> 415pb	<i>iroN</i> 665pb	<i>iutA</i> 470pb	<i>kefA</i> 705pb
1750	O107:H27	-	+	+	+	+	-	-	-	+
1757	OR:NM	-	+	+	+	+	-	-	+	-
1759	O104:H4	-	+	+	+	+	-	-	+	-
1765	O138:H31	+	+	-	+	+	-	+	+	-
1767B	O86:NM	-	+	+	+	+	-	-	+	-
1768	O28ab:NM	-	+	+	+	+	+	-	+	-
1770	O169:NM	-	+	+	-	+	+	-	+	+
1771B	O18ab:H4	-	+	+	+	+	-	-	+	+
1773	O125ab:H11	-	+	+	+	+	-	-	-	+
1774	O17:H18	+	+	+	+	+	-	-	+	+
1795	O166:H25	-	+	+	+	+	-	-	+	-
1797	O17:H18	+	+	+	+	+	-	+	+	-
1802	O103:H21	-	+	+	+	+	-	-	-	-
1803	OR:H21	-	+	+	+	+	-	-	-	-
1807	O?:H18	+	+	-	-	+	-	+	+	+
1808	O59:H9	-	+	+	-	+	+	-	+	-
Total (n=16)		4	16	15	13	16	3	3	12	6
%		25	100	88	81	100	18	18	75	38

^a Cepas que no fueron tipificables con los antisueros O utilizados (OR y O?)

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

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

NM No móvil

^b Presencia (+) o ausencia (-) del gen.

^c Tamaño del amplificado expresado en pares de bases (pb)

Para determinar la prevalencia de los nueve genes en estudio, que codifican para proteínas receptoras de hierro, se hizo una comparación entre las 18 cepas uropatógenas con serotipo asociado a ITU contra las 17 cepas fecales/comensales de *Escherichia coli* aisladas de individuos sanos (Tabla 9). Se observó que, dos genes *chuA* y *kefA* fueron significativamente más frecuentes ($P < 0.01$) en las cepas UPEC que en las cepas fecales/comensales. Los genes *ireA* e *iroN* también se presentaron con mayor frecuencia en las cepas UPEC que en las cepas fecales/comensales pero en un número menor de cepas. Por otro lado, dos de los nueve genes estudiados, *cirA* y *fhuA*,

se presentaron en todas las cepas tanto uropatógenas como fecales/comensales. En cuanto al gen *fepA*, también se encontró en todas las cepas uropatógenas y en la mayoría de las cepas fecales/comensales. En lo que respecta a los genes *iutA* y *fecA* se observó una prevalencia alta en ambos grupos (UPEC y fecales/comensales).

Tabla 9. Comparación sobre la prevalencia de genes de adquisición de hierro entre cepas de *Escherichia coli* uropatógenas con serogrupos asociados a ITU y cepas fecales/comensales.

Gen	No. (%) de Cepas positivas para el gen	
	Uropatógenas (n=18)	Fecales/comensales (n=16)
<i>chuA</i>	15 (83) [*]	4 (25)
<i>cirA</i>	18 (100)	17 (100)
<i>fecA</i>	14 (78)	15 (88)
<i>fepA</i>	18 (100)	14 (82)
<i>fhuA</i>	18 (100)	17 (100)
<i>ireA</i>	5 (28)	3 (18)
<i>iroN</i>	6 (33)	3 (18)
<i>iutA</i>	14 (78)	12 (75)
<i>kefA</i>	17 (94) [*]	6 (38)

^{*} $P < 0.01$ en la Prueba de Fisher exacta (comparada con la prevalencia en fecales/comensales)

8.3 Serotipificación

El empleo de serología por aglutinación en placa con 175 antisueros somáticos (O) y 56 flagelares (H) permitió la tipificación de las cepas objeto de nuestro estudio. Dentro de las 51 cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU encontramos gran variedad de serogrupos, distribuidos en 21 serogrupos O diferentes. De las 32 cepas que resultaron tipificables con los antisueros O empleados, 18 cepas (56%) pertenecen a los serogrupos considerados como clásicos UPEC (O2, O4, O6, O8, O18, O25 y O75), siendo el serogrupo O25 el más representativo entre estos aislados con 7 cepas (22%), seguido del serogrupo O6 en 4 cepas (13%), y el resto de los serogrupos solo se presentó en una cepa cada uno. Entre los serogrupos diferentes a los uropatógenos (44%) se observaron el O9, O11, O12, O15, O44, O53, O90, O100, O101, O164 y O166, distribuidos en 14 aislados. Diecinueve aislados de los 51 analizados no fueron tipificables (O? y OR).

Con respecto a las 16 cepas de *Escherichia coli* fecales/comensales 13 fueron tipificables (81%), teniendo un total de 12 serogrupos diferentes O17, O18ab, O28ab, O59, O86, O103, O104, O107, O125ab, O138, O166 y O169.

9. DISCUSIÓN

9.1 Proteínas de Membrana Externa (OMPs) de la bacteria, que son expresadas en condiciones mínimas de hierro.

El estudio de las Proteínas de Membrana Externa (OMPs) de UPEC es fundamental no sólo para ampliar el conocimiento de las interacciones hospedero-patógeno, sino también contribuye a la identificación de blancos para el desarrollo de mejores antibióticos y vacunas (Alteri y Mobley, 2007). Un grupo de estas proteínas son los receptores de compuestos de hierro, que presentan una serie de características que las hacen buenas candidatas para el diseño de vacunas. Entre ellas se encuentran su exposición en la membrana celular, el aumento de su síntesis durante un proceso infeccioso y que su neutralización por parte de anticuerpos puede bloquear la captación de hierro, inhibiendo así el crecimiento de la célula bacteriana dentro del hospedero (Alteri *et al.*, 2009).

En el presente estudio se contribuyó a la identificación de proteínas captadoras de compuestos de hierro a partir de una cepa de *Escherichia coli* uropatógena (1162) aislada de un caso notable de ITU en la Ciudad de México; la producción bacteriana de dichas proteínas se indujo mediante el cultivo de la bacteria en bajas cantidades de hierro. Además se examinó la frecuencia en que se encuentran los genes que codifican para estas proteínas captadoras de hierro en diferentes cepas uropatógenas.

En este estudio, el medio de cultivo mínimo M9, cuando se queló con dipiridil indujo a las bacterias a expresar OMPs captadoras de compuestos de hierro (Fig. 7, carril 3), donde detectamos bandas proteicas con aparente masa molecular de

70-85 kDa, en contraste del medio caldo Luria (LB) quelado no indujo este efecto (Fig. 7, carril 5). El medio M9 esta compuesto básicamente por sales como KH_2PO_4 y glucosa (ver métodos) lo cual facilita ser quelado, a diferencia del medio LB tiene extracto de levadura y triptona, ricos en nutrientes acarreadores de hierro, por lo tanto difícil de quelar. Incluso el medio M9 sin quelar permitió la expresión de las proteínas captadoras de hierro (Fig. 7, carril 2), aunque con menor abundancia que el M9-quelado, esto probablemente se debió a que el medio M9 se elaboró con agua desionizada de alta calidad (pobre en iones).

La inducción de receptores de compuestos de hierro por la cepa 1162 durante su crecimiento en la orina humana (Fig. 7, carril 7), refleja la limitación de hierro que experimenta el patógeno al infectar el tracto urinario. Al respecto se ha reportado que la orina y las vías urinarias son ambientes limitados de hierro (Alteri y Mobley, 2007; Russo *et al.*, 1999; Shand *et al.*, 1985; Snyder *et al.*, 2004). Además indica la importancia de la adquisición de hierro por parte de la bacteria, durante la infección del tracto urinario. Estudios recientes (con otras cepas de *Escherichia coli* uropatógenas) han reportado resultados similares, donde muestran la inducción de OMPs receptoras de hierro durante el cultivo en la orina humana, así como la represión de la producción de las mismas durante el crecimiento en un medio saturado de hierro (Alteri y Mobley, 2007; Hagan y Mobley, 2007).

La cepa UPEC (1162) utilizada en el presente estudio, probablemente tiene múltiples sistemas de adquisición de hierro, los cuales se producen y activan cuando la cantidad de hierro disponible es baja. La presencia de estos sistemas en las cepas uropatógenas de *Escherichia coli* refleja su adaptación al tracto urinario, que como se

ha mostrado, es un ambiente limitante en hierro. El hecho de que estas proteínas de membrana externa se expresen de manera simultánea cuando existe una baja disponibilidad de hierro, sugiere que sus genes están de alguna manera regulados por el hierro. Esto es que las bacterias censan su ambiente, detectando la falta de hierro y en consecuencia regulan la transcripción de genes que codifican para otros sistemas más eficientes para captar hierro. De hecho una de las proteínas identificadas es FecA que transporta dicitrato ferrico.

Es importante destacar, que varias OMPs (como son los receptores de hierro) han sido identificadas como antígenos protectores potenciales debido a que tienen un papel fundamental en la virulencia de UPEC (Alteri *et al.*, 2009; Hagan y Mobley, 2007). Algunos estudios han demostrado que cepas de *Escherichia coli* que carecen del receptor hemo/hemoglobina ChuA (Torres *et al.*, 2001), del receptor de aerobactina lutA (Torres *et al.*, 2001), del receptor de hierro salmochelina IroN (Russo *et al.*, 2002) o de la proteína de virulencia reguladora de hierro IreA (Russo *et al.*, 2001), fueron significativamente afectadas en su urovirulencia en un modelo murino de infección urinaria, lo que demuestra la importancia de la adquisición de hierro en este patógeno en experimentos *in vivo*.

9.2 Sistemas de adquisición de hierro y genes implicados

Dada la función bien establecida de la adquisición de hierro en la patogénesis, pensamos que las cepas de UPEC, en comparación con las cepas comensales de *Escherichia coli*, expresan un mayor número de genes que codifican para proteínas

receptoras de hierro, en respuesta a las condiciones limitantes de hierro que presenta el tracto urinario.

En el presente estudio se determinó la presencia y prevalencia de algunos genes que codifican para receptores de hierro en cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU en la Ciudad de México.

Los genes *chuA* y *kefA* fueron significativamente ($P < 0.01$) más frecuentes en las cepas UPEC que en las cepas fecales (Tabla 9). En el caso del gen *chuA* se presentó en un 83% para las cepas UPEC y en un 29% para las cepas fecales/comensales, dicho gen codifica para la proteína receptora del grupo hemo, lo que indica que al ser el grupo hemo la fuente de hierro más abundante *in vivo*, la presencia de un sistema de transporte del grupo hemo en las cepas de UPEC puede ser fundamental para la adquisición de hierro de la hemoglobina o del grupo hemo. Aunque la utilización del grupo hemo, puede no ser esencial para la colonización inicial de la vejiga por cepas UPEC, podría desempeñar un papel importante en las etapas tardías de la enfermedad cuando hay hemólisis de las células del hospedero y por ende la liberación del grupo hemo y hemoglobina, lo que explicaría claramente la alta prevalencia del gen *chuA* en las cepas UPEC. Al respecto, otros autores han reportado, 87% (Hagan y Mobley, 2007) y 72% de prevalencia en cepas uropatógenas (Wieser *et al.*, 2010).

En lo que respecta al gen *kefA*, éste se encontró en el 94% de las cepas UPEC estudiadas y 41% en las cepas fecales, este gen codifica para una proteína de membrana externa denominada KefA, la cual tiene un papel en la regulación normal del equilibrio iónico y la presión osmótica durante el crecimiento a elevada osmolaridad, a

través de la liberación controlada de los iones K^+ (Levina *et al.*, 1999), lo que es de vital importancia para la célula bacteriana debido a que en el tracto urinario se presentan constantes cambios drásticos en la presión osmótica. Hasta el momento no existen reportes en la literatura que indiquen el papel de esta proteína en la adquisición de compuestos de hierro, ni tampoco se conoce su función en la patogénesis. Nuestros resultados sugieren que el gen *kefA* puede ser importante en el establecimiento de la infección de cepas uropatógenas, pensamos esto por varias razones:

1. Fue una de las proteínas identificadas que se expresaron cuando la cepa uropatógena 1162 creció en condiciones bajas en hierro, como la orina humana (Fig. 7, carril 7) y el medio M9-quelado (Fig. 7, carril 3).
2. El gen *kefA* se encontró con mayor prevalencia significativa ($P < 0.01$) en las cepas uropatógenas en comparación con las fecales (Tabla 9).
3. La función osmoreguladora que presenta la proteína que codifica este gen.

Los genes *ireA* e *iroN*, se presentaron en mayor porcentaje en las cepas UPEC que en las cepas fecales/comensales (Tabla 9), dichos genes han sido considerados como marcadores de virulencia en estudios de epidemiología molecular de *Escherichia coli* patógenas (Okeke *et al.*, 2004; Russo *et al.*, 2002). Además en el caso de *iroN* que codifica para el receptor del sideróforo de salmochelina (IroN), ha sido considerado como un candidato potencial para la elaboración de una vacuna polivalente (Russo *et al.*, 2003).

Los genes *cirA*, *fecA*, *fepA*, *fhuA* e *iutA* se encontraron con una alta prevalencia en los aislados UPEC, sin embargo, no se encontró diferencia significativa con respecto

a las cepas de *Escherichia coli* fecales que también se encontraron con alta frecuencia (Tabla 9). Esto puede deberse a que, de acuerdo con una gran cantidad de investigaciones y estudios en individuos sanos, la mayoría de los uropatógenos se originan de la flora rectal y entran a la vejiga vía uretra (Mulvey, 2002); y en el caso de las mujeres, la colonización del introito vaginal en cepas de *Escherichia coli* también parece ser un paso crítico inicial en la patogénesis de ITU, ya que se ha encontrado que bacterias de la microflora vaginal poseen los genes que codifican para factores de virulencia involucrados en la ITU (Kuhar *et al.*, 1998; Obata *et al.*, 2002; Rama *et al.*, 2005); de esta forma dichos resultados obtenidos apoyan la hipótesis de que el reservorio activo para las UPEC son las cepas fecales que han adquirido factores de urovirulencia por transferencia horizontal (Figura 1), y que en algún momento las habilitarán para causar la ITU. Además, es importante considerar que las cepas fecales de *Escherichia coli*, pueden variar según el entorno geográfico (localización) y el grupo de individuos (hospederos) en el que se encuentren (Diurez *et al.*, 2001).

Estas pueden ser algunas de las razones principales por las cuales, las cepas fecales de *Escherichia coli* del presente estudio tuvieron una mayor prevalencia de los genes involucrados en la captación de hierro en comparación con los resultados de estudios anteriores donde la frecuencia de dichos genes es menor (Alteri *et al.*, 2009; Hagan y Mobley, 2007; Johnson *et al.*, 2005a), por ejemplo, en el gen que codifica para el receptor de aerobactina, *iutA*, se obtuvo prevalencia del 78% en cepas uropatógenas contra un 76% en cepas fecales (Tabla 9), mientras que otros estudios indican una frecuencia de dicho gen en cepas UPEC que va del 50 al 65% (Hagan y Mobley, 2007;

Johnson *et al.*, 2005a y 2005b; Piatti *et al.*, 2008; Wieser *et al.*, 2010) y del 17 al 26% en cepas fecales (Hagan y Mobley, 2007; Johnson *et al.*, 2005a).

El gen *fepA* que codifica para el receptor del sideróforo enterobactina, FepA, al ser la enterobactina uno de los sideróforos producidos por la mayoría de las cepas de *Escherichia coli* para la adquisición de hierro, la alta prevalencia en cepas tanto uropatógenas (100%) como las fecales/comensales (82%) (Tabla 9), confirma la importancia del sistema de enterobactina en la adquisición de hierro por *Escherichia coli*.

En cuanto a los genes *cirA* y *fhuA*, éstos se encontraron presentes en todas las cepas tanto uropatógenas como fecales/comensales (Tabla 9), esto podría deberse a que ambos genes codifican para proteínas de membrana externa multifuncionales que son necesarias tanto en las cepas uropatógenas como en las fecales/comensales de *Escherichia coli*. En el caso de CirA, es un receptor de colicina I y transporta el Fe³⁺ unido a catecolatos lineales, como la dihidroxi-benzoil serina, a través de la membrana externa (Hantke, 1990; Nikaido y Rosenberg, 1990). Mientras que la proteína FhuA está involucrada en la infección por bacteriófagos, la incorporación de colicinas, y el transporte de ciertos antibióticos, además del transporte de ferricromo (Ferguson *et al.*, 1998).

Son pocos los estudios que hasta el momento se han realizado en relación a los genes receptores de hierro presentes en otros patotipos de *Escherichia coli* (Okeke *et al.*, 2004; Sobieszczkańska, 2008). Uno de ellos, indica que la mayoría de las cepas EAEC poseen diferentes genes involucrados en la adquisición de hierro, mientras que en las cepas EPEC, ETEC y DAEC no son tan comunes, y que las cepas de UPEC son

en las que se ha observado un mayor número de sistemas de adquisición de hierro debido al ambiente en el que se encuentran (Okeke *et al.*, 2004).

Recientemente se han realizado estudios comparativos entre las cepas de *Escherichia coli* patógena aviar (APEC), causante de colibaciliosis aviar, con cepas de UPEC (Bauchart *et al.*, 2010; Johnson *et al.*, 2007; Ons *et al.*, 2007; Rodríguez-Siek *et al.*, 2005), debido a que ambos patotipos son causantes de enfermedades extraintestinales. Se ha observado, que tienen similitudes en sus serogrupos, factores de virulencia, dentro de los que se encuentran los sistemas de adquisición de hierro, y en sus grupos filogenéticos, lo que apoya la hipótesis de que las aves de corral pueden ser un reservorio de *Escherichia coli* capaces de causar infecciones del tracto urinario en humanos (Rodríguez-Siek *et al.*, 2005). Al comparar los resultados obtenidos con los de una reciente investigación en donde los autores buscaron la prevalencia de los genes receptores de hierro presentes en cepas de APEC, encontraron que los genes receptores de hierro más abundantes son *fepA*, *cirA*, *iroN* e *iutA* (Ons *et al.*, 2007). Lo que nos lleva a pensar que, la prevalencia de los genes receptores de hierro varía de acuerdo al patotipo de *Escherichia coli*, al entorno en el que se encuentre (si es o no un ambiente muy limitado de hierro) y a las características del hospedero; además es importante considerar la gran heterogeneidad genética presente en las diferentes variantes de *Escherichia coli*, incluso entre miembros del mismo patotipo o serogrupo.

En esta investigación se encontró que todas las cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU poseen más de 2 genes (de los 8 en estudio) que codifican para receptores de hierro (Tablas 3 y 4); esto nos lleva a pensar que, la presencia de varios sistemas de adquisición de hierro en una misma cepa de UPEC puede mejorar y

facilitar la colonización del tracto urinario, ya que le permite al patógeno aprovechar las diferentes fuentes de hierro presentes en el hospedero.

9.3 Serogrupos y serotipos de cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU

Tradicionalmente la clasificación de los serotipos de *Escherichia coli* está basada en la presencia de ciertos antígenos O (somáticos), H (flagelares) y K (capsulares). Una asociación entre la expresión de los antígenos somáticos específicos y los patotipos de *Escherichia coli* ha sido bien documentada, sin embargo, el grado con el cual estos antígenos impactan en la patogénesis de estas cepas no es del todo entendido (Lloyd *et al.*, 2007). En el presente estudio encontramos 21 diferentes serogrupos O. Algunos de los cuales pertenecen a patotipos comunes de *Escherichia coli* causantes de diarrea (ETEC, EIEC, EPEC, EHEC, DAEC y EAEC). Sin embargo, para conocer si realmente estos son grupos patógenos es necesario verificar que portan los factores de virulencia específicos para cada patotipo. Cabe mencionar que de las 51 cepas de *Escherichia coli* aisladas de ITU, 32 cepas que resultaron tipificables con los antisueros O empleados, 18 cepas (56%) pertenecen a los serogrupos considerados como clásicos UPEC (O2, O4, O6, O8, O18, O25 y O75). Dentro de los cuales, el más representativo fue el O25, observado en 7 cepas, seguido del serogrupo O6 en 4 cepas, y el resto de los serogrupos solo se presentó en una cepa cada uno.

Estos resultados indican que la prevalencia de ciertos serogrupos en las cepas causantes de ITU en pacientes de la Ciudad de México es diferente a la reportada en otros países como: España, Finlandia, Hungría, Inglaterra, Japón, China, Canadá, Estados Unidos y Brasil donde indican que los serogrupos encontrados con mayor

frecuencia han sido el O6, seguido del O2 (Johnson *et al.*, 1997; Rodríguez-Siek *et al.*, 2005; Manges *et al.*, 2006; Abe *et al.*, 2008). En otros estudios realizados por este mismo grupo de investigación, con aislados de la ciudad de México, reportaron que el serogrupo O25 es el más frecuente identificado en los aislados de ITU, seguido por el O2 (Alfaro-López, 2009) y el O8 (Ibarra-López, 2007). Lo anterior sugiere que los serogrupos O de cepas causantes de ITU en pacientes de la ciudad de México podrían ser distintos a los identificados en otras zonas geográficas como Europa y Asia, y en algunos países del Continente Americano. Debido a la alta frecuencia en la que fue identificado el serogrupo O25, específicamente el serotipo O25:H4 surge la pregunta ¿Se trata de un origen clonal entre dichas cepas uropatógenas?

10. CONCLUSIONES

Los genes *chuA* y *kefA* pueden ser importantes en el establecimiento de la infección del tracto urinario, dichos genes se encontraron con mayor frecuencia en las cepas UPEC en comparación con las cepas fecales, además la expresión de sus proteínas fue inducida por la baja cantidad de hierro en el medio.

La presencia de un sistema de utilización del grupo hemo (*chuA*) en las cepas de UPEC puede ser de gran ventaja en la colonización del tracto urinario, ya que la hemoglobina con su grupo hemo es muy abundante en el hospedero.

Las bacterias presentes en la flora intestinal pueden ser un reservorio activo para la ITU debido a que algunas cepas fecales poseen los factores de virulencia de las cepas UPEC. La adquisición de dichos factores puede habilitar a las bacterias para invadir, colonizar y persistir en el tracto urinario ocasionando una infección.

El serogrupo que se identificó con mayor frecuencia en los 51 aislados de pacientes con ITU de la Ciudad de México fue el O25, en contraste con lo reportado en otros países donde los serogrupos O6 y O2 son los más prevalentes.

Debido a la prevalencia del serotipo O25:H4 encontrada en el presente trabajo, surge la siguiente pregunta: ¿Las cepas aisladas en el presente estudio con serotipo O25:H4 corresponden al grupo clonal emergente multiresistente a antibióticos e identificado en todo Europa, Estados Unidos y Canadá?

El tracto urinario es un ambiente muy limitado de hierro, por lo que las cepas UPEC deben poseer sistemas específicos para la adquisición de hierro como son los receptores de membrana externa de compuestos de hierro.

11. PERSPECTIVAS

La identificación de los factores de virulencia, en este caso los receptores de hierro son de gran utilidad para ampliar el conocimiento de la interacción hospedero-patógeno y así establecer nuevos blancos terapéuticos y la posibilidad de desarrollar una vacuna polivalente.

En futuras investigaciones sería interesante corroborar el hecho de que el serogrupo O25 es el más frecuente entre las cepas uropatógenas que afectan a la población mexicana, para ello es necesario el análisis de un mayor número de cepas y de muestras representativas de la población.

12. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abe C, Salvador F, Falsetti I, Vieira M, Blanco J, Blanco JE, Blanco M, Machado A, Elias W, Hernandez R, Gomes T.** (2008). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains may carry virulence properties of diarrhoeagenic *E. coli*. *FEMS Immunol Med Microbiol* **301**:105-107.
- Ahmed N, Dobrindt U, Hacker J, Hasnain SE.** (2008). Genomic fluidity and pathogenic bacteria: applications in diagnostics epidemiology and intervention. *Nature Reviews Microbiology* **6**:387-394.
- Alfaro-López A.** (2009). Investigación sobre la capacidad invasiva de *Escherichia coli* uropatógena a células epiteliales y alteraciones en proteínas del citoesqueleto inducidas por la internalización de la bacteria. Tesis de Maestría. Posgrado en Ciencias Biológicas, Facultad de Medicina. UNAM, México.
- Alteri CJ, Hagan EC, Sivick KE, Smith SN, Mobley HLT.** (2009). Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PloS Pathogens* **5**(9):e1000586.
- Alteri CJ, Mobley HL.** (2007). Quantitive profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infection and Immunity* **75**:2679-2688.
- Andrews SC, Robinson AK, Rodríguez F.** (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS Microbiology Reviews* **27**:215-237.
- Bahrani-Mougeot F, Buckles E, Lockett C, Hebel J, Johnson D, Tang C, Donnenberg M.** (2002a). Type 1 fimbriae extracellular polysaccharides are preeminent uropathogenic *Escherichia coli* virulence determinants in the murine urinary tract. *Mol. Microbiol.* **45**:1079-1093.
- Bahrani-Mougeot F, Gunter IVN, Donnenberg M, Mobley HL.** (2002b). Uropathogenic *Escherichia coli*. En: Donnenberg (ed). *Escherichia coli: virulence mechanisms of a versatile pathogen*. Elsevier Science, p. 239-268.
- Bauchart P, Germon P, Brée A, Oswald E, Hacker J, Dobrindt U.** (2010). Pathogenomic comparison of human extraintestinal and avian pathogenic *Escherichia coli* search for factors involved in host specificity or zoonotic potential. *Microbial Pathogenesis* 12 May:1-11.
- Bigen-Bidois M, Clermont O, Bonacorsi S, Terki M, Brahimi N, Loukil C, Barraud D, Bingen E.** (2002). Phylogenetic analysis and prevalence of urosepsis strains of *Escherichia coli* bearing pathogenicity island-like domains. *Infection and Immunity* **70**(6):3216-3226.
- Blanco M, Blanco J, Blanco JE, Alonso M, Abalia I, Rodríguez E, Bilbao J, Umaran A.** (1995). Virulence factors and O serogroups of *Escherichia coli* as a cause of community-acquired urinary infections. *Enferm Infecc Microbiol Clin* **13**:236-241.

- Bonacorsi S, Houdouin V, Mariani-Kurkdjian P, Mahjoub-Messai F, Bingen E.** (2006). Comparative prevalence of virulence factors in *Escherichia coli* causing urinary tract infection in male infants with and without bacteremia. *Journal of Clinical Microbiology* **44**(3):1156-1158.
- Boyer E, Bergevin I, Malo D, Gros P, Cellier MF.** (2002). Acquisition of Mn(II) in addition to Fe(II) is required for full virulence of *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infection and Immunity* **70**:6032–6042.
- Braun V, Endriß F.** (2007). Energy-coupled outer membrane transport proteins and regulatory proteins. *Biometals* **20**:219-231.
- Braun V, Braun M.** (2002). Iron transport and signaling in *Escherichia coli*. Minireview. *FEBS Letters* **529**:78-85.
- Braun V, Killmann H.** (1999). Bacterial solutions to the iron-supply problem. *TBS* **24**:104-109.
- Braun V.** (1995). Energy-coupled transport and signal transduction through the Gram-negative outer membrane via TonB-ExbB-ExbD-dependent receptor proteins. *FEMS Microbiology Review* **16**:295-305.
- Brumfitt W, Gargan RA, Hamilton-Miller JM.** (1987). Periurethral enterobacterial carriage preceding urinary infection. *Lancet* **1**:824-826.
- Bryant WA, Krabben P, Baganz F, Zhou Y, Ward JM.** (2009). The analysis of multiple genome comparisons in genus *Escherichia* and its application to the discovery of uncharacterised metabolic genes in uropathogenic *Escherichia coli* CFT073. *Comparative and Functional Genomics* **1**:1-8.
- Brzuszkiewicz E, Brüggemann H, Liesegang H, Emmerth M, Ölschläger T, Nagy G, Albermann K, Wagner C, Buchrieser C, Emödy L, Gottschalk G, Hacker J, Dobrindt U.** (2006) How to become a uropathogen: Comparative genomic analysis of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* strains. *PNAS* **103**(34):12879-12884.
- Buchanan SK, Lukacik P, Grizot S, Ghirlando R, Ali MM, Barnard TJ, Jakes KS, Kienker PK, Esser L.** (2007). Structure of colicin I receptor bound to the R-domain of colicin Ia: implications for protein import. *The EMBO Journal* **26**(10):2594-2604
- Buchanan SK, Smith BS, Venkatramani L, Xia D, Esser L, Palnitkar M, Chakraborty R, van der Helm D, Deisenhofer J.** (1999). Crystal structure of the outer membrane active transporter FepA from *Escherichia coli*. *Nat Struct Biol* **6**(1):56-63.
- Burkhard KA, Wilks A.** (2008). Functional characterization of the *Shigella dysenteriae* heme ABC transporter. *Biochemistry* **47**:7977-7979.
- Cescau S, Cwerman H, Létoffé S, Delepelaire P, Wandersman C, Biville F.** (2007). Heme acquisition by hemophores. *Biometals* **20**:603-613.

- Chakraborty R, Storey E, van der Helm D.** (2007). Molecular mechanism of ferricsiderophore passage through the outer membrane receptor proteins of *Escherichia coli*. *Biometals* **20**:263-274.
- Chen SL, Hung CS, Xu J, Reigstad CS, Magrini V, Sabo A, Blasiar D, Bieri T, Meyer RR, Ozersky P, Armstrong JR, Fulton RS, Latreille JP, Spieth J, Hooton TM, Mardis ER, Hultgren SJ, Gordon JL.** (2006). Identification of genes subject to positive selection in uropathogenic strains of *Escherichia coli*: A comparative genomics approach. *PNAS* **103**(15):5977-5982.
- Clarke TE, Tari LW, Vogel HJ.** (2001). Structural biology of bacteria iron uptake systems. *Current Topics in Medicinal Chemistry* **1**:7-30.
- Connell I, Agace W, Klemm P, Schembri M, Marild S, Svanborg C.** (1996). Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **93**:9827-9832.
- Cope LD, Thomas SE, Hrkal Z, Hansen EJ.** (1998). Binding of heme-hemopexin complexes by soluble HxuA protein allows utilization of this complexed heme by *Haemophilus influenzae*. *Infection and Immunity* **66**(9):4511-4516.
- Cornelissen C.** (2003). Transferrin-iron uptake by Gram-negative bacteria. *Front. Biosci.* **8**:836-847.
- Croxen MA, Finlay BB.** (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology* **8**:26-38.
- Dimitri M, Drekonja MD, James R, Johnson MD.** (2008). Urinary tract infections. *Prim Care Clin Office Pract* **35**:345-367.
- Diurez P, Clermont O, Bonacorsi S, Bingen E, Chaventré A, Elion J, Picard B, Denamur E.** (2001). Commensal *Escherichia coli* isolates are phylogenetically distributed among geographically distinct human populations. *Microbiology* **147**:1671-1676.
- Dobrindt U, Agerer F, Michaelis K, Janka A, Buchrieser C, Samuelson M, Svanborg C, Gottschalk G, Karch H, Hacker J.** (2003). Analysis of genome plasticity in pathogenic and commensal *Escherichia coli* isolates by use of DNA arrays. *Journal of Bacteriology* **185**(6):1831-1840.
- Dobrindt U, Blum-Oehler G, Nagy G, Schneider G, Johann A, Gottschalk G, Hacker J.** (2002). Genetic structure and distribution of four pathogenicity islands (PAI I₅₃₆ to PAI IV₅₃₆) of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity* **70**(11):6365-6372.
- Durant L, Metais A, Soulama-Mouze C, Genevard JM, Nassif X, Escaich S.** (2007). Identification of candidates for a subunit vaccine against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **75**(4):1916-1925.
- Emori TG, Gaynes RP.** (1993). An overview of nosocomial infections, including the role of the microbiology laboratory. *Clin. Microbiol. Rev.* **6**:428-442.

- Faraldo-Gómez J, Sansom M.** (2003) Acquisition of siderophores in Gram-negative bacteria. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:105-116.
- Falkow S, Mekalanos J.** (1996). Bacilos entéricos y vibrios. En Davis BD, Dulbecco R, Eisen HN, Ginsberg HS. (eds). Tratado de Microbiología. Masson, 4a edición, p. 548-551.
- Feldmann F, Sorsa LJ, Hildinger K, Schubert S.** (2007). The salmochelin receptor IroN contributes to invasion of urothelial cells by extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* *in vitro*. *Infection and Immunity* **75**(6):3183-3187.
- Ferguson AD, Chakraborty R, Smith BS, Esser L, van der Helm D, Deisenhofer J.** (2002). Structural basis of gating by the outer membrane transporter FecA. *Science* **295**:1715-1719.
- Ferguson AD, Hofmann E, Coulton JW, Diederichs K, Welte W.** (1998). Siderophore-mediated iron transport: Crystal structure of FhuA with bound lipopolysaccharide. *Science* **282**:2215-2220.
- Finer G, Landau D.** (2004). Pathogenesis of urinary tract infections with normal female anatomy. *Lancet Infect Dis* **4**:631-635.
- Foxman B.** (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.* **113**(Suppl. 1A):5S-13S.
- Foxman B, Barlow R, D'Arcy H, Gillespie B, Sobel JD.** (2000). Urinary tract infection: self-reported incidence and associated costs. *Ann Epidemiol* **10**:509-515.
- Foxman B.** (1990). Recurring urinary tract infection: incidence and risk factors. *Am J Public Health* **80**(3):331-333.
- Gerhardt P, Murray R, Wood WA, Krieg N.** (1994). Methods for general and molecular bacteriology. *American Society for Microbiology*. USA.
- Goluszko P, Goluzko E, Nowicki B, Nowicki S, Popov V, Wang QH.** (1997). Development of experimental model of chronic pyelonephritis with *Escherichia coli* O75:K5:H-bearing Dr fimbriae: mutation in the dra region prevented tubulo interstitial nephritis. *J. Clin. Investig.* **99**:1662-1672.
- Gupta K, Hooton TM, Stamm WE.** (2001). Increasing antimicrobial resistance and the management of uncomplicated community-acquired urinary tract infections. *Ann. Intern. Med.* **135**:41-50.
- Gupta K, Hooton TM, Wobbe CL, Stamm WE.** (1999). The prevalence of antimicrobial resistance among uropathogens causing acute uncomplicated cystitis in young women. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**:305-308.
- Guyer DM, Henderson IR, Nataro JP, Mobley HT.** (2000). Identification of Sat, an autotransporter toxin produced by uropathogenic *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology* **38**:53-66.

- Guyer DM, Radulovic S, Jones FE, Mobley HT.** (2002). Sat, the secreted autotransporter toxin of uropathogenic *Escherichia coli*, is vacuolating cytotoxin for bladder and kidney epithelial cells. *Infection and Immunity* **70**:4539-4546.
- Hacker J, Blum-Oehler G, Janke B, Goebel W.** (1999). Pathogenicity island and other mobile virulence elements. En Kaper JB y Hacker J, eds. Washington, ASM Press.
- Hagan EC, Mobley HL.** (2009). Heme acquisition is facilitated by a novel receptor Hma and required by uropathogenic *Escherichia coli* for kidney infection. *Mol Microbiol* **71**(1):79-91.
- Hagan EC, Mobley HL.** (2007). Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infection and Immunity* **75**:3941-3949.
- Hantke K, Nicholson G, Rabsch W, Winkelmann G.** (2003). Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. *PNAS* **100**(7):3677-3682.
- Hantke K.** (1990). Dihydroxybenzoylserine a siderophore for *E. coli*. *FEMS Microbiology Letters* **67**:5-8.
- Hantke K.** (2001). Iron and metal regulation in bacteria. *Current Opinion in Microbiology* **4**:172-177.
- Henderson JP, Crowley JR, Pinkner JS, Walker JN, Tsukayama P, Stamm WE, Hooton TM, Hultgren SJ.** (2009). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens* **5**(2):e1000305.
- Hooton TM.** (2000). Pathogenesis of urinary tract infections: an update. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* **46**:1-7.
- Ibarra-López A.** (2007). Determinación de la capacidad adherente de cepas de *Escherichia coli* aisladas de infecciones del tracto urinario. Tesis de Licenciatura, Facultad de Química. UNAM, México
- James KJ, Hancock MA, Moreau V, Molina F, Coulton JW.** (2008). TonB induces conformational changes in surface-exposed loops of FhuA, outer membrane receptor of *Escherichia coli*. *Protein Science* **17**:1679-1688.
- Johnson JT, Kariyawasam S, Wannemuehler Y, Mangiamele P, Johnson SJ, Doetkott C, Skyberg JA, Lynne AM, Johnson SJ, Nolan LK.** (2007). The genome sequence of avian pathogenic *Escherichia coli* strain O1:K1:H7 shares strong similarities with human extraintestinal pathogenic *E. coli* genomes. *Journal of Bacteriology* **189**(8):3228-3236.
- Johnson JR, Owens K, Gajewski A, Kuskowski MA.** (2005a). Bacterial characteristics in relation to clinical source of *Escherichia coli* isolates from women with acute cystitis or pyelonephritis and uninfected women. *Journal of Clinical Microbiology* **43**(12):6064-6072.

- Johnson JR, Kuskowski MA, Owens K, Soto S, Horcajada JP, Jiménez de Anta MT, Vila J.** (2005b). Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* isolates from patients with cystitis, pyelonephritis, or prostatitis. *J. Infect. Dis.* **191**:46-50.
- Johnson JR, Russo TA, Tarr PI, Carlino U, Bilge SS, Vary JC, Stell AL.** (2000). Molecular epidemiological and phylogenetic associations of two novel putative virulence genes, *iha* and *iroN_{E. coli}*, among *Escherichia coli* isolates from patients with urosepsis. *Infection and Immunity* **68**(5):3040-3047.
- Johnson JR, Orskov I, Orskov F, Goulet P, Picard B, Moseley SL, Roberts PL, Stamm WE.** (1994). O, K, and H antigens predict virulence factors, carboxylesterase B pattern, antimicrobial resistance, and host compromise among *Escherichia coli* strains causing urosepsis. *J. Infect. Dis.* **169**:119–126.
- Johnson JR.** (1991). Virulence factors in *Escherichia coli* urinary tract infection. *Clinical Microbiology Reviews* **4**(1):80-128.
- Kanamaru S, Kurazono H, Ishitoya S, Terai A, Habuchi T, Nakano M, Ogawa O, Yamamoto S.** (2003). Distribution and genetic association of putative uropathogenic virulence factors *iroN*, *iha*, *kps MT*, *ompT* and *usp* in *Escherichia coli* isolated from urinary tract infections in Japan. *Journal of Urology* **170**:2490-2493.
- Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL.** (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology* **2**:123-140.
- Khan AS, Kniep B, Oelschlaeger TA, Van Die I, Korhonen T, Hacker J.** (2000). Receptor structure for F1C fimbriae of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **68**:3541-3547.
- Korhonen TK, Parkkinen J, Hacker J, Finne J, Pere A, Rhen M, Holthofer H.** (1986). Binding *Escherichia coli* S fimbriae to human kidney epithelium. *Infection and Immunity* **54**:322-327.
- Krieg S, Huché F, Diederichs K, Izadi-Pruneyre N, Lecroisey A, Wandersman C, Delepelaire P, Welte W.** (2009). Heme uptake across the outer membrane as revealed by crystal structures of the receptor-hemophore complex. *PNAS* **106**(4):1045-1050.
- Krewulak KD, Vogel HJ.** (2008). Structural biology of bacterial iron uptake. *Biochimica et Biophysica Acta* **1778**:1781-1804.
- Kuhar I, Grabnar M, Zgur-Bertok D.** (1998). Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli* in fecal strains from intestinal infections and healthy individuals. *FEMS Microbial Letters* **164**:243-248.
- Kurazono H, Nakano M, Yamamoto S, Ogawa O, Yuri K, Nakata K, Kimura M, Makino S, Nair GB.** (2003). Distribution of the *usp* gene in uropathogenic *Escherichia coli* isolated from companion animals and correlation with serotypes and size-variations of the pathogenicity island. *Microbiol Immunol* **47**(10):797-802.

- Laemmli UK.** (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**:680-685.
- Lane MC, Lockett V, Monterosso G, Lamphier D, Weinert J, Hebel JR, Johnson D, Mobley HLT.** (2005). Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infection and Immunity* **93**:7644-7656.
- Le Bouguenec C, Archambaud M, Labigne A.** (1992). Rapid and specific detection of the *pap*, *afa*, and *sfa* adhesin-encoding operons in uropathogenic *Escherichia coli* strains by polymerase chain reaction. *Journal of Clinical Microbiology* **30**(5):1189-1193.
- Léveillé S, Caza M, Johnson JR, Clabots C, Sabri M, Dozois CM** (2006). Iha from an *Escherichia coli* urinary tract infection outbreak clonal group A strain is expressed *in vivo* in the mouse urinary tract and functions as a catecholate siderophore receptor. *Infection and Immunity* **74**:3427-3436.
- Levina N, Totemeyer S, Stokes NR, Louis P, Jones MA, Booth IR.** (1999). Protection of *Escherichia coli* cells against extreme turgor by activation of MscS and MscL mechanosensitive channels: identification of genes required for MscS activity. *The EMBO Journal* **18**(7):1730-1737.
- Litwin CM, Calderwood SB.** (1993). Role of iron regulation of virulence genes. *Clinical Microbiology Reviews* **6**(2):137-149.
- Lloyd AL, Henderson TA, Vigil PD, Mobley HL.** (2009). Genomic islands of uropathogenic *Escherichia coli* contribute to virulence. *Journal of Bacteriology* **191**(11):3469-3481.
- Lloyd AL, Rasko DA, Mobley HL.** (2007). Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* **189**(9):3532-3546.
- Marrs CF, Zhang L, Foxman B.** (2005). *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: Are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes? *FEMS Microbiology Letters* **252**:183-190.
- Marrs CF, Zhang L, Tallman P, Manning SD, Somsel P, Raz P, Colodner R, Jantunen ME, Siitonen A, Saxen H, Foxman B.** (2002). Variations in 10 putative uropathogen virulence genes among urinary, faecal and peri-urethral *Escherichia coli*. *J Med Microbiol* **51**(2):138-142.
- Miethke M, Marahiel MA.** (2007). Siderophore-based iron acquisition and pathogen control. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* **71**(3):413-451.
- Miller, J.H.** (1972). *Experiments in molecular genetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, USA.
- Molloy MP, Herbert BR, Slade MB, Rabilloud T, Nouwens AS, Williams KL, Gooley AA.** (2000). Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *European Journal Biochemistry* **267**:2871-2881.

- Moreno E, Johnson JR, Pérez T, Prats G, Kuskowski MA, Andreu A.** (2009). Structure and urovirulence characteristics of the fecal *Escherichia coli* population among healthy women. *Microbes and Infection* **11**:274-280.
- Moreno E, Andreu A, Pigrau C, Kuskowski MA, Johnson JR, Prats G.** (2008). Relationship between *Escherichia coli* strains causing acute cystitis in women and the fecal *E. coli* population of the host. *Journal of Clinical Microbiology* **46**(8):2529-2534.
- Morschhauser J, Vetter V, Korhonen T, Uhlin BE, Hacker J.** (1993). Regulation and binding properties of S fimbriae cloned from *E. coli* strains causing urinary tract infection and meningitis. *Zentralbl Bakteriologie* **278**:165-176.
- Mulvey MA.** (2002). Microreview. Adhesion and entry of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular Microbiology* **4**:193.1-193.15
- Mysorekar IU, Hultgren SJ.** (2006). Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *PNAS* **103**:14170-14175.
- Nataro JP, Kaper JB.** (1998). Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin. Microbiol. Rev.* **11**:142-201.
- Nègre VL, Bonacorsi S, Schubert S, Bidet P, Nassif X, Bingen E.** (2004). The siderophore receptor IroN, but not the high-pathogenicity island or the hemin receptor ChuA, contributes to the bacteremic step of *Escherichia coli* neonatal meningitidis. *Infection and Immunity* **72**(2):1216-1220.
- Neidhardt FC, Curtiss RI, Ingraham JL, Lin ECC, Low KB, Magasanik B, Reznikoff WS, Riley M, Schaechter M, Umberger HE.** eds. (1996). *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*: Cellular and molecular biology. En: Earhart CF. Uptake and metabolism of iron and molybdenum. Washington, DC: Am. Soc. Microbiol. p. 1075-1102.
- Nikaido H, Rosenberg EY.** (1990). Cir and Fiu Proteins in the outer membrane of *Escherichia coli* catalyze transport of monomeric catechols: Study with β -Lactam antibiotics containing catechol and analogous groups. *Journal of Bacteriology* **172**(3):1361-1367.
- Obata YM, Ba-Thein W, Tsukamoto T, Yoshikawa H, Hayashi H.** (2002). Vaginal *Escherichia coli* share common virulence factor profiles, serotypes and phylogeny with other extraintestinal *E. coli*. *Microbiology* **148**:2745-2752.
- Ochsner UA, Vasil ML.** (1996). Gene repression by the ferric uptake regulator in *Pseudomonas aeruginosa*: cycle selection of iron-regulated genes. *Proc Natl Acad Sci USA* **93**:4409-4414.
- Okeke IN, Scaletsky ICA, Soars EH, Macfarlane LR, Torres AG.** (2004). Molecular epidemiology of the iron utilization genes of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Journal of Clinical Microbiology* **42**:36-44.

- Ons E, Bleyen N, Tuntufye HN, Vandemaele F, Goddeeris BM.** (2007). High prevalence iron receptor genes of avian pathogenic *Escherichia coli*. *Avian Pathology* **36**:411-414.
- Orskov F, Orskov I.** (1975). *Escherichia coli* O:H serotypes isolated from human blood. *APMIS* **83B**:565-600.
- Ouyang Z, Isaacson R.** (2006). Identification and characterization of a novel ABC iron transport system, fit, in *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **74**(12):6949-6956.
- Parreira VR, Giles CL.** (2003). A novel pathogenicity island integrated adjacent to the *thrW* tRNA gene of avian pathogenic *Escherichia coli* encodes a vacuolating autotransporter toxin. *Infection and Immunity* **71**:5087-5096.
- Piatti G, Mannini A, Balistreri M, Schito AM.** (2008). Virulence factors in urinary *Escherichia coli* strains: Phylogenetic background and quinolone and fluoroquinolone resistance. *Journal of Clinical Microbiology* **46**(2):480-487.
- Picard B, García JS, Gouriou S, Duriez P, Brahimi N, Bingen E, Elion J, Denamur E.** (1999). The link between phylogeny and virulence in *Escherichia coli* extraintestinal infection. *Infection and Immunity* **67**:546-553.
- Postle K, Kadner RJ.** (2003). Touch and go: tying TonB to transport. Microreview. *Molecular Microbiology* **49**(4):869-882.
- Rama G, China DK, China RS, Sharma S.** (2005). Urinary tract infections microbial virulence determinants and reactive oxygen species. *Comparative Immunology Microbiology & Infections Diseases* **28**:339-349.
- Ramos Jiménez J.** (2008). Infecciones del tracto urinario. En: *Infectología clínica. Manual Moderno*. México, p. 147-156.
- Ratledge C, Dover LG.** (2000). Iron metabolism in pathogenic bacteria. *Annu Rev Microbiol* **54**:881-941.
- Reigstad CS, Hultgren SJ, Gordon JI.** (2007). Functional genomic studies of uropathogenic *Escherichia coli* and host urothelial cells when intracellular bacterial communities are assembled. *Journal of Biological Chemistry* **282**(29):21259-21267.
- Reyes RE, Manjarrez HA, Drago ME.** (2005) El hierro y la virulencia bacteriana. *Enfermedades Infecciosas y Microbiología* **25**(3):104-107.
- Rippere-Lampe KE, O'Brien AD, Conran R, Lockman HA.** (2001). Mutation of the gene encoding cytotoxic necrotizing factor type 1 (*cnf1*) attenuates the virulence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **69**:3954-3964.

- Roberts JA, Marklund BI, Ilver D, Haslam D, Kaack MB, Baskin G, Louis M, Mollby R, Winberg J, Normark S.** (1994). The Gal(alpha 1-4)Gal-specific tip adhesin of *Escherichia coli* P-fimbriae is hended for pyelonephritis to occur in the normal urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91**:11889-11893.
- Rodríguez-Siek K, Giddings W, Doetkott C, Johnson T, Fakhr M, Nolan L.** (2005). Comparison of *Escherichia coli* isolates implicated in human urinary tract infection an avian colibacillosis. *Microbiology* **151**:2097-2110.
- Roos V, Klett GC, Schembri MA, Klemm P.** (2006). The asymptomatic bacteriuria *Escherichia coli* strain 83972 outcompetes uropathogenic *E. coli* strains in human urine. *Infection and Immunity* **74**(1):615-624.
- Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Oison R, Wilding GE.** (2003). The siderophore receptor IroN of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a potential vaccine candidate. *Infection and Immunity* **71**(12):7164-7169.
- Russo TA, McFadden CD, Carlino-MacDonald UB, Beanan JM, Barnard TJ, Johnson JR.** (2002). IroN functions as a siderophore receptor and is a urovirulence factor in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **70**(12):7156-7160.
- Russo TA, Carlino UB, Johnson JR.** (2001). Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **69**(10):6209-6216.
- Russo TA, Johnson JR.** (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *Jouranal Infection Disease* **181**:1753-1754.
- Russo TA, Carlino UB, MongA, Jodush ST.** (1999). Identification of genes in an extraintestinal isolate of *Escherichia coli* with increased expression after exposure to human urine. *Infection and Immunity* **10**:5306-5314.
- Sahm DF, Thornsberry C, Mayfield DC, Jones ME, Karlowsky.** (2001). Multidrug-resistant urinary tract isolates of *Escherichia coli*: prevalence and patient demographics in the United States in 2000. *Antimicrob Agents Chemother.* **45**:1402-1406.
- Schaible UE, Kaufmann SH.** (2004). Iron and microbial infection. *Nature* **2**:946-953.
- Schalk IJ, Yue WW, Buchanan SK.** (2004). Recognition of iron-free siderophores by TonB-dependent iron transporters. *Molecular Microbiology* **54**(1):14-22.
- Sen TZ, Kloster M, Jernigan RL, Kolinski A, Bujnicki JM, Kloczkowski A.** (2008). Predicting the complex structure and functional motions of the outer membrane transporter and signal transducer FecA. *Biophysical Journal* **94**:2482-2491.

- Shand GH, Anwar H, Kadurugamuwa J, Brown MR, S. H. Silverman, and J. Melling.** (1985). *In vivo* evidence that bacteria in urinary tract infection grow under iron-restricted conditions. *Infection and Immunity*. **4**:835-839.
- Snyder JA, Haugen BJ, Buckles EL, Lokatell CV, Johnson DE, Donnenberg MS, Welch RA, Mobley HLT.** (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infection and Immunity* **72**(11):6373-6381.
- Sobieszczkańska BM.** (2008). Distribution of genes encoding iron uptake systems among enteroaggregative *Escherichia coli* strains isolated from adults with irritable bowel syndrome. *Clinical Microbiology and Infection* **14**(11):1065-1086.
- Sorsa L, Dufke S, Schuber S.** (2004). Identification of novel virulence-associated loci in uropathogenic *Escherichia coli* by suppression subtractive hybridization. *FEMS Microbiology Letters* **230**:203-208.
- Stamm WE, Hooton TM, Johnson JR, Johnson C, Stapleton A, Roberts PL, Moseley SL, Fihn SD.** (1989). Urinary tract infections: from pathogenesis to treatment. *J. Infect. Dis.* **159**:400-405.
- Sussman M, Gally D.** (1999). The biology of cystitis: host and bacterial factors. *Ann Rev Med* **50**:149-158.
- Tabibian JH, Gornbein J, Heidari A, dien SL, Lau VH, Chahal P, Churchill BM, Haake DA.** (2008). Uropathogens and host characteristics. *Journal of Clinical microbiology*. **46**:3980-3986.
- Thulasiraman P, Newton SM, Xu J, Raymond KN, Mai C, Hall A, Montague MA, Klebba PE.** (1998). Selectivity of ferric enterobactin binding and cooperativity of transport in Gram-negative bacteria. *Journal of Bacteriology* **180**(24):6689-6696.
- Torres AG, Redford P, Welch RA, Payne SM.** (2001). TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: Aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity* **69**(10):6179-6185.
- Torres AG, Payne SM.** (1997). Haem iron-transport system in enterohaemorrhagic *Escherichia coli* O157:H7. *Molecular Microbiology* **23**(4):825-833.
- Vagrati MA.** (2009). Siderophore production by uropathogenic *Escherichia coli*. *Indian Journal of Pathology and Microbiology* **52**(1):126-127.
- Valdebenito M, Bister B, Reissbrodt R, Hantke K, Winkelmann G.** (2005). The detection of salmochelin and yersiniabactin in uropathogenic *Escherichia coli* strains by a novel hydrolysis-fluorescence-detection (HFD) method. *International Journal of Medical Microbiology* **295**:99-107.
- Van der Helm D.** (1998). The physical chemistry of bacterial outer-membrane siderophore receptor proteins. *Met Ions Biol Syst.* **35**:355-401.

- Velayudhan J, Hughes NJ, McColm AA, Bagshaw J, Clayton CL, Andrews SC, Kelly DJ.** (2000). Iron acquisition and virulence in *Helicobacter pylori*: a major role for FeoB, a high-affinity ferrous iron transporter. *Molecular Microbiology* **37**:274–86.
- Wandersman C, Delepelaire P.** (2004). Bacterial iron source: from siderophores to hemophores. *Annu.Rev.Microbiol.* **58**:611-647.
- Wandersman C, Stojiljkovic I.** (2000). Bacterial heme source: the role of heme, hemoprotein receptors and hemophores. *Current Opinion in Microbiology* **3**:215-220.
- Warren JW,** editor (1996) Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management. ASM Press. Washington, D.C.
- Weinberg ED.** (1997) The Lactobacilli anomaly: total iron abstinence. *Perspect. Biol. Med.* **40**:1-6.
- Welch RA, Burland V, Plunkett III, Redford P, Roesch P, Rasko D, Bucles EL, Liou SR, Boutin A, Hackett J, Stroud D, Mayhew GF, Rose DJ, Zhou S, Schwartz DC, Perna NT, Mobley HLT, Donnenberg MS, Blattner FR.** (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *PNAS* **99**(26):17020-17024.
- Welch RA, Dellinger EP, Minshew B, Falkow S.** (1981). Haemolysin contributes to virulence of extra-intestinal *E. coli* infections. *Nature* **294**:665-667.
- Welz D, Braun V.** (1998). Ferric citrate transport of *Escherichia coli*: Functional regions of the FecR transmembrane regulatory protein. *Journal of Bacteriology* **180**(9):2387-2394.
- Wieser A, Romann E, Magistro G, Hoffmann C, Nörenberg D, Weinert K, Schubert S.** (2010). A multi-epitope subunit vaccine conveys protection against extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* in mice. *Infection and Immunity* May 24. 1-52.
- Wiles TJ, Kulesus R, Mulvey, MA.** (2008). Origins and virulence mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli*. *Experimental and Molecular Pathology* **85**:11-19.
- Zhang L, Foxman B.** (2003). Molecular epidemiology of *Escherichia coli* mediated urinary tract infections. *Front. Biosci.* **1**(8):e235-244.
- Zhang L, Foxman B, Marrs C.** (2002). Both urinary and rectal *Escherichia coli* isolates are dominated by strains of phylogenetic group B2. *Journal of Clinical Microbiology* **40**(11):3951-3955.
- Zhang L, Foxman B, Manning SD, Tallman P, Marrs CF.** (2000). Molecular epidemiologic approaches to urinary tract infection gene discovery in uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and Immunity* **68**(4):2009-2015.

13. APÉNDICE

A) Medios de Cultivo

Luria-Bertani (LB) Broth Luria:

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

Medio para congelar bacterias

Glicerol	60 %
Luria-Bertani	40 ml

Gelosa Especial (conservación de cepas)

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

Agar Mac Conkey

Peptona de caseína	1.5 g
Peptona de gelatina	7 g
Peptona de carne	1.5 g
Lactosa	10 g
Sales biliares	1.5 g
Cloruro de sodio	5 g
Agar	13.5 g
Rojo neutro	0.03 g
Cristal violeta	0.001g
Agua destilada c.b.p.	1 L
pH = 7.1	

Medio Mueller-Hinton

Infusión deshidratada de carne de res	2.0 g
Peptona de caseína ácida	17.5 g
Almidón	1.5 g
Agar	17.0 g
Agua destilada c.b.p.	1 L
pH = 7.3	

Medio Mínimo M9

K ₂ HPO ₄	10.5 g
KH ₂ PO ₄	4.5 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	1 g
Citrato de sodio	0.50 g
Agua destilada c.b.p.	1 L

El medio mínimo M9 se suplementó con; 0.006 % de triptona, 10.0 mL de glucosa al 20%, previamente esterilizada por filtración, y con 1.0 mL de MgSO₄•7H₂O 1.0 M, esterilizado en autoclave.

Electroforesis en Gel de Poliacrilamida en Duodecil Sulfato de Sodio (SDS-PAGE).

Gel separador

Sustancia	8%	10%
Acrilamida	2 ml	2.5 ml
Buffer 3.0 M Tris - HCl pH 8.8	935 µl	935 µl
SDS 10%	75 µl	75 µl
Persulfato de amonio 1.5%	375 µl	375 µl
H ₂ O desionizada	4.36 ml	3.61 ml
TEMED	4 µl	4 µl

Gel concentrador

Sustancia	Volumen
Acrilamida	650 µl
Buffer 0.5 M Tris - HCl pH 6.8	1250 µl
SDS 10%	50 µl
Persulfato de amonio 1.5%	250 µl
H ₂ O desionizada	2.82 ml
TEMED	4 µl

Solución amortiguadora de corrida

Tris	0.025 M
Glicina	0.192 M
SDS	0.1 M
H ₂ O desionizada	1000 mL

Solución de Laemmli

SDS	2%
β-mercaptoetanol	5%
Glicerol	10%
Tris-HCl	0.063M
pH = 6.8	

Azul de Comassie

Azul brillante, R-250	0.1%
Metanol	30%
Ácido acético	10%

Composición de reactivos

TAE 10X (Solución Reguladora de Electroforesis para DNA):

Tris-base	48.4 g
Ácido acético glacial	11.42 ml
EDTA 0.5M	20 ml
Agua destilada c.b.p.	1 L
pH = 8.0	

HEPES 10mM-sarcosyl 1%

H ₂ O	445 μL
HEPES 100mM	50 μL
Sarcosyl	5 μL

Amortiguador de carga 10X:

Ficoll 400	20 %
EDTA	0.10 M
SDS	1 %
Azul bromofenol de	0.25 %

Buffer de carga 6X

Sacarosa	40%
Azul de bromofenol	0.25 %