



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO  
POSGRADO EN CIENCIAS BIOMÉDICAS  
INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR  
HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO “FEDERICO GÓMEZ”**

**Generación de una proteína quimérica de *Escherichia coli* uropatogénica para la  
detección de anticuerpos en sueros de pacientes pediátricos con infecciones del tracto  
urinario**

**T E S I S**

**QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE  
DOCTOR EN CIENCIAS BIOMÉDICAS**

**PRESENTA:  
VICTOR MANUEL LUNA PINEDA**

**DIRECTOR DE TESIS:  
DR. JUAN XICOHTENCATL CORTES  
(INSTITUTO DE FISIOLÓGÍA CELULAR, UNAM)**

**MIEMBROS DEL COMITÉ TUTOR:  
DRA. LETICIA MORENO FIERROS  
(UBIMED FES-IZTACALA, UNAM)  
DR. JUAN PABLO REYES GRAJEDA  
(FACULTAD DE MEDICINA, UNAM)**

**Ciudad Universitaria, Ciudad de México, abril de 2018**



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.



HOSPITAL INFANTIL *de* MÉXICO  
FEDERICO GÓMEZ  
Instituto Nacional de Salud

## LUGAR DE REALIZACIÓN

El presente trabajo se realizó en el Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”.

## FINANCIAMIENTOS Y APOYOS ECONÓMICOS

Este trabajo fue financiado por Fondos Federales del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” con los números de registros: HIM/2016/027 y HIM/2017/02.



Agradecimiento especial al CONACYT por otorgarme la beca con número de registro 261764 y al Posgrado en Ciencias Biomédicas de la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM) con número de cuenta 514015349.



## Índice de abreviaturas

ITU:	Infecciones del tracto urinario
UPEC:	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica
<i>fc</i> :	Fusión génica <i>fimH-csgA</i>
<i>fcp</i> :	Fusión génica <i>fimH-csgA-papG</i>
FC:	Fusión proteica FimH-CsgA
FCP	Fusión proteica FimH-CsgA-PapG
MHCII:	Complejo principal de histocompatibilidad clase II
pg:	Picogramos
mL:	Mililitros
µL:	Microlitros
TU:	Tracto urinario
LPS:	Lipopolisacárido
CBI:	Comunidades bacterianas intracelulares
CPA:	Célula presentadora del antígeno
Cdc:	Control de división celular
RAB:	Proteína relacionada a Ras
TLR:	Receptor tipo “Toll”
AMPc	Adenosina monofosfato cíclico
MDR:	Multidrogorresistente
XDR:	Extremodrogorresistente
BLEE:	Beta lactamasas de espectro extendido
TRPML3:	Canal 3 tipo mucolínico TRP
PI-3:	Fosfoinositol-3-P
IN:	Intranasal
NLRP3:	Proteína 3 que contienen dominios NACHT, LRR y PYD del inflamosoma
Daf:	Factor que acelera el decaimiento
HlyA:	α-hemolisina
CNF-1:	Factor necrotizante citotóxico
PAMP:	Patrones moleculares asociados a patógenos
PRR:	Receptor de reconocimiento de patrones
cITU:	Infecciones del tracto urinario complicadas
ADN:	Ácido desoxirribonucleico
ARN:	Ácido ribonucleico
PCR:	Reacción en cadena de la polimerasa
<i>iutD</i> :	Receptor de hierro de aerobactina
<i>fyuA</i> :	Receptor de hierro de yersinobactina
TosA:	Proteína de secreción tipo 1 A
FliC:	Subunidad estructural del flagelo (flagelina)
<i>motB</i> :	Gen asociado a movilidad
ATCC:	American Type Culture Collection
EMEM:	Medio mínimo esencial de “Eagle”
YESCA:	Extracto de levadura y casaminoácidos
SFB:	Suero fetal bovino
MOI:	Número de bacterias por célula
UFC:	Unidades formadoras de colonias

MET: Microscopía electrónica de transmisión  
BLAST: Alineamiento de secuencias de tipo local  
Ni-NTA: Niquel-ácido nitrilotriacético  
SDS-PAGE: Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes con SDS  
HRP: Fosfatasa alcalina de caballo  
DLS: Dispersión dinámica de la luz  
SAXS: Difracción de rayos X de ángulo bajo  
Å: Armstrong

## Contenido

<b>Resumen</b> .....	9
<b>Abstract</b> .....	10
<b>Introducción</b> .....	12
<b>Infecciones del tracto urinario: <i>Escherichia coli</i> uropatogénica</b> .....	12
<b>Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de UPEC en el tracto urinario.</b> .....	14
<b>Cepas clínicas de UPEC multidrogoresistentes (MDR) y extremodrogoresistentes (XDR)</b> 16	
<b>Vacunación</b> .....	17
<b>Adhesinas fimbriales y respuesta inmune</b> .....	18
<b>Inmunogenicidad de FimH</b> .....	19
<b>Inmunogenicidad de la proteína CsgA</b> .....	20
<b>Inmunogenicidad de PapG</b> .....	20
<b>Proteínas de fusión multiméricas</b> .....	21
<b>Planteamiento del problema</b> .....	22
<b>Justificación e hipótesis</b> .....	23
<b>Objetivo general</b> .....	24
<b>Objetivos particulares</b> .....	24
<b>Materiales y métodos</b> .....	25
<b>Aislamiento e identificación de cepas clínicas de UPEC</b> .....	25
<b>Susceptibilidad antibiótica de las cepas clínicas de UPEC</b> .....	25
<b>Identificación de los grupos filogenéticos de las cepas clínicas de UPEC</b> .....	26
<b>Determinación de genes de virulencia en cepas clínicas de UPEC</b> .....	26
<b>Generación de cepas mutante y complementación en <i>trans</i></b> .....	27
<b>Tabla 1: Lista de iniciadores usados en este estudio.</b> .....	28
<b>Herramientas bioinformáticas para el diseño de las proteínas de fusión</b> .....	31
<b>Síntesis del gen plantilla y clonación de los genes de fusión</b> .....	32
<b>Expresión y purificación de las proteínas de fusión</b> .....	33
<b>Caracterización de las proteínas de fusión</b> .....	34
<b>Determinación de la bioactividad en las proteínas de fusión</b> .....	35
<b>Identificación de anticuerpos en suero y orina contra las proteínas de fusión</b> .....	35
<b>Generación de anticuerpos policlonales en conejo</b> .....	36

Ensayos de inhibición de la adherencia con anticuerpos policlonales .....	37
Plan de análisis de datos .....	37
<b>Resultados y discusión .....</b>	<b>38</b>
Las adhesinas fimbriales son ampliamente distribuidas en cepas clínicas UPEC.....	38
<b>Figura 2. Distribución de los principales genes de virulencia en cepas clínicas de UPEC.</b> .....	39
<b>Figura 3. Asociación entre los grupos filogenéticos y los principales genes de virulencia de cepas clínicas de UPEC.</b> .....	40
<b>La fimbria curli de UPEC participa en la adherencia a células de vejiga .....</b>	<b>40</b>
<b>Figura 4. Evaluación genotípica y fenotípica de UPEC.</b> .....	42
<b>Figura 5. Ensayo de adherencia a células de vejiga HTB-5.</b> .....	43
<b>Figura 6. Adherencia bacteriana a células de vejiga HTB-5.</b> .....	44
<b>La participación de curli de UPEC en la colonización <i>in vivo</i>.....</b>	<b>45</b>
<b>Figura 7. Evaluación <i>in vivo</i> de la adherencia de UPEC a vejiga.</b> .....	45
<b>Figura 8. Evaluación <i>in vivo</i> de la adherencia de UPEC a riñón.</b> .....	46
<b>Las adhesinas FimH, CsgA y PapG son fusionadas <i>in silico</i> con el péptido EAAAK .....</b>	<b>47</b>
<b>Figura 9. Diseño y estrategia de clonación para la generación de las proteínas de fusión.</b> .....	49
<b>Viabilidad de las proteínas de fusión FC y FCP.....</b>	<b>49</b>
<b>Tabla 2: Predicción de epítomos de células B y péptidos que unen MHC clase II de las proteínas de fusión.</b> .....	50
<b>Tabla 3: Parámetros para el modelado 3D, refinamiento y validación de las proteínas de fusión.</b> .....	51
<b>Figura 11. Predicción de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de fusión.</b>	52
<b>Clonación, transformación y purificación de las proteínas de fusión.....</b>	<b>53</b>
<b>Figura 12. Generación de las proteínas de fusión.</b> .....	54
<b>Tabla 4. Análisis de los parámetros fisicoquímicos de las proteínas</b> .....	55
<b>Tabla 5. Caracterización de las proteínas de fusión por DLS</b> .....	55
<b>Actividad biológica de las proteínas de fusión.....</b>	<b>56</b>
<b>Figura 13. Expresión de TLR2 y TLR4 en las células de vejiga HTB-5.</b> .....	57
<b>Figura 14. Proteínas de fusión activan la liberación de IL-6.</b> .....	58
<b>Figura 15. Proteína de fusión activan la liberación de IL-8.</b> .....	59
<b>Proteínas de fusión reaccionan contra sueros y orina de pacientes pediátricos .....</b>	<b>59</b>



<b>Figura 16. Detección de anticuerpos IgG e IgA en el suero de pacientes con ITU.</b> .....	60
<b>Figura 17. Detección de anticuerpos IgG e IgA en la orina de pacientes con ITU.</b> .....	61
<b>Inhibición de la adherencia de UPEC a células de vejiga</b> .....	61
<b>Figura 18. Reducción de la adherencia bacteriana por la presencia de anticuerpos policlonales.</b> .....	62
<b>Conclusiones</b> .....	63
<b>Perspectivas</b> .....	64
<b>Referencias</b> .....	65
<b>Publicaciones</b> .....	72
<b>Registro de patente</b> .....	75
<b>Artículos en preparación</b> .....	77

## Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) están asociadas a altas tasas de morbilidad en todo el mundo y *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC) es el principal agente etiológico. La aparición de cepas clínicas de UPEC multirresistentes motivó el desarrollo de una proteína de fusión funcional para su utilización como una vacuna viable contra las ITU. La base principal para la generación de proteínas de fusión fue la amplia distribución de las fimbrias tipo 1, P y curli de UPEC asociadas a la colonización al tracto urinario, formación de biopelículas y modulación de la respuesta inmune. Las adhesinas PapG, CsgA y FimH de las fimbrias antes mencionadas fueron fusionadas con la secuencia EAAAK con el siguiente orden: *fimH-csgA-papG-fimH-csgA*. Esta plantilla permitió la clonación de los diferentes genes diméricos y triméricos para su posterior expresión y purificación a partir de cultivos de la cepa de *E. coli* BL21 (DE3). Los genes de fusión *fc* (*fimH-csgA*) y *fcp* (*fimH-csgA-papG*) mostraron una alta estabilidad como moléculas de fusión. Así mismo, el análisis bioinformático realizado en las proteínas de fusión FC (FimH-CsgA) y FCP (FimH-CsgA-PapG) mostró una adecuada estabilidad estructural con los epítomos expuestos y con péptidos de unión al complejo principal de histocompatibilidad clase II (MHCII). Estas proteínas de fusión generadas fueron funcionales al ser evaluada en cultivo celular su capacidad de activar la liberación de IL-6 de 464.79 pg/mL para la proteína FC y de 521.24 pg/mL para la proteína FCP. La liberación de IL-8 mostró un valor de 398.52 pg/mL para la proteína FC y de 450.40 pg/mL para la proteína FCP. Las proteínas de fusión también reaccionaron con sueros y orinas de pacientes con ITU; pero la proteína FC fue la molécula de mayor capacidad antigénica para interactuar con los anticuerpos IgA con una DO<sub>450</sub> de 2.216 y de IgG con una DO<sub>450</sub> de 0.837. La identificación de anticuerpos en las orinas mostró valores de 0.950

de DO<sub>450</sub> contra IgA y de 0.444 contra IgG. La adherencia de la cepa CFT073 a células de vejiga fue reducida hasta el 73% con anticuerpos anti-FC y del 46% con anti-FCP. Estos datos sugieren que estas proteínas de fusión tienen una capacidad protectora. En conclusión, las proteínas FC y FCP fueron las biomoléculas de mayor funcionalidad por su capacidad para liberar citocinas y por su alta expresión *in vivo* de acuerdo a los anticuerpos presentes en muestras de orina y suero de pacientes con ITU. Estas proteínas de fusión pueden ser consideradas viables para el diseño de una vacuna contra las ITU por su capacidad de protección contra la adherencia de UPEC a células de vejiga.

## **Abstract**

In the worldwide, urinary tract infections (UTI) are related to morbidity rates and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main etiological agent. The generation of a fusion protein as a viable vaccine against UTI has been proposed in this study due the high prevalence of multi-resistant UPEC clinical strains. Fusion proteins were generated considered the wide distribution of the type 1 fimbria, P, and curli. These fimbriae have been associated to colonization of UPEC to the urinary tract, biofilm formation, and modulation of the immune response. The adhesin PapG of P fimbria, CsgA of curli fimbria, and FimH of type 1 fimbria were linked with the EAAAK short sequence until generated the gene template with the followed order: *fimH-csgA-papG-fimH-csgA*. The dimeric and trimeric genes were cloned from fusion gene, expressed and purified of the BL21 *E. coli* (DE3). The *fc* and *fcp* genes showed the highest stability and viability as fusion molecules. In addition, FC and FCP proteins showed a structural stability with exposed epitopes and with MHCII binding peptides accord to bioinformatic analysis. The fusion proteins stimulated the release

of IL-6, 464.79 pg/mL for FC and 521.24 pg/mL for FCP. These proteins also stimulated the release of IL-8, 98.52 pg/mL for FC and 450.40 pg/mL FCP. On the other, the fusion proteins reacted with sera and urine from patients with UTI. In sera, FC protein reacted with IgA antibodies with an OD<sub>450</sub> of 2.216 and IgG with an OD<sub>450</sub> of 0.837. In urine, FC protein reacted IgA antibodies with an OD<sub>450</sub> of 0.950 and IgG with an OD<sub>450</sub> of 0.444. The adherence of UPEC strain CFT073 to the bladder cell showed a significant reduction of 73% when the bacteria were incubated with anti-FC and 46% incubated with anti-FCP antibodies. These data suggest that these fusion proteins had a protective capacity. In conclusion, the FC and FCP proteins were highly stable, demonstrated antigenic properties, and induced cytokine release (IL-6 and IL-8); furthermore, antibodies generated against these proteins showed protection against bacterial adhesion.

## Introducción

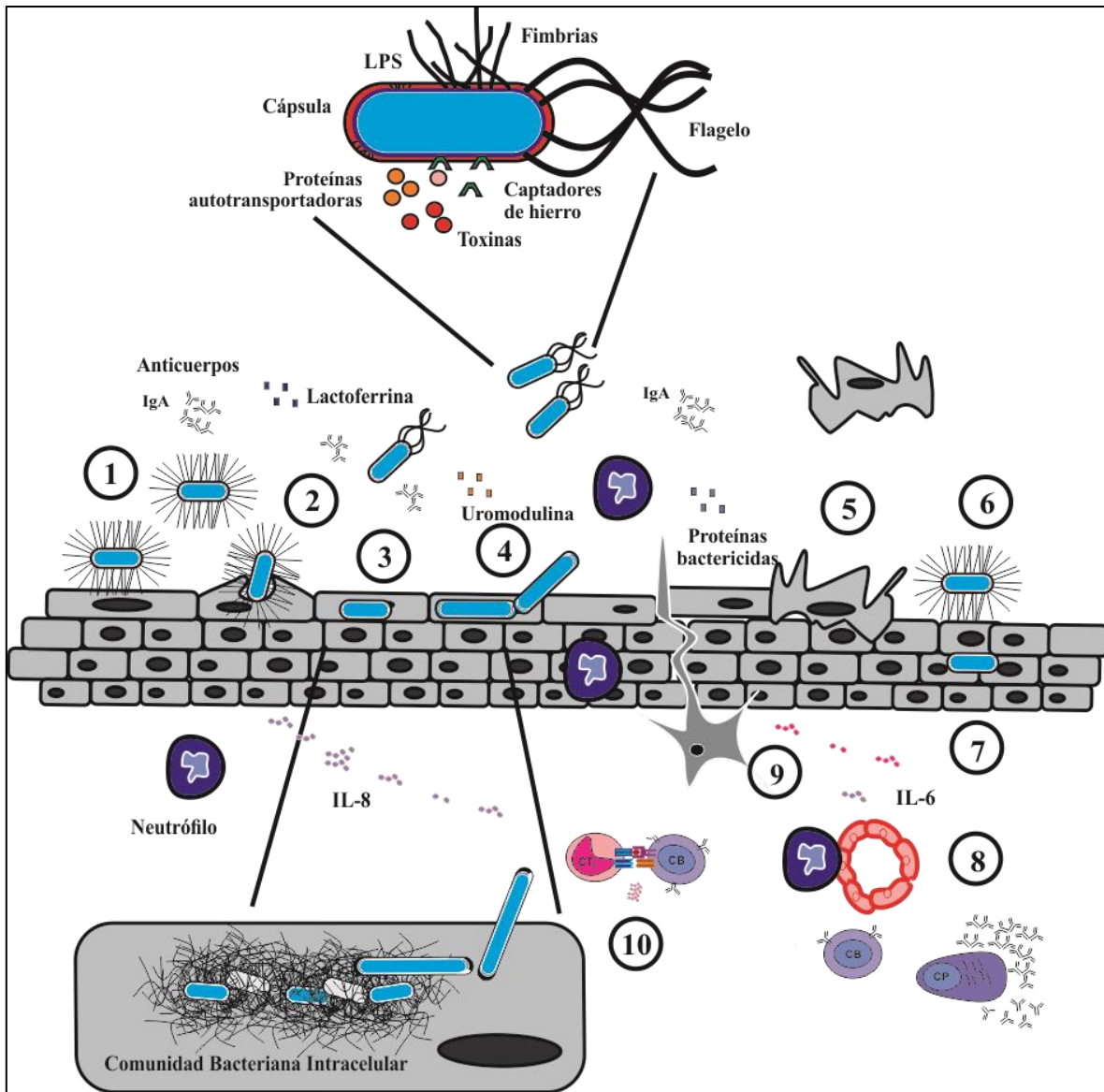
### Infecciones del tracto urinario: *Escherichia coli* uropatogénica

Las ITU son causadas principalmente por patógenos de origen intestinal que contaminan la uretra y ascienden a la vejiga<sup>1</sup>. Las ITU pueden ser adquiridas en la comunidad y en los hospitales; las cuales, están asociadas con elevadas tasas de morbilidad a nivel mundial<sup>2</sup>. Estas ITU son clasificadas de acuerdo al sitio de infección: orina (bacteriuria asintomática), vejiga (cistitis), riñón (pielonefritis) y sangre (bacteriemia)<sup>3</sup>. Las ITU también son caracterizadas con signos y síntomas generales, tales como: hematuria, piuria, disuria, frecuencia urinaria, urgencia, fiebre, dolor en la espalda baja y suprapúbico<sup>4</sup>.

En México, se han registrado más de 4 millones de casos de ITU anualmente causando un problema serio de salud pública por su alta morbilidad<sup>5</sup>. Las poblaciones con alto riesgo de contraer ITU, son: recién nacidos, niñas en edad preescolar, mujeres con actividad sexual y ambos sexos en edad avanzada<sup>1,2</sup>. Las ITU en edad reproductiva representan la segunda causa de morbilidad en mujeres y es la causa más frecuente de complicaciones perinatales en mujeres embarazadas<sup>6</sup>. Recientemente, 3,149,091 de casos de ITU se reportaron en mujeres de todas las edades y 1,392,235 en mujeres entre 20 y 44 años de edad<sup>6</sup>. Mientras, las ITU son la tercera causa de morbilidad con 957,875 casos por año en el sexo masculino; la cual, su distribución ha sido asociada con la edad, observando una disminución de estas infecciones en adultos mayores de 44 años<sup>6</sup>. Las ITU en la pubertad (15 a 19 años) son la tercera causa de morbilidad con 297,831 casos y en pediátricos (<15 años) con 360,220 casos<sup>6</sup>. La prevalencia de ITU en niños menores de 1 año es de 20,300 casos por año; adicionalmente, la frecuencia de estas infecciones es de 0.4-1.0% en niñas, 0.1% en niños circuncidados y 0.7% en niños no circuncidados<sup>6,7</sup>.

*Escherichia coli* uropatogénica (UPEC, por sus siglas en inglés) es el agente etiológico con más del 80% de las ITU; sin embargo, las infecciones por catéter en los hospitales, se han asociado también con *Staphylococcus*, *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Proteus* y *Enterococcus*<sup>8</sup>. La secuenciación completa de los genomas de las cepas clínicas de UPEC F11, IAI39, UMN026, UTI89, 536, CFT073, ABU 83972 y VR50 han mostrado que la adquisición de factores de virulencia ocurre en islas de patogenicidad, plásmidos y fagos a través de la transferencia horizontal de genes<sup>9</sup>. Existen factores de virulencia que son secretados y algunos de ellos son exportados para anclarse en la membrana externa para colonizar el tracto urinario (TU) y generar una patología clínica (**Figura 1**)<sup>10,11</sup>.

El mecanismo de patogenicidad de UPEC inicia con la adherencia a través de la participación de adhesinas fimbriales (FimH, PapG, SfaS, FocH, CsgA y DrA) localizadas en la parte distal de diferentes fimbrias (Tipo 1, P, S, F1C, curli y Dr), respectivamente<sup>12,13</sup>. La interacción de las adhesinas con receptores celulares [proteínas  $\alpha$ -D-manosiladas, glicoesfingolípidos, ácido neuramínico, factor que acelera el decaimiento (Daf, por sus siglas en inglés) y proteínas de la matriz extracelular], localizados en el TU activan diferentes vías de señalización (apoptosis) y contribuyen a la colonización bacteriana<sup>14,15</sup>. La expresión de la  $\alpha$ -hemolisina (HlyA, por sus siglas en inglés), la toxina autotransportadora secretada (Sat, por sus siglas en inglés) y el factor necrotizante citotóxico (CNF-1, por sus siglas en inglés), contribuyen al aumento de la capacidad citotóxica de UPEC al TU<sup>11</sup>. La presencia de sistemas de captación de hierro (yersiniabactina y aerobactina), son necesarios para la persistencia y colonización de UPEC en una zona anatómica con una baja concentración de hierro<sup>10</sup>.



**Figura 1. Mecanismo de patogenicidad de UPEC en el tracto urinario.** UPEC coloniza el tracto urinario (TU) usando varios factores de virulencia (fimbrias, flagelo, cápsula, LPS, proteínas autotransportadoras, toxinas y sideróforos). El mecanismo de patogenicidad inicia por la adherencia íntima a las células superficiales del TU (1) activando un proceso de invasión (2); el cual, le permite a la bacteria permanecer intracelularmente para formar comunidades bacterianas intracelulares (CBI) (3). La interacción de UPEC con la célula promueve un estado de oxidación intracelular, causando la filamentación de la bacteria y eflujo posterior a la lisis celular (4). La interacción célula-bacteria estimula un proceso de apoptosis y el desprendimiento de las células protectoras del TU (5). El epitelio intermedio del TU permanece expuesto y la bacteria coloniza nuevamente para un nuevo ciclo de infección (6). Después de la reinfección, UPEC puede permanecer intracelularmente en estado quiescente durante varios meses (7). El eflujo de UPEC es estimulado a través de la célula del huésped, saliendo y colonizando el TU. Por otro lado, la lactoferrina (azul), la uromodulina (rojo), los anticuerpos IgA (negro), la catelicidina y/o las defensinas (café) son secretados por diversos tipos celulares del huésped para inhibir la unión de UPEC al TU. El uroepitelio produce IL-6 e IL-8 estimulando la migración de células de la respuesta inmune, principalmente de neutrófilos (8). La activación de las células presentadoras del antígeno (CPA) por la captación de antígenos asociados a UPEC (9), permite la presentación de péptidos a las células T y a la diferenciación de células B a células plasmáticas que producen inmunoglobulinas (10).

La adherencia de UPEC a las células del TU es un proceso inicial que promueve la invasión para evitar el flujo de la orina, la actividad de anticuerpos y de proteínas con propiedades bactericidas; además, de la acción de los antibióticos<sup>16</sup>. La invasión por UPEC es a través de un mecanismo tipo “zipper”, un proceso que involucra a la membrana celular del hospedero para envolver a la bacteria mediante la activación de varias proteínas [las tirosinas cinasas, el fosfoinositol-3-P (PI-3) cinasa y las proteínas de control de división celular (Cdc, por sus siglas en inglés) que promueven complejos entre componentes del citoesqueleto (actina, microtúbulos y vinculina)<sup>17</sup>.

Se ha demostrado que UPEC es capaz de sobrevivir dentro de macrófagos, un evento que contribuye a su diseminación en el TU<sup>18</sup>. En el citoplasma, UPEC inicia la formación de estructuras tipo biopelículas denominadas comunidades bacterianas intracelulares (CBI), encapsuladas en vesículas fusiformes RAB27b<sup>+</sup> (proteína relacionada a Ras) y asociadas a filamentos intermedios de las células del TU<sup>19</sup>. La formación de CBI ocurre en tres etapas: estado temprano (formación de las CBI), estado intermedio (maduración de las CBI) y estado tardío (eflujo y liberación de las CBI por las células del TU)<sup>20</sup>. La interacción del LPS (lipopolisacarido) con el receptor tipo “Toll” (TLR, por sus siglas en inglés) favorece el aumento de adenosina monofosfato cíclico (AMPc, por sus siglas en inglés) y la expulsión de UPEC envueltas en vesículas RAB27b<sup>+</sup> <sup>19,21,22</sup>. La activación de TLR4 por UPEC (LPS, FimH y/o PapG) genera un estado oxidativo intracelular; la cual, origina la filamentación por inhibición de la división bacteriana<sup>23</sup>. El crecimiento de los filamentos de UPEC, promueve la lisis celular del huésped, el eflujo de la bacteria y el inicio de un nuevo ciclo de infección<sup>24,25</sup>. UPEC puede entrar en un estado quiescente por periodos prolongados en



exosomas, un mecanismo que favorece a la bacteria para pasar desapercibida por el sistema inmune<sup>26</sup>. El canal 3 tipo mucolínico TRP (TRPML3, por sus siglas en inglés) es expresado en la superficie de los exosomas; el cual, puede ser activado por UPEC promoviendo la neutralización y la exocitosis de los exosomas con bacterias en estado quiescente<sup>27</sup>. La salida de UPEC envuelta en vesículas fusiformes probablemente es promovida por su fusión en la membrana celular del uroepitelio, utilizando vías alternas; la cual, tiene como finalidad el aumento de la superficie celular y la distensión de la vejiga<sup>28</sup>. La salida del estado quiescente de la bacteria favorece el proceso de reinfección al TU por la misma bacteria; la cual, es definida como ITU recurrente y sus complicaciones favorece la presencia de pielonefritis y urosepsis<sup>29</sup>. La patogenicidad de UPEC a través de diferentes mecanismos promueve la colonización, persistencia y recurrencia de la infección; aunque, el huésped también establece una respuesta inmune contra las ITU (**Figura 1**).

### **Cepas clínicas de UPEC multidrogoresistentes (MDR) y extremodrogoresistentes (XDR)**

El aumento de cepas de UPEC MDR y XDR ha complicado el tratamiento de las ITU con un impacto directo en el costo y la estancia hospitalaria<sup>30</sup>. Recientemente, describimos el perfil de resistencia, integrones y beta lactamasas de espectro extendido (BLEEs); además la tipificación (genes de virulencia y grupos filogenéticos) de cepas clínicas de UPEC MDR y XDR aisladas de niños con ITU. Las cepas clínicas de UPEC MDR se agruparon dentro del filogrupo D y se asociaron con la presencia de integrones de clase 1 y 2. Las cepas de UPEC XDR se agruparon principalmente en el grupo filogenéticos B2 y mostraron un fenotipo de BLEEs. La distribución de los genes que codifican para las adhesinas fimbriales FimH, CsgA y PapG variante II se identificaron en ambos grupos de cepas clínicas de UPEC<sup>31</sup>. La

implementación de nuevas vacunas viables que generen protección eficiente contra las cepas de UPEC MDR y XDR puede generar un impacto favorable en la salud a través de la disminución de las ITU

## **Vacunación**

Las vacunas disponibles actualmente son dirigidas principalmente a la respuesta inmune sistémica, debido a la dificultad de estimular la inmunidad de la mucosa<sup>32</sup>. Diferentes antígenos de UPEC (antígeno O, FimCH [FimH unida a la chaperona FimC] y PapDG [PapG unida a la chaperona PapD], HlyA y IroN), han sido evaluados después de la inmunización parenteral en modelos animales, generando una respuesta específica a nivel sistémico y no en mucosa<sup>33-36</sup>. La inmunogenicidad en la mucosa es inducida eficazmente por la administración de antígenos vía intranasal (IN), intravaginal y oral; mientras, con la administración parenteral se adquiere una respuesta no eficiente<sup>37</sup>. La vacuna SolcoUrovac® (lisados de uropatógenos) administrada vía mucosa vaginal, reduce significativamente las ITU recurrentes de acuerdo a un estudio de fase clínica II<sup>38</sup>. Sin embargo, las vacunas administradas vía vaginal ha generado reacciones adversas; las cuales, son manifestadas por dolor e irritación del epitelio vaginal<sup>39</sup>. La administración oral del inmunomodulador Urostim, estimula una respuesta celular y humoral sin generar una protección contra la infección<sup>40</sup>. La administración vía oral diaria de OM-89/Uro-Vaxom® ha generado una reducción en las ITU recurrentes; sin embargo, esta vía produce una tolerancia inmunológica y diversas manifestaciones clínicas a nivel gastrointestinal<sup>41</sup>. La inmunización vía transuretral a ratones con cepas de UPEC atenuadas no son persistentes en el TU y favorecen una protección inespecífica<sup>42</sup>. La inmunización IN con diferentes antígenos de UPEC (ChuA, Hma, Iha, IreA, IroN, IutA y FimH) activa la liberación de altas concentraciones de IgA en

saliva, vagina y orina<sup>43,44</sup>. La vacunación IN de adhesinas fimbriales puede ser la mejor vía para generar una respuesta inmune humoral con anticuerpos IgA en la mucosa del TU con protección al huésped contra las ITU por UPEC.

### **Adhesinas fimbriales y respuesta inmune**

Diversos estudios han sido empleados para describir el desarrollo de estrategias efectivas en la prevención, tratamiento y/o manejo de las ITU causado por la aparición de cepas de UPEC MDR y XDR. Existen vacunas poco efectivas generadas a partir de proteínas de UPEC, tales como: adhesinas fimbriales, autotransportadores, toxinas, sideróforos, flagelo y proteínas de membrana externa. Estas estructuras proteicas se encuentran localizadas en la superficie de la bacteria, participan en el mecanismo de patogenicidad, son expresadas durante una infección y son consideradas como estimuladoras de la respuesta inmune del hospedero<sup>45</sup>. UPEC produce la adhesina FimH localizada en la parte distal de la fimbria tipo 1, PapG en la fimbria P, SfaS en la fimbria S, FocI en la fimbria F1C, DraA en la fimbria Dr y CsgA en la fimbria Curli. Estas adhesinas fimbriales participan significativamente en la adherencia y colonización de UPEC a las células del TU<sup>12</sup>. La fimbria tipo 1 está ampliamente distribuida (80-90%) en cepas de UPEC, relacionada con procesos de adherencia, invasión y formación de CBI en el TU<sup>46</sup>. El gen *csgA* se encuentra en más del 95% de las cepas de UPEC; el cual, codifica para la proteína estructural CsgA de la fimbria curli que se ha asociado principalmente a procesos de urosepsis<sup>47-49</sup>. La fimbria P tiene una distribución entre el 35 al 45% en cepas de UPEC y participa en la colonización del riñón a través de la interacción con las globoceramidas localizadas en la superficie de las células renales. La diversidad de globoceramidas ha favorecido la aparición de 3 variantes alélicas en el gen *papG* [*papG*<sub>J96</sub> (variante I), *papG*<sub>AD/1A2</sub> (variante II) y *prsG*<sub>J96</sub> (variante III)]<sup>50</sup>. Es importante mencionar que

las adhesinas FimH, CsgA y PapG (variante II) son relevantes en la patogénesis de UPEC; además, de su amplia distribución cuando son comparadas con otras adhesinas fimbriales<sup>47</sup>. Por lo tanto, estas adhesinas pueden ser importantes biomoléculas viables para la generación de una vacuna eficaz que estimule una respuesta inmune.

### **Inmunogenicidad de FimH**

La adhesina FimH de la fimbria tipo 1 ha sido ampliamente utilizada como una vacuna en modelo animal. El suero de ratones C3H/HeJ inmunizados con FimH y la fimbria tipo 1 inhibe la adherencia a células humanas de vejiga<sup>51</sup>. El dominio de unión a manosa de FimH, la proteína completa y en asociación con FimC (chaperona), reducen significativamente la adherencia en vejiga y riñón de ratones y monos *cynomolgus*. Estos datos sugieren que los anticuerpos específicos anti-FimH inhiben la colonización de UPEC<sup>35,52-54</sup>. La proteína recombinante FimH fusionada con FliC, induce un aumento de la respuesta inmune celular y humoral contra las ITU en modelo murino. Estos estudios, mostraron niveles altos de inmunoglobulinas (IgG1 e IgG2a) y la liberación de citocinas (INF $\gamma$  y IL4) por células T (Th1 y Th2) identificados después de una inmunización subcutánea<sup>55</sup>. La proteína de fusión de FimH (UPEC) y MrpH (*Proteus mirabilis*), induce significativamente la liberación de anticuerpos IgG e IgA en diversas muestras de ratón (suero, orina, lavado nasal y vaginal) después de la inmunización IN. La inmunidad celular tipo Th1 y Th2 generada por las proteínas FimH/MrpH con o sin adyuvante MPL, sugiere que una de estas proteínas funcionan como una molécula adyuvante<sup>56</sup>. Adicionalmente, se observó que la proteína FimH interacciona con el TLR4 a través de un correceptor  $\alpha$ -manosilado, que favorece la activación de células epiteliales CD4<sup>-</sup> mediante la vía Tirap-MyD88 para el reclutamiento de neutrófilos en la mucosa<sup>57,58</sup>.

### **Inmunogenicidad de la proteína CsgA**

Datos preliminares han mostrado que la proteína CsgA funciona como una adhesina accesoria que contribuye a la adherencia de UPEC a células de vejiga. Estudios más finos son requeridos para determinar la función específica de CsgA de UPEC en un proceso de colonización<sup>49</sup>. Otro estudio mostró niveles altos de anticuerpos anti-CsgA en sueros de pacientes convalecientes de sepsis, sugiriendo que la proteína CsgA es expresada *in vivo*; sin embargo, la inmunogenicidad de esta proteína no fue evaluada en este estudio. La fimbria curli en otras *E. coli* induce significativamente la liberación de citocinas proinflamatorias (TNF $\alpha$ , IL-6 e IL-8) en células de macrófagos<sup>59</sup>. La proteína recombinante CsgA de *Salmonella* y la fimbria curli de *E. coli* MC4100, participan en la liberación de IL-8 en células de macrófagos de humano THP-1 a través de la interacción cooperativa de TLR1 y TLR2<sup>60</sup>. La proteína CsgA también ha sido considerada como un PAMP (Patrones Moleculares Asociados a Patógenos, por sus siglas en inglés), responsable de generar una respuesta de IL-6 e IL1 $\beta$  mediante la vía del inflamosoma (NLRP3)<sup>61,62</sup>.

### **Inmunogenicidad de PapG**

La adhesina PapG de UPEC ha sido involucrada en procesos de pielonefritis en humanos<sup>63</sup>. La interacción de PapG con un correceptor del TLR4 con características de esfingolípido, activa la secreción de IL-6 e IL-8<sup>57,64</sup>. La inmunización intraperitoneal de la fimbria completa y con la chaperona PapD generará una protección contra la inflamación del riñón e induce una producción de anticuerpos específicos en sueros de ratón y mono *cynomolgus*<sup>33,65</sup>. Sin embargo, diferencias no significativas fueron observadas entre el número de bacterias

recuperadas en orina y el grupo control, probablemente por la expresión de otras fimbrias que contribuyen en la colonización bacteriana<sup>33</sup>.

### **Proteínas de fusión multiméricas**

Las proteínas recombinantes generadas por la fusión de diferentes antígenos de dos o más patógenos, han conferido una mayor respuesta inmune y una protección en modelo animal contra las ITU<sup>56,66</sup>. Estos antígenos o biomoléculas son conocidas como quimeras y/o proteínas de fusión; además, son utilizadas para la generación de vacunas multiméricas contra las ITU de UPEC. La vacunación utilizando proteínas de fusión han mostrado aumentos en la respuesta inmune celular [células T tipo Th1 y Th2 (INF- $\gamma$  y IL-4)] y humoral (niveles altos de anticuerpos IgG1 e IgG2a) contra las ITU *in vivo*<sup>55,56</sup>. Las proteínas de fusión que incluyen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP), inducen una respuesta específica, potente y rápida en ausencia de adyuvante<sup>67</sup>. El reconocimiento específico de PAMP es mediado principalmente por TLR, un receptor de reconocimiento de patrones (PRR) que estimula cambios en la presentación del antígeno y en la activación celular<sup>68</sup>. La probable interacción de PRR con proteínas de fusión basadas en las adhesinas (FimH, CsgA y PapG) de UPEC, puede generar la activación rápida del sistema inmune y la presentación de antígenos por la célula presentadora del antígeno (CPA). La finalidad de estas proteínas de fusión es generar anticuerpos de mucosa del isotipo IgA, específicos contra las principales fimbrias con capacidad para bloquear la adherencia de UPEC en el TU.

## **Planteamiento del problema**

A nivel mundial, diversas vacunas se han empleado para prevenir las ITU; sin embargo, no se ha desarrollado una protección eficaz. El tratamiento de las ITU por UPEC también se ha complicado por la adquisición de la resistencia a diversos antibióticos por la bacteria; el cual, disminuye las opciones de tratamiento a estas infecciones. La adhesina FimH de UPEC ha sido utilizada frecuentemente para el desarrollo de vacunas contra las ITU sin obtener resultados eficientes. Esta bacteria es capaz de expresar otras fimbrias durante la infección representando un problema para generar una vacuna monovalente. Diversas fimbrias involucradas en la patogénesis de UPEC en el tracto urinario, tales como: La fimbria P (PapG) relacionada a pielonefritis y curli (CsgA) a urosepsis. Estas fimbrias junto a FimH pueden ser candidatos para la generación de proteínas recombinantes de fusión. En este contexto, la pregunta de investigación a responder es: ¿La construcción de una proteína de fusión con las adhesinas FimH, PapG y CsgA generará una biomolécula viable para la implementación de una vacuna contra la infección de UPEC?

## **Justificación e hipótesis**

El desarrollo de una proteína de fusión eficiente y segura que sea capaz de inducir una respuesta inmune representa una alternativa como vacuna para la prevención de las ITU. La incorporación de ligandos TLR puede dar como resultado una vacuna segura con mayor eficacia, siendo igual o mejor a las formuladas con adyuvante. Recientemente, una proteína de fusión generada con FimH y FliC como ligando de TLR5 fue evaluada y mostró un aumento en la respuesta humoral y celular cuando se comparó con la proteína FimH individual y la mezcla FimH con FliC<sup>69</sup>. La incorporación de uno o más factores de virulencia como en una proteína de fusión puede generar una respuesta más eficiente, como la proteína MrpH-FimH de UPEC y *Proteus*. Por lo tanto, una proteína de fusión generada con las adhesinas PapG, CsgA y FimH aumentará la respuesta inmune humoral y celular, además de su capacidad protectora contra la infección por UPEC en el huésped.



### **Objetivo general**

Generar y caracterizar proteínas de fusión que incluyan las principales adhesinas fimbriales de cepas clínicas de *Escherichia coli* uropatogénica.

### **Objetivos particulares**

- Identificar las principales adhesinas fimbriales en cepas clínicas de UPEC
- Diseñar *in silico* las proteínas recombinantes de fusión.
- Generar proteínas recombinantes de fusión.
- Determinar la viabilidad de las proteínas recombinantes de fusión como una biomolécula con potencial a vacuna funcional.

## **Materiales y métodos**

### **Aislamiento e identificación de cepas clínicas de UPEC**

En el Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG) fueron colectadas 178 cepas clínicas de UPEC de pacientes pediátricos con ITU complicadas (cITU) y no complicadas entre el 1 de noviembre del 2012 al 31 de julio del 2013. Adicionalmente, las cITU de los pacientes pediátricos también fueron diagnosticadas con otras manifestaciones clínicas, tales como: diabetes, leucemia, cáncer y anomalías en el tracto urinario.

Para este estudio, las cepas de UPEC fueron procesadas en el Laboratorio Central (área de Bacteriología) del HIMFG siguiendo los criterios Kass ( $\geq 100,000$  UFC/mL) y se identificaron utilizando el sistema Vitek MS (BioMérieux SA, France). La pureza de las cepas clínicas de UPEC fue realizada cultivándolas en medio MacConkey y Agar sangre (Difco-Becton Dickinson, NJ, USA) a 37°C durante 24 h. Las cepas de UPEC fueron guardadas en crioviales con medio Luria-Bertani (LB; Difco-Becton Dickinson, NJ, USA) y suplementado con 25% de glicerol (Sigma-Aldrich St. Louis, MO, USA) a -70°C.

### **Susceptibilidad antibiótica de las cepas clínicas de UPEC**

El perfil de susceptibilidad de las cepas clínicas de UPEC a 9 grupos de antibióticos fue realizado usando el equipo automatizado Vitek 2 (BioMérieux SA, France) y siguiendo el protocolo de la CSLI/2015. Los antibióticos ampicilina, amoxicilina-ácido clavulánico, cefaclor, ceftriaxona, ceftazidima, norfloxacina, ofloxacina, meropenem, imipenem, gentamicina; trimethoprim-sulfamethoxazol y nitrofurantoína fueron incluidos en este estudio. Las cepas *E. coli* ATCC 25922 (VA, USA) y *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853 (VA, USA) se utilizaron como control de calidad.

### **Identificación de los grupos filogenéticos de las cepas clínicas de UPEC**

Las cepas clínicas de UPEC fueron cultivadas en medio LB y la extracción del ADN (ácido desoxirribonucleico) fue realizada utilizando el Kit de Purificación de ADN Genómico Wizard® (Promega Corporation; WI, USA) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. La concentración y pureza del ADN fue determinada espectrofotométricamente a una densidad óptica de 260 nm utilizando un NanoDrop (Thermo Fisher Scientific; MA, USA). Los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D fueron determinados por Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR, por sus siglas en inglés) de acuerdo a la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2 usando iniciadores específicos (**Tabla 1**). Los grupos filogenéticos fueron asignados de la siguiente manera: grupo B2 (*chuA* + / *yjaA* +), grupo D (*chuA* + / *yjaA*-), grupo B1 (*chuA*- / TspE4.C2 +) y grupo A (*chuA*- / TspE4.C2-)<sup>70</sup>. Las cepas de *E. coli* LMM36-ULA (*chuA* + y *yjaA* +) y *E. coli* LMM32-ULA (TspE4.C2 +) obtenidas de la casa comercial ATCC (VA, USA), fueron utilizadas como control positivo.

### **Determinación de genes de virulencia en cepas clínicas de UPEC**

Los principales genes asociados a la virulencia de UPEC fueron determinados por PCR multiplex usando iniciadores específicos (**Tabla 1**). Los genes asociados a las fimbrias fueron los siguientes: la adhesina PapG con sus tres variantes (*papGI*, *papGII*, *papGIII*) y la proteína PapF (*papF*) de la fimbria P; además, el gen *fimH* que codifica para la adhesina FimH de la fimbria tipo 1 y el gen *csgA* que codifica para la proteína CsgA de la fimbria curli. Otros genes que codifican para captadores de hierro y toxinas también se incluyeron en este estudio, tales como: el gen *iutD* que codifica para la aerobactina, *fyuA* para la yersiniabactina, *hlyA*

para la  $\alpha$ -hemolisina, *tosA* para la proteína TosA (type one secretion A, por sus siglas en inglés). Por último, los genes asociados a movilidad y quimiotaxis, fueron los siguientes: el gen *motB* que codifica para la proteína MotB y *fliC* para la proteína FliC como componentes esenciales en la función del flagelo de UPEC. La cepa de UPEC CFT073 (ATCC 700928) y J96 (ATCC 700336) fueron usadas como control positivo.

### **Generación de cepas mutante y complementación en *trans***

La cepa de UPEC 529U-0712 fue seleccionada considerando la presencia del gen *csgA* y su sensibilidad a gentamicina, ampicilina, kanamicina y cloranfenicol. Esta cepa fue caracterizada por nuestro grupo de investigación; a partir de una colección de 500 cepas clínicas de UPEC<sup>31</sup>. La inactivación del gen *csgA* con un casete de resistencia kanamicina o cloranfenicol fue realizada usando el método descrito por Datsenko y Wanner en el 2002<sup>71</sup>. La verificación de las probables mutantes fue evaluada por PCR usando iniciadores que reconocen 100 pb río arriba y abajo del gen *csgA* (**Tabla 1**). La mutante fue verificada por la presencia de un amplicón de aproximadamente 1400 pb y por la ausencia de fijación del colorante rojo Congo. La observación de las estructuras en forma de risos por microscopía electrónica de transmisión (MET) fue otra forma de verificar la mutación del gen *csgA*.

La restauración del fenotipo de la cepa mutante fue realizada por complementación en *trans* con el plásmido pJcsgGC; el cual, contiene los genes involucrados en la biogénesis de curli. El plásmido pJcsgGC fue generado por la clonación de los operones *csgGD* y *csgBA* en el plásmido pJET1.2 blunt (Thermo Fisher Scientific; MA, USA).

**Tabla 1: Lista de iniciadores usados en este estudio.**

No.		Secuencia (5'-3')	Aplicación
1	FimH F	AGAAGGAGATATAACTATGAAAACCGCGAACGGT ACCGCGATCCCGATCGGTGGTGGT	Amplificación y clonación de proteínas
2	FimH R	GTGGTGGTGATGGTGGTGGCCCTGGTAAACGAAG GTAACACCGATGATAGACTGAAC	Amplificación y clonación de proteínas
3	CsgA F	AGAAGGAGATATAACTATGTCTGAACTGAACATCT ACCAGTACGGTGGTGGTA	Amplificación y clonación de proteínas
4	CsgA R	GTGGTGGTGATGGTGGTGGCCGTAAGTGGTGGCGCGG TCGCGTTGTTACCGAA	Amplificación y clonación de proteínas
5	PapG F	AGAAGGAGATATAACTATGTCTCTGGGTAACGTTA ACTCTTACCAGGGTGGTAA	Amplificación y clonación de proteínas
6	PapG R	GTGGTGGTGATGGTGGTGGCCCGGCAGGATCATCA GCAGGGTCGCAGAACCAG	Amplificación y clonación de proteínas
7	mCsgA F	GTTTTACATGAAACTTTTAAAAGTAGCAGCAATTG CAGCAATCGTATTCGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC	Mutación del gen <i>csgA</i>
8	mCsgA R	GCGCCCTGTTTCTTTCATACTGATGATGTATTAGTA CTGATGAGCGGTGCATATGAATATCCTCCTTAG	Mutación del gen <i>csgA</i>
9	vCsgA F	GCCAGTATTTTCGCAAGGTGC	Verificación de la mutación del gen <i>csgA</i> e identificación de curli
10	VCsgA R	GGTGACATATCCCCTTGCTGG	Verificación de la mutación del gen <i>csgA</i> e identificación de curli
11	CsgG F	GCGAGCTCGGTTGATATTTGGTTACGC	Clonación del operón de curli
12	CsgC R	CTCTCTTATGCTCGGCAGTTGAGCTC	Clonación del operón de curli
13	iFimH F	CGGCGGATCCATGGAGATGATTGTAATGAAACGA G	Identificación de la fimbria tipo 1
14	iFimH R	CCGCAGATGCGGGCAACTCG	Identificación de la fimbria tipo 1
15	iPapF F	GTTTTCTGTACCGCTCTCCG	Identificación de la fimbria P
16	iPapF R	CATGCTCATACTGGCCGTG	Identificación de la fimbria P
17	ChuA-F	GACGAACCAACGGTCAGGAT	Grupos filogenéticos
18	ChuA-R	TGCCGCCAGTACCAAAGACA	Grupos filogenéticos
19	YjaA-F	TGAAGTGTGAGGAGACGCTG	Grupos filogenéticos
20	YjaA-R	ATGGAGAATGCGTTCCTCAAC	Grupos filogenéticos
21	TspE4C2-F	GAGTAATGTGCGGGCATTCA	Grupos filogenéticos

22	TspE4C2-R	CGCGCCAACAAAGTATTACG	Grupos filogenéticos
23	TosA-F	GCACAGCATAACGGGAAAAT	Identificación de TosA
24	TosA-R	CCAGCATGTTACCACGAATG	Identificación de TosA
25	iutD-F	TACCGGATTGTCATATGCAGACCGT	Identificación de la aerobactina
26	iutD-R	AATATCTTCCTCCAGTCCGGAGAAG	Identificación de la aerobactina
27	HylA-F	CGTGGACACAGCTGCCAGCA	Identificación de la alfa hemolisina
28	HylA-F	TGCAGCGTGGCGGGCATCAT	Identificación de la alfa hemolisina

### **Ensayos de adherencia e invasión de UPEC a una línea celular de vejiga**

La línea celular de vejiga humana HTB-5 adquiridas de la American Type Culture Collection (ATCC, por sus siglas en inglés; VA, USA) fueron cultivadas en Medio Mínimo Esencial de Eagle (EMEM, por sus siglas en inglés) de la ATCC (VA, USA). Las placas de 24 pozos se prepararon con 1 ml de medio EMEM con una concentración de  $1 \times 10^5$  células/pozo suplementado con 10% suero fetal bovino (SFB) de Gibco (Thermo Fisher Scientific; MA, USA) hasta alcanzar una confluencia del 80%. Previamente, la cepa de UPEC fue cultivada en medio sólido de extracto de levadura y casaminoácidos (YESCA, por sus siglas en inglés) a 37°C durante 38 horas para favorecer la expresión de la fimbria curli. La bacteria cosechada del medio sólido y ajustada a una  $OD_{600}$  de 1 fue tratada con 2.5% de manosa (Sigma-Aldrich Corp.; MO, USA) e incubada durante 1 hora a 37°C en agitación constante. Las monocapas de células fueron infectadas con  $1 \times 10^7$  bacterias (MOI de 100) e incubadas durante 3 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. El número de unidades formadoras de colonias (CFU, por sus siglas en inglés) se realizaron de tres formas: **1)** Después de la infección, las monocapas fueron tratadas con 20 µL de 0.5% de TritonX-100 en PBS y colectadas para la cuantificación de las bacterias totales (no adheridas, adheridas e intracelulares). **2)** Las monocapas infectadas fueron lavadas

tres veces con 1 mL de PBS, seguido de un tratamiento con 1 mL de PBS con 0.1% de TritonX-100 y colectadas para la cuantificación las bacterias adheridas e intracelulares. 3) Las monocapas infectadas fueron lavadas tres veces con 1 mL de PBS, incubadas con 1 mL de EMEM con 100 µg/mL de gentamicina durante 2 horas para eliminar las bacterias adheridas y lavadas tres veces con PBS. Finalmente, las monocapas tratadas fueron colectadas con 1 mL de PBS con 0.1% de TritonX-100 para la cuantificación de las bacterias intracelulares. La cuantificación de las CFU/mL fue realizada con el método de microdilución descrito por Hannan and Hunstad, 2016<sup>72</sup>.

### **Modelo murino de ITU**

Los experimentos con animales fueron realizados de acuerdo a los criterios de la Comisión Nacional de Bioética y de las especificaciones de la NOM-62-200-199. Los ratones C57BL/6 hembra de 10 a 12 semanas fueron obtenidos del Bioterio de la Facultad de Estudios Superiores-Iztacala de la UNAM para la implementación del modelo murino de ITU. Previamente, la cepa de UPEC fue cultivada en agar YESCA a 37°C durante 38 horas y fue cosechada en 1 mL de PBS a una DO<sub>600</sub> de 1.0. Los grupos fueron conformados por 8 ratones y fueron inoculados vía transuretralmente con  $1 \times 10^8$  bacterias en 100 µL del cultivo bacteriano de acuerdo al procedimiento descrito por Hung y cols., 2009<sup>73</sup>. Después de 48 horas los ratones fueron sacrificados para colectar la vejiga y los riñones en 1 mL de PBS con 0.05%, de Triton X-100 (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA). Los órganos fueron homogenizados para la cuantificación de las UFC/órgano utilizando el métodos de microdilución en placa descrito por Hannan and Hunstad, 2016<sup>72</sup>.

## Herramientas bioinformáticas para el diseño de las proteínas de fusión

Los genes de las adhesinas *fimH*, *csgA*, y *papG* de UPEC fueron obtenidos a partir de la secuencia completa del genoma de *E. coli* CFT073 usando la base de datos GenBank de Centro Nacional de Información bioinformática [NCBI, por sus siglas en inglés (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>)]. Los genes *fimH*, *csgA*, y *papG* obtenidos de los genomas de las diferentes cepas de UPEC (UTI89, ABU83972, NA114, UPEC26-1, CF-088, CF-468, aislados IA2 y AD110) fueron comparados con el programa ClustalOmega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Los genes *fimH*, *csgA*, y *papG* de UPEC fueron optimizados para determinar los codones preferenciales con el programa OPTIMIZER (<http://genomes.urv.es/OPTIMIZER/>). La predicción de la estructura secundaria del ARN de los genes fue generada utilizando el programa Mfold (<http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold/RNA-Folding-Form>).

Por otro lado, la predicción del péptido señal de las proteínas empleadas (FimH, CsgA y PapG) fue realizada con el servidor SignalP 4.1<sup>74</sup>. Los parámetros fisicoquímicos de estas proteínas fueron determinados usando el programa ProtParam de ExPASy<sup>75</sup>. La predicción de la estructura secundaria de las proteínas fue generada con el programa GOR IV<sup>76</sup>. El modelado tridimensional (3D) de las proteínas fue realizado con el servidor I-TASSER y visualizado con el programa PyMOL<sup>77</sup>. Las estructuras 3D fueron refinadas y minimizadas con los programas KoBaMIN (<http://csb.stanford.edu/kobamin/>) y VegaZZ<sup>78</sup>. Estas estructuras 3D fueron validadas con los programas “Protein Structure Analysis” (ProSA) y el programa PROCHECK<sup>79,80</sup>. El valor “Root Mean Square Deviation” (RMSD, por sus siglas en inglés) fue evaluado usando las estructuras resueltas del dominio de unión a manosa de FimH (Protein Data Bank; 1TR7) y el dominio lectina de PapG (PDB; 1J8R) con el programa TM-align<sup>81</sup>.



Para la respuesta inmune, los epítomos lineales fueron determinados teóricamente con el servidor bcPred (<http://www.imtech.res.in/raghava/abcpred/>) y los péptidos con afinidad al complejo mayor de histocompatibilidad (MHC) clase II con el programa NetMHCII (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetMHCII/>). La estructura 3D de las proteínas fueron utilizadas para determinar epítomos conformacionales usando el servidor Discotope (<http://www.cbs.dtu.dk/services/Disco Tope/>).

### **Síntesis del gen plantilla y clonación de los genes de fusión**

El gen plantilla diseñado-optimizado, fue sintetizado químicamente y clonado en el plásmido pUC57 por la casa comercial GenScript (NJ, USA). Los iniciadores para amplificar los genes quiméricos (monoméricos, diméricos y triméricos), fueron diseñados manualmente siguiendo el protocolo de “aLICator LIC Cloning and Expression handbook” (Thermo Fisher Scientific, MA, USA) y sintetizados por la casa comercial IDT Technologies (Iowa, USA) (**Tabla 1**). Los genes fueron amplificados mediante PCR con la ADN polimerasa *Pfu* de Thermo Fisher Scientific (MA, USA) siguiendo los protocolos del sistema aLICator. Los genes fueron clonados en el vector de expresión pLATE31 para transformar por electroporación a la cepa de *E.coli* BL21 (DE3). La verificación de la clonación de los genes fue realizada con el equipo NexSeq 500 (Illumina, CA, USA) en la Unidad de secuenciación del INMEGEN. Los iniciadores específicos para la secuenciación fueron obtenidos del “aLICator LIC Cloning and Expression Kit” y las secuencias resultantes fueron analizadas usando el programa informático de alineamiento de secuencias de tipo local (BLAST, por sus siglas en inglés).

### **Expresión y purificación de las proteínas de fusión**

Las cepas de *E. coli* BL21 con el apropiado vector de expresión pLATE31 fueron cultivadas en agar LB e incubadas por 16 h a 30°C. Las colonias transformantes fueron seleccionadas por el método de “colony-blotting” usando anticuerpos anti-6XHis (C-Term) HRP (Abcam; MA, USA). Después de seleccionar las colonias positivas, la solubilidad de las proteínas recombinantes fueron determinada usando los protocolos establecidos por “The expressionist” de Qiagen. Posterior a la verificación de la solubilidad, las bacterias fueron crecidas en 500 ml de LB suplementado con 1mM IPTG durante 5 h a 37°C para la purificación de las proteínas recombinantes. El paquete celular fue obtenido por centrifugación a 5000 rpm durante 10 min y resuspendido en un amortiguador A (10mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH7.4, 150mM NaCl y 1mM EDTA) con fenil-metil-sulfonil fluoruro (PMSF; Sigma-Aldrich Corp., MO, USA). El lisado bacteriano fue obtenido por sonicación con pulsos de 10 segundos y por ultracentrifugación a 20,000 rpm durante 20 min fue obtenida la fracción soluble. El paquete fue resuspendido nuevamente en un amortiguador B (8M hidroxiclورو de guanidina, 100mM NaCl y 100mM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH8) e incubado durante tres días a temperatura ambiente para disolver los posibles cuerpos de inclusión. Los cuerpos de inclusión solubilizados fueron incubados en agarosa níquel-ácido nitrilotriacético de Qiagen (Ni-NTA, Stockach, Germany) durante 1 h en agitación constante y a 4°C. La resina Ni-NTA con la fracción soluble fue empaquetada en una columna de vidrio, lavada con un amortiguador C (8.5M urea, 20mM Tris, pH7.5, 160mM NaCl y 20mM imidazol) y eluida con un amortiguador D (8M urea, 50mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, pH8, 100mM NaCl y 500mM imidazol). Las proteínas colectadas fueron

dializadas con un amortiguador E (25mM Tris, pH7.5, 100mM NaCl y 0.5mM EDTA) en gradiente de 7 a 1M de urea y conservadas a  $-70^{\circ}\text{C}$  para su posterior uso.

### **Caracterización de las proteínas de fusión**

Las proteínas de fusión fueron cuantificadas con el kit 2D-Quant siguiendo el protocolo de GE Healthcare Bio-Sciences AB (Uppsala, Sweden) y visualizadas en geles de poliacrilamida al 14% en condiciones desnaturalizantes con SDS (SDS-PAGE) después de la tinción de Coomassie (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA). La presencia de las proteínas fueron confirmadas por Western blot usando anticuerpos anti-6His (C-Terminal) HRP (Abcam; MA, USA) como ha descrito Ledesma y colaboradores en el 2010<sup>82</sup>. En el caso específico de la proteína CsgA, primeramente fue tratada con 88% de ácido fórmico (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) y después procesada por SDS-PAGE<sup>83</sup>.

La identificación de las proteínas fue realizada por espectroscopia de masas usando un analizador 4800 MALDI TOF/TOF<sup>TM</sup> (Applied Biosystems/MDSSCIEX, MA, USA) en la unidad de proteómica del INMEGEN. El peso molecular fue estimado usando la imagen del gel y el programa Image Lab versión 5.2 de Bio-Rad (Hercules, CA, USA). La agregación de las proteínas fue determinado por dispersión dinámica de la luz (DLS, por sus siglas en inglés) con el equipo Zetasizer Helix de Malvern Instruments Ltd, Worcestershire (United Kingdom) en el Laboratorio de cristalización de proteínas del Instituto de Química de la UNAM. Los niveles de endotoxina (LPS) de las preparaciones de proteína fueron determinados usando el sistema de Pierce<sup>TM</sup> LAL Chromogenic Endotoxin Quantitation de acuerdo al protocolo de Thermo Fisher Scientific (MA, USA). Las proteínas también fueron

tratadas con 50 µg/mL de polimixina B (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) durante 12 h y a 4°C previo a los ensayos de bioactividad.

### **Determinación de la bioactividad en las proteínas de fusión**

Las proteínas incluidas en la fusión pueden estimular la liberación de IL-6 e IL-8 mediante la interacción de los TLR2 y TLR4. La determinación de TLR2 y TLR4 en las células de vejiga HTB-5 fue analizada por citometría de flujo usando los anticuerpos human TLR2 fluorescein-conjugated (R&DSystems, Inc., MN, USA) y human TLR4/MD2 complex phycoerythrin-conjugated (Santa Cruz Biotechnology Inc., TX, USA). La evaluación de la activación de los TLR por las proteínas de fusión fue determinada por la cuantificación de estas citocinas usando el método de ELISA en los sobrenadantes de las células de vejiga HTB-5. Brevemente, las células HTB-5 fueron cultivadas en placas de 24 pozos (Greiner, Germany) a densidad de  $10^5$  células/pozo, incubadas con 1 mL de medio EMEM suplementado con 10% de SFB. La inducción de citocinas en las células HTB-5 fue detectada después de 6 h de incubación con 10µg/mL de proteínas FimH, CsgA, PapG, FC y FCP con el kit de IL-6 e IL-8 de BD Biosciences (CA, USA) siguiendo los protocolos establecidos por la casa comercial. El control de inducción del TLR2 fue con 100 ng/mL de ácido lipoteicoico (LTA; Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) de *S. aureus* y para el TLR4 con 100 ng/mL de lipopolisacarido (LPS; Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) de *E. coli* 0111:B4.

### **Identificación de anticuerpos en suero y orina contra las proteínas de fusión**

Las muestras de suero y orina fueron obtenidas de 14 pacientes con ITU y 14 pacientes sin ITU en el Laboratorio Central del HIMFG. Los criterios de inclusión de pacientes con ITU

fueron los siguientes: síntomas de ITU, cultivo de orina con  $\geq 100,000$  CFU/mL de *E.coli*, esterías leucocitaria, nitrito en orinas y células endoteliales en el sedimento urinario. Las muestras de orina fueron centrifugadas a 8,000 rpm durante 5 min y filtradas a través de una membrana de 0.22  $\mu\text{m}$  Durapore de Merck Millipore (Darmstadt, Germany). Los anticuerpos IgG e IgA contra las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC y FCP fueron determinados por ELISA a una dilución de 1:50 para los sueros y 1:10 para las orinas siguiendo los protocolos establecidos por Habibi y colaboradores en el 2015<sup>56</sup>.

### **Generación de anticuerpos policlonales en conejo**

Los anticuerpos contra las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC y FCP fueron producidos en conejos Nueva Zelanda de 5 a 6 meses de edad, obtenidos en el bioterio del Instituto de Fisiología Celular de la UNAM. Los conejos fueron inmunizados vía subcutánea con 200  $\mu\text{g}$  de cada proteína suplementada con adyuvante completo de Freund (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA). Los conejos fueron inmunizados tres veces (21, 28 y 37 días posteriores) con 100  $\mu\text{g}$  de cada proteína en adyuvante incompleto de Freund (Sigma-Aldrich Corp., MO, USA) y sangrados por punción cardiaca posteriores a los 40 días. El suero fue separado de la sangre por centrifugación a 8,000 rpm durante 5 min y conservados a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Los sueros fueron absorbidos usando la cepa mutante CFT073*csgA::Km/fimH::Cm* generada en este estudio, de acuerdo al método de inactivación de genes en un solo paso<sup>71</sup>. Los sueros fueron inactivados por calor a  $56^{\circ}\text{C}$  durante 30 minutos y titulados por ELISA usando diluciones seriadas de 1:10 a 1:100,000 contra las proteínas específicas.

### **Ensayos de inhibición de la adherencia con anticuerpos policlonales**

Las células de vejiga humana HTB-5 fueron procesadas como se describió previamente. La cepa de UPEC CFT073 fue crecida toda la noche y una alícuota 1:1000 fue incubada en 5mL de caldo LB a 37°C en agitación hasta obtener una DO<sub>600</sub> de 1.0 (aproximadamente 3 horas). Las suspensiones de bacterias ( $1 \times 10^7$  bacterias, MOI 100) en 1 mL de EMEM fueron incubadas durante 1 hora con los anticuerpos policlonales (anti-FimH, -CsgA, -PapG, FC y -FCP) a una concentración final de 1:2 a 37°C en agitación. Las células fueron infectadas e incubadas durante 3 horas a 37°C con 5% de CO<sub>2</sub>. Las células infectadas fueron lavadas 3 veces con PBS estéril y tratadas con 1 mL de PBS con 0.1% de TritonX-100. Las CFU/mL fueron determinada por el método de dilución en placa descrito por Hannan and Hunstad, 2016<sup>72</sup>.

### **Plan de análisis de datos**

Las diferencias significativas de los valores medios fueron analizadas con la prueba t de Student, las medianas con la prueba de U de Mann-Whitney y las asociaciones con Chi-squared. Los análisis y gráficos fueron elaborados con GraphPad Prism software (versión 6, CA, USA) y un valor de  $p < 0.05$  fue considerado como estadísticamente significativo.

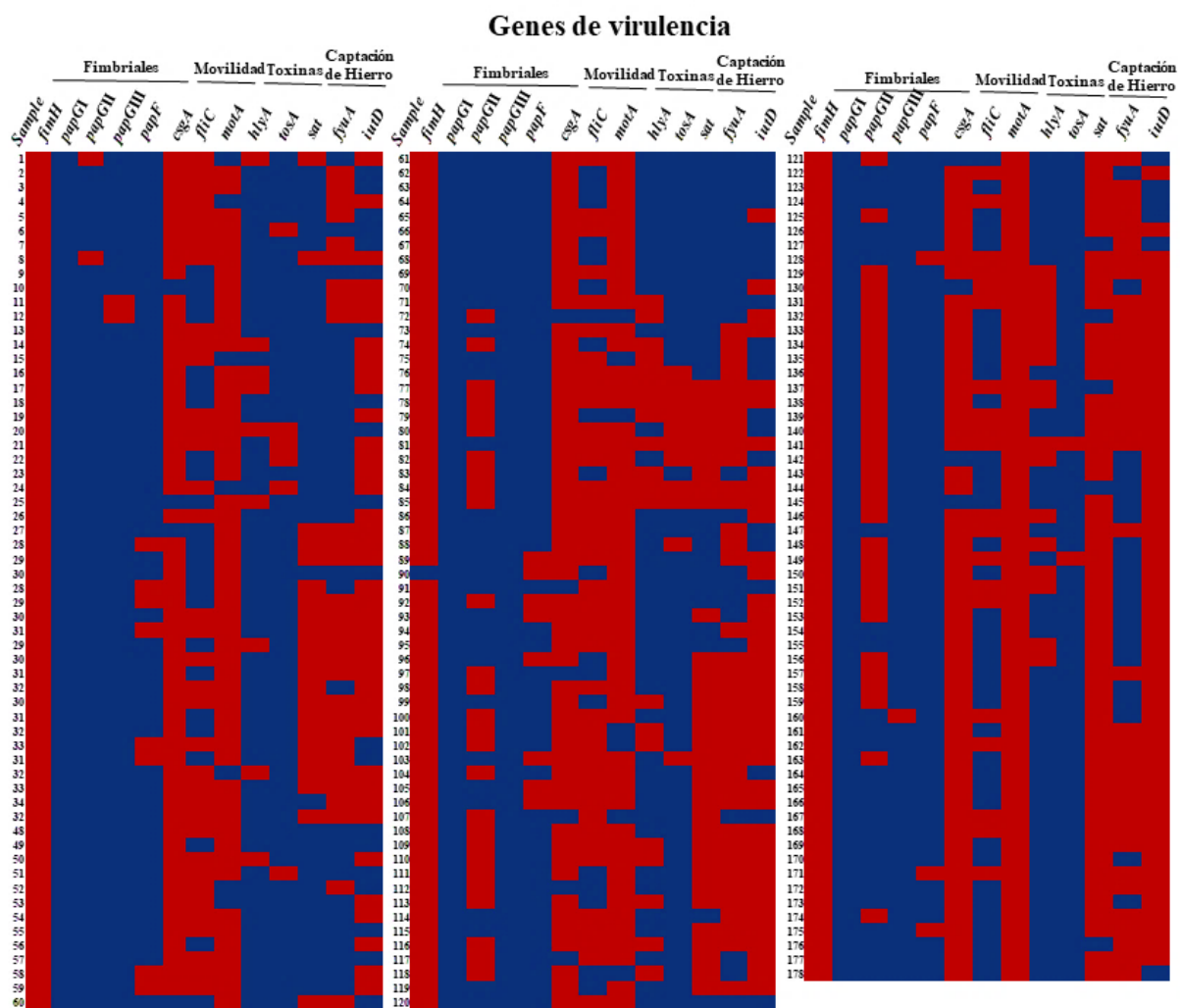
## Resultados y discusión

### Las adhesinas fimbriales son ampliamente distribuidas en cepas clínicas UPEC

Recientemente, en el Laboratorio describimos a una colección de aislados clínicos de vías urinarias de pacientes pediátricos con ITU en el HIMFG. En esta colección de 500 cepas clínicas de UPEC, se analizó el perfil de susceptibilidad a antibióticos; de las cuales, 109 (20.6%) de estas cepas de UPEC correspondieron a un perfil MDR<sup>31</sup>. Otra colección de 178 cepas clínicas de UPEC aisladas en el HIMFG (2012 y 2013) fue evaluada su perfil de susceptibilidad a antibióticos en este estudio. El resultado mostró un aumento en el perfil MDR con el 80.1% (142/178) de cepas MDR con respecto al 20.6% de la colección de 500 cepas UPEC aisladas entre el 2010 y 2011 (manuscrito en preparación). El aumento de la resistencia a diferentes antibióticos por cepas clínicas de UPEC, ha complicado el tratamiento de las ITU, impactando directamente en la morbilidad y los costos en salud pública. La finalidad de este proyecto es proponer una alternativa diferente a los antibióticos que permita disminuir las ITU causadas por UPEC.

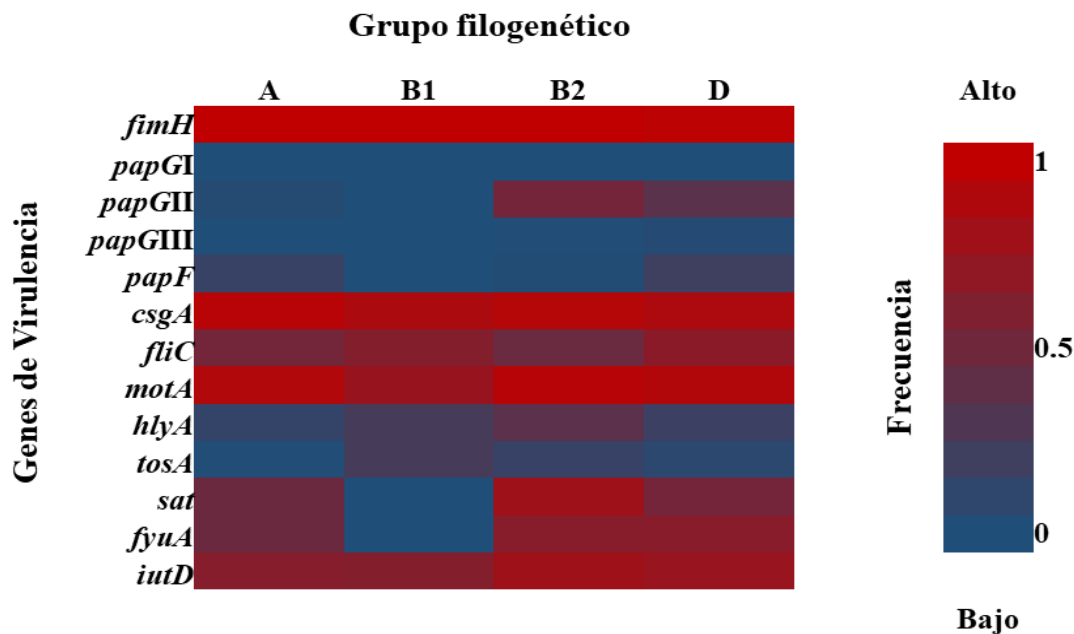
Una alternativa viable es la generación de proteínas de fusión; las cuales, han conferido una mayor respuesta inmune y de protección contra las ITU<sup>56,66</sup>. La vacuna viable contra las ITU debe contener antígenos inmunogénicos localizados en la superficie bacteriana, estar involucrada en la patogénesis y tener una amplia distribución en cepas clínicas de UPEC<sup>45,84-86</sup>. Por lo tanto, se evaluó la distribución de los principales genes de virulencia en las 178 cepas clínicas de UPEC. Los resultados de los genes asociados a la adherencia, mostraron la siguiente distribución: el 99% (177/178) corresponden al gen *fimH*, 92.1% (164/178) a *csgA* y 43% (83/178) a *papG* (**Figura 2**). El gen *papGII* es la principal variante del gen *papG* y está distribuido principalmente en dos grupos filogenéticos (B2 y D), considerados como

cepas patógenas de *E. coli* en el ámbito hospitalario (**Figura 3**)<sup>70</sup>. Los grupos filogenéticos B2 y D relacionados estrechamente con los genes de adherencia también están ampliamente distribuidos en cepas clínicas de UPEC aisladas en diferentes hospitales en México<sup>87</sup>.



**Figura 2. Distribución de los principales genes de virulencia en cepas clínicas de UPEC.** Los genes asociados a la adherencia, movilidad, toxinas y de captación de hierro fueron identificados por PCR en 178 cepas clínicas de UPEC aisladas de niños del HIMFG. Los genes incluidos en este estudio fueron: *fimH* (Fimbria tipo 1), *papG* y *papF* (Fimbria P), *csgA* (Curli), *flhC* y *motB* (Flagelo), *hlyA* (Hemolisina A), *toxA* (Toxina RTX), *sat* (Toxina Autotransportadora de Secreción), *fyuA* (Yersiniabactina) e *iutD* (Aerobactina). El color rojo indica la presencia de los genes y el azul la ausencia.





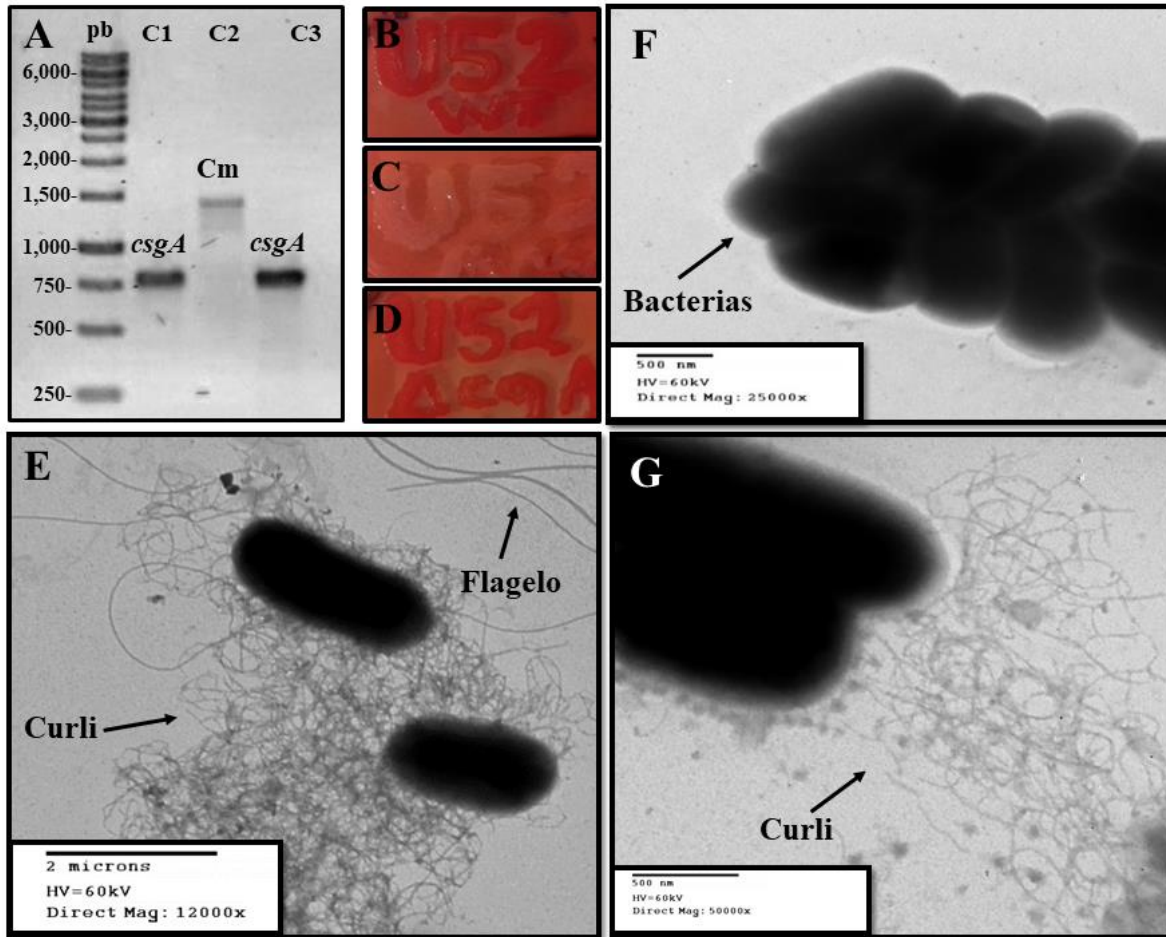
**Figura 3. Asociación entre los grupos filogenéticos y los principales genes de virulencia de cepas clínicas de UPEC.** Los grupos filogenéticos A, B1, B2 y D fueron determinados por PCR múltiple de acuerdo a la presencia de los genes *chuA*, *yjaA* y el fragmento génico TspE4.C2. El grupo B2 muestran un genotipo de *chuA*<sup>+</sup> e *yjaA*<sup>+</sup>, el grupo D de *chuA*<sup>+</sup> e *yjaA*<sup>-</sup>, grupo B1 de *chuA*<sup>-</sup> y TspE4.C2<sup>+</sup> y el grupo A de *chuA*<sup>-</sup> y TspE4.C2<sup>-</sup>. Las cepas de *E. coli* LMM36-ULA (*chuA*<sup>+</sup> e *yjaA*<sup>+</sup>) y *E. coli* LMM32-ULA (TspE4.C2<sup>+</sup>) fueron utilizadas como control. Los genes incluidos en este estudio fueron: *fimH* (Fimbria tipo 1), *papG* y *papF* (Fimbria P), *csgA* (Curli), *fliC* y *motB* (Flagelo), *hlyA* (Hemolisina A), *tosA* (Toxina RTX), *sat* (Toxina Autotransportadora de Secreción), *fyuA* (Yersiniabactina) e *iutD* (Aerobactina).

### La fimbria curli de UPEC participa en la adherencia a células de vejiga

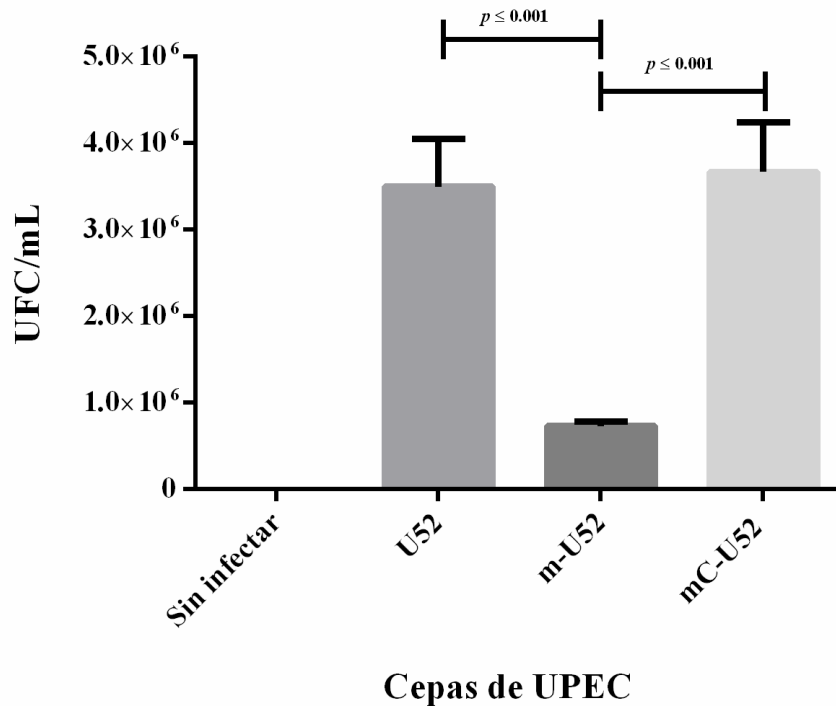
La fimbria curli está altamente distribuida en cepas clínicas de UPEC y se ha relacionado con la liberación de IL-8; sin embargo, su función en el tracto urinario no ha sido definida<sup>47,49,60,88</sup>.

A partir de la cepa clínica de UPEC 529U-0712, se generó una mutación en el gen *csgA* para determinar la función de curli en el proceso de colonización al tracto urinario. La cepa mutante fue nombrada como 529U-0712 *csgA*::Cm y fue restaurada a través de la complementación con el plásmido pJcsgG-C; la cual, fue denominada como 529U-0712 *csgA*::Cm-pJcsgG-C. La verificación genotípica de la mutación se realizó por PCR, obteniendo un amplicón de 788 pb para la cepa silvestre, 1400 pb para la mutante y 788 pb para el gen *csgA* en pJcsgG-C (**Figura 4A**).

La cepa mutante y su complementada se evaluaron fenotípicamente a través de la captación del colorante rojo Congo. Los resultados mostraron, la fijación del colorante en la cepa de UPEC 529U-0712, la pérdida de la retención del colorante en la mutante *csgA::Cm* y la restauración de la fijación de este colorante en la mutante *csgA::Cm* complementada con *pJcsgG-C* (**Figura 4B-D**). Es importante hacer énfasis que el colorante rojo Congo es capaz de teñir o intercalarse con complejos proteicos estables, como las estructuras amiloideas y es utilizado para la determinación de estas estructuras<sup>89</sup>. Curli tiene características proteicas semejantes a las estructuras amiloideas, son fimbrias delgadas, finas y sus propiedades fisicoquímicas favorecen el ensamblaje en forma de racimos para formar estructuras estables. Las micrografías de tinción negativa por MET, mostraron la presencia de estructuras finas y delgadas en las cepas UPEC 529U-0712 y 529U-0712 *csgA::Cm* complementada con *pJcsgG-C*; las cuales, sugieren por morfología la presencia de la fimbria curli. Mientras, la cepa de UPEC mutante *csgA::Cm* no mostró estas estructuras (**Figura 4E-G**). La función de curli de UPEC en la colonización del tracto urinario fue evaluada mediante ensayos de adherencia e invasión a células de vejiga humana HTB-5 en presencia de manosa. La interacción entre la adhesina FimH de la fimbria tipo 1 con la manosa, bloquea la colonización de UPEC a las células uroepitelio. El análisis cuantitativo de los ensayos de adherencia de UPEC 529U-0712 a células de vejiga, mostró una adherencia de  $7.33 \times 10^5$  UFC/mL y la cepa 529U-0712 *csgA::Cm* una adherencia de  $3.5 \times 10^6$  UFC/mL. De acuerdo al análisis estadístico la disminución de la adherencia mostró un cambio significativo del 79.1% y una  $p=0.0001$  (**Figura 5**).



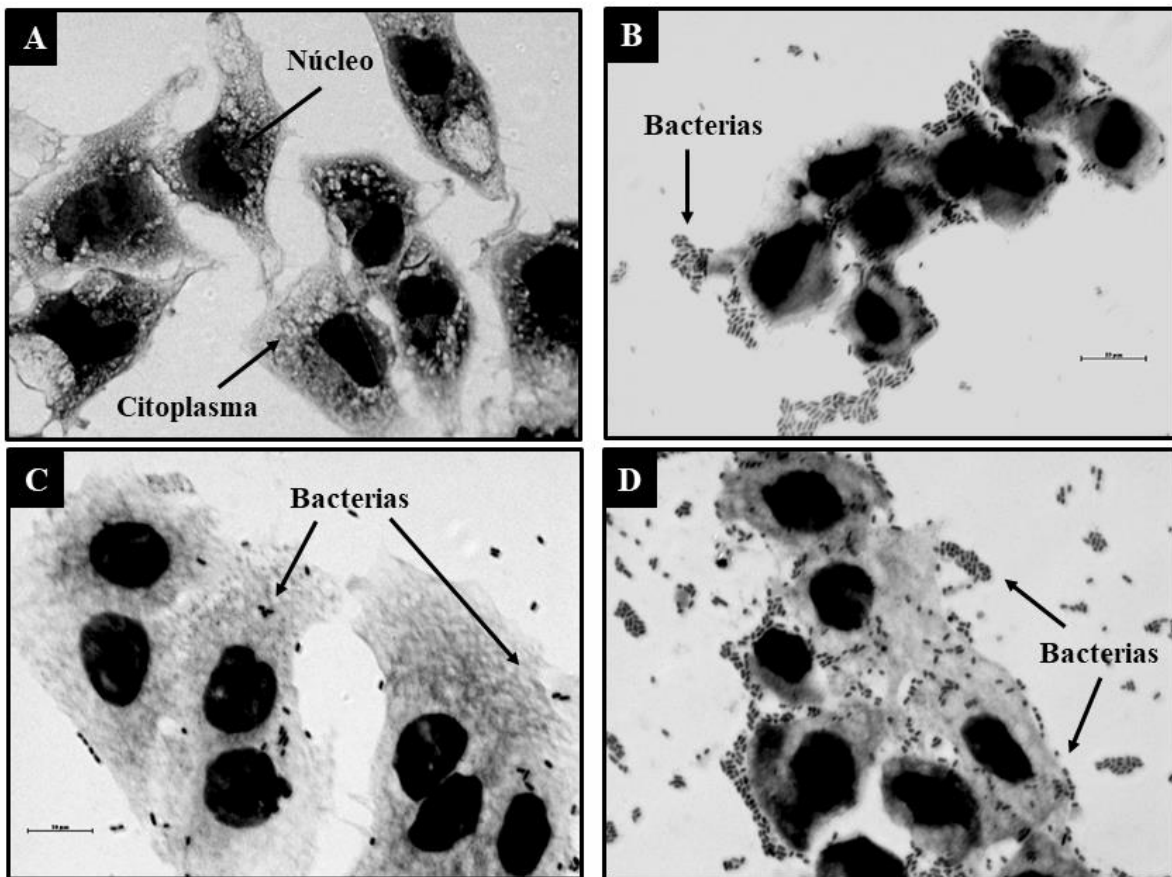
**Figura 4. Evaluación genotípica y fenotípica de UPEC.** En este estudio fueron incluidas la cepas: UPEC 529U-0712, la mutante en el gen *csgA* 529U-0712 *csgA::Cm* y la cepa 529U-0712 *csgA::Cm* complementada con el plásmido pJcsgG-C. A) La presencia del gen *csgA* en las diferentes cepas clínicas de UPEC se muestran en un gel de agarosa al 0.7%, teñido con bromuro de etidio. El carril 1 corresponde a la amplificación de *csgA* de 780 pb, el carril 2 al gen involucrado en la resistencia de cloranfenicol flanqueado por las regiones homologas de *csgA*, de 1400 pb y el carril 3 a la ampliación de *csgA* de 780 pb contenido en el plásmido pJcsgG-C. B) La cepa de UPEC 529U-0712 mostró un crecimiento bacteriano con coloración roja; la cual, indica la expresión de curli. C) La cepa 529U-0712 *csgA::Cm* careció de este fenotipo por la ausencia de la expresión de curli. D) La cepa 529U-0712 *csgA::Cm* con el plásmido pJcsgG-C restauró su fenotipo, similar a la cepa 529U-0712. Las micrografías de MET muestran la presencia de la fimbria curli en las cepas de UPEC E) 529U-0712 y G) 529U-0712 *csgA::Cm* con el plásmido pJcsgG-C. F) 529U-0712 *csgA::Cm* no fueron visualizadas las estructuras características de curli. Las micrografías fueron tomadas con la asesoría del Dr. Edgar Oliver López Villegas de la Central de Instrumentación de Microscopía de la Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-INP.



**Figura 5. Ensayo de adherencia a células de vejiga HTB-5.** La cepa de UPEC 529U-0712 (U52) y la cepa 529U-0712 *csgA::Cm* con el plásmido pJcsgG-C (mCU52) mostraron un perfil de adherencia similar; mientras, una reducción significativa ( $p \leq 0.001$ ) fue observada en la cepa 529U-0712 *csgA::Cm*. La cuantificación de UFC/mL fue realizada por microdilución en placa. Las barras representan el promedio  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. Las células sin infectar fueron utilizadas como control del experimento.

Las muestras de los ensayos de adherencia fueron analizadas también por análisis cualitativos través de la visualización por microscopia de luz después de la tinción con Giemsa. Las micrografías confirmaron el número de bacteria adheridas a la superficie de las células vejiga (**Figura 6**). La expresión de FimH de la fimbria tipo 1 de UPEC ensamblada en la superficie bacteriana se caracteriza para promover también el proceso de la invasión a células del tracto urinario<sup>14</sup>. Varios estudios han mostrado que la interacción de la proteína FimH con manosa bloquea el proceso de invasión por competición con el receptor manosilado presente en las células del tracto urinario<sup>48,90,91</sup>. La cepa mutante y su complementada fueron cultivadas en agar YESCA para favorecer la expresión de la fimbria curli<sup>88</sup>. Estas cepas también fueron incubadas con manosa durante 1 hora; ambas condiciones,

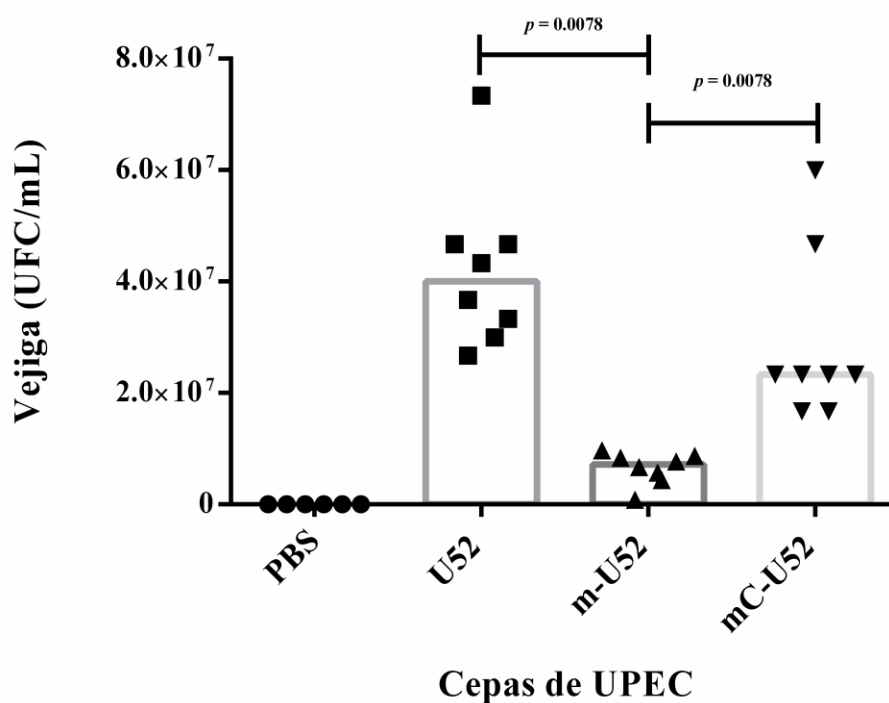
favorecieron la interacción de la bacteria con las células de vejiga HTB-5 vía la expresión de la fimbria curli. Las bacterias adheridas en las monocapas de las células de vejiga HTB-5 eliminadas después del tratamiento con gentamicina, indicó que después de la cuantificación de las UFC/mL no hubo un crecimiento de bacterias intracelulares. Estos datos indican que curli de UPEC no participa en el proceso internalización celular en el tracto urinario (datos no mostrados).



**Figura 6. Adherencia bacteriana a células de vejiga HTB-5.** Las muestras fueron visualizadas por microscopia de luz después de la tinción con Giemsa. A) Control sin infectar; B) Cepa 529U-0712; C) Cepa 529U-0712 *csgA::Cm*; D) Cepa 529U-0712 *csgA::Cm* con el plásmido *pJcsgG-C*. Las micrografías fueron procesadas a 100X.

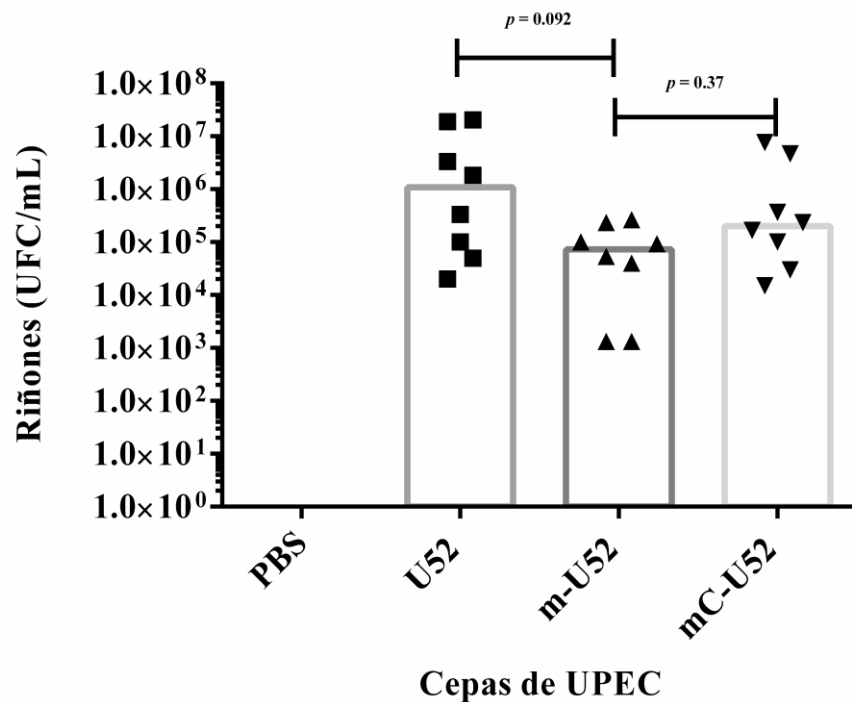
## La participación de curli de UPEC en la colonización *in vivo*

La función de curli de UPEC *in vivo* fue determinada en modelo murino de ITU usando ratones hembra C57BL/6 de 10 a 12 semanas. La cuantificación de UFC/mL en la vejiga mostró una disminución significativa ( $p = 0.00094$ ) de la cepa mutante 529U-0712 *csgA::Cm* ( $7.16 \times 10^6$  UFC/mL) cuando se comparó con las cepas de UPEC 529U-0712 ( $4.50 \times 10^7$  UFC/mL) y 529U-0712 *csgA::Cm* complementada con pJcsgG-C ( $2.33 \times 10^7$  UFC/mL) posterior a las 48 horas de la inoculación transuretral (**Figura 7**).



**Figura 7. Evaluación *in vivo* de la adherencia de UPEC a vejiga.** El modelo murino de ITU fue generado en ratones C57BL/6 hembras de 10-12 semanas con una inoculación transuretral de  $1 \times 10^8$  bacterias en  $100 \mu\text{L}$ . Después de 48 horas después de la infección, los ratones fueron sacrificados para obtener la vejiga; los cuales, fueron homogenizadas en PBS y cuantificadas las bacterias (UFC/mL) por órgano por microdilución en placa. La cepa de UPEC 529U-0712 (U52) y la cepa 529U-0712 *csgA::Cm* con el plásmido pJcsgG-C (mCU52) mostraron un perfil de adherencia similar; mientras, una reducción significativa ( $p = 0.0078$ ) fue observada en la cepa 529U-0712 *csgA::Cm*. La inoculación transuretral con PBS fue utilizada como control en el experimento.

La cuantificación de UFC/mL en los riñones de ratones C57BL/6 mostró una reducción no significativa ( $p=0.05$ ) con la cepa 529U-0712 *csgA::Cm* ( $7.30 \times 10^4$  UFC/mL), cuando se comparó con las cepas 529U-0712 ( $1.08 \times 10^6$  UFC/mL) y 529U-0712 *csgA::Cm* complementada con *pJcsgG-C* ( $6.50 \times 10^4$  UFC/mL) después de 48 horas de la inoculación transuretral (**Figura 8**).



**Figura 8. Evaluación *in vivo* de la adherencia de UPEC a riñón.** El modelo murino de ITU fue generado en ratones C57BL/6 hembras de 10-12 semanas con una inoculación transuretral de  $1 \times 10^8$  bacterias en  $100 \mu\text{L}$ . Después de 48 horas después de la infección, los ratones fueron sacrificados para obtener los riñones; los cuales, fueron homogenizadas en PBS y cuantificadas las bacterias (UFC/mL). La cepa de UPEC 529U-0712 (U52), la cepa 529U-0712 *csgA::Cm* (m-U52) y la cepa 529U-0712 *csgA::Cm* mostraron un perfil heterogéneo sin cambios significativos en la de colonización. La inoculación transuretral con PBS fue utilizada como control en el experimento.

Los datos generados en este estudio mostraron que la fimbria curli participa en la colonización de UPEC a vejiga; sin embargo, no participa en la colonización a riñón en

modelo murino. Otros estudios han indicado que curli en cepas clínicas de UPEC se ha asociado a bacteriemia y urosepsis; así como, en procesos que favorecen la formación de biopelículas en superficies abióticas, en la protección contra el péptido antimicrobiano LL-37 y en la inducción de IL-8<sup>48,88,92,93</sup>.

### **Las adhesinas FimH, CsgA y PapG son fusionadas *in silico* con el péptido EAAAK**

Los datos generados *in vitro* e *in vivo* en este estudio usando la cepa mutante y complementada de UPEC 529U-0712, muestran la participación de la fimbria curli en la colonización a células de vejiga (manuscrito en preparación). La distribución amplia de las tres principales fimbrias (tipo 1, P y curli) en cepas clínicas de UPEC asociadas a la colonización al tracto urinario, formación de biopelículas, modulación de la respuesta inmune y en el proceso de bacteriemia/septicemia, fueron la base principal para el diseño de la generación de las proteínas de fusión.

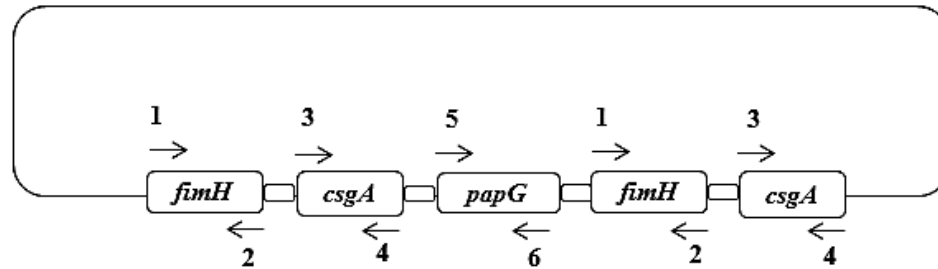
La proteína FimH contiene dos dominios conectados por 8 residuos de aminoácidos: 1) Dominio unión a manosa entre los residuos aminoácidos 1 al 150 y 2) Dominio pilina entre los residuos de aminoácidos 159 al 279<sup>94</sup>. La proteína PapG también contiene dos dominios: 1) Dominio de unión a Lectina entre los residuos del 1 al 198 y 2) Dominio pilina entre los residuos de aminoácidos 206 al 336<sup>95</sup>. La proteína CsgA contiene un dominio de nucleación entre los residuos de aminoácidos 22 y 41 con cinco repeticiones de estructuras láminas  $\beta$ <sup>96</sup>. A partir de las secuencias primarias, se identificó de manera teórica el péptido señal entre los residuos 1 a 27 de las adhesinas FimH y PapG; mientras, en la proteína CsgA se identificó entre los residuos de aminoácidos 1 al 21. Los péptidos señal de las adhesinas y la región de nucleación de CsgA fueron eliminadas de las secuencias maduras para el diseño de las proteínas de fusión; las cuales, fueron unidas con una secuencia de cinco residuos de



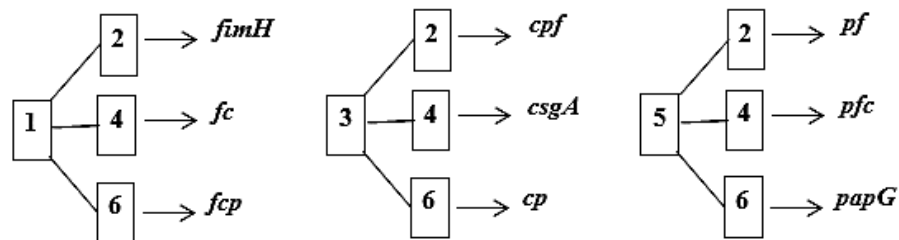
aminoácidos (EAAAK)<sup>5</sup>. Este péptido (EAAAK)<sup>5</sup> reveló una estructura hélice alfa, con una longitud de 39.95 Å aproximadamente y estabilizada por cinco puentes salinos entre los residuos de Glu<sup>-</sup> y Lys<sup>+</sup>. Datos de difracción de rayos X de ángulo bajo (SAXS, por sus siglas en inglés), ha mostrado que este péptido (EAAAK)<sup>n</sup> forma oligómeros cuando es utilizado para proteínas de fusión con hélices cortas (n=2 a 3) y con hélices largas (n=4 a 5) generan proteínas solubles y con una función específica<sup>97,98</sup>. La secuencia de nucleótidos que codifica (EAAAK)<sup>5</sup> junto con los genes de *fimH*, *csgA* y *papG*, fue esencial para el diseño del gen plantilla de fusión, con el siguiente orden: *fimH-csgA-papG-fimH-csgA* definido como *fcpfc* (**Figura 9A**).

La optimización de codones preferenciales en la plantilla *fcpfc* presentó un valor de CAI de 1.0 y un contenido del 55.4% de GC. Las secuencias con codones preferenciales han sido utilizadas para aumentar la tasa de expresión de proteínas en estudios previos<sup>99-101</sup>. El gen de fusión *fcpfc* diseñado y optimizado, fue la plantilla para generar las tres variantes de genes diméricos (*fc*, *cp* y *pf*) y las tres variantes de genes triméricos (*fcp*, *cpf*, y *pcf*) con iniciadores específicos como se ha descrito en la **Tabla 1** y **Figura 9B**. Las variantes diméricas y triméricas separados con el péptido (EAAAK)<sup>5</sup> reducen los errores de plegamiento de los diferentes monómeros y facilita la localización de cada uno de ellos. Análisis *in silico* de otros estudios, han mostrado que el orden de los monómeros en la proteína de fusión basada en FimH de UPEC y MrpH de *Proteus mirabilis*, es crítica para la estabilidad y plegamiento de sus estructuras tridimensionales<sup>66</sup>.

A



B



**Figura 9. Diseño y estrategia de clonación para la generación de las proteínas de fusión.** A) La secuencia genética plantilla contiene el siguiente orden: *fimH-csgA-papG-fimH-csgA* unido a una secuencia GAAGCGGCGGCGAAA; la cual, es repetida cinco veces. B) La generación de los genes de fusión se realizó por combinación de iniciadores para cada uno de los genes. La nomenclatura utilizada para nombrar los genes dimérico y trimérico fue la primera letra: *fimH* (*f*), *csgA* (*c*) y *papG* (*p*).

### Viabilidad de las proteínas de fusión FC y FCP

Las herramientas bioinformáticas se han utilizado para el diseño de propuestas de vacunas en *Helicobacter pylori*, *E. coli* enterotoxigénica, *Brucella*, virus de la influenza y UPEC<sup>56,102–106</sup>. La predicción de epítomos lineales usando las secuencias primarias de las proteínas de fusión reveló entre 18 a 32 epítomos para las proteínas diméricas y entre 32 a 33 epítomos para las proteínas triméricas (**Tabla 2**). La predicción de péptidos que unen MHC clase II mostró entre 68 a 147 secuencias de aminoácidos para las proteínas diméricas y entre 149 a 159 para las proteínas triméricas (**Tabla 2**). La predicción de epítomos para células B y de péptidos que unen a MHC clase II en diferentes antígenos, es una herramienta importante para el diseño de vacunas<sup>85,107</sup>. Como se había considerado en los antecedentes, el péptido

(EAAAK)<sup>5</sup> utilizado para unir las proteínas en la fusión no mostró epítomos lineales y péptidos de unión a MHC clase II.

**Tabla 2: Predicción de epítomos de células B y péptidos que unen MHC clase II de las proteínas de fusión.**

Proteína de fusión	Epítomos lineales	Epítomos conformacionales	Péptidos que unen a MHC clase II
FC	18	13	86
CP	27	12	68
PF	32	8	147
FCP	32	17	149
CPF	33	14	152
PFC	33	13	159

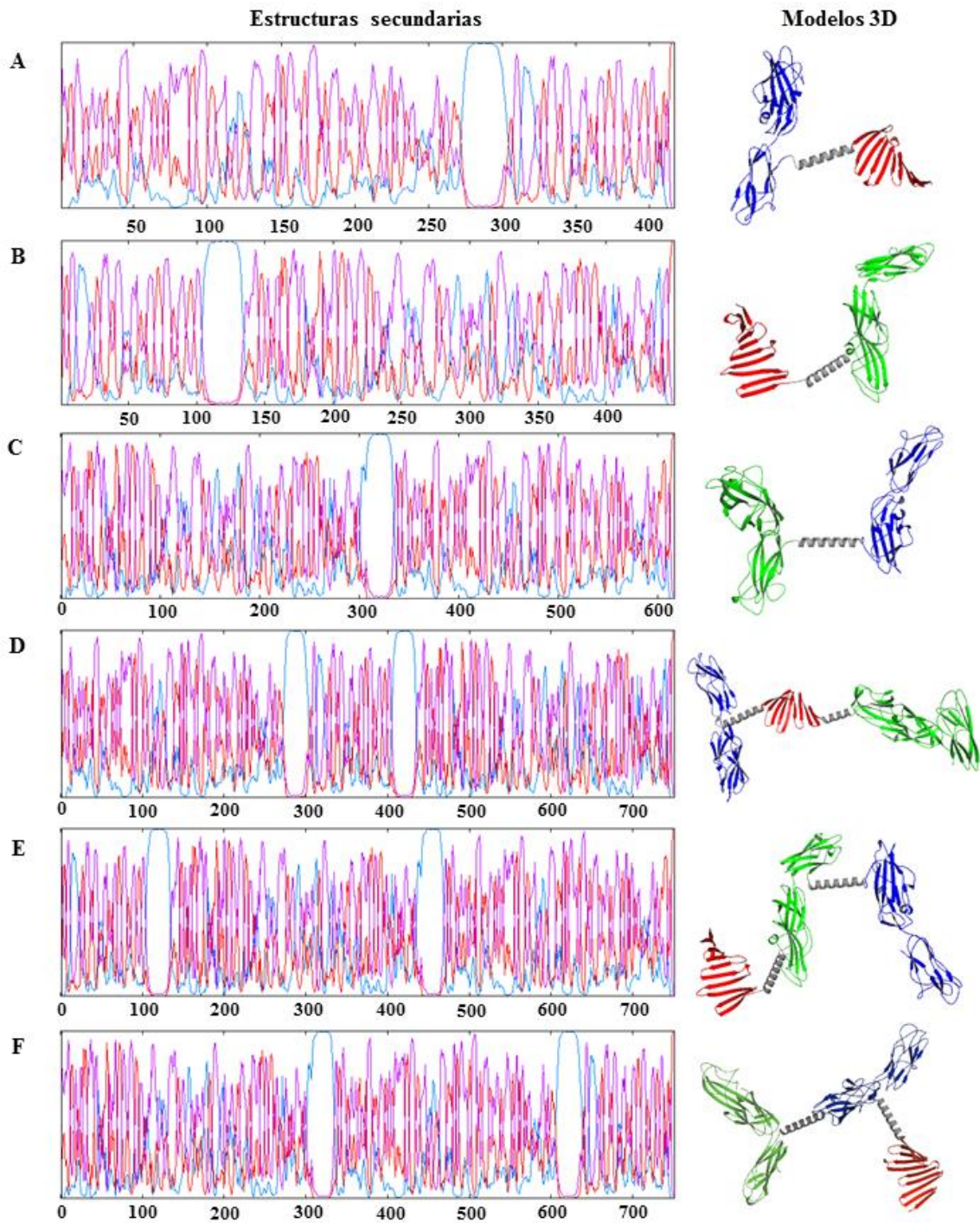
La predicción de estructuras secundarias en las proteínas de fusión mostró un alto porcentaje de estructuras al azar, seguido de estructuras hebras beta y hélice alfa. Además, en el péptido (EAAAK)<sup>5</sup> fue identificada una región hélice alfa (**Figura 10**). Las proteínas con alto contenido de estructuras al azar son consideradas antigénicas por la flexibilidad en estas regiones; las cuales, permiten la interacción entre proteínas<sup>108,109</sup>. El refinamiento y minimización de la estructura tridimensional (3D) de las proteínas diméricas y triméricas después de 10 ciclos mostró valores óptimos de energía (**Figura 11 y Tabla 3**). Brevemente, la estructura dimérica tridimensional de mayor estabilidad fue la proteína FC con valores de energía libre de Gibbs ( $\Delta G$ ) de -7,040.78 kcal/mol, seguida de la estructura trimérica tridimensional de la proteína FCP con -13,343.83 kcal/mol (**Tabla 3**). Entre el 94.7 al 93.1% de los residuos de aminoácidos de las estructuras 3D de las proteínas FC y FCP, se ubicaron en las regiones permitidas en el gráfico de Ramachandran. El valor Z fue de -6.95 para la proteína FC y -9.53 para FCP cuando se compararon con las estructuras resueltas por difracción de rayos X y resonancia magnética nuclear (RMN) (**Tabla 3**). El valor de RMSD usando la estructura resuelta del dominio de unión a manosa de FimH, mostró un valor de

1.81 para la proteína FC, 1.67 Å para FCP y 1.62 Å para la proteína FCP con el dominio lectina de PapG (**Tabla 3**). La proteína CsgA no cuenta con datos cristalográficos en la base de datos PDB; sin embargo, los datos generados por difracción circular y NMR usando fibras de curli sugieren la presencia de estructuras en lámina beta paralelas<sup>110</sup>. Los datos generados en este estudio a través de modelos 3D de la proteína CsgA, diméricas (FC y CP) y triméricas, proyectaron moléculas con estructuras beta amiloideas.

**Tabla 3: Parámetros para el modelado 3D, refinamiento y validación de las proteínas de fusión.**

Proteína de fusión	Ciclos de refinamiento	Energía de minimización ( $\Delta G$ )	Gráfico de Ramachandran	Z-score	RMSD (FimH-PapG)
FC	10	-11,912.82 kcal/mol	94.70%	-6.97	1.81 Å-NA
CP	10	-7,040.78 kcal/mol	92.30%	-7.7	NA-2.02 Å
PF	10	-7,140.54 kcal/mol	92.40%	-7.7	1.83 Å-1.37 Å
FCP	10	-13,866.68 kcal/mol	93.10%	-9.53	1.67 Å-1.62 Å
CPF	10	-13,343.83 kcal/mol	92.50%	-10.72	1.99 Å-2.02 Å
PFC	10	-13,577.65 kcal/mol	91.90%	-10.68	1.88 Å-1.38 Å

El cálculo de RMSD fue generado con el dominio de unión a manosa FimH (PDB 1TR7) y el dominio lectina de PapG (PDB 1J8R). NA, no aplica.



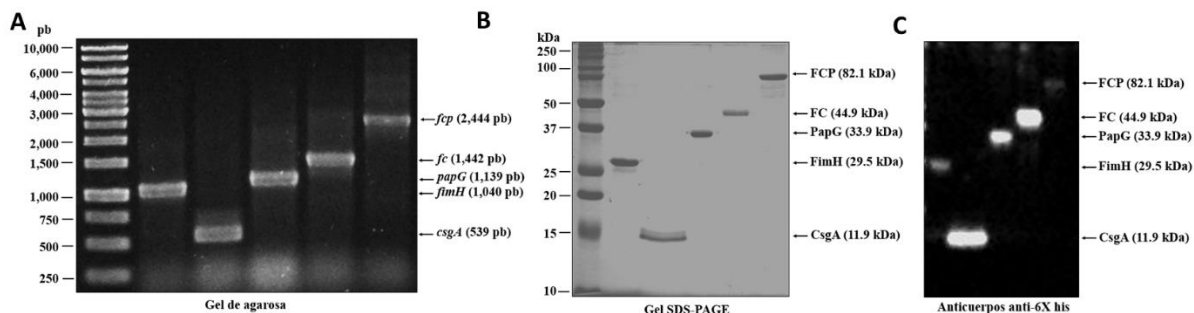
**Figura 11. Predicción de la estructura secundaria y terciaria de las proteínas de fusión.** A) Proteína FC. B) Proteína CP. C) Proteína PF. D) Proteína FCP. E) Proteína CPF. F) Proteína PFC. Estas proteínas fueron representadas como: La proteína FimH en azul, CsgA en rojo, y PapG en verde. La alfa hélice del péptido EAAAK se representó en color gris. Predicción de la estructura secundaria: Laminas beta (Púrpura), hélice (Azul).

Los modelos 3D de cada una de las proteínas de fusión proyectaron diferentes epítomos conformacionales con intervalos entre 8 a 17 secuencias de aminoácidos (**Tabla 2**). En la proteína FimH se identificó un epítomo conformacional entre los residuos de aminoácidos 1 al 25 que corresponde al sitio de unión a manosa y se ha relacionado también con la unión de anticuerpos anti-FimH para conferir protección contra las ITU causadas por UPEC<sup>52</sup>. En la proteína PapG se identificó un epítomo conformacional con cuatro residuos de aminoácidos (1, 63, 155 y 173) relacionado con el sitio de unión a Gal( $\alpha$ 1-4)Gal del dominio lectina (conformado entre los residuos de aminoácidos 1 al 198)<sup>95</sup>. Para las proteínas CsgA, FC, CP, FCP, CPF y PFC, se identificaron dos epítomos en las regiones de unión a componentes de matriz extracelular. Estos epítomos son conformados cuando interacciona las repeticiones 4 y 5 de estructuras betas de la proteína CsgA con propiedades hidrofóbicas<sup>111,112</sup>. El uso de herramientas bioinformáticas incluidas en este estudio para el diseño de las proteínas fusión, ha permitido reducir los riesgos experimentales y ha favorecido la optimización de recursos, como se ha descrito en otros estudios<sup>113</sup>. Las proteínas de fusión FC y FCP mostraron estructuras estables con altos números de epítomos conformacionales y péptidos de unión a MHC clase II; sin embargo, un número bajo de epítomos conformacionales se identificaron en las otras proteínas díméricas y triméricas. De acuerdo a este análisis, las proteínas FC y FCP fueron seleccionadas para su caracterización; además, se incluyeron las proteínas monoméricas FimH, CsgA y PapG como controles en este estudio.

### **Clonación, transformación y purificación de las proteínas de fusión**

El análisis bioinformático fue una herramienta esencial para la selección de los genes monoméricos (*fimH*, *csgA* y *papG*), dímérico (*fc*) y trimérico (*fc**p*); los cuales, fueron

clonados en el plásmido de expresión pLATE31 del sistema aLICator. El análisis de PCR, mostró amplicones de 1040 pb para *fimH*, 539 pb para *csgA*, 1139 pb para *papG*, 1442 pb para *fc* y 2,444 pb para *fcp* (**Figura 12A**). La secuenciación de cada uno de los genes confirmó la correcta clonación (Datos no mostrados).



**Figura 12. Generación de las proteínas de fusión.** A) Los iniciadores específicos para cada uno de los genes fueron usados para la amplificación de los genes de fusión por PCR; los cuales, fueron clonados en el plásmido pLATE31 y verificados por PCR. B) Los genes de fusión clonados en pLATE31 fueron usados para transformar a *E. coli* BL21 (DE3). La expresión de las proteínas se favoreció con la inducción con 1 mM de IPTG y la purificación de las proteínas de fusión se realizó por cromatografía de afinidad a Ni-NTA. C) El análisis de Western blot con anticuerpos anti-6His (C-Term) marcados con HRP mostró la presencia de las proteínas monoméricas, diméricas y triméricas.

La proteínas de fusión obtenidas de cultivos de *E. coli* BL21 (DE3) fueron localizadas en la fracción insoluble posterior a la incubación de 5 horas con 1 mM de IPTG. Por este motivo, la purificación de las proteínas de fusión inducidas en la cepa de *E. coli* BL21 (DE3), se realizó bajo condiciones desnaturalizantes con GdnHCl y urea con la finalidad de solubilizar los posibles cuerpos de inclusión<sup>96,114</sup>. Los geles de SDS-PAGE al 14% y los Western blot mostraron una banda proteica de 26.5 kDa para FimH, 11.9 kDa para CsgA, 33.9 kDa para PapG, 44.9 kDa para FC y 82.1 kDa para FCP (**Figura 12 B y C**). El peso molecular de cada una de estas proteínas fue confirmado a través de la predicción de las propiedades fisicoquímicas (**Tabla 4**). Es importante mencionar que la proteína CsgA fue tratada con ácido fórmico al 80% para evitar la formación de agregados amiloideos y facilitar

su visualización en los geles de SDS-PAGE<sup>83</sup>. El análisis de espectrometría de masas por MALDI-TOF/TOF de las proteínas obtenidas de los geles, indicó la presencia de péptidos específicos que correspondieron a las proteínas de fusión. Los ensayos de DLS fueron realizados después de determinar la concentración de proteína de 2.7 mg/mL para FimH, 0.697 mg/mL para CsgA, 2.63 mg/mL para PapG, 1.03 mg/mL para FC y 0.998 mg/mL para FCP. Los resultados mostraron un estado polidisperso para cada una de las proteínas de fusión (**Tabla 5**).

**Tabla 4. Análisis de los parámetros fisicoquímicos de las proteínas**

Proteína	No. de aminoácidos	Peso Molecular (kDa)	pI teórico	Coefficiente de Extinción	Tiempo de vida media	Índice de Inestabilidad	Índice Alifático	GRAVY
FimH	283	29.64	6.63	1.179	10	25.59	85.72	0.029
CsgA	116	12.06	5.58	0.826	10	16.23	51.38	-0.791
PapG	316	35.38	8.89	1.882	10	25.89	74.05	-0.364
FC	417	43.09	5.66	1.043	10	21.74	76.07	-0.183
CP	450	48.83	6.92	1.563	10	21.37	68.58	-0.443
PF	617	66.4	8.44	1.529	10	25.58	79.68	-0.161
FCP	751	79.85	6.74	1.397	10	22.37	75.39	-0.245
CPF	751	79.85	6.74	1.397	10	22.37	75.39	-0.245
PFC	751	79.85	6.74	1.397	10	22.37	75.39	-0.245

**Tabla 5. Caracterización de las proteínas de fusión por DLS**

Proteínas	T (°C)	Z-Ave (d.nm)	PdI
FimH	24.9	132.8	0.276
CsgA	24.9	2.97E+04	0.948
PapG	25	264.9	0.253
FC	24.9	381.2	0.665
FCP	25	113.8	0.451

PdI  $\leq$  0.04, monodispersado; PdI  $\geq$  0.04, polidispersado

La proteína CsgA mostró un índice de polidispersividad (PdI) de 0.948 y un tamaño de partícula [promedio Z (radio hidrodinámico)] de  $2.97 \times 10^4$  nm; el cual, confirmó la

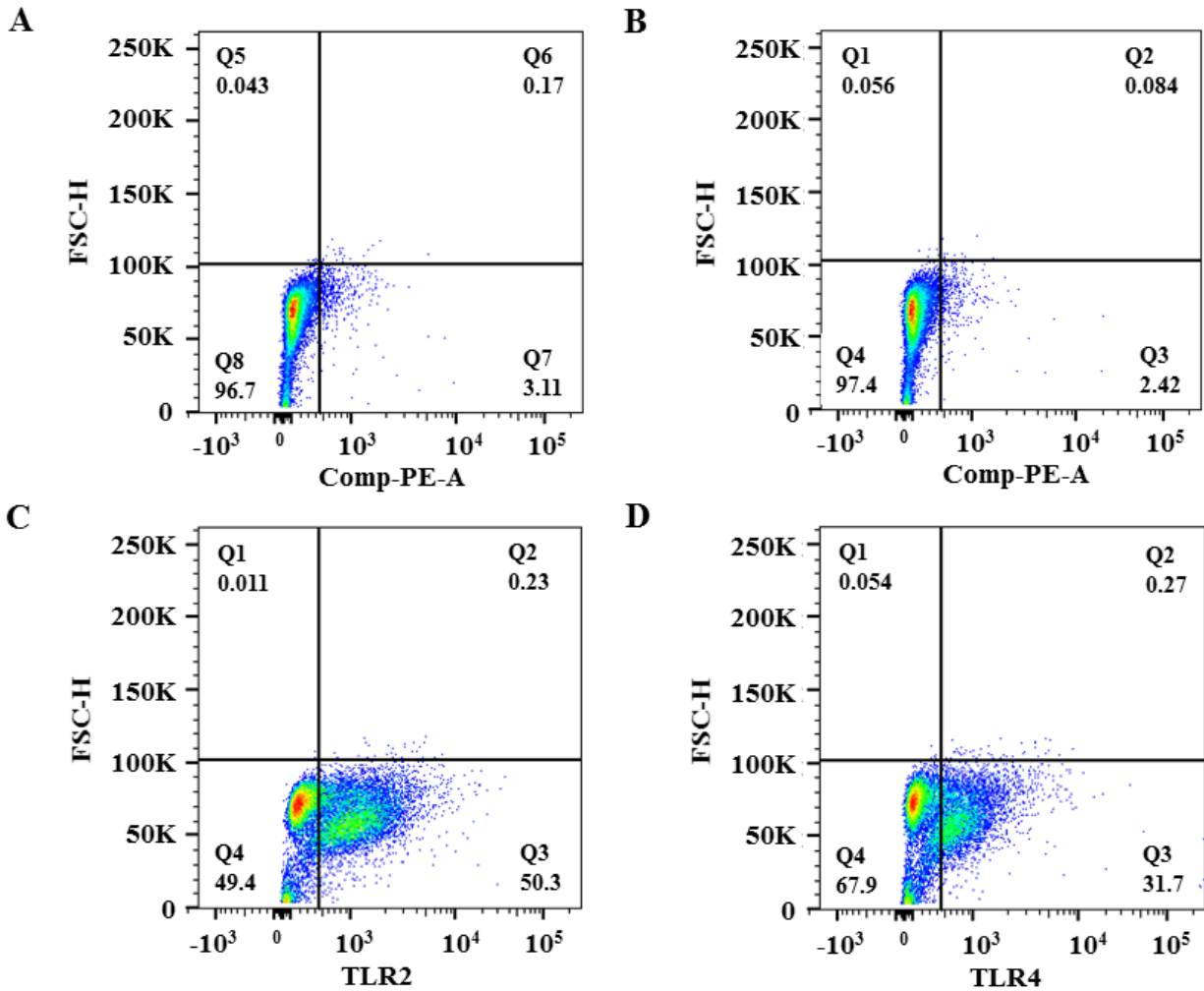


formación de agregados amiloideos favorecida por la interacción CsgA-CsgA. Las proteínas FC y FCP mostraron un valor de PDI y de Z menor comparado con los valores de la proteína CsgA. Estos datos indican una disminución de los agregados de CsgA por la interacción con FimH y/o PapG. Por lo tanto, para el corrimiento electroforético de las proteínas de fusión en geles SDS-PAGE no requirieron el pretratamiento con ácido fórmico. Las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC y FCP mostraron niveles apropiados de endotoxina ( $\leq 0.012$  EU/mL) para los ensayos de bioactividad e inmunizaciones.

### **Actividad biológica de las proteínas de fusión**

La actividad de una proteína de fusión depende de la separación entre monómeros, de la estabilidad y de su plegamiento<sup>115</sup>. La estimulación de una respuesta inflamatoria por los TLR depende de la estructura del PAMP y de la estabilidad de la interacción con el PRR<sup>68</sup>. La expresión de los TLR2 y TLR4 aún no se ha descrito en células de carcinoma transicional anaplásico (TCCSUP) de vejiga humana HTB-5<sup>116</sup>. Análisis por citometría de flujo mostró una expresión del 50.3% para el TLR2 y del 31.7% para el TLR4 (**Figura 13**).

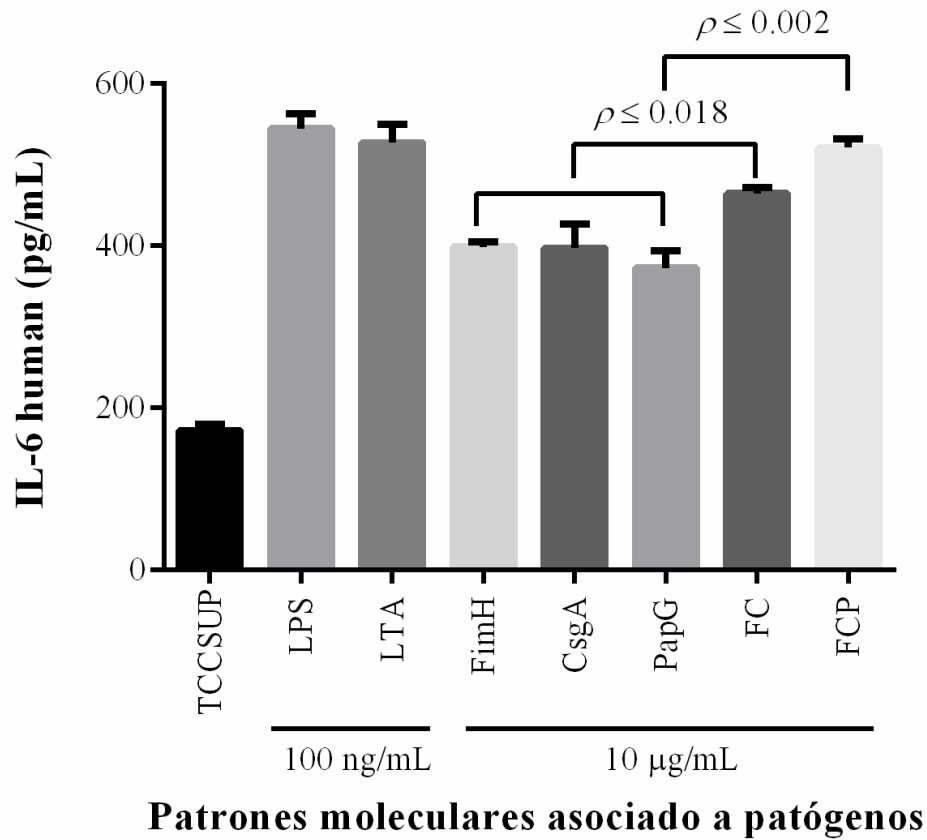
Las proteínas FimH, CsgA y PapG (10  $\mu\text{g/mL}$ ) estimularon la liberación de IL-6 entre 372 y 398 pg/mL en células HTB-5, sin observar diferencias significativas entre ellas. Varios autores han descrito que las adhesinas fimbriales FimH y PapG son consideradas PAMP que participan en la liberación de citocinas IL-6 e IL-8 vía la interacción con correceptores  $\alpha$ -manosilados y glicosfingolípidos del TLR4 localizados en la mucosa de tracto urinario<sup>57,117</sup>.



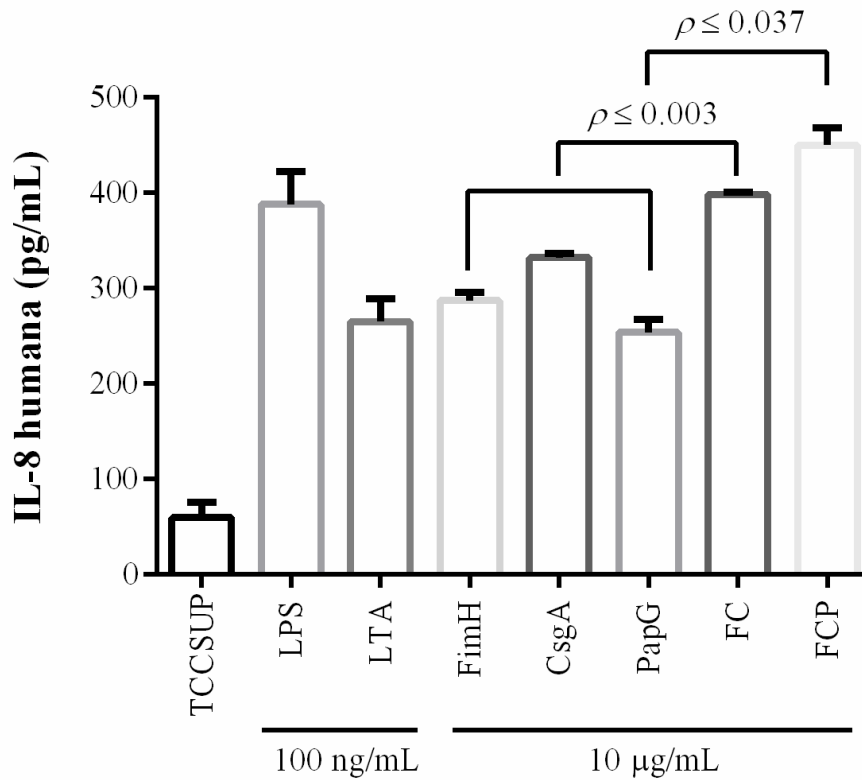
**Figura 13. Expresión de TLR2 y TLR4 en las células de vejiga HTB-5.** La expresión de TLR2 y TLR4 en HTB-5 células de la vejiga humana se analizó por citometría de flujo. A) Células HBT-5 no teñidas. B) Células HTB-5 con anticuerpo secundario. C) Expresión de TLR2 en células HTB-5 detectada con anticuerpos anti-TLR2 conjugados con fluoresceína. D) Expresión de TLR4 en células HTB-5 detectada con anticuerpos conjugados anti-TLR4/MD-2 conjugados con ficoeritrina.

La fimbria curli está implicada en la unión al dímero TLR2-TLR1 y estimula la liberación de IL-6 en macrófagos aislados de medula espinal<sup>118</sup>. Interesantemente, la liberación de IL-6 incrementó a 464.79 pg/mL para la proteína FC y de 521.24 pg/mL para la proteína FCP (**Figura 14**). Por otro lado, la proteína FC ( $p \leq 0.003$ ) estimulo la liberación de IL-8 con valores de 398.52 pg/mL y FCP ( $p \leq 0.037$ ) de 450.40 pg/mL (**Figura 15**). La

liberación de IL-6 e IL-8 por las proteínas de fusión probablemente es a través de la señalización sinérgica de los TLR2 y TLR4. Otros estudios han indicado que los TLR4 y TLR5 son activados por la interacción de FimH y FliC<sup>119</sup>.



**Figura 14. Proteínas de fusión activan la liberación de IL-6.** Las células HTB-5 fueron tratadas con 10 µg/mL de cada una de las proteínas de fusión y la liberación de IL-6 en los sobrenadantes fue detectada por ELISA. Las barras representan el promedio ± D.E de tres experimentos independientes. LPS y LTA (100 ng/mL) fueron usados como controles.



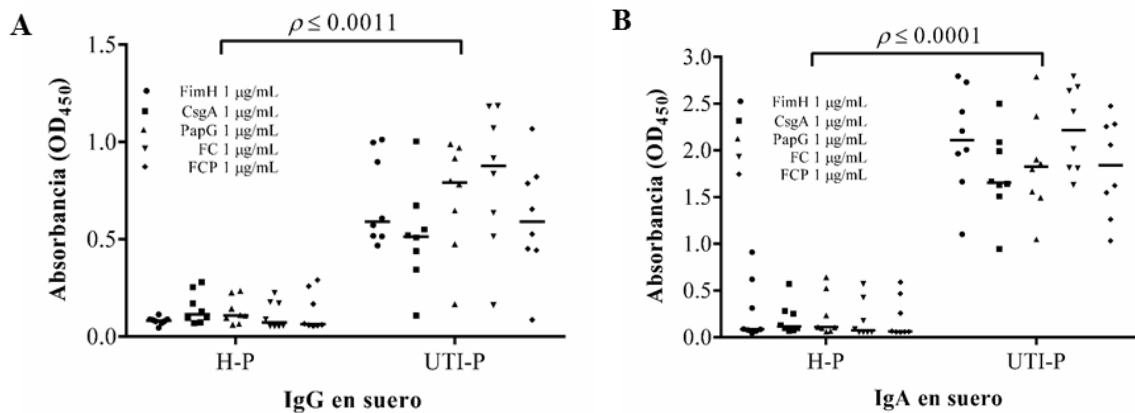
### Patrones moleculares asociados a patógeno

**Figura 15. Proteína de fusión activan la liberación de IL-8.** Las células HTB-5 fueron tratadas con 10 µg/mL de cada una de las proteínas de fusión y la liberación de IL-8 en los sobrenadantes fue detectada por ELISA. Las barras representan el promedio  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. LPS y LTA (100 ng/mL) fueron usados como controles.

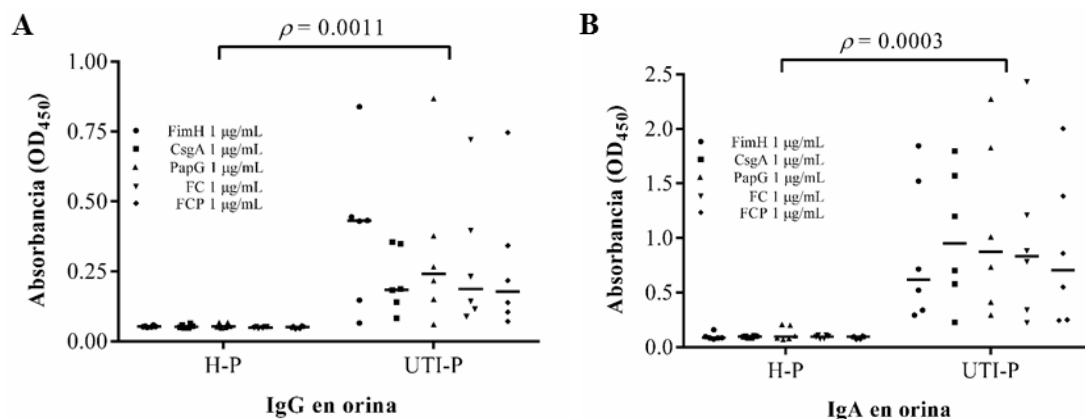
### Proteínas de fusión reaccionan contra sueros y orina de pacientes pediátricos

Las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC y FCP mostraron una alta reactividad contra sueros y orinas de pacientes con ITU, indicando la presencia de anticuerpos contra estas proteínas. Estos datos indican que las adhesinas fimbriales son antigénicas y expresadas *in vivo* durante un proceso infeccioso<sup>120</sup>. Las proteínas de fusión mostraron altos niveles de anticuerpos IgA en los sueros de pacientes con ITU con un valor medio de DO<sub>450</sub> entre 1.628 y 2.216. La proteína de fusión FC fue la molécula con mayor capacidad antigénica para interactuar con los anticuerpos IgA; sin embargo, mostró una baja capacidad para interactuar con los

anticuerpos IgG con un valor medio de  $DO_{450}$  de 0.837 (**Figura 16**). La respuesta serológica en pacientes con ITU contra fimbrias de UPEC ha sido descrita en pocos estudios. Niveles altos de IgG se han detectado al inicio de una infección y con incrementos de IgA conforme cursa dicha infección<sup>121</sup>. Es importante hacer énfasis, que anticuerpos IgA e IgG contra fimbrias no se han identificados en muestras orina; aunque, si se han detectado diferentes niveles de anticuerpos IgA y IgG contra LPS y la capsula de UPEC<sup>121-123</sup>. Las proteínas de fusión incluidas en este estudio, mostraron niveles de anticuerpos IgA entre valores de 0.6189 y 0.950 ( $p = 0.0003$ ) de  $DO_{450}$  en las muestras de orina de los pacientes con ITU (**Figura 17A**). Mientras, los niveles de IgG en orina mostraron valores de 0.444 y 0.619 de  $DO_{450}$  contra las proteínas de fusión (**Figura 17B**).



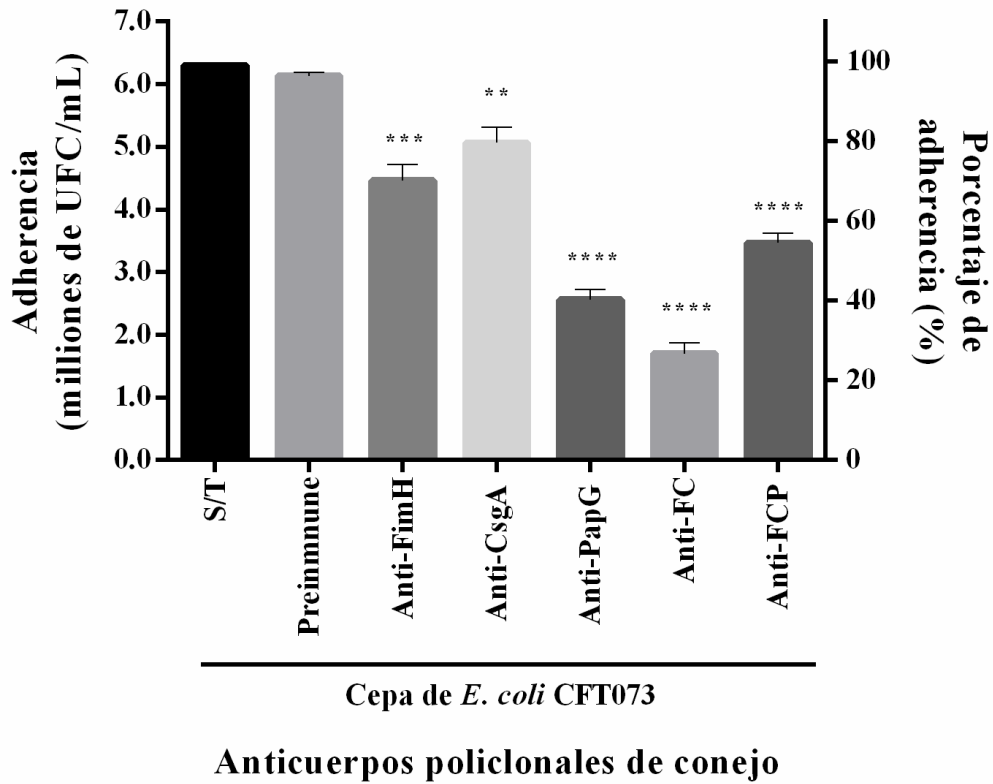
**Figura 16. Detección de anticuerpos IgG e IgA en el suero de pacientes con ITU.** (A) Un incremento significativo ( $p \leq 0.0011$ ) de anticuerpos IgG en suero de pacientes (UTI-P) fue detectado, comparado con los valores de anticuerpos IgG en suero de pacientes sanos (H-P). (B) Anticuerpos IgA en suero de UTI-P mostraron incrementos significativos ( $p \leq 0.0001$ ), comparado con los anticuerpos IgA en suero de H-P. Los ensayos de ELISA fueron realizados por triplicado con 1  $\mu\text{g/mL}$  de cada una de las proteínas. Los puntos representan valores individuales y las barras representan la mediana.



**Figura 17. Detección de anticuerpos IgG e IgA en la orina de pacientes con ITU.** (A) Un incremento significativo ( $p = 0.0011$ ) en anticuerpos IgG en orina de pacientes con ITU (UTI-P) fue detectado comparado con los valores de anticuerpos IgG en pacientes sanos (H-P). (B) Anticuerpos IgA en orina de UTI-P mostraron incrementos significativos ( $p = 0.0003$ ), comparado con los anticuerpos IgA en suero de H-P. Los ensayos de ELISA fueron realizados por triplicado con 1 µg/mL de cada una de las proteínas. Los puntos representan valores individuales y las barras representan la mediana.

### Inhibición de la adherencia de UPEC a células de vejiga

La finalidad de las proteínas de fusión fue implementar una biomolécula capaz de generar una respuesta inmune humoral para bloquear la adherencia de UPEC al tracto urinario. Los anticuerpos policlonales contra las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC y FCP inhibieron la adherencia de UPEC a células de vejiga HTB-5. Los anticuerpos policlonales mostraron una reducción significativa del 32% para anti-FimH ( $p = 0.002$ ), 21% para anti-CsgA ( $p = 0.0011$ ), 60% para anti-PapG ( $p < 0.0001$ ), 73% para anti-FC ( $p < 0.0001$ ) y 46% para anti-FCP ( $p < 0.0001$ ), comparado con los niveles de adherencia de la cepa de UPEC CFT073 (**Figura 18**). Los sueros pre-inmune utilizados como muestras control no bloquearon la adherencia, indicando que la reducción de adherencia fue por la presencia de anticuerpos contra las proteínas de fusión.



**Figura 18. Reducción de la adherencia bacteriana por la presencia de anticuerpos policlonales.** Las células de vejiga HTB-5 (MOI 1:100) fueron infectadas con la cepa *E. coli* CFT073; después de 1 hora de incubación con suero de conejos inmunizados con las proteínas FimH, CsgA, PapG, FC, FCP (1:1). Los anticuerpos policlonales de conejo favorecieron una reducción en la adherencia bacteriana (CFU/mL y porcentaje) después de 3 horas de infección. La adherencia de la cepa CFT073 sin anticuerpos y con una mezcla de cada uno de los sueros preinmunes. Las barras representan el promedio  $\pm$  D.E de tres experimentos independientes. \*\*p = 0.0011, \*\*\*p = 0.0002, and \*\*\*\*p < 0.0001.

## **Conclusiones**

Las proteínas de fusión fueron diseñadas considerando la distribución de las principales adhesinas fimbriales, la predicción de su antigenicidad y la participación en la patogénesis de UPEC. Las proteínas FC y FCP fueron las biomoléculas de mayor funcionalidad por su capacidad para liberar citocinas y por su alta expresión *in vivo* de acuerdo a los anticuerpos presentes en muestras de orina y suero de pacientes con ITU. Estas proteínas de fusión pueden ser consideradas viables para el diseño de una vacuna contra las ITU por su capacidad de protección contra la adherencia de UPEC a células de vejiga.



## **Perspectivas**

Los datos obtenidos en este estudio muestran la viabilidad de las proteínas de fusión para la generación de una vacuna contra las ITU. La probable vacuna debe ser soluble; por este motivo, es necesario proponer un amortiguador que incluya chaperonas artificiales y compuestos que promueven puentes disulfuro, cambios en la fuerza iónica y estabilidad en las proteínas de fusión. Una vacuna viable debe contener proteínas estables con un plegamiento adecuado; la cual, pueda generar una respuesta inmune adecuada con anticuerpos protectores contra los antígenos involucrados. La estabilidad podrá ser confirmada por Calorimetría Diferencial de Barrido (DSC, por sus siglas en inglés) y la determinación de las estructuras secundarias de las proteínas triméricas por Dicroísmo Circular (CD, por sus siglas en inglés). La estructura terciaria puede ser evaluada por CD y por Fluorescencia Extrínseca (FE) usando anilino naftaleno sulfonato (ANS) como fluoróforo externo. La vacuna viable contra las ITU debe ser evaluada su inmunogenicidad y capacidad protectora *in vivo*. La inmunización intranasal induce una respuesta inmune de mucosas y la aplicación de las proteínas de fusión por esta vía permitirá la evaluación de parámetros inmunológicos, tales como: proliferación de células del sistema inmune, cuantificación citocinas proinflamatoria y antiinflamatorias. La estandarización del modelo murino de ITU realizado en este proyecto permitirá la evaluación de la capacidad protectora de las proteínas de fusión contra la bacteria de UPEC.

## Referencias

1. Foxman, B. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **7**, 653–660 (2010).
2. Foxman, B. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect. Dis. Clin. North Am.* **28**, 1–13 (2014).
3. Foxman, B. Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Am. J. Med.* **113 Suppl 1A**, 5S–13S (2002).
4. Kumar, S., Dave, A., Wolf, B. & Lerma, E. V. Urinary tract infections. *Dis.--Mon. DM* **61**, 45–59 (2015).
5. Secretaria de Salud. Panorama epidemiológico de las infecciones de vías urinarias en México 2003-2008. [http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/grupo/veinte\\_principales\\_causas\\_enfermedad\\_nacional\\_grupo\\_edad.pdf](http://www.epidemiologia.salud.gob.mx/anuario/2015/morbilidad/grupo/veinte_principales_causas_enfermedad_nacional_grupo_edad.pdf) (2015).
6. Secretaria de Salud. Anuario de Morbilidad 1984 - 2016. (2016).
7. Schlager, T. A. Urinary Tract Infections in Infants and Children. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
8. Kline, K. A. & Lewis, A. L. Gram-Positive Uropathogens, Polymicrobial Urinary Tract Infection, and the Emerging Microbiota of the Urinary Tract. *Microbiol. Spectr.* **4**, (2016).
9. Lloyd, A. L., Rasko, D. A. & Mobley, H. L. T. Defining genomic islands and uropathogen-specific genes in uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **189**, 3532–3546 (2007).
10. Subashchandrabose, S. & Mobley, H. L. T. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* **3**, (2015).
11. Emody, L., Kerényi, M. & Nagy, G. Virulence factors of uropathogenic *Escherichia coli*. *Int. J. Antimicrob. Agents* **22 Suppl 2**, 29–33 (2003).
12. Antão, E.-M., Wieler, L. H. & Ewers, C. Adhesive threads of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *Gut Pathog.* **1**, 22 (2009).
13. Spaulding, C. N. & Hultgren, S. J. Adhesive Pili in UTI Pathogenesis and Drug Development. *Pathog. Basel Switz.* **5**, (2016).
14. Lüthje, P. & Brauner, A. Virulence factors of uropathogenic *E. coli* and their interaction with the host. *Adv. Microb. Physiol.* **65**, 337–372 (2014).
15. Thumbikat, P. *et al.* Bacteria-induced uroplakin signaling mediates bladder response to infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000415 (2009).
16. Dhakal, B. K., Kulesus, R. R. & Mulvey, M. A. Mechanisms and consequences of bladder cell invasion by uropathogenic *Escherichia coli*. *Eur. J. Clin. Invest.* **38 Suppl 2**, 2–11 (2008).
17. Dhakal, B. K. & Mulvey, M. A. Uropathogenic *Escherichia coli* invades host cells via an HDAC6-modulated microtubule-dependent pathway. *J. Biol. Chem.* **284**, 446–454 (2009).
18. Bokil, N. J. *et al.* Intramacrophage survival of uropathogenic *Escherichia coli*: differences between diverse clinical isolates and between mouse and human macrophages. *Immunobiology* **216**, 1164–1171 (2011).
19. Bishop, B. L. *et al.* Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat. Med.* **13**, 625–630 (2007).

20. Scott, V. C. S., Haake, D. A., Churchill, B. M., Justice, S. S. & Kim, J.-H. Intracellular Bacterial Communities: A Potential Etiology for Chronic Lower Urinary Tract Symptoms. *Urology* **86**, 425–431 (2015).
21. Song, J. *et al.* TLR4-mediated expulsion of bacteria from infected bladder epithelial cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **106**, 14966–14971 (2009).
22. Song, J., Bishop, B. L., Li, G., Duncan, M. J. & Abraham, S. N. TLR4-initiated and cAMP-mediated abrogation of bacterial invasion of the bladder. *Cell Host Microbe* **1**, 287–298 (2007).
23. Justice, S. S., Lauer, S. R., Hultgren, S. J. & Hunstad, D. A. Maturation of intracellular *Escherichia coli* communities requires SurA. *Infect. Immun.* **74**, 4793–4800 (2006).
24. Mulvey, M. A., Schilling, J. D., Martinez, J. J. & Hultgren, S. J. Bad bugs and beleaguered bladders: interplay between uropathogenic *Escherichia coli* and innate host defenses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 8829–8835 (2000).
25. Klein, K., Palarasah, Y., Kolmos, H. J., Møller-Jensen, J. & Andersen, T. E. Quantification of filamentation by uropathogenic *Escherichia coli* during experimental bladder cell infection by using semi-automated image analysis. *J. Microbiol. Methods* **109**, 110–116 (2015).
26. Leatham-Jensen, M. P. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* Metabolite-Dependent Quiescence and Persistence May Explain Antibiotic Tolerance during Urinary Tract Infection. *mSphere* **1**, (2016).
27. Miao, Y., Li, G., Zhang, X., Xu, H. & Abraham, S. N. A TRP Channel Senses Lysosome Neutralization by Pathogens to Trigger Their Expulsion. *Cell* **161**, 1306–1319 (2015).
28. Truschel, S. T. *et al.* Stretch-regulated exocytosis/endocytosis in bladder umbrella cells. *Mol. Biol. Cell* **13**, 830–846 (2002).
29. Kodner, C. M. & Thomas Gupton, E. K. Recurrent urinary tract infections in women: diagnosis and management. *Am. Fam. Physician* **82**, 638–643 (2010).
30. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M. & Hultgren, S. J. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* **13**, 269–284 (2015).
31. Ochoa, S. A. *et al.* Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Strains: Phylogenetic Groups Widely Associated with Integrons Maintain High Genetic Diversity. *Front. Microbiol.* **7**, 2042 (2016).
32. Lamm, M. E. Interaction of antigens and antibodies at mucosal surfaces. *Annu. Rev. Microbiol.* **51**, 311–340 (1997).
33. Roberts, J. A. *et al.* Antibody responses and protection from pyelonephritis following vaccination with purified *Escherichia coli* PapDG protein. *J. Urol.* **171**, 1682–1685 (2004).
34. Russo, T. A. *et al.* The Siderophore receptor IroN of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* is a potential vaccine candidate. *Infect. Immun.* **71**, 7164–7169 (2003).
35. Langermann, S. *et al.* Vaccination with FimH adhesin protects cynomolgus monkeys from colonization and infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **181**, 774–778 (2000).
36. O’Hanley, P., Lalonde, G. & Ji, G. Alpha-hemolysin contributes to the pathogenicity of piliated digalactoside-binding *Escherichia coli* in the kidney: efficacy of an alpha-hemolysin vaccine in preventing renal injury in the BALB/c mouse model of pyelonephritis. *Infect. Immun.* **59**, 1153–1161 (1991).

37. Levine, M. M. Immunization against bacterial diseases of the intestine. *J. Pediatr. Gastroenterol. Nutr.* **31**, 336–355 (2000).
38. Kochiashvili, D., Khuskivadze, A., Kochiashvili, G., Koberidze, G. & Kvakhajelidze, V. Role of the bacterial vaccine Solco-Urovac® in treatment and prevention of recurrent urinary tract infections of bacterial origin. *Georgian Med. News* 11–16 (2014).
39. Hopkins, W. J., Elkahwaji, J., Beierle, L. M., Levenson, G. E. & Uehling, D. T. Vaginal mucosal vaccine for recurrent urinary tract infections in women: results of a phase 2 clinical trial. *J. Urol.* **177**, 1349–1353; quiz 1591 (2007).
40. Marinova, S. *et al.* Cellular and humoral systemic and mucosal immune responses stimulated by an oral polybacterial immunomodulator in patients with chronic urinary tract infections. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* **18**, 457–473 (2005).
41. Bauer, H. W. *et al.* A long-term, multicenter, double-blind study of an *Escherichia coli* extract (OM-89) in female patients with recurrent urinary tract infections. *Eur. Urol.* **47**, 542–548; discussion 548 (2005).
42. Billips, B. K., Yaggie, R. E., Cashy, J. P., Schaeffer, A. J. & Klumpp, D. J. A live-attenuated vaccine for the treatment of urinary tract infection by uropathogenic *Escherichia coli*. *J. Infect. Dis.* **200**, 263–272 (2009).
43. Mike, L. A., Smith, S. N., Sumner, C. A., Eaton, K. A. & Mobley, H. L. T. Siderophore vaccine conjugates protect against uropathogenic *Escherichia coli* urinary tract infection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 13468–13473 (2016).
44. Alteri, C. J., Hagan, E. C., Sivick, K. E., Smith, S. N. & Mobley, H. L. T. Mucosal immunization with iron receptor antigens protects against urinary tract infection. *PLoS Pathog.* **5**, e1000586 (2009).
45. Brumbaugh, A. R. & Mobley, H. L. T. Preventing urinary tract infection: progress toward an effective *Escherichia coli* vaccine. *Expert Rev. Vaccines* **11**, 663–676 (2012).
46. Connell, I. *et al.* Type 1 fimbrial expression enhances *Escherichia coli* virulence for the urinary tract. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **93**, 9827–9832 (1996).
47. Norinder, B. S., Köves, B., Yadav, M., Brauner, A. & Svanborg, C. Do *Escherichia coli* strains causing acute cystitis have a distinct virulence repertoire? *Microb. Pathog.* **52**, 10–16 (2012).
48. Hung, C., Marschall, J., Burnham, C.-A. D., Byun, A. S. & Henderson, J. P. The bacterial amyloid curli is associated with urinary source bloodstream infection. *PloS One* **9**, e86009 (2014).
49. Cordeiro, M. A., Werle, C. H., Milanez, G. P. & Yano, T. Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. *Braz. J. Microbiol. Publ. Braz. Soc. Microbiol.* **47**, 414–416 (2016).
50. Manning, S. D. *et al.* Prevalence of known P-fimbrial G alleles in *Escherichia coli* and identification of a new adhesin class. *Clin. Diagn. Lab. Immunol.* **8**, 637–640 (2001).
51. Langermann, S. *et al.* Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* **276**, 607–611 (1997).
52. Thankavel, K. *et al.* Localization of a domain in the FimH adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae capable of receptor recognition and use of a domain-specific antibody to confer protection against experimental urinary tract infection. *J. Clin. Invest.* **100**, 1123–1136 (1997).
53. Langermann, S. & Ballou, W. R. Vaccination utilizing the FimCH complex as a strategy to prevent *Escherichia coli* urinary tract infections. *J. Infect. Dis.* **183 Suppl 1**, S84–86 (2001).

54. Langermann, S. & Ballou, W. R. Development of a recombinant FimCH vaccine for urinary tract infections. *Adv. Exp. Med. Biol.* **539**, 635–648 (2003).
55. Asadi Karam, M. R., Oloomi, M., Mahdavi, M., Habibi, M. & Bouzari, S. Vaccination with recombinant FimH fused with flagellin enhances cellular and humoral immunity against urinary tract infection in mice. *Vaccine* **31**, 1210–1216 (2013).
56. Habibi, M. *et al.* Intranasal immunization with fusion protein MrpH·FimH and MPL adjuvant confers protection against urinary tract infections caused by uropathogenic *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Mol. Immunol.* **64**, 285–294 (2015).
57. Fischer, H., Yamamoto, M., Akira, S., Beutler, B. & Svanborg, C. Mechanism of pathogen-specific TLR4 activation in the mucosa: fimbriae, recognition receptors and adaptor protein selection. *Eur. J. Immunol.* **36**, 267–277 (2006).
58. Samuelsson, P., Hang, L., Wullt, B., Irjala, H. & Svanborg, C. Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect. Immun.* **72**, 3179–3186 (2004).
59. Bian, Z., Brauner, A., Li, Y. & Normark, S. Expression of and cytokine activation by *Escherichia coli* curli fibers in human sepsis. *J. Infect. Dis.* **181**, 602–612 (2000).
60. Tükel, C. *et al.* Toll-like receptors 1 and 2 cooperatively mediate immune responses to curli, a common amyloid from enterobacterial biofilms. *Cell. Microbiol.* **12**, 1495–1505 (2010).
61. Bian, Z., Yan, Z. Q., Hansson, G. K., Thorén, P. & Normark, S. Activation of inducible nitric oxide synthase/nitric oxide by curli fibers leads to a fall in blood pressure during systemic *Escherichia coli* infection in mice. *J. Infect. Dis.* **183**, 612–619 (2001).
62. Rapsinski, G. J. *et al.* Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infect. Immun.* **83**, 693–701 (2015).
63. Lane, M. C. & Mobley, H. L. T. Role of P-fimbrial-mediated adherence in pyelonephritis and persistence of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) in the mammalian kidney. *Kidney Int.* **72**, 19–25 (2007).
64. Freundus, B. *et al.* *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol. Microbiol.* **40**, 37–51 (2001).
65. Pecha, B., Low, D. & O’Hanley, P. Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by piliated *Escherichia coli* in a murine model. Single-component Gal-Gal pili vaccines prevent pyelonephritis by homologous and heterologous piliated *E. coli* strains. *J. Clin. Invest.* **83**, 2102–2108 (1989).
66. Habibi, M., Asadi Karam, M. R. & Bouzari, S. In silico design of fusion protein of FimH from uropathogenic *Escherichia coli* and MrpH from *Proteus mirabilis* against urinary tract infections. *Adv. Biomed. Res.* **4**, 217 (2015).
67. Huleatt, J. W. *et al.* Vaccination with recombinant fusion proteins incorporating Toll-like receptor ligands induces rapid cellular and humoral immunity. *Vaccine* **25**, 763–775 (2007).
68. Akira, S., Takeda, K. & Kaisho, T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity. *Nat. Immunol.* **2**, 675–680 (2001).
69. Karam, M. R. A., Oloomi, M., Mahdavi, M., Habibi, M. & Bouzari, S. Assessment of immune responses of the flagellin (FliC) fused to FimH adhesin of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Mol. Immunol.* **54**, 32–39 (2013).
70. Clermont, O., Bonacorsi, S. & Bingen, E. Rapid and simple determination of the *Escherichia coli* phylogenetic group. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**, 4555–4558 (2000).

71. Datsenko, K. A. & Wanner, B. L. One-step inactivation of chromosomal genes in *Escherichia coli* K-12 using PCR products. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**, 6640–6645 (2000).
72. Hannan, T. J. & Hunstad, D. A. A Murine Model for *Escherichia coli* Urinary Tract Infection. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1333**, 159–175 (2016).
73. Hung, C.-S., Dodson, K. W. & Hultgren, S. J. A murine model of urinary tract infection. *Nat. Protoc.* **4**, 1230–1243 (2009).
74. Li, G. *et al.* Construction of a linker library with widely controllable flexibility for fusion protein design. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **100**, 215–225 (2016).
75. Wilkins, M. R. *et al.* Protein identification and analysis tools in the ExPASy server. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **112**, 531–552 (1999).
76. Sen, T. Z., Jernigan, R. L., Garnier, J. & Kloczkowski, A. GOR V server for protein secondary structure prediction. *Bioinforma. Oxf. Engl.* **21**, 2787–2788 (2005).
77. Yang, J. *et al.* The I-TASSER Suite: protein structure and function prediction. *Nat. Methods* **12**, 7–8 (2015).
78. Pedretti, A., Villa, L. & Vistoli, G. VEGA--an open platform to develop chemo-bio-informatics applications, using plug-in architecture and script programming. *J. Comput. Aided Mol. Des.* **18**, 167–173 (2004).
79. Laskowski, R. A., MacArthur, M. W. & Thornton, J. M. Validation of protein models derived from experiment. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **8**, 631–639 (1998).
80. Wiederstein, M. & Sippl, M. J. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. *Nucleic Acids Res.* **35**, W407–410 (2007).
81. Zhang, Y. & Skolnick, J. TM-align: a protein structure alignment algorithm based on the TM-score. *Nucleic Acids Res.* **33**, 2302–2309 (2005).
82. Ledesma, M. A. *et al.* The hemorrhagic coli pilus (HCP) of *Escherichia coli* O157:H7 is an inducer of proinflammatory cytokine secretion in intestinal epithelial cells. *PLoS One* **5**, e12127 (2010).
83. Saldaña, Z. *et al.* Synergistic role of curli and cellulose in cell adherence and biofilm formation of attaching and effacing *Escherichia coli* and identification of Fis as a negative regulator of curli. *Environ. Microbiol.* **11**, 992–1006 (2009).
84. Sivick, K. E. & Mobley, H. L. T. Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect. Immun.* **78**, 568–585 (2010).
85. De Groot, A. S. & Moise, L. New tools, new approaches and new ideas for vaccine development. *Expert Rev. Vaccines* **6**, 125–127 (2007).
86. Mobley, H. L. T. & Alteri, C. J. Development of a Vaccine against *Escherichia coli* Urinary Tract Infections. *Pathog. Basel Switz.* **5**, (2015).
87. Molina-López, J. *et al.* Drug resistance, serotypes, and phylogenetic groups among uropathogenic *Escherichia coli* including O25-ST131 in Mexico City. *J. Infect. Dev. Ctries.* **5**, 840–849 (2011).
88. Lim, J. Y., Pinkner, J. S. & Cegelski, L. Community behavior and amyloid-associated phenotypes among a panel of uropathogenic *E. coli*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **443**, 345–350 (2014).
89. Khurana, R., Uversky, V. N., Nielsen, L. & Fink, A. L. Is Congo red an amyloid-specific dye? *J. Biol. Chem.* **276**, 22715–22721 (2001).
90. Zhou, G. *et al.* Uroplakin Ia is the urothelial receptor for uropathogenic *Escherichia coli*: evidence from in vitro FimH binding. *J. Cell Sci.* **114**, 4095–4103 (2001).

91. Eto, D. S., Jones, T. A., Sundsbak, J. L. & Mulvey, M. A. Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathog.* **3**, e100 (2007).
92. Kai-Larsen, Y. *et al.* Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS Pathog.* **6**, e1001010 (2010).
93. Cegelski, L. *et al.* Small-molecule inhibitors target *Escherichia coli* amyloid biogenesis and biofilm formation. *Nat. Chem. Biol.* **5**, 913–919 (2009).
94. Hung, C.-S. *et al.* Structural basis of tropism of *Escherichia coli* to the bladder during urinary tract infection. *Mol. Microbiol.* **44**, 903–915 (2002).
95. Sung, M., Fleming, K., Chen, H. A. & Matthews, S. The solution structure of PapGII from uropathogenic *Escherichia coli* and its recognition of glycolipid receptors. *EMBO Rep.* **2**, 621–627 (2001).
96. Wang, X., Smith, D. R., Jones, J. W. & Chapman, M. R. In vitro polymerization of a functional *Escherichia coli* amyloid protein. *J. Biol. Chem.* **282**, 3713–3719 (2007).
97. Arai, R., Wriggers, W., Nishikawa, Y., Nagamune, T. & Fujisawa, T. Conformations of variably linked chimeric proteins evaluated by synchrotron X-ray small-angle scattering. *Proteins* **57**, 829–838 (2004).
98. Zagrovic, B., Jayachandran, G., Millett, I. S., Doniach, S. & Pande, V. S. How large is an alpha-helix? Studies of the radii of gyration of helical peptides by small-angle X-ray scattering and molecular dynamics. *J. Mol. Biol.* **353**, 232–241 (2005).
99. Andrews, B. *et al.* A tightly regulated high level expression vector that utilizes a thermosensitive lac repressor: production of the human T cell receptor V beta 5.3 in *Escherichia coli*. *Gene* **182**, 101–109 (1996).
100. Brinkmann, U., Mattes, R. E. & Buckel, P. High-level expression of recombinant genes in *Escherichia coli* is dependent on the availability of the dnaY gene product. *Gene* **85**, 109–114 (1989).
101. Pedersen-Lane, J., Maley, G. F., Chu, E. & Maley, F. High-level expression of human thymidylate synthase. *Protein Expr. Purif.* **10**, 256–262 (1997).
102. Golshani, M. *et al.* In silico design, cloning and high level expression of L7/L12-TOmp31 fusion protein of Brucella antigens. *Res. Pharm. Sci.* **10**, 436–445 (2015).
103. Mohammad, N. *et al.* In Silico Design of a Chimeric Protein Containing Antigenic Fragments of Helicobacter pylori; A Bioinformatic Approach. *Open Microbiol. J.* **10**, 97–112 (2016).
104. Muñoz-Medina, J. E. *et al.* In Silico Identification of Highly Conserved Epitopes of Influenza A H1N1, H2N2, H3N2, and H5N1 with Diagnostic and Vaccination Potential. *BioMed Res. Int.* **2015**, 813047 (2015).
105. Nazarian, S. *et al.* An in silico chimeric multi subunit vaccine targeting virulence factors of enterotoxigenic *Escherichia coli* (ETEC) with its bacterial inbuilt adjuvant. *J. Microbiol. Methods* **90**, 36–45 (2012).
106. Savar, N. S. *et al.* In silico and in vivo studies of truncated forms of flagellin (FliC) of enteroaggregative *Escherichia coli* fused to FimH from uropathogenic *Escherichia coli* as a vaccine candidate against urinary tract infections. *J. Biotechnol.* **175**, 31–37 (2014).
107. De Groot, A. S., Sbai, H., Aubin, C. S., McMurry, J. & Martin, W. Immunoinformatics: Mining genomes for vaccine components. *Immunol. Cell Biol.* **80**, 255–269 (2002).

108. Chen, J., Liu, H., Yang, J. & Chou, K.-C. Prediction of linear B-cell epitopes using amino acid pair antigenicity scale. *Amino Acids* **33**, 423–428 (2007).
109. Janin, J. & Chothia, C. The structure of protein-protein recognition sites. *J. Biol. Chem.* **265**, 16027–16030 (1990).
110. Shewmaker, F. *et al.* The functional curli amyloid is not based on in-register parallel beta-sheet structure. *J. Biol. Chem.* **284**, 25065–25076 (2009).
111. Ikai, A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. *J. Biochem. (Tokyo)* **88**, 1895–1898 (1980).
112. Olsén, A. *et al.* Identification of two protein-binding and functional regions of curli, a surface organelle and virulence determinant of *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **277**, 34568–34572 (2002).
113. Luscombe, N. M., Greenbaum, D. & Gerstein, M. What is bioinformatics? A proposed definition and overview of the field. *Methods Inf. Med.* **40**, 346–358 (2001).
114. Seras-Franzoso, J., Peternel, S., Cano-Garrido, O., Villaverde, A. & García-Fruitós, E. Bacterial inclusion body purification. *Methods Mol. Biol. Clifton NJ* **1258**, 293–305 (2015).
115. Chen, X., Zaro, J. L. & Shen, W.-C. Fusion protein linkers: property, design and functionality. *Adv. Drug Deliv. Rev.* **65**, 1357–1369 (2013).
116. Nayak, S. K., O’Toole, C. & Price, Z. H. A cell line from an anaplastic transitional cell carcinoma of human urinary bladder. *Br. J. Cancer* **35**, 142–151 (1977).
117. Sirard, J.-C., Bayardo, M. & Didierlaurent, A. Pathogen-specific TLR signaling in mucosa: mutual contribution of microbial TLR agonists and virulence factors. *Eur. J. Immunol.* **36**, 260–263 (2006).
118. Rapsinski, G. J. *et al.* Toll-like receptor 2 and NLRP3 cooperate to recognize a functional bacterial amyloid, curli. *Infect. Immun.* **83**, 693–701 (2015).
119. Cheng, L. *et al.* Toll-Like Receptors 4 and 5 Cooperatively Initiate the Innate Immune Responses to Uropathogenic *E. coli* Infection in Mouse Epididymal Epithelial Cells. *Biol. Reprod.* (2016). doi:10.1095/biolreprod.115.136580
120. Hagan, E. C. & Mobley, H. L. T. Uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane antigens expressed during urinary tract infection. *Infect. Immun.* **75**, 3941–3949 (2007).
121. Rene, P., Dinolfo, M. & Silverblatt, F. J. Serum and urogenital antibody responses to *Escherichia coli* pili in cystitis. *Infect. Immun.* **38**, 542–547 (1982).
122. Hanson, L. A. *et al.* Antigens of *Escherichia coli*, human immune response, and the pathogenesis of urinary tract infections. *J. Infect. Dis.* **136 Suppl**, S144–149 (1977).
123. Deo, S. S. & Vaidya, A. K. Elevated levels of secretory immunoglobulin A (sIgA) in urinary tract infections. *Indian J. Pediatr.* **71**, 37–40 (2004).





## Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli*

Victor M. Luna-Pineda<sup>1,2</sup>, Juan Pablo Rayos-Grajeda<sup>2</sup>, Ariadna Cruz-Córdova<sup>1</sup>, Zeou Saldarña-Ahuactzi<sup>1,2</sup>, Sara A. Ochoa<sup>2</sup>, Carmen Maldonado-Bernal<sup>4</sup>, Vicenta Cázarez-Domínguez<sup>1</sup>, Leófila Morano-Flores<sup>5</sup>, José Arallano-Galindo<sup>6</sup>, Rigoberto Hernández-Castro<sup>7</sup> and Juan Xicohtencatl-Cortés<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal, Hospital Infantil de México "Fidelco Gómez", Ciudad de México, México; <sup>2</sup> Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México, Ciudad de México, México; <sup>3</sup> Instituto Nacional de Medicina Genómica, Ciudad de México, México; <sup>4</sup> Laboratorio de Investigación de Inmunología y Protección, Hospital Infantil de México "Fidelco Gómez", Dirección De Investigación, Ciudad de México, México; <sup>5</sup> Unidad de Bionanotecnología, Laboratorio de Inmunidad en Mucosas, Facultad de Estudios Superiores Iztacala, Universidad Nacional Autónoma de México, Tlahuepantla, México; <sup>6</sup> Departamento de Infectología, Hospital Infantil de México "Fidelco Gómez", Ciudad de México, México; <sup>7</sup> Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General "Dr. Manuel Gea González", Ciudad de México, México

### OPEN ACCESS

#### Edited by:

Alfredo G. Torres,  
University of Texas Medical Branch,  
USA

#### Reviewed by:

Sheryl S. Justiz,  
Ohio State University, USA  
Cherise Martin-Davies,  
Institut National de la Recherche  
Scientifique, Canada

#### \*Correspondence:

Juan Xicohtencatl-Cortés  
jxcortez@yahoo.com

Received: 20 July 2016

Accepted: 04 October 2016

Published: 21 October 2016

#### Citation:

Luna-Pineda VM, Rayos-Grajeda JP, Cruz-Córdova A, Saldarña-Ahuactzi Z, Ochoa SA, Maldonado-Bernal C, Cázarez-Domínguez V, Morano-Flores L, Arallano-Galindo J, Hernández-Castro R and Xicohtencatl-Cortés J (2016) Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6:125. doi: 10.3389/fcimb.2016.00125

Urinary tract infections (UTIs) are associated with high rates of morbidity and mortality worldwide, and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main etiologic agent. Fimbriae assembled on the bacterial surface are essential for adhesion to the urinary tract epithelium. In this study, the FimH, CsgA, and PapG adhesins were fused to generate biomolecules for use as potential target vaccines against UTIs. The fusion protein design was generated using bioinformatics tools, and template fusion gene sequences were synthesized by GenScript in the following order *fimH-csgA-papG-fimH-csgA* (*fcpf*) linked to the nucleotide sequence encoding the [EAAAK]<sub>5</sub> peptide. Monomeric (*fimH*, *csgA*, and *papG*), dimeric (*fimH-csgA*), and trimeric (*fimH-csgA-papG*) genes were cloned into the pLATE31 expression vector and generated products of 1040, 539, 1139, 1442, and 2444 bp, respectively. Fusion protein expression in BL21 *E. coli* was induced with 1 mM IPTG, and His-tagged proteins were purified under denaturing conditions and refolded by dialysis using C-buffer. Coomassie blue-stained SDS-PAGE gels and Western blot analysis revealed bands of 29.5, 11.9, 33.9, 44.9, and 82.1 kDa, corresponding to FimH, CsgA, PapG, FC, and FCP proteins, respectively. Mass spectrometry analysis by MALDI-TOF/TOF revealed specific peptides that confirmed the fusion protein structures. Dynamic light scattering analysis revealed the polydispersed state of the fusion proteins. FimH, CsgA, and PapG stimulated the release of 372–398 pg/mL IL-6; interestingly, FC and FCP stimulated the release of 464.79 pg/mL ( $p \leq 0.018$ ) and 521.24 pg/mL ( $p \leq 0.002$ ) IL-6, respectively. In addition, FC and FCP stimulated the release of 396.52 pg/mL ( $p \leq 0.001$ ) and 450.40 pg/mL ( $p \leq 0.002$ ) IL-8, respectively. High levels of IgA and IgG antibodies in human sera reacted against the fusion proteins, and under identical conditions, low levels of IgA and IgG antibodies were detected in human urine.



# Multidrug- and Extensively Drug-Resistant Uropathogenic *Escherichia coli* Clinical Strains: Phylogenetic Groups Widely Associated with Integrons Maintain High Genetic Diversity

Sara A. Ochoa<sup>1,2,3</sup>, Ariadna Cruz-Córdova<sup>2</sup>, Víctor M. Luna-Pineda<sup>1</sup>, Juan P. Rojas-Grajeda<sup>4</sup>, Wicenta Cázarez-Domínguez<sup>1</sup>, Gerardo Escalona<sup>1</sup>, Ma. Eugenia Sepúlveda-González<sup>1</sup>, Fernanda López-Montiel<sup>2</sup>, José Arallano-Galindo<sup>2</sup>, Eriocela López-Martínez<sup>5</sup>, Israel Parra-Ortega<sup>2</sup>, Silvia Glono-Corozo<sup>2</sup>, Rigoberto Hernández-Castro<sup>6</sup>, Daniela de la Rosa-Zamboni<sup>6</sup> and Juan Xicohtencatl-Cortés<sup>1\*</sup>

## OPEN ACCESS

Edited by:  
Yuji Morita,

Aichi Gakuin University, Japan

Reviewed by:

Sebastian Guenther,

Rice University of Berlin, Germany

Tatiana Amabile De Campos,

Universidade de Brasilia, Brazil

\*Correspondence:

Juan Xicohtencatl-Cortés

juancort@yahoo.com

Specialty section:

This article was submitted to

Infectious Diseases,

a section of the journal

Frontiers in Microbiology

Received: 05 September 2016

Accepted: 05 December 2016

Published: 21 December 2016

Citation:

Ochoa SA, Cruz-Córdova A,

Luna-Pineda VM, Rojas-Grajeda JP,

Cázarez-Domínguez W, Escalona G,

Sepúlveda-González ME,

López-Montiel F, Arallano-Galindo J,

López-Martínez E, Parra-Ortega I,

Glono-Corozo S, Hernández-Castro R,

de la Rosa-Zamboni D and

Xicohtencatl-Cortés J (2016)

Multidrug- and Extensively

Drug-Resistant Uropathogenic

*Escherichia coli* Clinical Strains:

Phylogenetic Groups Widely

Associated with Integrons Maintain

High Genetic Diversity.

Front. Microbiol. 7:2042.

doi: 10.3389/fmicb.2016.02042

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Bacteriología Intestinal, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México City, México, <sup>2</sup>Posgrado en Ciencias Químico-Biológicas, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México City, México, <sup>3</sup>Laboratorio de Bacteriología Médica, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas, Instituto Politécnico Nacional, México City, México, <sup>4</sup>Laboratorio de Estructuras de Proteínas, Instituto Nacional de Medicina Genómica, México City, México, <sup>5</sup>Área de Virología, Laboratorio de Infectología, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México City, México, <sup>6</sup>Subdirección de Servicios Auxiliares de Diagnóstico, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México City, México, <sup>7</sup>Laboratorio Clínico, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México City, México, <sup>8</sup>Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General Dr. Manuel Gea González, México City, México, <sup>9</sup>Epidemiología Hospitalaria, Hospital Infantil de México Federico Gómez, México City, México

In recent years, an increase of uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) strains with Multidrug-resistant (MDR) and Extensively Drug-resistant (XDR) profiles that complicate therapy for urinary tract infections (UTIs) has been observed and has directly impacted costs and extended hospital stays. The aim of this study was to determine MDR- and XDR-UPEC clinical strains, their virulence genes, their phylogenetic groups and to ascertain their relationship with integrons and genetic diversity. From a collection of 500 UPEC strains, 103 were selected with MDR and XDR characteristics. MDR-UPEC strains were mainly associated with phylogenetic groups D (54.87%) and B2 (39.02%) with a high percentage ( $\geq 70\%$ ) of several fimbrial genes (*ecpA*, *fimH*, *csgA*, and *papGII*), an iron uptake gene (*chuA*), and a toxin gene (*hlyA*). In addition, a moderate frequency (40–70%) of other genes (*iutD*, *tosA*, and *bcsA*) was observed. XDR-UPEC strains were predominantly associated with phylogenetic groups B2 (47.61%) and D (42.85%), which grouped with  $\geq 80$  virulence genes, including *ecpA*, *fimH*, *csgA*, *papGII*, *iutD*, and *chuA*. A moderate frequency (40–70%) of the *tosA* and *hlyA* genes was observed. The class 1 and 2 integrons that were identified in the MDR- and XDR-UPEC strains were associated with phylogenetic groups D, B2, and A, while the XDR-UPEC strains that were associated with phylogenetic groups B2, D, and A showed an extended-spectrum beta-lactamase (ESBL) phenotype. The modifying enzymes (*aadA1*, *aadB*, *aacC*, *ant1*, *dfrA1*, *dfrA17*, and *aadA4*) that

## Infecciones del tracto urinario, inmunidad y vacunación

Victor Manuel Luna-Pineda<sup>1,2\*</sup>, Sara Ochoa<sup>1</sup>, Arladna Cruz-Córdova<sup>1</sup>, Vicenta Cázares-Domínguez<sup>1</sup>,  
Fernanda Vélez-González<sup>1</sup>, Rigoberto Hernández-Castro<sup>2</sup> y Juan Xicohtencatl-Cortés<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Laboratorio de Investigación en Bacteriología Inesahil, Hospital Infantil de México Federico Gómez; <sup>2</sup>Instituto de Fisiología Celular, Universidad Nacional Autónoma de México; <sup>3</sup>Departamento de Ecología de Agentes Patógenos, Hospital General Dr. Manuel Gea González, Ciudad de México, México

### Resumen

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se consideran como una de las principales causas de morbilidad en el mundo, y *Escherichia coli* uropatogénica (UPEC, por sus siglas en inglés) es el agente causal asociado a estas infecciones. La alta morbilidad generada por las ITU y la limitación de tratamientos debido al aumento de la resistencia bacteriana a los diversos antibióticos inducen la búsqueda de nuevas alternativas contra estas infecciones. El conocimiento que se ha generado acerca de la respuesta inmunitaria en el tracto urinario (TU) es importante para el desarrollo de estrategias efectivas en la prevención, el tratamiento y el control de las ITU. Los avances en las herramientas de biología molecular y bioinformática han permitido generar proteínas de fusión consideradas como biomoléculas potenciales para el desarrollo de una vacuna viable contra las ITU. Las adhesinas fimbriales (FimH, CsgA y PapG) de UPEC son factores de virulencia que contribuyen a la adherencia, la invasión y la formación de comunidades bacterianas intracelulares. Pocos estudios *in vivo* e *in vitro* han mostrado que las proteínas de fusión promueven una respuesta inmunitaria eficiente y de protección contra las ITU causadas por UPEC. Adicionalmente, la vía de inmunización intranasal con moléculas inmunogénicas ha generado una respuesta en la mucosa del TU en comparación con otras vías de inmunización. El objetivo de esta revisión fue proponer un diseño de vacuna contra las ITU causadas por UPEC, describiendo el panorama general de la infección, el mecanismo de patogenicidad de la bacteria y la respuesta inmunitaria del huésped.

**Palabras clave:** *Escherichia coli* uropatogénica. Adhesina fimbrial. Proteínas de fusión. Infecciones del tracto urinario. Interleucina.

### Urinary tract infections, immunity, and vaccination

#### Abstract

Urinary tract infections (UTI) are considered one of the main causes of morbidity worldwide, and uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the etiological agent associated with these infections. The high morbidity produced by the UTI and the limitation of antibiotic treatments promotes the search for new alternatives against these infections. The knowledge that has been generated regarding the immune response in the urinary tract is important for the development of effective strategies in the

#### Correspondencia:

\*Victor Manuel Luna-Pineda

E-mail: luna.pineda@hotmail.com

\*Juan Xicohtencatl-Cortés

E-mail: juanxico@yahoo.com

Fecha de recepción: 25-07-2017

Fecha de aceptación: 20-11-2017

DOI: 10.24875/IMH-IMJM18000011


Disponible en internet: : 00-00-20XX

Boletín Med Hosp Infant Mex. 2018;75:74-77


www.bmhim.com

1905-1146/2018. Hospital Infantil de México Federico Gómez, Impreso por Permalyer México SA de CV, todos los derechos reservados.

# Registro de patente



**Instituto Mexicano de la Propiedad Industrial**



**INSTITUTO MEXICANO DE LA PROPIEDAD INDUSTRIAL**  
Dirección Divisional de Patentes

**DERECHOS PAGADOS**  
11 OCT 2017  
Folio 6-38-19

Use exclusión Delegaciones y Subdelegaciones de la Secretaría de Economía y Órganos Regionales de SEME

Solo

Fecha de entrada

Fecha y hora de recepción

Solicitud: MX/2017/013184  
Fecha: 11/OCT/2017 Hora: 16:36:27  
Folio: MX/E/2017/015942 100152

**1 DATOS DEL (DE LOS) SOLICITANTE(S)**

El solicitante es el inventor  El solicitante es el causahabiente  A

1) Nombre (s): 2) Nacionalidad(es): 3) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: Población, Estado y País: 4) Teléfono(s) clave: 5) Fax(s) clave:  
**HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ", Sociedad Mexicana, con domicilio en: Dr. Márquez No. 162, Col. Doctores, C.P. 06720 Ciudad de México, México**

**2 DATOS DEL (DE LOS) INVENTOR (ES)**

6) Nombre(s): 7) Nacionalidad(es): 8) Domicilio: calle, número, colonia y código postal: Población, Estado y País: 9) Teléfono(s) clave: 10) Fax(s) clave:  
**JUAN XICOHTENCATL CORTES, de nacionalidad Mexicana con domicilio en: Dr. Márquez 162, Cuauhtémoc, 06720 Ciudad de México, México**  
**VICTOR MANUEL LUNA PINEDA, de nacionalidad Mexicana con domicilio en: Dr. Márquez 162, Cuauhtémoc, 06720 Ciudad de México, México**

**3 DATOS DEL (DE LOS) APODERADO(S)**

11) Nombre (s): LUIS MARIO PONCE WALRAVEN, FRANCISCO JAVIER UHTHOFF ORIVE, CONSUELO GONZALEZ RODRIGUEZ, CARLOS ARMANDO UHTHOFF ORIVE, ERYCK ARMANDO CASTELO ORIVE, CARLOS MAURICIO TRUJILLO CASTELLANOS, SAUL SANTOYO CHOUZO, MARCELA ROLLAND GONZALEZ, IGNACIO SOMBRIGUIER TORRADO, EUGENIO PEREZ PEREZ, XAVIER HADAD SOLIAS, Indistintamente. 12) R G P:  
 13) Domicilio: calle, número, colonia, código postal: **HAMBURGO No. 200 COL. JUAREZ C.P. 06600 Ciudad de México 14) Teléfono (clave): 5535-8068 15) Fax (clave): 5208-8087**  
 16) Personas autorizadas para dar y recibir notificaciones: **LUIS FRANCISCO MONDRAGON JIMENEZ, ISAC VILLEGAS LOERA, VICTOR MANUEL ZUÑIGA RESENDIZ, LUIS CARLOS MALDONADO PONCELES. Ver hoja adjunta**

17) Denominación o Título de la invención:  
**PROTEÍNAS DIMÉRICAS Y TRIMÉRICAS BASADAS EN LAS ADHESINAS FIMH, CSGA Y PAPG DE ESCHERICHIA COLI UROPATOGÉNICA**

18) Fecha de divulgación previa: 31 | 10 | 2016 (Día Mes Año)  
 19) Clasificación Internacional: usa exclusivo del IMPI

20) Divisional de la solicitud: Número Figura jurídica  
 21) Fecha de presentación: Día Mes Año

22) Prioridad Reclamada: País                      Fecha de presentación                      No. de serie

**Lista de verificación hoja invento**

No. Hojas		No. Hojas	
X 1	Certificado de pago de la tarifa	X 1	Documento de cesión de derechos
X 22	Descripción y reivindicación (es) de la invención	X 27	Procedencia de depósito de material biológico
X 8	Dibujo (s) en su caso	X 17	Documento (s) comprobatorio (s) de divulgación previa
X 1	Resumen de la descripción de la invención		Documento (s) de prioridad
X 2	Documento que acredite la personalidad del apoderado		Traducción
		89	TOTAL DE HOJAS

Observaciones: - Documentos continúan en la hoja adjunta  
 - Carta Poder-Original en el Exp. de Patente No. MX/2017/005154 de HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"  
 Bajo protesta de decir verdad, manifiesto que los datos esbozados en esta solicitud son ciertos.  
LIC. FRANCISCO JAVIER UHTHOFF ORIVE Ciudad de México, a 11 de octubre del 2017  
 Nombre y firma del solicitante o su apoderado Legar y fecha

Página 1 de 2 EPWAM/05/SM/201418

IMP-08-009



---

Hoja complementaria relativa a documentación adicional y/o a complementación de información faltante en el asunto abajo indicado.

---

SOLICITANTE : HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ"

FECHA DE PRESENTACIÓN : 11 de octubre del 2017

TÍTULO : PROTEÍNAS DIMERICAS Y TRIMERICAS BASADAS EN LAS ADHESINAS FIMB, CSGA Y PAPG DE ESCHERICHIA COLI UROFATOGÉNICA

---

ANEXOS:

- No.  
Hojas
- 9 LISTADO DE SECUENCIAS
  - 37 "La divulgación previa fue efectuada mediante la revista Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, el 31 de octubre de 2014 en Estados Unidos de América. Lo anteriormente expuesto se acredita con copia de las páginas de la revista antes mencionada, en las cuales se hace alusión al título "Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic Escherichia coli" base de lo que aquí se reclama y cuyas páginas adjunto se acompañan con su respectiva traducción al español,

OBSERVACIONES: (continuación)

- Carta Poder Original en el Exp. de Patente No. MX/a/2017/005154 de HOSPITAL INFANTIL DE MÉXICO "FEDERICO GÓMEZ".

---

## Artículos en preparación

Feature of urinary *Escherichia coli* isolated of children with complicated and uncomplicated urinary tract infection in Mexico. **Luna-Pineda VM**<sup>1,2</sup>, Ochoa SA<sup>1</sup>, Cázares-Domínguez V<sup>1</sup>, Cruz-Córdova A<sup>1</sup>, Reyes-Grajeda JP<sup>3</sup>, Arellano-Galindo J<sup>4</sup>, Hernández-Castro R<sup>5</sup>, Xicohtencatl-Cortes J<sup>1\*</sup>.

Uropathogenic *Escherichia coli* curli fimbriae are associated with the adherence to mice bladder. **Luna-Pineda VM**<sup>1,2</sup>, Ochoa SA<sup>1</sup>, Cázares-Domínguez V<sup>1</sup>, Cruz-Córdova A<sup>1</sup>, Moreno-Fierros L<sup>3</sup>, Ilhuicatzí-Alvarado D<sup>3</sup>, Arellano-Galindo J<sup>4</sup>, Hernández-Castro R<sup>5</sup>, Xicohtencatl-Cortes J<sup>1\*</sup>.

Typing of the 025b/ST131 epidemic clone in uropathogenic *Escherichia coli* clinical strains isolated from children with urinary tract infection. Ochoa SA<sup>1</sup>, **Luna-Pineda VM**<sup>1,2</sup>, Cázares-Domínguez V<sup>1</sup>, Cruz-Córdova A<sup>1</sup>, Reyes-Grajeda JP<sup>3</sup>, Arellano-Galindo J<sup>4</sup>, Hernández-Castro R<sup>5</sup>, Xicohtencatl-Cortes J<sup>1\*</sup>.