



Universidad Autónoma de Querétaro

Facultad de Ciencias Naturales

"Análisis inmunoproteómico de componentes de superficie en cepas de *E. coli* uropatógena para identificar potenciales candidatos con propiedades inmunogénicas"

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta

M. C. Ricardo Ernesto Ahumada Cota

Dirigido por:

Dr. Feliciano Milián Suazo

Co-Director:

Dr. Ulises Hernández Chiñas

Querétaro, Qro. a enero de 2021

La presente obra está bajo la licencia:
<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/deed.es>



CC BY-NC-ND 4.0 DEED

Atribución-NoComercial-SinDerivadas 4.0 Internacional

Usted es libre de:

Compartir — copiar y redistribuir el material en cualquier medio o formato

La licenciatario no puede revocar estas libertades en tanto usted siga los términos de la licencia

Bajo los siguientes términos:



Atribución — Usted debe dar [crédito de manera adecuada](#), brindar un enlace a la licencia, e [indicar si se han realizado cambios](#). Puede hacerlo en cualquier forma razonable, pero no de forma tal que sugiera que usted o su uso tienen el apoyo de la licenciatario.



NoComercial — Usted no puede hacer uso del material con [propósitos comerciales](#).



SinDerivadas — Si [remezcla, transforma o crea a partir](#) del material, no podrá distribuir el material modificado.

No hay restricciones adicionales — No puede aplicar términos legales ni [medidas tecnológicas](#) que restrinjan legalmente a otras a hacer cualquier uso permitido por la licencia.

Avisos:

No tiene que cumplir con la licencia para elementos del material en el dominio público o cuando su uso esté permitido por una [excepción o limitación](#) aplicable.

No se dan garantías. La licencia podría no darle todos los permisos que necesita para el uso que tenga previsto. Por ejemplo, otros derechos como [publicidad, privacidad, o derechos morales](#) pueden limitar la forma en que utilice el material.



Universidad Autónoma de Querétaro
Facultad de Ciencias Naturales
Doctorado en Ciencias Biológicas

“Análisis inmunoproteómico de componentes de superficie en cepas de *E. coli* uropatógena para identificar potenciales candidatos con propiedades inmunogénicas”

Tesis

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de
Doctor en Ciencias Biológicas

Presenta:

M. C. Ricardo Ernesto Ahumada Cota

Dirigido por:

Dr. Feliciano Milián Suazo

Co-dirigido por:

Dr. Ulises Hernández Chiñas

Dr. Feliciano Milián Suazo
Presidente

Dr. Ulises Hernández Chiñas
Secretario

Dr. Ulises Edgardo Esquivel Naranjo
Vocal

Dr. Carlos Agustín Vega y Murguía
Suplente

Dr. Genaro Patiño López
Suplente

Centro Universitario, Querétaro, Qro.
enero, 2021
México

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Unidad Periférica de Hemato Oncología e Investigación del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) y la Facultad de Medicina de la UNAM bajo la supervisión y la dirección del Dr. Carlos A. Eslava Campos, del Dr. Ulises Hernández Chiñas y del Dr. Feliciano Milián Suazo.

Dirección General de Biomedicina de la UAQ

Resumen

Las infecciones de vías urinarias (IVUs) son un problema de salud pública relevante con efectos económicos y sociales en la vida de los pacientes. El aumento de la resistencia bacteriana a los antimicrobianos es un elemento importante que dificulta significativamente el tratamiento de las IVUs; lo cual ha llevado a la búsqueda de terapias alternativas de carácter drogo independientes.

Los lisados bacterianos (LBs) fabricados a partir de cepas de *Escherichia coli* han demostrado resultados prometedores en el tratamiento de diferentes enfermedades infecciosas. Recientemente, trabajos realizados con pacientes con IVUs en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana (Hospital Infantil de México) mostraron remisión en el 70% de los casos dentro de los 3 meses posteriores a la administración de los LB, y el control de la infección se mantuvo durante 6-12 meses. En este trabajo, el análisis de las fracciones de LBs y extractos de superficie bacteriana de cepas UPEC, mostró la presencia de LPS, proteínas citosólicas (udp, masZ y gpmA), fimbrias (FimH), OMPs (BamB, BamC, OmpC y OmpA), donde la porina OmpA fue el principal elemento inmunogénico. Además, la detección del gen *ompA* en 148 cepas de *E. coli* de diferentes orígenes reveló que solo el 51% de estas bacterias albergaban dicho gen. Por lo tanto, surgen preguntas sobre la naturaleza de este llamado factor de virulencia. Un análisis más detallado de las secuencias *ompA* de la base de datos NCBI mostró una falta de asociación entre la secuencia del gen y el patotipo de *E. coli*. Es necesario realizar ensayos adicionales para aclarar este aspecto de la proteína. Finalmente, la identificación de estos potenciales inmunógenos, especialmente OmpA, sería el primer paso hacia el desarrollo de una vacuna protectora polivalente.

Palabras clave: *E. coli* uropatógena, UPEC, IVUs recurrentes, lisados bacterianos autólogos, gen *ompA*

Abstract

Urinary tract infections (UTIs) are a relevant public health problem with economic and social effects on the lives of the patients. The increase of antimicrobial bacterial resistance is an important element that significantly hinders the treatment of UTIs, raising the need to search for alternative therapies. Bacterial Lysates (BL) manufactured from *Escherichia coli* strains have proved being useful for the treatment of different UTIs with promising results. Specifically, previous work carried out at the Bacterial Pathogenicity Lab (Hospital Infantil de México) showed remission in 70 % of the patients within the first 3 months after the administration of the BL and the control of the infection was maintained for 6-12 months. Herein, the analysis by LC-MS of the BLs fractions showed the presence of LPS, cytosolic proteins (udp, masZ, and gpmA), fimbriae (FimH), OMPs (BamB, BamC, OmpC, and OmpA), where the OmpA porin was the main immunogenic element. Additionally, the detection of the *ompA* gene in 148 *E. coli* strains from different origins revealed that only 51 % of these bacteria harbored the gene. Thus, raising questions about the nature of this so-called virulence factor. Further analysis of the *ompA* sequences from the NCBI database showed a lack of association between the sequence and the *E. coli* pathotype. Additional assays need to be performed to clarify this aspect of the protein. Finally, the identification of these potential immunogens, specially OmpA, would be the first step towards the development of a polyvalent protective vaccine.

Keywords: Uropathogenic *E. coli*, UPEC, recurrent UTI, bacterial lysates, *ompA* gene

Dedicatoria

A mi madre, por ser la responsable de la mejor parte de mí. Te amo, mamá.

A mi hermano, lo más cercano que tengo y a quien querré siempre.

A mi padre, de quien tanto he aprendido.

A mi familia, amigos y compañeros del laboratorio, a quienes siempre llevo conmigo.

Al Dr. Feliciano Milián Suazo, por haberme dado la confianza para realizar este trabajo.

Al Dr. Ulises Hernández Chiñas, por haberme enseñado y dedicado su tiempo. Siempre estaré agradecido y orgulloso de haber sido su primer alumno de doctorado.

Al Dr. Carlos A. Eslava Campos, por ayudarme a realizar mis estudios de doctorado, sin usted nada de esto habría sido posible. Por ser un guía y un buen amigo.

Agradecimientos

A CONACYT, por el apoyo económico que me otorgó durante mis estudios de doctorado, teniendo yo el número de becario 464646.

Al programa de Doctorado en Ciencias Biológicas de la Facultad de Ciencias Naturales de la Universidad Autónoma de Querétaro (UAQ), en la cual realicé mis estudios de doctorado.

A la Universidad Nacional Autónoma de México (UNAM), por el apoyo recibido por parte del proyecto PAPIT-UNAM IN221318.

Al Hospital Infantil de México Federico Gómez (HIMFG), por el apoyo recibido para la realización de este proyecto, proyectos con clave HIM2014/022 SSA y HIM2018/051-SSA1554.

A mis directores y asesores de tesis, Dr. Feliciano Milián, Dr. Ulises Hernández Chiñas, Dr. Carlos Alberto Eslava Campos, Dr. Ulises Esquivel, Dr. Carlos Vega y Dr. Genaro Patiño, por su apoyo, comentarios y guía en este proyecto.

Índice

Resumen	i
Abstract	ii
Agradecimientos	iii
Índice	iv
Índice de Cuadros	vi
Índice de Figuras	vii
I. Introducción	1
II. Antecedentes	3
II.1. Infecciones de las vías urinarias (IVUs).....	3
II.2. Agentes etiológicos de las IVUs.....	4
II.3. <i>E. coli</i> uropatógena (UPEC).....	6
II.3.1. Mecanismo de patogenicidad y factores de virulencia de UPEC	8
II.3.2. Respuesta inmune durante las IVU.....	11
II.4. Tratamientos contra la infección de cepas de UPEC	12
II.4.1. Uso de antibióticos contra las IVUs	12
II.4.2. Tratamientos alternativos contra las IVUs.....	16
II.4.2.1 Nutracéuticos	16
II.4.2.2 Vacunas e inmunoestimulantes	17
II.4.2.3. Estructuras de superficie bacteriana son candidatos para la creación de proteínas recombinantes con capacidad inmunogénica	20
III. Hipótesis	22
IV. Objetivos	22
IV.1. Objetivo General.....	22
IV.2. Objetivos específicos.....	22
V. Materiales y Métodos	23
V.1. Materiales	23
V.1.1. Materiales biológicos	23
V.2. Métodos	23
V.2.1. Obtención de Lisados Bacterianos (LBs).....	23
V.2.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con los LBs.	24
V.2.3. Obtención de estructuras de superficie y proteínas de membrana externa provenientes de cepas UPEC y <i>E. coli</i> provenientes de heces.....	24
V.2.4. Análisis inmunoproteómico de las proteínas de superficie obtenidas de cepas de UPEC y <i>E. coli</i> provenientes de heces	26
V.2.5. Identificación de las proteínas de superficie con capacidad inmunogénica por medio de espectrometría de masas.....	29
V.2.6. Metodología de PCR para la detección de genes de virulencia asociados a UPEC	31
V.2.7. Metodología de PCR para la detección de los genes que codifican para las proteínas de superficie inmunogénicas de UPEC.....	32

V.2.8. Elaboración de una base de datos bioinformática de la diversidad de las secuencias DNA de las proteínas de superficie con capacidad inmunogénica.	33
V.2.9. Análisis estadístico	33
V.2.10. Manejo de residuos biológicos infecciosos.....	34
VI. Resultados y Discusión	35
VI.1. Serotipos UPEC más frecuentemente aislados de pacientes con IVU recurrentes.....	35
VI.2. Inmunodetección por ELISA y Western-Blot en los LBs.....	38
VI.3. Identificación de estructuras de superficie bacteriana de cepas UPEC y provenientes de heces con reactivada inmunogénica	40
VI.4. Identificación de OMPs con reactivada inmunogénica	48
VI.5. Presencia de ompA en diferentes patotipos de <i>E. coli</i>	52
VII. Conclusiones	56
VIII. Referencias	57

Índice de Cuadros

Cuadro	Pág.
1. Microorganismos aislados de muestras de orina de pacientes con cuadro clínico de IVU en México en el periodo 2007-2020.	6
2. Factores de virulencia de UPEC, mecanismo y función.	10
3. Tratamiento para IVUs en adultos según la guía MAPPA y sus costos en el mercado mexicano. Selección de cepas UPEC provenientes de urocultivos de pacientes con IVUs.	12
4. Resistencia a diferentes antibióticos de cepas de <i>E. coli</i> aisladas de IVUs en México en el periodo 2007-2020.	14
5. Selección de cepas provenientes de heces de pacientes con IVUs.	36
6. Selección de cepas provenientes de heces de pacientes con IVUs.	37
7. Genes relacionados a la virulencia de <i>E. coli</i> .	43
8. Proteínas predichas por TagIdent (ExPASy).	47
9. Proteínas identificadas para los dos métodos utilizados para diferentes cepas UPEC.	51
10. Prevalencia del gen <i>ompA</i> en cepas de <i>E. coli</i> aisladas de diferentes fuentes.	53

Índice de Figuras

Figura	Pág.
1. Epidemiología de los agentes etiológicos de IVUs.	5
2. Reactividad del suero de pacientes contra el LB.	38
3. Identificación de proteínas inmunogénicas presentes en el LB.	39
4. Reactividad del suero de pacientes y donadores contra estructuras de superficie de cepas de <i>E. coli</i> .	42
5. Reactividad del suero de pacientes y donadores contra la fracción proteica de ~35 kDa de superficie de cepas de UPEC.	44
6. Análisis de pl de las fracciones proteicas de los extractos de estructuras de superficie bacteriana.	46
7. Reactividad del suero de pacientes y donadores contra OMPs.	49
8. Análisis filogenético de <i>ompA</i> de <i>E. coli</i> .	54

I. Introducción.

Las infecciones de las vías urinarias (IVUs) son un problema de salud mundial que afectan cada año aproximadamente a 150 millones de personas; las cuales afectan principalmente a niños, hombres mayores y mujeres de todas las edades. Dentro de los patógenos que provocan las IVUs, el grupo de cepas de *E. coli*, denominadas uropatógenas (UPEC, por sus siglas en inglés) es el responsable de la mayoría de IVUs a nivel global.

El tratamiento contra las IVUs es el uso de antibióticos que consumidos de manera constante, como en el caso de pacientes con IVU crónica, puede alterar la microbiota intestinal y vaginal de los pacientes. Además, el uso constante de estos compuestos selecciona poblaciones de bacterias multirresistentes, complicando el tratamiento de la misma infección. Debido a esto, ha surgido la necesidad de desarrollar tratamientos alternativos para combatir las IVUs crónicas causadas por UPEC. Teniendo esto en cuenta, en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México se evaluó la utilidad del empleo de lisados bacterianos (LBs) autólogos como tratamiento de Infecciones crónicas de vías urinarias; donde se observó una remisión del cuadro en el 70% de los pacientes a quienes se les administraba el LB autólogo. Estos resultados dan elementos para continuar evaluando la efectividad de las autovacunas en un mayor número de pacientes.

Sin embargo, debido a su grado de especificidad, un LB autólogo es personalizado y no puede administrarse a otro paciente con IVU. Esto quiere decir que debe de desarrollarse una vacuna específica por paciente y eso conlleva altos costos de producción. Una estrategia para superar estas barreras es la creación de vacunas con los antígenos específicos que se sabe provocan la respuesta del sistema inmune en el hospedero.

Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue identificar proteínas de superficie de cepas de UPEC, utilizando protocolos propios de la inmunoproteómica, herramienta de la proteómica que utiliza anticuerpos para la detección de péptidos que tienen la capacidad de provocar una respuesta inmune, que sean reconocidas por el sistema inmune del paciente con IVU.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

II. Antecedentes.

II.1. Infecciones de las vías urinarias (IVUs).

Las infecciones de vías urinarias (IVUs) se encuentran entre las causas de morbilidad más comunes en el ser humano. Estas se clasifican como cistitis si la infección se presenta en la vejiga, y pielonefritis si esta se ubica en los riñones (Subashchandrabose & Mobley, 2014). Además de esta clasificación basada en la zona de infección, clínicamente las IVUs se dividen en complicadas y no complicadas. En el caso de las IVUs complicadas, estas se definen como aquellas que se presentan en individuos con alguna anormalidad anatómica o neurológica asociada a las vías urinarias. Estas condiciones predisponen a estos individuos a tener varios episodios de IVUs. Por otro lado, las IVUs no complicadas son aquellas que afectan a pacientes sin anomalías fisiológicas (Foxman, 2010).

Factores como la predisposición genética, actividad sexual y género estarían vinculados al desarrollo de IVUs (Foxman, 2014). Los principales grupos de personas que padecen IVUs no complicadas son adultos mayores y mujeres de todas las edades (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Estas últimas son un grupo particularmente sensible, ya que se estima que una de cada dos mujeres tendrá por lo menos una IVU a lo largo de su vida (O'Brien *et al.*, 2016). Se presume que esta predisposición hacia contraer IVUs se debe a rasgos como la longitud de la uretra femenina, más corta que la masculina, y que, debido a su cercanía con el recto, estaría exponiendo a la uretra a bacterias provenientes del colon, permitiendo así el acceso a patógenos (Foxman, 2014).

Finalmente, las IVUs no complicadas suelen diferenciarse entre agudas, aquellas que suceden de manera poco frecuente y cuyo tratamiento con antibióticos alivia la infección, y las llamadas crónicas, aquellas que son recurrentes. El riesgo de desarrollar una IVU crónica (o recurrente) varía dependiendo de las diferentes poblaciones afectadas. Los niños tienen un riesgo que oscila entre el 19-22 % dentro de los primeros cinco años desde su primera IVU. En hombres, el riesgo disminuye al 12 % dentro del primer año, mientras

que las mujeres presentan la mayor probabilidad de volver a desarrollar una IVU, del 30 al 50 % dentro del primer año (Foxman, 2014).

A nivel mundial, estas infecciones afectan aproximadamente a 150 millones de personas, donde solamente en los EE. UU. representan un costo de aproximadamente 5 mil millones de dólares al año (Foxman, 2010; Foxman, 2014; O'Brien *et al.*, 2016). Mientras que, en México el Boletín Epidemiológico Nacional enlista, desde 2004 a la fecha, a esta enfermedad como la tercera causa de morbilidad en el país en la población en general y la segunda en mujeres. Solamente en 2019 el Boletín Epidemiológico Nacional reportó 4,339,674 casos de IVUs, el 77 % pertenecieron a mujeres, esto es, 3.3 casos registrados en mujeres por cada caso en hombres (Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica, 2019). El Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS) indica que las IVUs se encuentran entre los 10 principales motivos de consulta en el área de medicina familiar (Chávez-Valencia *et al.*, 2010). Estos datos resaltan la relevancia actual que tienen las IVUs en el sector salud en nuestro país.

II.2. Agentes etiológicos de las IVUs.

Diversos patógenos se han asociado como agentes etiológicos de las IVUs, desde bacterias Gram negativas y Gram positivas hasta hongos. Los principales patógenos responsables de las IVUs son *Candida*, *Enterococcus*, *Staphylococcus*, *Pseudomonas*, *Proteus*, *Klebsiella* y *E. coli* (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Este último es el patógeno más relevante durante la cistitis, la IVU más común, tanto en su manifestación complicada como no complicada (**Figura 1**).

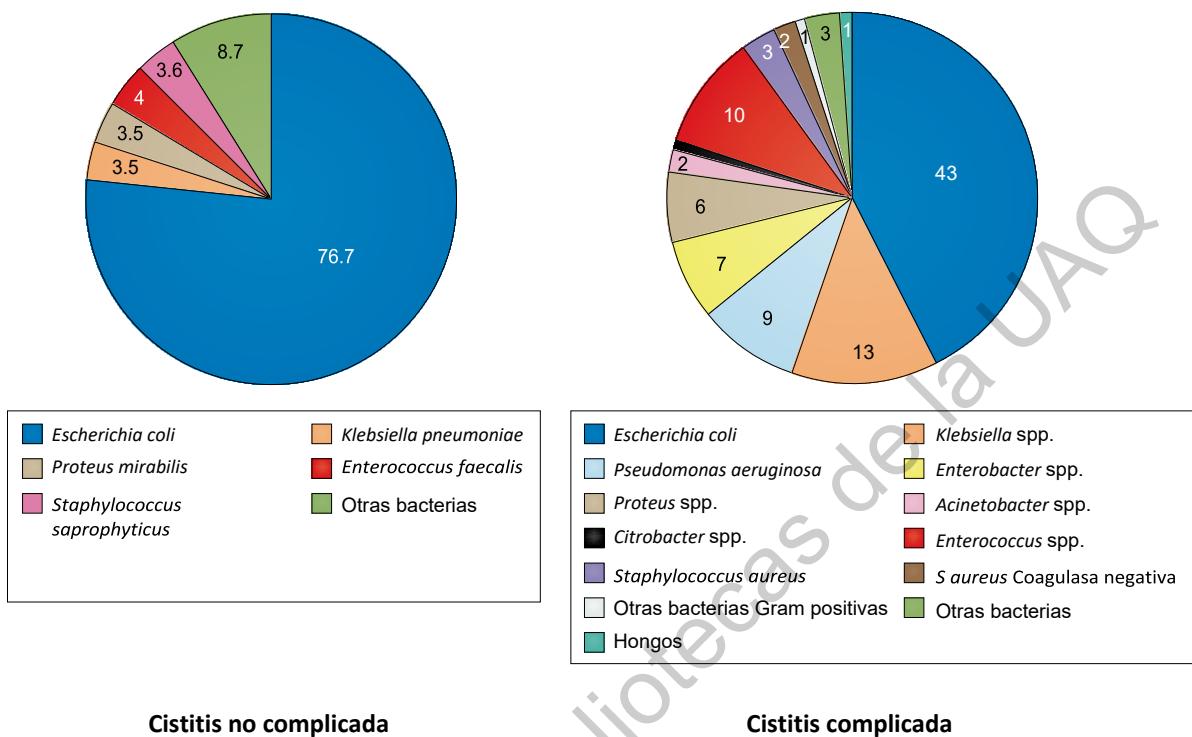


Figura 1. Epidemiología de los agentes etiológicos de cistitis. La prevalencia de los patógenos asociados a cistitis complicadas y no complicadas se muestra expresada en porcentaje (Adaptado de Wagenlehner *et al.*, 2020).

En nuestro país, una revisión bibliográfica realizada por Ahumada-Cota *et al.* (Manuscrito en revisión) sobre IVUs en México durante el periodo 2007-2020 señala que los principales patógenos responsables de causar IVUs son cepas de *E. coli* (62.8 %) seguidas por bacterias de los géneros *Klebsiella* (7.8 %) y *Enterococcus* (7.2 %) (**Cuadro 1**).

Cuadro 1. Microorganismos aislados de muestras de orina de pacientes con cuadro clínico de IVU en México en el periodo 2007-2020.

Microorganismo	Nº de aislamientos	Frecuencia (%)
<i>E. coli</i>	11,406	62.8
<i>Klebsiella</i> spp.	1,418	7.8
<i>Enterococcus</i> spp.	1,311	7.2
<i>Pseudomonas</i> spp.	1,159	6.4
<i>Proteus</i> spp.	468	2.6
<i>Candida</i> spp.	455	2.5
<i>Citrobacter</i> spp.	443	2.4
<i>Enterobacter</i> spp.	415	2.3
<i>Acinetobacter</i> spp.	277	1.5
<i>Staphylococcus</i> spp.	211	1.2
Otros	590	3.3
TOTAL	18,153	100

II.3. *E. coli* uropatógena (UPEC).

Las cepas de *E. coli* representan a un grupo amplio de bacterias que oscilan entre aislamientos considerados biota normal del tracto intestinal humano y aquellas cepas que se han demostrado como causantes de diversas enfermedades humanas (Kaper *et al.* 2004). Existen diferentes patotipos de *E. coli* que provocan daño intestinal, mientras que aquellas cepas que generan infecciones fuera del tracto intestinal se clasifican dentro del grupo de *E. coli* Patógenas Extra-intestinales (ExPEC, por sus siglas en inglés) (Kaper *et al.* 2004; Robins-Browne *et al.* 2016). A este último grupo pertenece el grupo de cepas de *E. coli* que provocan IVUs, denominadas cepas de *E. coli* uropatógena (UPEC, por sus siglas en inglés). Por ser un grupo con alta relevancia clínica, el origen y los mecanismos de patogenicidad y virulencia de las UPEC se han estudiado ampliamente (Hamilton *et al.* 2017; Sirah *et al.*, 2018; Lacerda Mariano e Ingersoll, 2020).

De manera notable, las cepas de UPEC no tienen una característica única que las defina como uropatógenas. Estas cepas albergan una colección de factores de virulencia que también están asociados a otros patotipos de *E. coli*, tanto intestinales como ExPEC (Klein y Hultgren, 2020). Sin embargo, sí se ha

encontrado una frecuencia mayor de ciertos serogrupos de *E. coli* entre aquellas cepas que provocan IVUs. Este sistema de clasificación se basa en la detección de ciertos componentes que forman parte de la pared celular bacteriana, como son el antígeno somático (O), parte de la estructura del Lipopolisacárido (LPS), y que, debido a su variabilidad, es bastante útil en la caracterización de las diferentes clonas de *E. coli*. Actualmente se tienen descritas 186 variedades del antígeno O y gracias a esto se han definido a los serogrupos O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75, O83 y O175 como serogrupos UPEC clásicos debido a que, como se mencionó anteriormente, se relacionan con mayor frecuencia a los aislamientos de IVUs (Li *et al.*, 2010; Noie Oskouie *et al.*, 2019; Shokouhi Mostafavi *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2017). Adicionalmente, la caracterización del antígeno flagelar (H) ayuda a establecer el serotipo de la bacteria y debido a esto se conoce que los serotipos O1:H4, O1:H6, O1:H7, O1:NM-, O2:H1, O2:H4, O4:H5, O6:H1, O7:H4, O7:H6, O7:NM, O18ac:H7, O18ac:NM-, O25:H4, O75:NM representan los que con mayor frecuencia se identifican en las infecciones ocasionadas por las cepas de UPEC (Terai *et al.*, 1997; Bidet *et al.*, 2007).

Por otro lado, se ha documentado que la principal fuente de origen es el intestino desde donde estas bacterias logran contaminar la uretra y ascender para colonizar las vías urinarias (O'Brien *et al.*, 2016). Existen diferencias notables entre estos dos hábitats: en las vías urinarias, las cepas de UPEC se encuentran en un ambiente con alta osmolaridad y baja cantidad de nutrientes (carente de carbohidratos), mientras que en el intestino la alta cantidad de nutrientes (principalmente carbohidratos derivados de la mucina) promueve fácilmente el desarrollo de microorganismos (Alteri y Mobley, 2015; Mann *et al.*, 2017). En general, las cepas de UPEC despliegan una serie de factores de virulencia que les permiten adaptarse rápidamente a su nuevo entorno, evadir la respuesta inmune y finalmente colonizar.

II.3.1. Mecanismo de patogenicidad y factores de virulencia de *E. coli* uropatógena (UPEC).

A pesar de que no se conoce con certeza cuál es el mecanismo específico de patogenicidad que llevan a cabo las cepas de UPEC, sí se ha logrado inferir, mediante ensayos en modelos animales y líneas celulares, algunos de sus rasgos particulares.

Se especula que el tracto intestinal es la fuente de las cepas de UPEC que llegan a colonizar las vías urinarias. Una vez en extremo exterior de la uretra, las cepas de UPEC empiezan a migrar de manera ascendente hasta llegar a la vejiga. Esto es posible gracias a la movilidad que les confieren los flagelos que expresan en su superficie. Una vez que las cepas de UPEC se encuentran en la luz de la vejiga, se especula que la población bacteriana estaría en suspensión en la orina que, a pesar de ser un medio considerado bajo en nutrientes, estaría permitiendo el crecimiento y replicación de estas bacterias. En este respecto, Mann *et al.* (2017) mencionan que la orina es rica en carbohidratos y aminoácidos, en general; sin embargo, las cepas de UPEC dependerían de manera importante de su mecanismo de síntesis *de novo*, ya que en la orina no se encuentran cantidades considerables de los aminoácidos arginina, metionina, valina, uracilo, adenina e isoleucina.

Otro aspecto relevante para el crecimiento y replicación de las cepas de UPEC es la captación de hierro, un elemento esencial para la replicación bacteriana y bastante escaso en la orina. La manera en que este elemento es absorbido por la célula bacteriana está mediada por los captadores de hierro bacterianos denominados sideróforos; estos tienen la característica de ser altamente afines al hierro libre y, una vez unidos al hierro, ser internalizadas a la célula bacteriana por medio de proteínas de superficie (O'Brien *et al.*, 2016; Terlizzi *et al.*, 2017). Debido a esto se ha asociado la expresión de captadores de hierro con su virulencia.

Además de encontrarse en suspensión, las cepas de UPEC también estarían interactuando con las células epiteliales de la vejiga (uroepitelio) por

medio de distintas estructuras del grupo de pili de ruta dependiente de chaperona y acarreadora (CUP, por sus siglas en inglés) como son FimH y PapG, adhesinas del pili tipo 1 y P, respectivamente (Bien *et al.*, 2012; O'Brien *et al.*, 2016; Terlizzi *et al.*, 2017). Además de las adhesinas ya mencionadas, existen otras que no dependen de ningún tipo de estructura fimbrial (**Cuadro 2**). (Subashchandrabose *et al.*, 2015). Otra forma de interacción se da a través de los denominados curli, estructuras extracelulares fibrosas que permiten la creación de un tipo de biofilm, mediante el cual se estaría logrando un contacto con las células epiteliales de la vejiga y provocando la posterior internalización de estas poblaciones bacterianas (Klein y Hultgren, 2020). Una vez dentro, las cepas de UPEC formarían comunidades bacterianas intracelulares (IBCs, por sus siglas en inglés) que eventualmente se dispersarían fuera de estas células colonizadas hacia otras células cercanas (Duraiwamy *et al.*, 2018).

Además, en ocasiones las infecciones de vejiga suelen no resolverse y las cepas de UPEC logran acceder a los riñones por medio de los uréteres, esto sucede comúnmente en personas con reflujo urinario (Abraham y Miao, 2015; Klein y Hultgren, 2020). Este escenario es bastante grave para el hospedero, ya que desde allí las cepas de UPEC pueden ganar acceso al torrente sanguíneo y provocar sepsis (Wagenlehner *et al.*, 2020).

Factores de virulencia de superficie y secretados al ambiente.

De manera general, podemos dividir a los factores de virulencia de UPEC en estructuras de superficie bacteriana y aquellas que son excretadas fuera de la bacteria. En el primer grupo se encuentran aquellas proteínas o complejos proteicos expresados en la superficie celular de las UPEC que van desde estructuras que confieren motilidad y adherencia como pili, flagelos y adhesinas independientes a pili, hasta sistemas de captación de hierro esenciales para desarrollar las funciones celulares de la bacteria (O'Brien *et al.*, 2016). Por otro lado, en el segundo grupo se encuentran aquellas proteínas que son excretadas al ambiente y que no forman parte de la estructura de la bacteria, *i.e.* toxinas, como la α -hemolisina y algunas serina proteasas. Estas proteínas son relevantes

para evadir el sistema inmune y para la obtención de nutrientes mediante la lisis de las células del hospedero (Alteri y Mobley, 2015; Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Debido a que estos factores de virulencia son necesarios para que las cepas de UPEC logren colonizar las vías urinarias, es de gran importancia su estudio para su posterior caracterización. Esto llevará a dilucidar los mecanismos de patogenicidad de UPEC y proponer tratamientos dirigidos específicamente contra factores clave en su virulencia.

Cuadro 2. Factores de virulencia de UPEC, mecanismo y función. (Flores-Mireles *et al.*, 2015; O'Brien *et al.*, 2016; Terlizzi *et al.*, 2017).

Mecanismo	Función	Factor
Expresado en la superficie de la bacteria	Adherencia	<ul style="list-style-type: none">• Pili P (PapG)• Pili F1C• Pili S• Pili tipo 1 (FimH)• Fibras de tipo curli• Adhesinas no fimbriales F17, Dr, FdeC, TosA
Secretados al ambiente	Evasión del sistema inmune	<ul style="list-style-type: none">• CNF1• HlyA• TraT
	Toxicidad	<ul style="list-style-type: none">• Lipopolisacárido (LPS)
	Serina proteasa	<ul style="list-style-type: none">• PicU• Vat• Sat
	Captación de hierro	<ul style="list-style-type: none">• Aerobactina• Enterobactina• FeoB• Irp2• Salmochelina• Yersiniabactina

II.3.2. Respuesta inmune durante las IVUs.

La respuesta inmune que lleva a cabo el hospedero para contrarrestar las IVUs aún no está completamente dilucidada; sin embargo, sí se ha logrado identificar algunos de sus rasgos particulares. A continuación, hablaremos únicamente de la respuesta inmune durante la cistitis debido a que es el tipo de infección urinaria más común y mejor caracterizada.

Las primeras defensas que las vías urinarias ofrecen contra el asentamiento y colonización de las bacterias, es la capa de mucosa compuesta por glucosaminoglicanos y proteoglicanos (Hamilton *et al.* 2017). Esta capa impide que exista una interacción cercana entre las células epiteliales de la vejiga y las bacterias invasoras. Sin embargo, como ya mencionamos anteriormente, las cepas de UPEC cuentan con estructuras de superficie externa que le permiten adherirse e internalizarse en las células del hospedero. Estas bacterias son detectadas por el receptor de tipo Toll 4 (TLR4), cuya activación eleva los niveles de AMP cíclico dentro de las células infectadas y provoca la expulsión de las vesículas que contienen a UPEC de vuelta a la luz de la vejiga. Otro proceso desencadenado por la activación de TLR4 es la secreción de péptidos antimicrobianos (catelicidina, β -defensina 1 y pentraxina 3, que impedirán que las bacterias se unan a las células de vejiga; y ciertas quimiocinas que ayudarán a atraer a las células del sistema inmune, neutrófilos en una primera instancia y macrófagos posteriormente (Lacerda Mariano *et al.*, 2020).

Finalmente, si la infección no logra resolverse, la vejiga se desprende de sus capas superiores, eliminando de manera física a las células infectadas. Sin embargo, este recurso termina siendo contraproducente en varios casos, ya que, además de dañar al órgano en cuestión, propicia la infección de células epiteliales de vejiga que se encuentran en las capas más profundas. Lo anterior estaría condenando al hospedero a un estado de infección crónica, debido a la dificultad de eliminar a estos patógenos ((Flores-Mireles *et al.*, 2015; Abraham y Miao, 2015; O'Brien *et al.*, 2016; Terlizzi *et al.*, 2017; Lacerda Mariano *et al.*, 2020)).

II.4. Tratamientos contra la infección de cepas de UPEC.

II.4.1. Uso de antibióticos contra las IVUs.

La prescripción de antibióticos es el tratamiento por excelencia a las IVUs; sin embargo, el uso indiscriminado de estos ha provocado que las cepas de UPEC sean multirresistentes a un amplio rango de antibióticos (O'Brien *et al.*, 2016). En nuestro país la guía para el Manejo Antibacteriano de Procesos infecciosos en el Paciente Adulto (MAPPA) de la Academia Nacional de Medicina, señala que para el tratamiento de IVUs en el paciente adulto se deben de administrar nitrofuranos, quinolonas, fosfomicina o inhibidores de la vía de los folatos, dependiendo del resultado del antibiograma realizado por el laboratorio (**Cuadro 3**); siendo estas indicaciones las mismas que recomienda la Asociación de Urología Europea (Kot, 2019).

Cuadro 3. Tratamiento para IVUs en adultos según la guía MAPPA y sus costos en el mercado mexicano.

IVUs	Antibiótico	Dosis	Duración del tratamiento (días)
Cistitis no complicada	Nitrofurantoína	100 mg, 3 a 4 veces/día	5 a 7
	Ciprofloxacino	250 mg, 2 veces/día	3
	Ciprofloxacino de liberación prolongada	500 m, 1 vez/día	3
	Fosfomicina	3g, dosis única	-
Pielonefritis	Trimetroprim/sulfametoazol	160/800 mg, 2 veces/día	3
	Ciprofloxacino	500 mg, 2 veces/día	
	Ciprofloxacino de liberación prolongada	1g, 1 vez/día	
	Levofloxacino	500 mg, 1 vez/día	14
	Ceftibuten	400mg, 1 vez/día	
	Cefixima	400 mg, 1 vez/día	

En el caso de pacientes pediátricos existe un consenso de pediatría que ha publicado diversas recomendaciones. La más reciente de estas publicaciones se realizó por Lombarto-Aburto (2018), en donde se presenta un esquema de tratamiento con los mismos tipos de antibióticos que los señalado por la MAPPA, solamente tomando en consideración la edad y el peso del infante.

En nuestro país se han desarrollado diversos trabajos sobre el perfil de resistencia a antibióticos que tienen diferentes cepas de UPEC aisladas de pacientes mexicanos. Una revisión realizada por Ahumada-Cota *et al.* (Manuscrito en revisión) señala que las cepas de UPEC muestras resistencia a todos los antibióticos probados (**Cuadro 4**); donde la mayor resistencia se presentó hacia el grupo de las penicilinas (79.1 %) y las quinolonas y fluoroquinolonas (58.5%). De manera preocupante, se observa una resistencia de un 56.1 % para trimetroprim/sulfametoazol y de un 60.7 % y ciprofloxacino, ambos antibióticos señalados por la guía MAPPA como recomendados para tratar las IVUs.

Cuadro 4. Resistencia a diferentes antibióticos de cepas de *E. coli* aisladas de IVUs en México en el periodo 2007-2020.

Grupo de antibiótico	Antibiótico*	Cepas de <i>E. coli</i> de pacientes con IVUs	
		Total	Resistentes (%)
Aminoglucósidos	Trobramicina	12,958	5,666 (43.7)
	Gentamicina	17,075	7,335 (43)
	Amikacina	29,981	4,640 (15.5)
	Netilmicina	2,198	169 (7.7)
Anfenicos	Cloranfenicol	417	140 (33.6)
B-Lactámicos/Inhibidores de β-Lactamasas	Ampicillin/Sulbactam	12,263	7,057 (57.5)
	Amox-Ácido clavulanico	11,033	4,064 (36.8)
	Ticarcilina/Ácido clavulanico	1,788	317 (17.7)
	Piperacilina-Tazobactam	13444	1,427 (10.6)
Carbapenems	Imipenem	24,440	627 (2.6)
	Ertapenem	11,197	125 (1.1)
	Meropenem	22,232	209 (0.9)
Cefalosporinas	Cefuroxime	7,680	4,596 (59.8)
	Cefalexina	638	355 (55.6)
	Cefalotina	3,237	1,752 (54.1)
	Cefotaxime	4,034	2,177 (54)
	Ceftriaxona	29,117	15,511 (53.3)
	Ceftazidime	20,741	10,809 (52.1)
	Cefozolina	8,259	3,976 (48.1)
	Cefepime	24,847	11,738 (47.2)
	Cefoxitina	20,168	9,466 (46.9)
	Ceftizoxime	1,231	74 (6)
	Cefotetan	1,091	19 (1.7)
	Ceftibuten	638	2 (0.3)

Continuación de Cuadro 4.

Grupo de antibiótico	Antibiótico*	Cepas de <i>E. coli</i> de pacientes con IVUs	
		Total	Resistentes (%)
Fluoroquinolonas	Pefloxacina	218	167 (76.7)
	Gemifloxacina	638	430 (67.4)
	Moxifloxacina	4,145	2,726 (65.8)
	Levofloxacina	11,828	7,605 (64.3)
	Ciprofloxacino	32,331	19,630 (60.7)
	Norfloxacino	2,549	1,096 (43)
	Ofloxacino	1,014	322 (31.8)
Fosfomicinas	Fosfomicina	1,402	107 (7.6)
Inhibidor de la vía de los Folatos	Trimetroprim/sulfametozaxol	30,668	17,204 (56.1)
Macrólidos	Azamicina	49	33 (67.3)
Monobactámicos	Aztreonam	4,393	1,672 (38.1)
Nitrofuranos	Nitrofurantoína	25,272	2,199 (8.7)
Penicilinas	Ticarcillín	127	113 (89)
	Carbenicilina	313	263 (84)
	Ampicilina	25,758	20,142 (78.2)
	Piperacilina	515	336 (65.2)
Quinolonas	Ácido nalidíxico	432	299 (69.2)
	Gatifloxacina	224	99 (44.2)
Tetraciclinas	Tetraciclina	1,198	563 (47)
	Doxiciclina	49	23 (46.9)

Esta situación ha desembocado en un nuevo y grave problema de salud pública, ya que cada vez es más complicado controlar las IVUs y ante ello surge con mayor fuerza la emergencia de complicaciones graves que afectarán a los pacientes. Debido a este surgimiento de tipo de infecciones difíciles de tratar por antibiótico, la OMS ha propuesto la búsqueda de alternativas para el control y tratamiento de las enfermedades infecciosas. Tomando esto en cuenta, diversos grupos de trabajo han propuesto tratamientos alternativos para combatir la IVUs.

II.4.2. Tratamientos alternativos contra las IVUs.

II.4.2.1 Nutracéuticos.

En lo que se refiere a las IVUs el consumo de nutracéuticos es una de las líneas de investigación de tratamientos alternativos de estas infecciones. El concepto de nutracéuticos está basado en lo pregonado por el galeno Hipócrates quien decía que “debemos dejar que nuestros alimentos sean nuestro medicamento.” El término nutracéutico fue acuñado en 1989 por el médico Stephen Defelice y viene de la conjunción de las palabras nutritivo y farmacéutico. En general, los nutracéuticos se definen como alimentos, o parte de estos, considerados como benéficos para la salud ya que pueden prevenir o tratar cierta enfermedad y su consumo no necesita estar regulado por ninguna autoridad de salud (Chauhan *et al.*, 2013).

Entre los productos nutracéuticos más consumidos se encuentran los probióticos, estos son microorganismos que en cantidades adecuadas confieren un beneficio en la salud del huésped (Reid, 2016). En este respecto, se sabe que ciertas especies del género *Lactobacillus* son capaces de colonizar la vagina y la zona periuretral impidiendo que cepas de UPEC logren llegar al tracto urinario. Basándose en este principio, se diseñaron los supositorios vaginales LACTIN-V, los cuales contienen como probiótico activo una cepa de *Lactobacillus crispatus*. En un ensayo clínico de fase dos utilizando este probiótico, Stapleton *et al.* (2011) encontraron que solamente el 15 % (7/48) de las mujeres tratadas volvieron a presentar IVUs, comparadas contra el 27 % (13/48) de aquellas que fueron tratadas con el placebo. Finalmente, mencionaron que el tratamiento con LACTIN-V resultaba protector contra las IVUs. Sin embargo, un metaanálisis, compuesto de los resultados de todos los ensayos clínicos de este probiótico aplicado para prevenir las IVUs concluyó que no hay un efecto benéfico de *Lactobacillus* más allá del efecto placebo (Schwenger *et al.*, 2015).

Además del consumo de probióticos, existe la idea popular que el consumo de productos de arándanos previene las IVUs. Debido a esto, se han desarrollado diferentes investigaciones para identificar las cualidades que

impiden la IVU por UPEC. Se ha identificado en ensayos *in vivo* con células eucariotas, que la fructosa y proantocianidinas de tipo A presentes en los arándanos, bloquean el sitio de unión del pili tipo 1 y P, respectivamente, inhibiendo así la adherencia de las células UPEC: (Howell *et al.*, 2005; Gupta *et al.*, 2007). Diversos ensayos clínicos han reportado ciertos beneficios del consumo de jugo de arándanos en mujeres con IVUs recurrentes; sin embargo, aún no hay estudios contundentes que logren verificar esta aseveración (Sirah *et al.*, 2018; O'Brien *et al.*, 2016).

II.4.2.2 Vacunas e inmunoestimulantes.

Diferentes estudios han demostrado que el diseño de vacunas o inmunoestimulantes para el tratamiento de las IVUs promueven una respuesta del sistema inmune contra las UPEC y ayudarían a combatir o prevenir la infección. Las vacunas pueden dividirse en aquellas que se basan en: 1) patógenos de referencia inactivados; 2) patógenos inactivados aislados del mismo paciente, llamada también autovacuna; y 3) antígeno específicas. A continuación, se describen cada una de estas categorías.

Vacunas inactivadas o lisados bacterianos (LBs).

Desde hace años se ha investigado el uso de cepas de bacterias uropatógenas inactivadas para el desarrollo de vacunas que prevengan las IVUs. A la fecha se conocen tres diferentes propuestas de vacunas comerciales para combatir las IVUs: Uro-Vaxom, Solco-Urovac y Uromune.

La vacuna OM-89 (comercializada como Urovaxom) es una vacuna diseñada con 18 cepas uropatógenas de *E. coli* aisladas de diferentes pacientes con IVUs. Diferentes metaanálisis han identificado que esta vacuna tiene un efecto superior al placebo cuando es administrada diariamente por el periodo de 3 meses que recomienda para mujeres la Asociación Europea de Urología. Mientras que también se han desarrollado estudios donde la dosis se ha vuelto a administrar una vez a los 7, otra a los 8 y una más a los 9 meses, lo que al

parecer prolonga la ausencia de IVUs hasta por un año (Bauer *et al.*, 2002; Bauer *et al.*, 2005).

Solco-Urovac (también conocida como Strovac) es una vacuna polivalente de administración intramuscular creada a partir de 6 cepas de *E. coli* y una cepa de cada una de las siguientes especies: *Klebsiella*, *Proteus*, *Morganella* y *Enterococcus*, todas estas cepas uropatógenas fueron aisladas de casos de IVUs en pacientes. En ensayos clínicos se demostró que Solco-Urovac proporcionaba cierta protección contra el desarrollo de IVUs en pacientes recurrentes (O'Brien *et al.*, 2016; Sirah *et al.*, 2018). Además, se diseñó con las mismas cepas una vacuna vaginal llamada Urovac que en ensayos clínicos demostró tener efectos adversos en la zona administrada (Das, 2002). A pesar de los resultados prometedores en la versión inyectable intramuscularmente, aún no se ha aprobado el uso de esta vacuna en el mercado (Grischke y Rüttgers, 1987; O'Brien *et al.*, 2016).

En años recientes, se ha realizado un análisis multicéntrico retrospectivo observacional con la vacuna Uromune, una preparación comercialmente disponible en España, realizada con cepas de *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Enterococcus faecalis*. Las mujeres incluidas en este ensayo clínico tenían un historial de IVUs recurrentes y se les administró de manera profiláctica la vacuna. Al finalizar el periodo de observación de 15 meses, las mujeres quienes habían consumido Uromune de manera diaria durante 3 meses (al igual que Urovaxom), mostraron un menor número de infecciones recurrentes que aquellas mujeres que recibieron tratamiento profiláctico con trimetroprim/sulfametoxazol diariamente durante seis meses (Lorenzo-Gómez *et al.*, 2013).

En un estudio posterior con un grupo de mujeres más grande, los mismos investigadores repitieron sus hallazgos preventivos de esta preparación (Lorenzo-Gómez *et al.*, 2015). Además, un estudio realizado en Reino Unido ha demostrado que utilizando esta misma vacuna el efecto profiláctico de Uromune

se mantiene en mujeres británicas que presentan IVUs recurrentes (Yang y Foley, 2017).

Autovacunas o LBs autólogos.

Desde la segunda década del siglo pasado se encuentran reportes sobre la implementación de autovacunas, también conocidos como LBs autólogos para el tratamiento de diversas infecciones, desde vaginales hasta respiratorias (Rusch *et al.*, 2001; Rusch y Schwierz, 2007; De Benedetto y Sevieri, 2013; O'Brien *et al.*, 2016). Sin embargo, su aplicación cayó en desuso debido a la extendida aplicación que se les dio a los antibióticos. Las autovacunas se definen como un tipo de vacunas preparadas utilizando los mismos microorganismos que provocan la infección en los pacientes; por esto se les dice que están “hechas a la medida”. Estas se recomiendan en pacientes que no han mostrado mejoría al ser tratados con antibióticos o vacunas convencionales (Rusch *et al.*, 2001, Rusch y Schwierz, 2007). A pesar de que este tipo de terapia ha caído en desuso por la medicina tradicional, recientemente Carrión- López *et al.* (2020) identificaron que la aplicación de una autovacuna entre pacientes con IVUs recurrentes es capaz de obtener urocultivos negativos durante los primeros tres meses del tratamiento en el 76 % de los sujetos de estudio. Este tipo de investigaciones dan un impulso para que se generen este tipo de terapias y la posterior identificación y caracterización de los componentes inmunogénicos de los mismos.

Vacunas antígeno específicas.

Además de utilizar cepas inactivadas de uropatógenos con la finalidad de inmunizar a pacientes con IVUs, diferentes grupos de investigación se han dado a la tarea de identificar y utilizar únicamente antígenos específicos que podrían estar jugando un papel clave en el proceso infeccioso de la bacteria. Un ejemplo de esto es la utilización de las adhesinas FimH y PapG de los pili tipo 1 y pili P, respectivamente, que median la primera interacción que tienen las cepas de UPEC con las células del hospedero. Debido a esto se han desarrollado vacunas

cuyo antígeno específico son las adhesinas de estos pili, obteniendo resultados positivos.

Roberts *et al.* (2004) administraron vía peritoneal una vacuna que contenía PapG purificado y reportaron que esta inmunización protegía a los 6 monos vacunados en el estudio contra pielonefritis causada por UPEC; mientras que el grupo no vacunado, grupo control de 5 monos, mostraba daños en tejido renal provocados por UPEC. Por otro lado, Poggio *et al.* (2006) utilizaron a FimH purificada como vacuna protectora contra la infección de ratones por UPEC y reportaron que aquellos ratones que fueron vacunados (independientemente si la ruta de vacunación fue intranasal o intramuscular), mostraron una reducción de dos logaritmos de Unidades Formadoras de Colonia (UFC) de UPEC en vejiga posterior al sacrificio. Estos resultados prueban que es posible crear una protección, por lo menos en modelos animales, contra las infecciones causadas por las cepas de UPEC.

II.4.2.3. Estructuras de superficie bacteriana son candidatos para la creación de proteínas recombinantes con capacidad inmunogénica.

En la actualidad, diversas herramientas de la biología molecular nos permiten diseñar proteínas recombinantes, también llamadas químéricas, expresadas en vectores bacterianos que puedan funcionar como vacunas contra diferentes tipos de enfermedades. El principio de esta tecnología se fundamenta en que la parte realmente antigénica de una proteína suele ser una pequeña sección peptídica. Esto permite diseñar proteínas artificiales que presenten más de un péptido antigénico y potenciar sus capacidades inmunogénicas (Saylor, 2020).

En este respecto, las estructuras de superficie externa bacteriana son componentes críticos que median la primera interacción que tienen las UPEC con las células del hospedero. Debido a esto, muestran un gran potencial para ser utilizados en el diseño de inmunógenos que logren incrementar la respuesta inmune del hospedero. El uso de estas estructuras en la creación de vacunas contra patógenos Gram negativos se ha llevado a cabo desde hace varios años

con resultados prometedores (Braun *et al.*, 1976; Hofstra & Dankert, 1980; Pagès *et al.*, 1987; Kawahara *et al.*, 1994; Grandi, 2001).

Nuevas tecnologías han permitido hacer diversos estudios en donde se han caracterizado de manera genómica y proteómica las diferentes proteínas que conforman la membrana externa de las cepas de UPEC (Alteri & Mobley, 2007; Wurpel *et al.*, 2015; Wurpel *et al.*, 2016). Esta información se ha aplicado para la creación de diferentes proteínas recombinantes que logren generar un efecto inmunizante contra las UPEC. Un ejemplo de esto es lo realizado por Luna-Pineda *et al.* (2016) diseñaron una serie de proteínas recombinantes combinando los genes que codifican para las adhesinas FimH, CsgA y PapG en UPEC y evaluaron la capacidad inmunogénica de cada una de éstas. Ellos concluyeron que las proteínas recombinantes FimH-CsgA y FimH-CsgA-PapG fueron capaces de estimular la producción de Interleucina 6 y 8. Por otro lado, probaron el efecto que tenían los anticuerpos de conejos contra FimH, CsgA y PapG, generados en respuesta a la inoculación con estas proteínas, en la adherencia de UPEC (cepa de referencia, “CFT073”) a una línea celular de vejiga. De manera notable, los autores señalan que los anticuerpos anti-FimH, anti-CsgA y anti-PapG, mostraron una disminución en la adherencia de UPEC a células de vejiga de un 32, 21 y 60 %, respectivamente.

Lamentablemente, la limitación de este estudio radica en que el diseño de esta vacuna químérica se basó solamente en aquellos factores de virulencia encontrados en la cepa de referencia de UPEC “CFT073”, factores que no son compartidos por la mayoría de las cepas de UPEC. De hecho, se sabe que no todas las cepas de UPEC comparten la misma estructura en su pili y adhesinas (O’Brien *et al.*, 2016).

En general, estos estudios demuestran que las estructuras de superficie externa bacteriana tienen el potencial para ser usados en el diseño de una vacuna de amplio espectro contra las IVUs. Es por eso por lo que es necesario identificar a aquellas que sean relevantes para la mayoría de las cepas UPEC.

III. Hipótesis.

Las cepas de UPEC expresan proteínas de superficie inmunogénicas exclusivas con capacidad para inducir una respuesta inmune protectora.

IV. Objetivos.

IV.1. Objetivo general.

Identificar proteínas de superficie con capacidad inmunogénica en cepas de UPEC aisladas de pacientes con IVU.

IV.2. Objetivos específicos.

1. Seleccionar las cepas de UPEC y *E. coli* provenientes de heces con serovares que se aíslan con mayor frecuencia de pacientes con IVU.
2. Realizar la extracción de proteínas de superficie de UPEC y *E. coli* provenientes de heces para comparar su perfil proteico.
3. Definir a las proteínas de superficie inmunogénicas exclusivas de las cepas de UPEC.
4. Identificar los genes que codifican para las proteínas de superficie inmunogénicas en cepas de UPEC y *E. coli* provenientes de heces de pacientes con IVU.

V. Materiales y métodos.

V.1. Materiales.

V.1.1. Materiales biológicos.

Se seleccionaron las cepas UPEC con los serotipos aislados con mayor frecuencia de pacientes con IVUs y cepas de *E. coli* provenientes de heces (serotipos no UPEC) aislados con mayor frecuencia de pacientes con IVUs. Las cepas estudiadas fueron obtenidas del proyecto HIM/2014/022 SSA.1122 “Desarrollo de autovacunas para el tratamiento y control de infecciones persistentes de vía urinarias” realizado en el Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana de la Unidad Periférica de Hemato Oncología e Investigación del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” (HIMFG) y la Facultad de Medicina de la UNAM. Finalmente, se utilizaron como controles a las cepas UPEC CFT073 (O6:H1) ATCC 700928 y a la cepa no patógena *E. coli* HB101.

Por otro lado, con el objetivo de tener una muestra representativa de la respuesta inmune de diversos pacientes y debido a que en estudios previos (Serrano Valdez, 2017; Salazar Jiménez, 2018) se había demostrado que la reactividad de los sueros individuales se comportaba de manera uniforme, en este estudio utilizamos una mezcla compuesta del suero de 4 pacientes después de ser sometidos a un tratamiento con el lisado bacteriano pertenecientes a los serogrupos O75, O25, O6 y O1, identificados como los más prevalentes en este estudio (**Cuadro 5**).

V.2. Métodos.

V.2.1. Obtención de Lisados Bacterianos (LBs).

Cada una de las cepas UPEC seleccionadas fue cultivada en caldo hasta llegar a una concentración celular de 10^8 UFC/ml. Estos cultivos se concentraron por centrifugación a $4,600 \times g$ (Sorvall® RT 6000D, DuPont, EE. UU.) durante 15 min. Posteriormente, se agregaron 20 ml de solución salina isotónica (SSI) y el sedimento se homogenizó con agitación mecánica. La suspensión bacteriana fue

inactivada por calor fluente (96 °C) durante 1 h y se centrifugó nuevamente (4,600 x g). El nuevo paquete celular se suspendió en SSI, se realizó una nueva centrifugación (4,600 x g) y el sobrenadante se pasó por filtro con poro de 0.22 µm (Millipore Sigma, EE. UU.). Para evaluar la ausencia de crecimiento bacteriano en el filtrado, se sembraba una alícuota en Agar Soya Trypticaseína (AST) (Bioxon, México). El LB se colocó en viales de cristal estériles que fueron sellados con anillo metálico, estos se incubaron a 37 °C durante 24 h para confirmar la esterilidad.

V.2.2. Ensayo por inmunoabsorción ligado a enzimas (ELISA) con los LBs.

Para identificar si los sueros de los pacientes tendrían reacción contra componentes del LB, se realizó un ensayo de ELISA utilizando microplacas de 96 pozos (Inmulon™ 1 B, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.), donde en cada pozo se colocaron 100 µl (8 µg de proteína/ml en solución amortiguadora de carbonatos) del LB de cada una de las cepas, e incubaron toda la noche a 4 °C. Posteriormente se bloqueó la superficie de los pozos con 100 µl de 2 % BSA (w/v) diluida en PBS. Después de tres lavados (2 min c/u) con PBS-Tween al 0.1 % (PBS-T) se agregó el primer anticuerpo (una mezcla de 4 sueros de pacientes con IVU o una mezcla de 4 sueros de personas sin IVU, suero control) a una dilución 1:100 y se incubó durante 1 h a 37 °C. A continuación, se repitieron los lavados con PBS-T y se aplicó el anticuerpo secundario anti-IgG humano, marcado con la enzima peroxidasa (Millipore Sigma, EE. UU.) a una dilución de 1:1000 e incubados durante 1 h a 37 °C. Finalmente, se repitieron los lavados con PBS-T y la reacción antígeno-anticuerpo se hizo evidente al agregar el sustrato H₂O₂-ABTS (Sigma Aldrich, EE. UU.) durante 20 min a 37 °C; la lectura de la reacción se realizó a 405 nm en un lector Fotómetro para microplacas Multiskan™ FC (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.).

V.2.3. Obtención de estructuras de superficie y proteínas de membrana externa provenientes de cepas UPEC y *E. coli* provenientes de heces.

Obtención de estructuras de superficie.

La expresión y obtención de estructuras de superficie se realizó por el método reportado por Mazariego-Espinosa *et al.* (2010) con ciertas modificaciones. Cada una de las cepas utilizadas en este ensayo se cultivaron por siembra masiva en AST adicionado con 5 % de sangre de carnero (24 h a 37 °C, 5 % de CO₂). La biomasa se colectó en Solución Salina amortiguadora con Fosfatos (PBS, por sus siglas en inglés) y se agitó de manera vigorosa durante 30 min, posteriormente las preparaciones se centrifugaron a 10,000 x g (30 min a 4 °C). El sobrenadante se colectó y centrifugó a 18,000 x g (30 min a 4 °C), el nuevo sobrenadante se colectó y centrifugó a 72,000 x g (4 h a 4 °C). El botón obtenido se solubilizó en PBS al que se le adicionaron 100 U de una mezcla de inhibidor de proteasa (No. de catálogo P8465, Sigma-Aldrich, EE. UU.). Para estandarizar la cantidad de proteína utilizada en los diferentes ensayos con los LBs y extractos proteicos, la concentración de proteína se calculó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) utilizando la absorbancia a 280 nm normalizada a una longitud de 10 mm de trayectoria.

Obtención de proteínas de membrana externa (OMPs).

La obtención de OMPs se realizó utilizando la técnica descrita por Molloy *et al.* (2010) con ciertas modificaciones. Cada una de las cepas que fueron utilizadas en este ensayo se cultivaron en 500 ml de caldo Luria (DIBICO, EE. UU.) en agitación constante a 200 rpm (24 h a 37 °C). Posteriormente el cultivo se centrifugó a 8,000 x g (10 min a 4 °C), el botón se suspendió en HEPES 10 mM (pH 7.0) y se lavó dos veces con el mismo amortiguador. Las bacterias fueron disgregadas al pasar dos veces a través de una prensa French (American Instrument Company, EE. UU.) a 20,000 lb/in². Las células bacterianas no lisadas se removieron por centrifugación a 8,000 x g (10 min a 4 °C), el sobrenadante recuperado se diluyó en carbonato de sodio 0.1 M (pH 11) hasta alcanzar a un volumen de 50 ml y se mantuvo en agitación en hielo durante 1 h.

Las membranas insolubles en carbonato se recuperaron por ultracentrifugación a 112,000 x g (1 h a 4 °C); el botón se lavó con HEPES 10 mM (pH 7.0) y centrifugó una vez más a 112,000 x g (30 min a 4 °C). Finalmente, el botón fue suspendido en 1 ml de HEPES 10 mM (pH 7.0) con 100 U de una mezcla de inhibidor de proteasas (Sigma-Aldrich, EE. UU.). Para estandarizar la cantidad de proteínas a utilizar en los diferentes ensayos con los LB y extractos proteicos, la concentración de proteína se calculó en un espectrofotómetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) utilizando la absorbancia a 280 nm normalizada a una longitud de 10 mm de trayectoria.

V.2.4. Análisis inmunoproteómico de las proteínas de superficie obtenidas de cepas de UPEC y *E. coli* provenientes de heces.

Con la finalidad de identificar a las proteínas de superficie inmunogénicas expresadas por las cepas UPEC y diferenciarlas de aquellas producidas por *E. coli* provenientes de heces, se realizaron análisis inmunoproteómicos en donde se utilizaron sueros de dos diferentes grupos de individuos: pacientes con IVU y personas sanas. Aquellas fracciones proteicas de las cepas de UPEC que generaron una reacción inmunogénica con el suero de individuos con IVUs pero no con suero de individuos sanos, fueron de nuestro interés. La metodología realizada se describe a continuación.

Electroforesis desnaturizante en gel de poliacrilamida con dodecil sulfato de sodio (SDS-PAGE) y en 2 dimensiones (2D-PAGE).

Las determinaciones de peso molecular y punto isoeléctrico se hicieron mediante la técnica de SDS-PAGE y 2D-PAGE, respectivamente. Ambas técnicas aplican un gradiente eléctrico a una mezcla de proteínas embebidas en una gel de poliacrilamida que permite la separación e identificación de estas proteínas. De manera adicional, previo al corrimiento de la mezcla proteica en el gel de poliacrilamida, la técnica de 2D-PAGE aplica un gradiente de pH a la mezcla.

SDS-PAGE desnaturizante.

La separación de las mezclas proteicas (100 µg) se realizó conforme a lo descrito por Laemmli (1970), utilizando un gel de poliacrilamida (12 o 15 % dependiendo del ensayo) bajo condiciones desnaturizantes, con 0.1 % (w/v) de dodecilsulfato de sodio (SDS), en presencia de β -mercaptoetanol. Los geles fueron colocados en una cámara de electroforesis vertical Mini-PROTEAN® (Bio-Rad, EE. UU.) y la separación de las proteínas se llevaba a cabo utilizando un amortiguador de corrida Tris-Glicina a 100 V durante el tiempo que le tomara al frente migrar hasta el final del gel. Para resolver la separación de las proteínas se utilizó un marcador de peso molecular (10 a 250 kDa) (PAGE RulerTM Plus #26619, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Finalmente, el gel se sumergió en una solución de Azul de Coomassie R 0.2 % (Bio-Rad, EE. UU.) y era destañido con una solución de metanol/ácido acético (30 %/10 %). Los geles fueron fotografiados con un fotodocumentador (omniDOC Gel Documentation System, Cleaver Scientific LTD, RU). El peso molecular aproximado fue determinado por interpolación con los pesos de las proteínas conocidas del marcador de peso molecular.

2D-PAGE.

La separación de proteínas basándose en su punto isoeléctrico (el valor de pH en que la carga neta del péptido equivale a cero, pl) aumenta la resolución y facilita la identificación de las proteínas de superficie inmunogénicas. En este trabajo se utilizó el protocolo comercial de 2D-PAGE desarrollado por GE Healthcare Life Sciences, en donde las tiras de gradiente de pH (Immobiline® DryStrip pH 3-10, 13 cm, GE Healthcare Life Sciences. EE. UU.) previamente hidratadas se colocaron en una gradilla especial para tiras (Immobiline® DryStrip Reswelling Tray, GE Healthcare Life Sciences. EE. UU.) y se pusieron en contacto con la mezcla de proteínas (100 µg) de superficie de cada cepa. La gradilla se colocó dentro del IPG Box (GE Healthcare Life Sciences. EE. UU.) y se dejó interactuando a la tira y a la mezcla de proteínas durante 10 h a temperatura ambiente. A continuación, las tiras se trataron con una solución

amortiguadora de equilibrio SDS y ditiotreitol con la finalidad de cargar negativamente la mezcla proteica embebida en la tira Inmobiline®.

Posteriormente, estas tiras se colocaron en la parte superior de un gel de poliacrilamida al 15 % y montados en una cámara de electroforesis vertical PROTEAN® II XL (Bio-Rad, EE. UU.) y la separación de las proteínas se llevaba a cabo utilizando un amortiguador de corrida Tris-Glicina a 50 V durante el 22 h. Finalmente, el gel se teñía con Azul de Coomassie R 0.2 % (Bio-Rad, EE. UU.) y era desteñido con una solución de metanol/ácido acético (30 %/10 %). Los geles fueron fotografiados con un fotodocumentador (omniDOC Gel Documentation System, Cleaver Scientific LTD, RU). El peso molecular aproximado se calculó por interpolación con los pesos de las proteínas conocidas del marcador de peso molecular (10 a 250 kDa) (PAGE RulerTM Plus #26619, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.). Mientras que el pl fue calculado con la distancia de la tira de 13 cm (Immobiline® DryStrip pH 3-10, GE, EE. UU.).

Electrotransferencia de proteínas e inmunodetección (Western Blot).

Una vez realizada la separación de las fracciones proteicas por los métodos de SDS-PAGE, estas fueron transferidas a membranas de PVDF (Millipore Sigma, EE. UU.) (Towbin *et al.*, 1979). Para comprobar la transferencia de proteínas, las membranas fueron teñidas con rojo de Ponceau al 0.001 % en 0.5 % de ácido acético glacial, para posteriormente ser lavadas con PBS-T (0.05 %). Después de la transferencia de las proteínas de superficie a la membrana, los espacios libres fueron saturados con una solución bloqueadora (leche descremada al 5 % en PBS) durante 1 h a temperatura ambiente. Posteriormente, se realizaron tres lavados con PBS-Tween (15 min c/u) previo a la incubación (por 1 h a 25 °C) con el primer anticuerpo (una mezcla de 4 sueros de pacientes con IVU o una mezcla de 4 sueros de personas sin IVU, suero control) 1:200. A continuación, se repitieron los tres lavados con PBS-T y se aplicó el anticuerpo secundario anti-IgG humano, marcado con la enzima peroxidasa (Millipore Sigma, EE. UU.), siguiendo las instrucciones del fabricante. Finalmente, se repitieron los tres lavados con PBS-Tween y se incubaron durante

5 minutos en una solución de Tris-HCl (pH 6.8, 0.01 M). Para determinar la unión del anticuerpo al antígeno, se utilizó una reacción colorimétrica con H₂O₂, como sustrato, en presencia de 4-cloro-1-naftol. Las membranas fueron fotografiadas con un fotodocumentador (omniDOC Gel Documentation System, Cleaver Scientific LTD, RU). Los perfiles de proteínas inmunorreactivas entre los grupos de bacterias UPEC y provenientes de heces revelados por el suero de pacientes con IVU o suero control, fueron analizados.

V.2.5. Identificación de las proteínas de superficie con capacidad inmunogénica por medio de espectrometría de masas.

Las proteínas reconocidas por el suero de pacientes con IVU se cortaron de los geles de SDS-PAGE y 2D-PAGE teñidos con Azul de Coomassie. Estas proteínas se enviaron para su secuenciación al Instituto de Biotecnología de la UNAM en Cuernavaca, Morelos; y el método utilizado se describe a continuación.

Optimización del espectrómetro de masas (calibración externa).

El ajuste de los parámetros para asegurar que el instrumento funcione dentro de las especificaciones fue realizado con una solución Calmix (N-butilamina, cafeína, Met-Arg-Phe-Ala (MRFA) y Ultramark 1621 (*Pierce LTQ Velos ESI Positive Ion Calibration Solution*). Estos calibrantes se utilizan para calibrar el módulo LTQ Velos con trampa de iones y el módulo Orbitrap con detector de masas FT (*Fourier Transform*) en modo de ionización positiva ESI. La N-butilamina se utiliza para extender la calibración de masas a menores valores de m/z (73.14 Da). Este tipo de calibración permite determinaciones de masas moleculares con variación de exactitudes menores a 5 ppm (partes/millón).

Procesamiento químico de las muestras y análisis espectrométrico.

Las muestras fueron previamente reducidas con ditiotreitol (Sigma-Aldrich, EE. UU.), alquiladas con iodoacetamida (Sigma-Aldrich) y digeridas en gel con tripsina (*Promega Sequencing Grade Modified Trypsin*; Promega, EE.

UU.). En el procesamiento de las muestras con tripsina se utilizó una solución que contiene 50 mM bicarbonato de amonio (pH 8.2) y la incubación fue de 18 h a 37 °C.

Los péptidos producidos por clivaje enzimático fueron desalados con Zip Tip C18 (Millipore Sigma, EE. UU.) y aplicados en un sistema de espectrometría de masa por cromatografía en fase líquida (LC-MS, por sus siglas en inglés) compuesto de una bomba Accela (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) acoplado a un espectrómetro de masas LTQ-Orbitrap Velos (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) con fuente de ionización tipo *nano-electrospray* (ESI). En la cromatografía de líquidos de nano flujo en línea se utilizó un sistema gradiente de 5-85 % B (acetonitrilo con 0.1 % de ácido fórmico) en 60 minutos utilizando una columna capilar RP-C18 hecha en casa (0.75 µm de diámetro interno y 10 cm de largo). El flujo del sistema LC fue de 300 nanolitros/minuto.

El escaneo total de iones (*Full Scan*) fue realizado en el analizador Orbitrap con un poder de resolución de masas (*Resolution Power*; RP = m/FWHM) de 30,000. Para la fragmentación de los péptidos se aplicaron los métodos de CID (*Collision-Induced Dissociation*) y HCD (*High-Energy Collision Dissociation*) con un poder de resolución de masas (*ResolutionPower*; RP=m/FWHM) de 15,000. Todos los espectros fueron adquiridos en modo de detección positivo. La ejecución y captura de los datos de fragmentación fueron realizados de forma dependiente del escaneo total de iones según las cargas predeterminadas (solamente se fragmentó iones con carga z^{2+} , z^{3+} y z^{4+}) con un ancho de aislamiento de 2.0 (m/z), energía de colisión normalizada de 35 unidades arbitrarias, activación Q de 0.250, tiempo de activación de 5 milisegundos y tiempo máximo de inyección de 10 milisegundos por microescaneo. Durante la captura automática de los datos se utilizó la exclusión dinámica de iones: (i) lista de exclusión de 500 iones, (ii) tiempo de pre-exclusión de 30 segundos y (iii) tiempo de exclusión de 70 segundos.

Búsqueda en la base de datos del programa e identificación de proteínas.

La identificación de proteínas se realizó con los datos espectrométricos en formato **.raw** en el programa Proteome Discoverer 1.4. (Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) a través del motor de búsqueda Sequest HT. Para la búsqueda de identidad se utilizó la base de datos invertida (*Decoy database*) de Uniprot-*E. coli*, con un FDR (*False Discovery Rate*) mínimo de 0.01 y máximo de 0.05. La tolerancia máxima de diferencia de masas moleculares del ion precursor cuando comparados los valores teóricos contra experimentales (*precursor mass tolerance*) fue de 20 ppm y la tolerancia para los fragmentos obtenidos por disociación del ion precursor (*fragment mass tolerance*) fue de 0.6 Da. Para la búsqueda automática fueron establecidas modificaciones constantes carbamidometilación de cisteínas y variables como oxidación de metioninas y deaminación de asparagina y glutamina.

V.2.6. Metodología de PCR para la detección de genes de virulencia asociados a UPEC

Para determinar la presencia de los genes de viurlencia de UPEC en las cepas de *E. coli* aisladas de heces, se realizaron ensayos de PCR utilizando los iniciadores para los genes *fimH*, *traT*, *feoB*, *irp2* y *sat* propuestos por Johnson y Stell (2000) y Ewers *et al.* (2007). Se preparó una mezcla de reacción de PCR que contenía 3 µl de templete de DNA, 0.4 µl (10 µM) de cada par de iniciadores (*fimH*: sentido 5'-TGCAGAACGGATAAGCCGTGG-3' y contrasentido 5'-GCAGTCACCTGCCCTCCGGTA-3'; *traT*: sentido 5'-GGTGTGGTGCGATGAGCACAG-3' y contrasentido 5'-CACGGTTCAGCCATCCCTGAG-3'; *feoB*: sentido 5'-AATTGGCGTGCATGAAGATAACTG-3' y contrasentido 5'-AGCTGGCGACCTGATAGAACAAATG-3'; *irp2*: sentido 5'-AAGGATTGCGCTGTTACCGGAC-3' y contrasentido 5'-TCGTCGGGCAGCGTTCTTCT-3'; *sat*: sentido 5'-TGCTGGCTCTGGAGGAAC-3' y contrasentido 5'-TTGAACATTCAAGAGTACCGGG-3') y 5 µl de PCR Master Mix (2X) (No. de

catálogo K0171, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) ajustada con H₂O a un volumen final de 10 µl. El protocolo de PCR para los genes *fimH*, *traT* y *feoB* fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 25 ciclos de 94 °C por 30 segundos, alineación de 63 °C por 30 segundos, una extensión de 68 °C por 3 min y extensión final a 72 °C por 10 min. Mientras el protocolo de PCR para los genes *irp2* y *sat* fue idéntico al anterior con una variación en las condiciones de alienación de 58 °C por 30 segundos. Los productos de PCR fueron cargados (5 µl/pozo) en geles de agarosa (1.5 %) y el corrimiento de los geles se llevó a cabo utilizando un amortiguador de corrida SB a 100 V durante el tiempo que le tomara al frente recorrer todo el largo el gel. Finalmente, los geles fueron teñidos utilizando Bromuro de Etilio (0.5 mg/ml) (Bio-Rad, EE. UU.) durante 15 min y posteriormente fotografiados con un fotodocumentador (omniDOC Gel Documentation System, Cleaver Scientific LTD, RU). El peso del producto fue comparado con el marcador de peso molecular (100 a 1,500 pb) (AMPIGENE® DNA Ladder, No. de catálogo ENZ-GEN101-0100, Enzo Life Sciences, EE. UU.).

V.2.7. Metodología de PCR para la detección de los genes que codifican para las proteínas de superficie inmunogénicas de UPEC.

Para determinar la frecuencia del gen *ompA* en cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes, se analizaron 148 cepas. Esta muestra representativa de cepas fue recuperada del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”. Se realizaron ensayos de PCR utilizando los iniciadores propuestos por Ewers *et al.* (2007). Se preparó una mezcla de reacción de PCR que contenía 3 µl de template de DNA, 0.4 µl (10 µM) del par de iniciadores (sentido 5'-AGCTATCGCGATTGCAGTG-3' y contrasentido 5'-GGTGTTGCCAGTAACCGG-3') y 5 µl de PCR Master Mix (2X) (No. de catálogo K0171, Thermo Fisher Scientific, EE. UU.) ajustada con H₂O a un volumen final de 10 µl. El protocolo de PCR fue el siguiente: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, seguido de 35 ciclos de 94 °C por 45 segundos, alineación de 55 °C por 60 segundos, una extensión de 72 °C por 1 min y extensión final a 75 °C por 5 min. Los productos de PCR fueron cargados (5

μ l/pozo) en geles de agarosa (1.5 %) y el corrimiento de los geles se llevó a cabo utilizando un amortiguador de corrida SB a 100 V durante el tiempo que le tomara al frente recorrer todo el largo el gel. Finalmente, los geles fueron teñidos utilizando Bromuro de Etidio (0.5 mg/ml) (Bio-Rad, EE. UU.) durante 15 min y posteriormente fotografiados con un fotodocumentador (omniDOC Gel Documentation System, Cleaver Scientific LTD, RU). El peso del producto fue comparado con el marcador de peso molecular (100 a 1,500 pb) (AMPIGENE® DNA Ladder, No. de catálogo ENZ-GEN101-0100, Enzo Life Sciences, EE. UU.).

V.2.8. Elaboración de una base de datos bioinformática de la diversidad de las secuencias DNA de las proteínas de superficie con capacidad inmunogénica.

Se creó una base de datos con secuencias de nucleótidos reportados en la literatura que incluyera todas las variaciones del gen *ompA*. Para integrar la base de datos, se realizó una búsqueda en la literatura científica de las secuencias de referencia de *ompA*. Los números de acceso fueron registrados y las secuencias descargadas del GenBank. Posteriormente, cada secuencia se sometió a una búsqueda de secuencias homólogas usando la herramienta BLAST del NCBI (Altschul *et al.*, 1990). Secuencias con un porcentaje de identidad $\geq 99\%$ y $\geq 95\%$ de cobertura fueron descargadas y depositadas en nuestra base de datos.

Las secuencias de nucleótidos obtenidas se alinearon utilizando el programa bioinformático MEGA X (Kumar *et al.*, 2018) y se calculó el porcentaje de identidad para cada secuencia de *ompA*. Los alineamientos de secuencias fueron utilizados para la construcción de un árbol filogenético utilizando el método de *Maximum-Likelihood* (Kishino & Hasegawa, 1989) para identificar posibles linajes de las secuencias de *ompA*.

V.2.9. Análisis estadístico.

Para el análisis estadístico se utilizó el paquete computacional GraphPad Prism 8 (GraphPad Software, CA, EE. UU.). Las diferencias estadísticas en el

ensayo de inmunodetección por ELISA entre las mezclas de sueros fueron evaluadas utilizando la prueba paramétrica ANOVA de una vía y una prueba *post hoc* de Tukey; mientras que para el ensayo de PCR buscando la presencia del gen *ompA* se realizó una prueba exacta de Fisher. En ambos análisis, los valores $p < 0.05$ fueron considerados estadísticamente significativos.

V.2.10. Manejo de residuos biológicos infecciosos.

Al finalizar cada ensayo, el agente biológico-infeccioso fue procesado de acuerdo con lo señalado por la **NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo**. De acuerdo con la norma, las cepas y cultivos bacterianos fueron desechadas en bolsas de polietileno translúcido rojo para su recolección y posterior incineración.

VI. Resultados y Discusión

VI.1. Serotipos UPEC más frecuentemente aislados de pacientes con IVU recurrentes.

En primera instancia era necesario realizar una selección de las cepas de UPEC más representativas aisladas de pacientes con IVUs y resguardadas en el cepario del laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez” / Unidad Periférica de la UNAM. Para esto se realizó una base de datos en donde los aislamientos fueron enlistados por serotipo (antígeno somático O y flagelar H), esta es la manera tradicional en que se tipifican las cepas de *E. coli* con base en el empleo de una batería de sueros de conejo que reconocen específicamente a alguna de las 167 variantes del antígeno somático (O) y 75 del antígeno flagelar (H) de la bacteria. Además de esta característica relevante, también se identificó el número de aislamientos pertenecientes a dicho serotipo y el número de urocultivos positivos relacionadas a este. Finalmente, se seleccionó una cepa de cada uno de los serotipos O25:H4; O75:HND; O6:H1; y O8:HND por ser los que mostraron una mayor frecuencia en el número total de aislamientos y urocultivos (**Cuadro 5**).

Cuadro 5. Selección de cepas UPEC provenientes de urocultivos de pacientes con IVUs. *HND, significa antígeno flagelar H no determinado.

Serotipo*	Aislamientos de UPEC provenientes de IVUs (%)	No. de urocultivos positivos (%)
O25:H4	236 (28.96)	12 (27.27)
O75:HND	109 (13.37)	5 (11.36)
O6:H1	38 (4.66)	3 (6.81)
O8:HND	23 (2.82)	2 (4.54)
O75:H44	21 (2.58)	1 (2.27)
O20:H9	20 (2.45)	1 (2.27)
O25:HND	19(2.33)	1 (2.27)
O1:H7	17 (2.09)	1 (2.27)
O22:H1	17 (2.09)	1 (2.27)
Otros	315 (38.65)	17 (38.63)
TOTAL	815	44

Además del grupo de cepas de UPEC, se seleccionó un grupo de bacterias *E. coli* frecuentemente aislado de las heces de los mismos pacientes con IVUs (**Cuadro 6**). De manera interesante, seis de los 10 serogrupos identificados pertenecían a los serogrupos clásico UPEC (O1, O2, O4, O6, O7, O8, O15, O16, O18, O21, O22, O25, O75, O83 y O175); debido a esto, se seleccionaron cepas de los serotipos O169:HND; O82:HND; O70:H11; y O48:HND.

Cuadro 6. Selección de cepas provenientes de heces de pacientes con IVUs. *HDN, significa antígeno flagelar H no determinado.

Serotipo*	Aislamientos de <i>E. coli</i> provenientes de heces	No. de aislamientos en %
O25:H4	42	21.21
O48:HND	13	6.57
O18ac:HND	10	5.05
O6:H1	10	5.05
O1:H30	9	4.55
O70:H11	7	3.54
O16:H5	6	3.03
O82:HND	5	2.53
O169:HND	4	2.02
O8:H7	4	2.02
TOTAL	198	100.00

Debido a que cada serogrupo es único para cada una de las cepas utilizadas y por practicidad, de ahora en adelante se utilizará como código el serogrupo de cada una de las cepas. En resumen, las cepas seleccionadas y utilizadas en este estudio fueron 4 cepas UPEC: O25 [RMR(U1)02], O75 [EGR(U2)01], O6 [TCJ(U2)01] y O8 [JRC(U4)01], 4 cepas provenientes de heces: O48 [AMR(C1)01], O70 [LNA(C1)01], O82 [CMP(C1)01] y O169 [VR(C1)01], y las cepas control CFT073 (UPEC de referencia) y HB101(cepa de *E. coli* K-12 de referencia), provenientes del cepario del Laboratorio de Patogenicidad Bacteriana del Hospital Infantil de México “Federico Gómez”/Unidad Periférica de la UNAM. De manera interesante, las cepas seleccionadas para este estudio corresponden a serogrupos previamente reportados en el país; en el caso particular de las cepas UPEC, estas pertenecen a serogrupos UPEC encontrados con mayor frecuencia en México (Ahumada-Cota *et al.*, Manuscrito en revisión)

VI.2. Inmunodetección por ELISA y Western-Blot en los LBs

Se decidió realizar un ensayo de ELISA con la finalidad de identificar si la reacción inmunogénica en el suero de los pacientes variaba después de ser inmunizados. Para esto se utilizaron tres diferentes mezclas de sueros: 1) Post-tratamiento, obtenido de pacientes después de haber sido tratados con el LB; 2) Pre-tratamiento, obtenido de pacientes antes de haber sido tratados con el LB; y 3) Sanos, una mezcla de suero de personas sin casos de IVUs en los últimos 6 meses. El suero de pacientes post-tratamiento mostró una mayor reactividad contra los LBs de las cepas O75, O25 y CFT073 (perteneciente al serogrupo O6), que lo observado con los sueros de pacientes antes de la administración del lisado (suero pre-tratamiento) y el de donadores (suero sanos) ($p < 0.05$) (**Figura 2**).

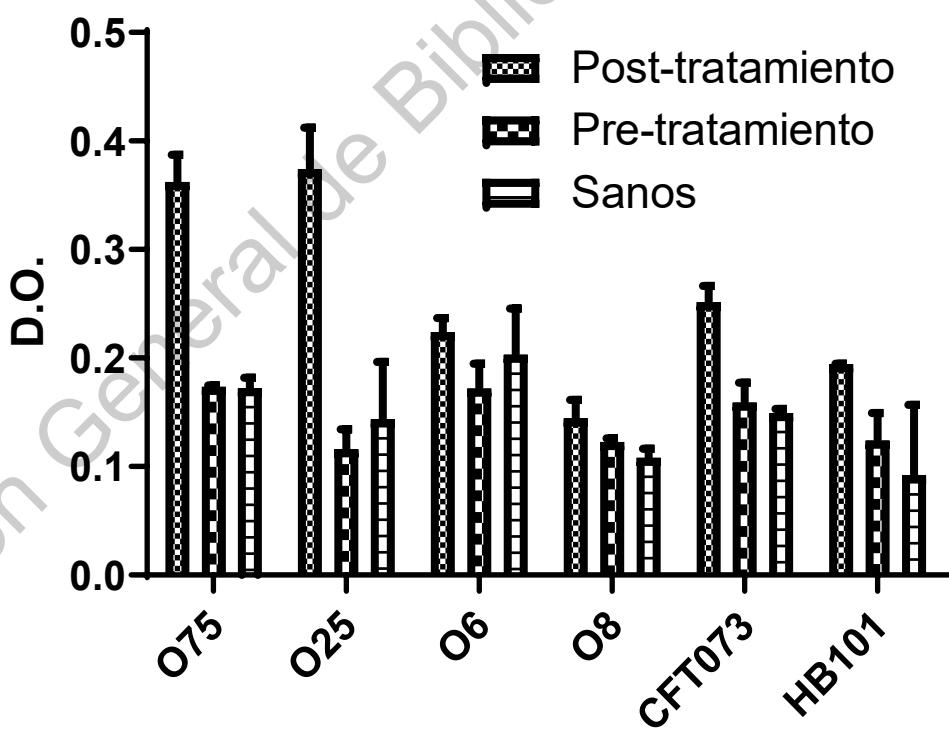


Figura 2. Reactividad del suero de pacientes contra el LB. Ensayo de ELISA para evaluar la respuesta de sueros de pacientes con IVUs previo (Pre-tratamiento), posterior a la administración del LB (Post-tratamiento) y de donadores sin IVUs (Sanos) analizados contra los 4 LBs de serogrupos más prevalentes (O75, O25, O6 y O8) y las cepas de referencia (CFT073 y HB101).

Con estos resultados, se procedió a identificar por Western-Blot las fracciones proteicas inmunogénicas presentes en los LBs de estas mismas cepas (O75, O25, O6, O8, CFT073 y HB101). El análisis reveló una reacción intensa del suero de pacientes tratados contra dos fracciones proteicas (~25 y ~30 kDa) de los LBs (**Figura 3A**), mientras que el suero antes del tratamiento y la correspondiente de donadores sin IVUs mostró una reactividad de menor intensidad (**Figura 3B**). Además, en el suero de pacientes tratados con LBs autólogos se observó respuesta con una fracción de ~55 kDa y la presencia de lipopolisacárido en los LBs de O75 y O25 (**Figura 3A**), respuesta que no se observa con el suero de individuos sanos.

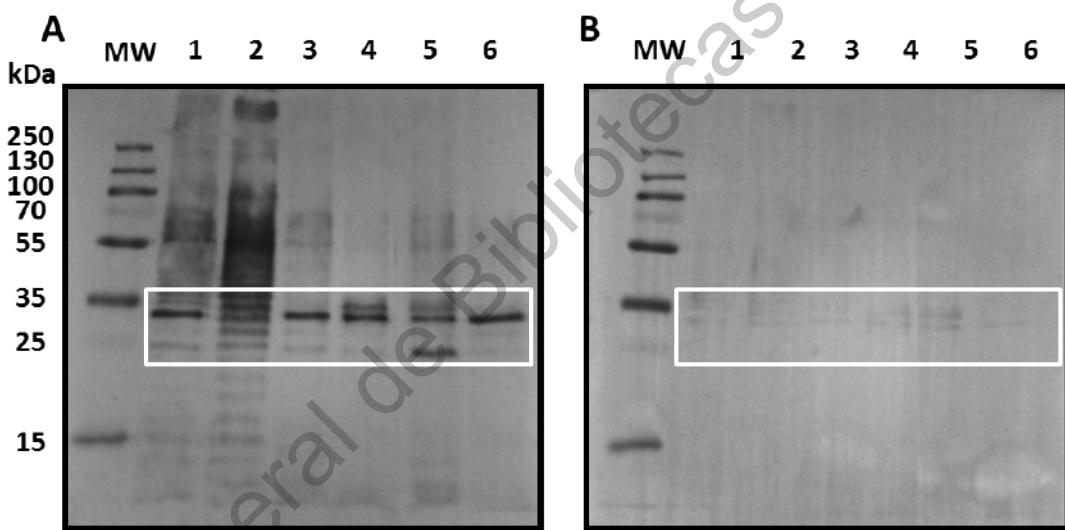


Figura 3. Identificación de proteínas inmunogénicas presentes en el LB. Ensayo de Western-Blot. Los LBs fueron sometidos a un ensayo de SDS-PAGE en un gel del 12 %, transferidos a una membrana de PVDF e incubados con (A) la mezcla de suero de los pacientes tratados con LB autólogo y (B) donadores sanos. MW: marcador de peso molecular; Carril 1-6: LB de O75, O25, O6, O8, CFT073 y HB101, respectivamente. La reacción del suero se observó primordialmente contra fracciones con pesos entre 25 y 35 kDa, enmarcado en blanco.

Algo notable es que a pesar de que los pacientes han tenido contacto previo con diversos antígenos bacterianos, ya sea durante las IVUs recurrentes o aquellos presentes en la microbiota intestinal, solamente se observa una mayor reactividad del suero contra LB después de que el paciente ha recibido el tratamiento. En los ensayos de ELISA, esta reactividad es mayor contra los LB

provenientes de las cepas de *E. coli* O75 y O25. Esto se explicaría por la composición de la mezcla de sueros en donde se emplearon suero de dos pacientes con infección crónica contra los serogrupos O75 y O25, por lo que estos pacientes recibieron el tratamiento con LB más de una vez. Lo anterior también podría explicar la detección de LPS solamente en esas dos muestras de LB.

Finalmente, los resultados referidos concuerdan con lo reportado por otros autores en donde se ha observado en modelos animales un aumento en la producción de IgGs e IgAs en suero y en mucosas al momento de administrar el lisado bacteriano con respecto al mismo grupo previo al tratamiento (Bessler et al., 2010). En el presente estudio, el suero utilizado provenía de pacientes a los que se les había administrado el LB autólogo de manera oral. Esta vía de administración de un inmunógeno o inmunoestimulante ayuda a la creación de anticuerpos contra antígenos específicos (Holmgren y Czerkinsky, 2005; Lycke, 2012). Específicamente, en IVUs se menciona que los LBs que son administrados por vía oral alcanzan las placas de Peyer en el intestino y estimulan la producción de IgGs e IgAs, que son liberadas en vejiga (Bessler et al., 2010).

VI.3. Identificación de estructuras de superficie bacteriana de cepas UPEC y provenientes de heces con reactivada inmunogénica

Para identificar a qué proteínas correspondían las fracciones inmunogénicas identificadas en los LB se realizó un protocolo para obtener estructuras de superficie de bacterias Gram negativas, utilizando las cepas UPEC (O75, O6 y O8) y las cepas aisladas de heces (O48, O70, O82 y O169), además de las cepas de referencia CFT073 y HB101. El análisis de las fracciones se realizó primero por SDS-PAGE y la tinción con Azul de Coomassie reveló la presencia de fracciones de proteínas con pesos entre 10 y 250 kDa, con una concentración alta de fracciones proteicas entre 55 y 100 kDa (**Figura 4A**). Debido al método de obtención, se cree que estas fracciones estarían siendo porinas de diferentes pesos. Posteriormente, el ensayo de Western-Blot

para identificar las fracciones inmunorreactivas mostró respuesta con el suero de pacientes tratados con LBs autólogos principalmente con una fracción de entre 33 y 35 kDa, presente en todos los extractos (**Figura 4B**). Otra observación interesante fue que los sueros de personas tratadas con LBs autólogos y de los donadores sin IVUs reaccionaron con el lipopolisácarido del extracto de la cepa O8 (**Figura 4B y 4C**). Además, al igual que en el ensayo anterior, no se observó una reacción contra estas mismas fracciones cuando se utilizó el suero de los donadores sanos (marco blanco **Figura 4B y 4C**).

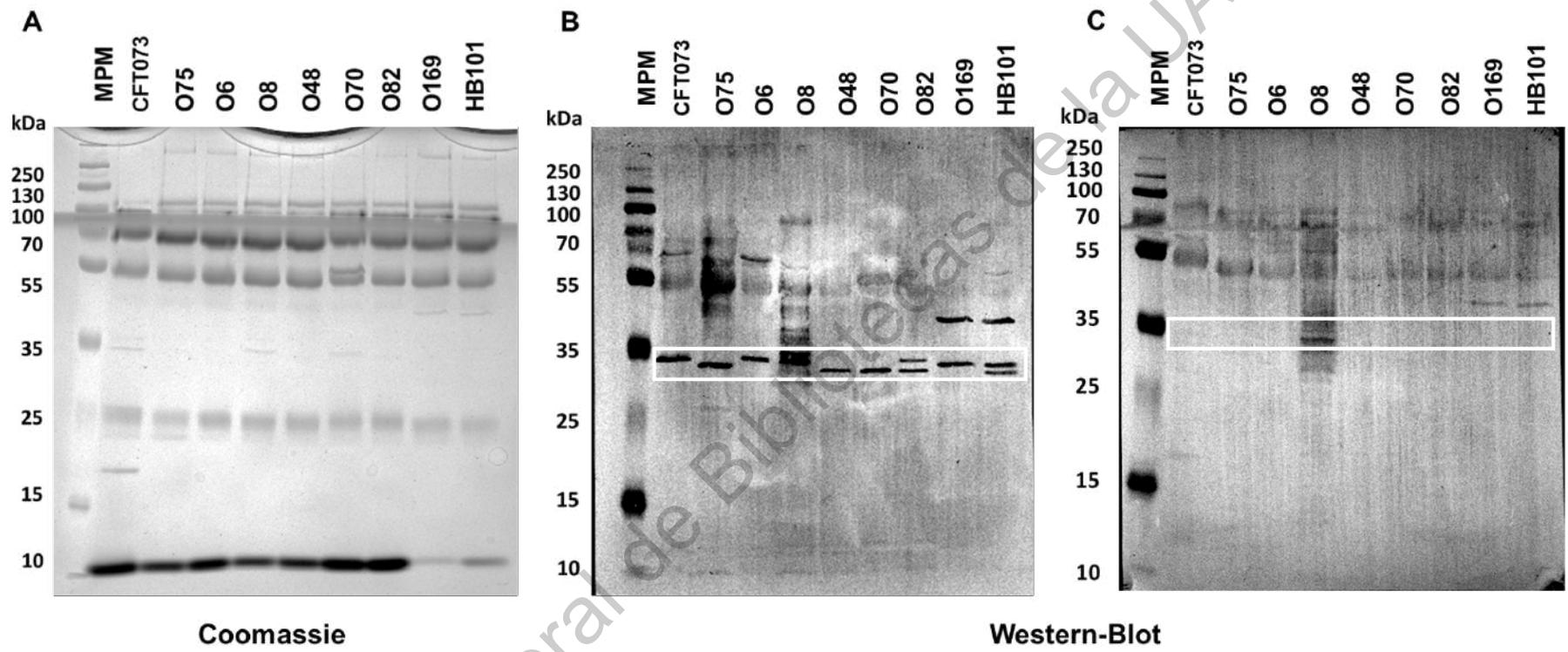


Figura 4. Reactividad del suero de pacientes y donadores contra estructuras de superficie de cepas de *E. coli*. Extractos de estructuras de superficie sometidos a un ensayo de (A) SDS-PAGE en un gel al 15 % de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie y Western-Blot utilizando (B) la mezcla de suero de pacientes tratados con el LB y (C) la mezcla de suero de donadores sanos. MPM: marcador de peso molecular; Carril 1-4: estructuras de superficie de cepas UPEC CFT073 (cepa de referencia), O75, O6 y O8, respectivamente; Carril 5-9: estructuras de superficie de cepas aisladas de heces, O48, O70, O82, O169 y HB101 (cepa de referencia), respectivamente. La reacción del suero se observó primordialmente contra fracciones con pesos entre 25 y 35 kDa, enmarcado en blanco.

Debido a que detectamos que las cepas consideradas no virulentas mostraron también fracciones inmunorreactivas de entre 33 y 35 kDa, investigamos si estas cepas podrían albergar genes de virulencia de *E. coli*, a pesar de ser obtenidas de heces y no pertenecer a serogrupos clásicos UPEC. Un análisis genético posterior ayudó a identificar que estas cepas contenían factores de virulencia vinculados, ya sea con la adherencia de la bacteria a las células del hospedero (*fimH*), con la resistencia a suero (*traT*), transportadores (*feoB*) y quelantes de hierro (*irp2*), y proteasas (*sat*) (**Cuadro 7**). Finalmente, se decidió no seguir trabajando con estas cepas ya que, al albergar genes de virulencia vinculados a UPEC, no se podría asegurar que se trataran de cepas no patógenas. Esto a pesar de que todas las cepas pertenecieron al filogrupo A de *E. coli*, asociado a cepas comensales (Clermont *et al.*, 2013; Morcatti Coura *et al.*, 2015). Además, que se especula que las cepas de *E. coli* que logran causar IVUs serían cepas intestinales que de alguna manera estarían invadiendo las vías urinarias (Klein y Hultgren, 2020; Wagenlehner *et al.*, 2020).

Cuadro 7. Genes relacionados a la virulencia de UPEC presentes en cepas de *E. coli* aisladas de heces.

Serogrupo	Filogrupo	Genes				
		<i>fimH</i>	<i>traT</i>	<i>feoB</i>	<i>irp2</i>	<i>sat</i>
O48	A	+	-	+	-	-
O70	A	-	+	+	+	+
O82	A	+	+	+	+	+
O169	A	+	+	+	+	+

Posteriormente, con el objetivo de realizar un ensayo semicuantitativo, se realizó un análisis de imagen de Western-Blot evaluando la densidad relativa de la reactividad de los sueros pre-tratamiento y doadores sanos contra la fracción de ~35 kDa observada en las cepas de UPEC en el ensayo anterior (**Figura 5**). De manera contundente, se observó que las bandas detectadas en el Western-Blot del suero de pacientes post-tratamiento (**Figura 5A**) no fueron detectadas por el suero de donadores sanos (**Figura 5B**), confirmando que la reactividad del suero es dada por el tratamiento con LBs autólogos. Mientras que la intensidad

de las bandas detectadas por el suero de pacientes post-tratamiento (**Figura 5A**) no muestran diferencias significativas entre sí ($p < 0.05$).

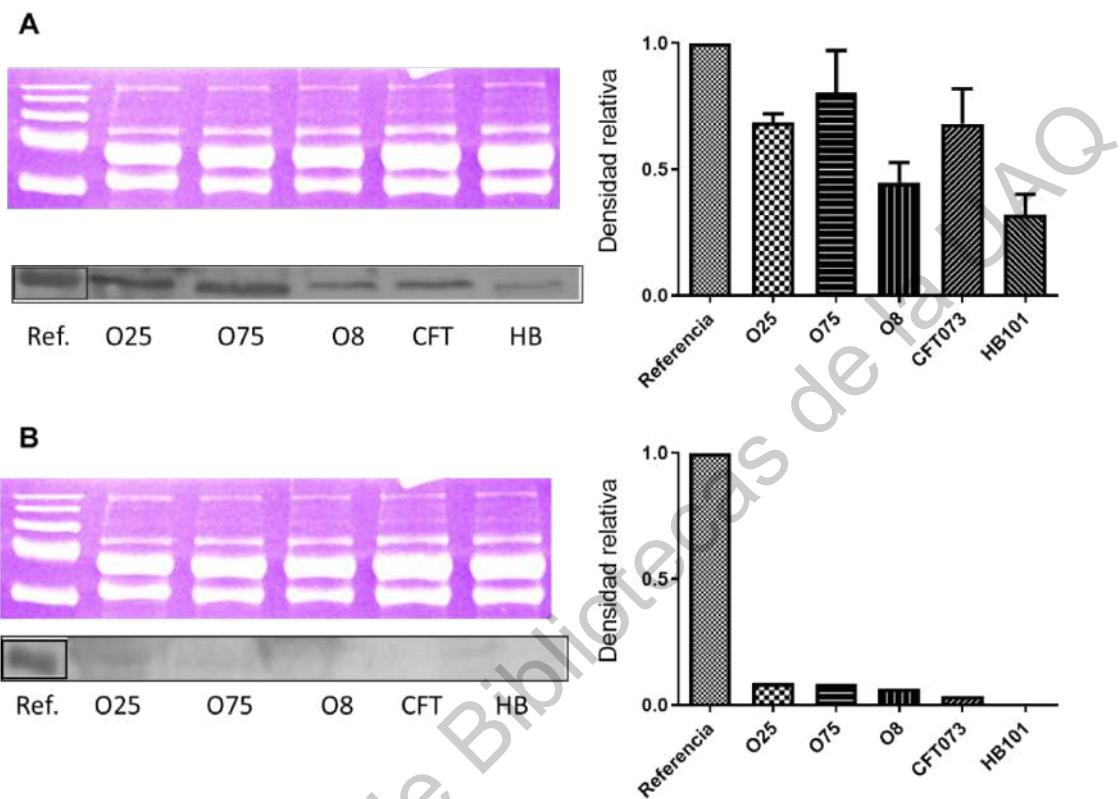


Figura 5. Reactividad del suero de pacientes y donadores contra la fracción proteica de ~35 kDa de superficie de cepas de UPEC. Ensayos de SDS-PAGE (geles en color azul) y Western-Blot (marco inferior) utilizando el extracto estructuras de superficie de las cepas UPEC O25, O75, O8, CFT073 (referencia UPEC) y HB101 (referencia *E. coli* no UPEC), transferidos a una membrana de PVDF e incubados con (A) la mezcla de suero de los pacientes tratados con LB autólogo y (B) donadores sanos. Las gráficas de barras en el panel A fueron compuestas por el valor promedio del análisis de imagen de 3 membranas distintas del mismo ensayo, mientras que el panel B es la representación de una sola imagen de una única membrana.

Para identificar las proteínas correspondientes a las fracciones inmunogénicas identificadas observadas en los extractos de estructuras de superficie bacteriana, se realizaron ensayos de SDS-PAGE 2D con la cepa UPEC CFT073 (referencia) y O75 (proveniente de este estudio). La tinción con Azul de Coomassie demostró una alta concentración de fracciones proteicas entre 55 y 100 kDa (**Figura 6**) para ambos geles (CFT073 y O75),

presumiblemente porinas, ya sea completas o fraccionadas. Buscando proteínas con peso molecular de ~35 kDa se identificaron un par de manchas de 24 y 28 kDa y con un pI de 6.6 y 8.05, respectivamente.

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

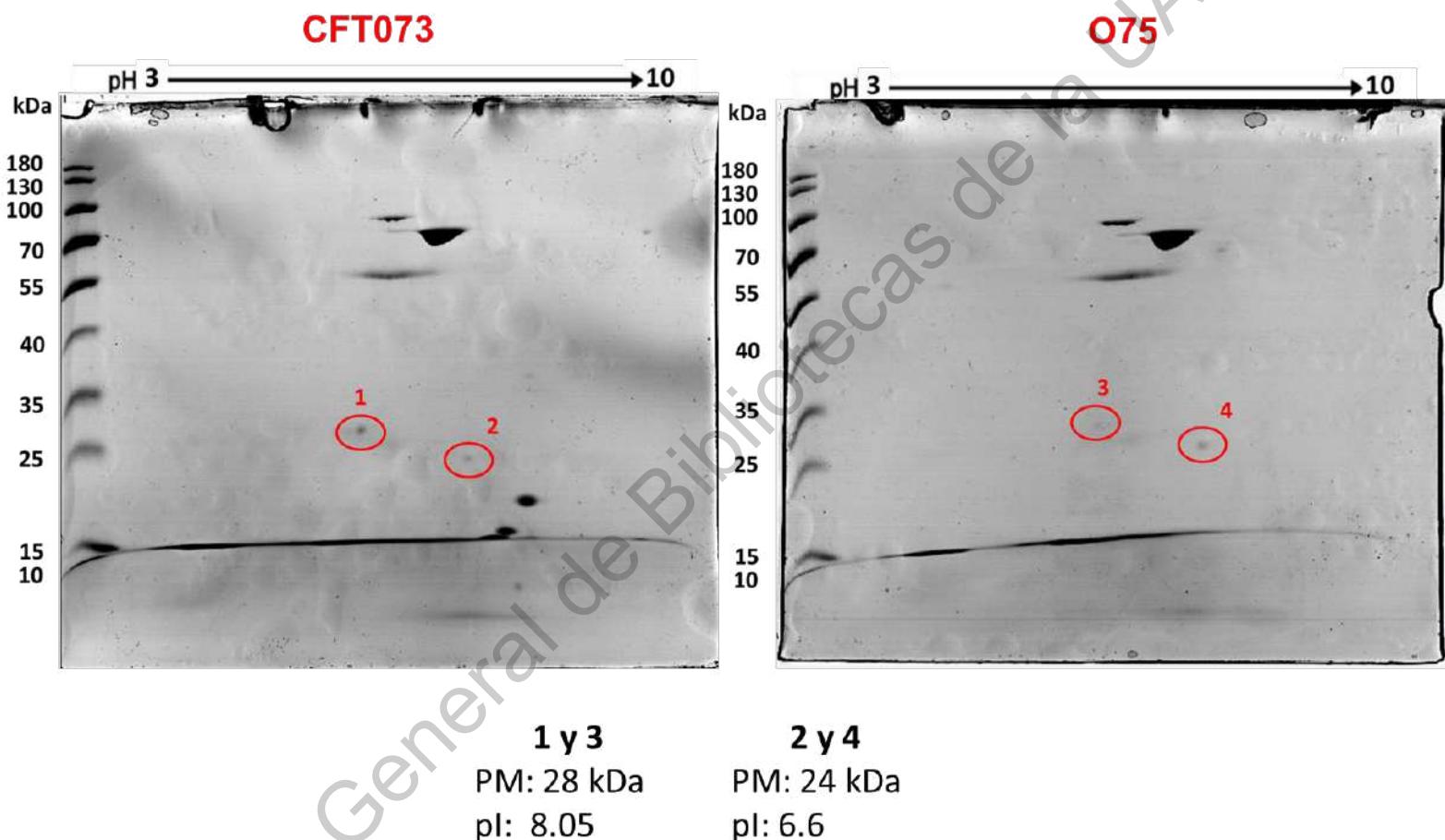


Figura 6. Análisis de pl de las fracciones proteicas de los extractos de estructuras de superficie bacteriana. Ensayo de SDS-PAGE 2D utilizando el extracto de la cepa UPEC CFT073 (izquierda) y O75 (derecha) en un gel al 15 % de poliacrilamida teñido con Azul de Coomassie. En círculos rojos se señalan las fracciones proteicas de pesos esperados, 1 y 3 son la misma mancha en diferentes geles, lo mismo para 2 y 4. Los valores estimados de peso molecular y pl se señalan en la parte inferior de la imagen.

Un análisis *in silico*, utilizando la base de datos de *E. coli* del software TagIdent de ExPASy, reveló que las manchas que se identificaron en la **Figura 6** podrían corresponder a diferentes adhesinas presentes en *E. coli* (**Cuadro 8**). Todas estas proteínas corresponden al grupo de las adhesinas y están vinculadas a la adherencia del patogrupo de *E. coli* patógena intestinal, FimH y PapG son las adhesinas de los pilis de tipo 1 y Pap, respectivamente, TibA es una proteína autotransportadora y el resto son adhesinas pertenecientes a la familia de las fimbrias F17 (Flores-Mireles *et al.*, 2015). Estos resultados serían distintos a los reportados por otros autores como Alteri y Mobley (2007), quienes reportan una abundancia de porinas, principalmente captadores de hierro, en la membrana externa de la cepa de referencia para UPEC CFT073. La diferencia se atribuye a que la metodología empleada por los autores mencionados solamente recupera proteínas de membrana externa y no todas las estructuras adheridas a esta membrana.

Cuadro 8. Proteínas predichas por TagIdent (ExPASy).

Proteína identificada	pl	Peso molecular (kDa)
FimH	5.69	29.069
PapG	5.64	35.986
F17a-G	7.83	34.048
TibA	7.75	33.674
F17e-G	5.71	33.989
F17f-G	5.6	33.864

Las manchas identificadas fueron recortadas de los geles y enviadas para su secuenciación por LC-MS al laboratorio de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, como se describe a detalle en el apartado **V.2.5**. Sin embargo, debido a que la concentración proteica de las muestras no fue óptima para la secuenciación, los resultados fueron insatisfactorios. El reporté indicó la ausencia de fracciones proteicas en dos de las cuatro muestras enviadas. En el resto de estas, se identificaron cuatro proteínas: 1) albumina de suero de *Felis catus* (gato doméstico), considerada como contaminación de la muestra; 2)

Oxidasa putativa (esto es, identificada solamente de manera computacional) de *E. coli*, una proteína citosólica; 3) glnE, proteína citosólica vinculada en la asimilación del amoníaco en *E. coli*; y 4) proteína chaperona tipo clpA/B putativa de *E. coli*.

Cabe señalar que ninguna de las proteínas identificadas en esta primera secuenciación, coincide con los pesos moleculares vistos en los ensayos previos ni con la metodología empleada para la obtención de los extractos proteicos. En donde se espera que haya una mayor concentración de proteínas de superficie bacteriana y no citosólicas. Debido a lo anterior, estos resultados fueron descartados y se decidió realizar una secuenciación con las bandas obtenidas del SDS-PAGE de una sola dimensión, con el objetivo de concentrar la mayor cantidad de proteína posible. Además, con la finalidad de corroborar que las fracciones proteicas inmunogénicas eran componentes de superficie celular bacteriana, también se decidió utilizar un método específico para la obtención de proteínas de membrana externa (OMPs).

VI.4. Identificación de OMPs con reactivada inmunogénica.

Con el propósito de enriquecer la obtención de OMPs se aplicó la metodología descrita a detalle en la sección **V.2.3.** utilizando la cepa O75 (**Figura 7**). El análisis de los extractos por SDS PAGE mostró la presencia de fracciones de proteínas con pesos entre 10 y 55 kDa (**Figura 7A**). Estos resultados son diferentes a los mostrados en la **Figura 4A**, donde la mayoría de las fracciones corresponde a pesos de arriba de 55 kDa. De manera interesante, los sueros de las personas sanas y de los pacientes antes y después del tratamiento identificaron las mismas fracciones proteicas (proteínas de entre 15 y 100 kDa) (**Figura 7B, C y D**). Sin embargo, se observó en estas preparaciones una reactividad más intensa con una fracción proteica con peso entre 30 y 35 kDa al evaluar la mezcla de proteínas de membrana externa con el suero de los pacientes tratados con el LB autólogo (**Figura 7B**); esta fracción es similar a la mostrada en los ensayos de Western-Blot con los LBs (**Figura 4B y C**). Finalmente, la reactividad que se observa de parte de las mezclas de suero de

los 3 diferentes grupos podría deberse a un exceso en la cantidad de anticuerpo secundario utilizado en esta técnica. Ausubel *et al.* (2003) mencionan que este tipo de técnicas requieren un ensayo de factor de dilución para seleccionar las concentraciones de anticuerpo reportero que muestren una imagen sin intensidad inespecífica. A pesar de esto, se considera que la imagen es lo suficientemente contundente para asegurar que hay una intensidad claramente distinta en la banda identificada en la **Figura 7B** comparada con el resto de los sueros.

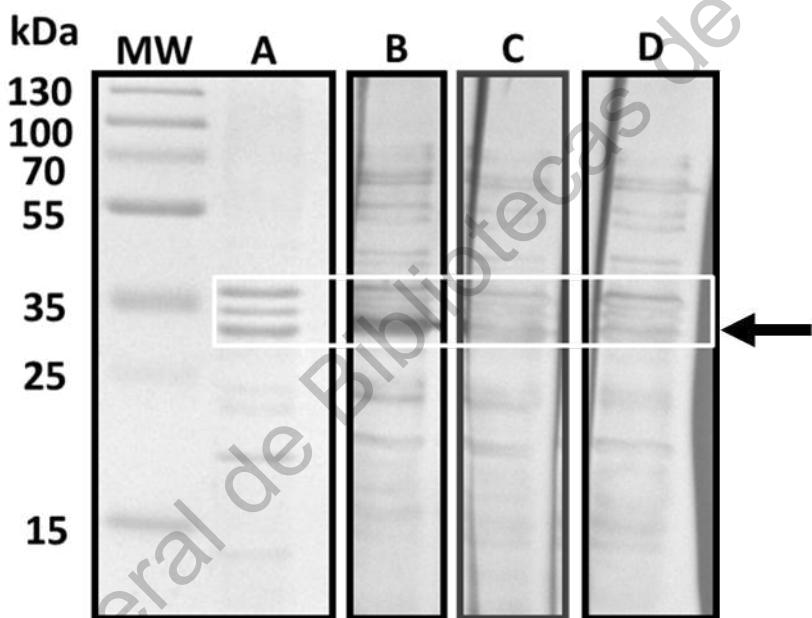


Figura 7. Reactividad del suero de pacientes y donadores contra OMPs. Ensayos de Western-Blot utilizando el extracto enriquecido de OMPs de la cepa O75 sometido a un ensayo de SDS-PAGE en un gel de 12 % (A) y transferidos a una membrana de PVDF e incubado con (B) la mezcla de suero de pacientes tratados con el LB; (C) la mezcla de suero de pacientes antes del tratamiento; y (D) la mezcla de suero de donadores sanos. OMPs con pesos entre 30 y 37 kDa dentro del marco blanco. La flecha indica la fracción proteica que muestra una mayor inmunorreactividad.

Con los resultados previamente referidos se realizó la identificación por secuencia por LC-MS en el laboratorio de Proteómica del Instituto de Biotecnología de la UNAM, como se describe a detalle en el apartado **V.2.5.**, de las fracciones proteicas más inmunogénicas, obtenidas por los diferentes métodos, de las cepas O75, O8 y O6 (**Cuadro 9**). El resultado reportó la

presencia de las proteínas citosólicas udp, masZ y gpmA, así como de proteínas de superficie bacteriana componentes del complejo Bam (BamB y BamC), la adhesina fimbrial FimH y la porina OmpC. Cabe resaltar que en los ensayos de Western-Blot, en ambos tipos de extracción utilizados, la porina OmpA fue la proteína que mostró mayor reactividad con el suero de pacientes tratados con los LBs autólogos (**Figura 3, 4 y 7**)

Dirección General de Bibliotecas de la UAQ

Cuadro 9. Proteínas identificadas para los dos métodos utilizados para diferentes cepas UPEC. *Solamente aparecen las proteínas de superficie identificadas en la secuenciación, por ello la suma de los porcentajes no siempre equivale a 100.

Método	Cepas	Fracción proteica (kDa)	Proteínas de superficie identificadas*							
			OmpA (%)	OmpC (%)	NmpC (%)	Udp (%)	Gpma (%)	FimH (%)	BamB (%)	BamC (%)
OMPs	O75	~37	19.2	65.4	-	-	-	-	15.4	-
		~35	7.7	15.4	61.5	-	-	-	-	15.4
		~33	100	-	-	-	-	-	-	-
Estructuras de superficie	O75	~35	100	-	-	-	-	-	-	-
		~25	34.6	-	-	19.2	15.4	-	-	-
	O8	~35	-	8.4	91.6	-	-	-	-	-
		~25	18.7	-	-	-	18.7	25	-	-
	O6	~25	-	-	-	-	-	-	-	-

En conjunto, todos los ensayos anteriores nos permitieron identificar a OmpA como la proteína con mayor reactividad con el suero de los pacientes después del tratamiento. OmpA es una porina de superficie encontrada en cepas de *E. coli* con homólogos en otras bacterias Gram negativas como *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Salmonella* (Smith *et al.*, 2007). De manera similar a todas las proteínas de membrana externa bacteriana, OmpA tiene una estructura de β-barril formada por 8 β-listones transmembranales alineados de forma antiparalela (Koebnik *et al.*, 2000; Smith *et al.*, 2007; Reusch *et al.*, 2012); debido a estos se forman 4 bucles expuesto en la superficie de la membrana externa (Confer *et al.*, 2013). Además, se sabe que OmpA también tendría una función en la estabilidad estructural de la membrana externa de las bacterias (Ortiz-Suarez *et al.*, 2016). A su vez, esta proteína está vinculada con la adherencia y virulencia de las cepas de *E. coli* y su expresión se ve regulada por diferentes factores extrínsecos de la bacteria. Con respecto a esto, Alteri y Mobley (2009) reportaron que UPEC expresa una mayor cantidad de OmpA durante su crecimiento en orina; por otro lado, diversos estudios han demostrado que OmpA es una proteína asociada a la producción de biopelículas y a la invasión intracelular a células epiteliales de vejiga, por medio de la creación de comunidades bacterianas internas (Nicholson *et al.*, 2009; Wu *et al.*, 2009)

Finalmente, debido a su alta capacidad inmunogénica, OmpA se ha utilizado de manera individual como un antígeno administrado para la activación del sistema inmune por distintos grupos de trabajo (Pore & Chakrabarti, 2013; Guan *et al.*, 2015; Mobley & Alteri, 2015; Novinrooz *et al.*, 2017; Gu *et al.*, 2018); lo que confirma la importancia de la proteína identificada en el presente trabajo.

VI.5. Presencia de *ompA* en diferentes patotipos de *E. coli*

Debido a que OmpA es un factor de virulencia en diversos patotipos de *E. coli*, comúnmente se investiga la presencia del gen *ompA* como parte de la caracterización de estas cepas (da Silva *et al.*, 2017). Para evaluar la importancia que OmpA tendría en diferentes cepas de *E. coli*, se identificó la presencia del gen *ompA* en una colección de diversos patotipos de *E. coli*, utilizando las

condiciones descritas a detalle en el apartado V.2.7. El ensayo de PCR reveló la presencia de *ompA* en 81 (55 %) de 148 cepas analizadas (**Cuadro 10**). En general, el análisis de la prevalencia de *ompA* reveló que no obedece a una distribución definida por patogrupos de *E. coli* ($p>0.05$).

Cuadro 10. Prevalencia del gen *ompA* en cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes.

Origen del aislamiento	No. de aislamientos analizados	<i>ompA</i> No. (%)	*valor <i>p</i>
<i>E. coli</i> de heces humanas	23	10 (43)	-
<i>E. coli</i> de ganado bovino	45	26 (58)	0.3108
DAEC aislados de pacientes	10	7 (70)	0.2587
<i>E. coli</i> asociadas a IVUs	70	38 (54)	0.4720
Total de aislamientos de <i>E. coli</i>	148	81 (55)	0.2617

*Valor *p* de la prueba exacta de Fisher comparando contra el número de aislamientos de heces humanas.

Debido a esto, se realizó un ensayo para detectar la presencia del gen *ompA* en una colección de cepas de *E. coli* aisladas de diferentes fuentes y se observó que solamente el 55 % de las cepas fueron portadoras del gen. En contraste, en un estudio realizado con cepas aisladas de Brasil, Cordeiro *et al.* (2016) reportaron una prevalencia del 93.3 %, mientras que, en Egipto, Osman *et al.* (2018) reportaron una prevalencia del 17.2 % de *ompA* en cepas aisladas de personas con IVUs en Egipto. Estos datos aunados con lo reportado que se presentan, cuestionan que OmpA sea un factor de virulencia exclusivo de ningún patogrupo de *E. coli* en particular. Es por ello por lo que se integró una base de datos con 950 secuencias del gen *ompA* provenientes del GenBank y se analizaron filogenéticamente. Esto confirmó que se trata de un gen altamente conservado, con porcentaje de similitud > 97 %. Al ubicar las secuencias de *ompA* provenientes de 6 genomas de UPEC anotados en la base de datos (Números de acceso del GeneBank: AE014075.1, CP000247.1, CP016497.1,

CP011018.1, CP000243.1, y CU928164.2), se encontró que estas se encuentran distribuidas de manera no homogénea en el árbol, fallando en formar un grupo único (**Figura 8**).

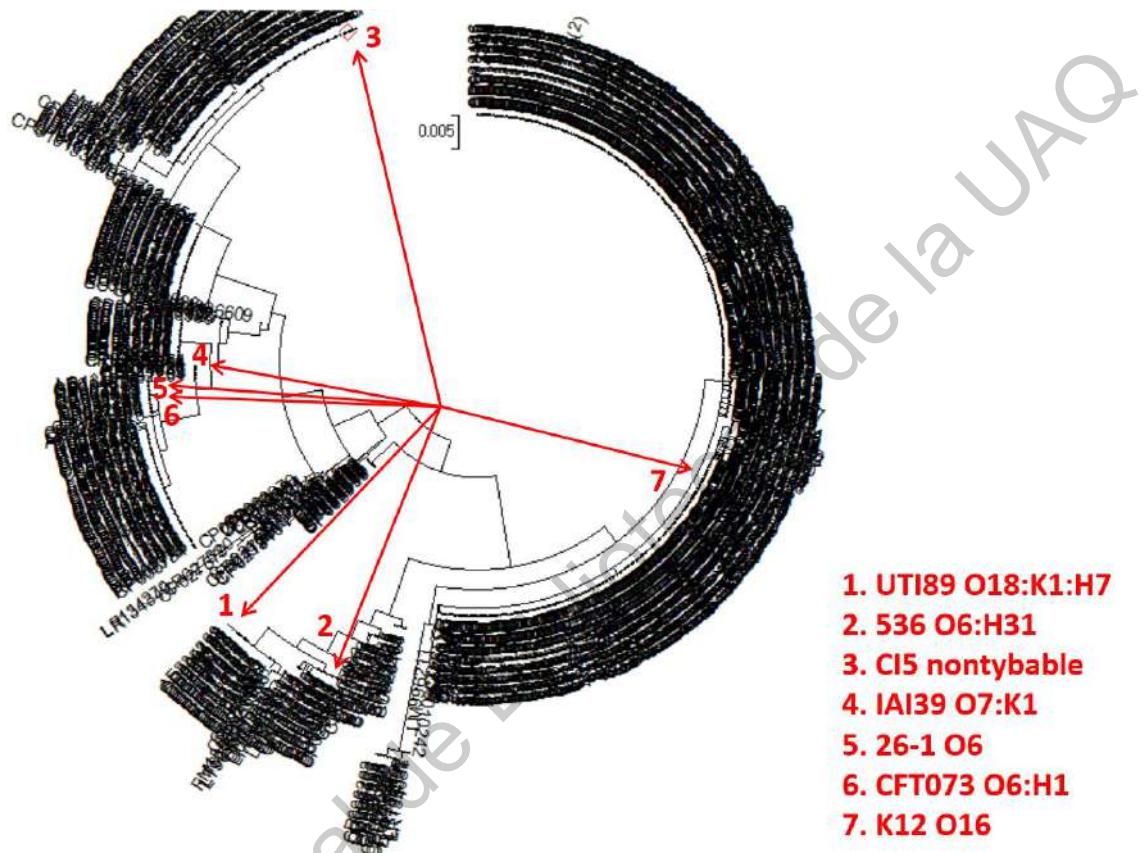


Figura 8. Análisis filogenético de *ompA* de *E. coli*. El árbol muestra 950 secuencias del gen *ompA* obtenidas de la base de datos de GenBank y alineadas con el algoritmo de máxima similitud utilizando el software MEGA X. Las flechas rojas señalan las secuencias de *ompA* de los seis genomas de UPEC y K-12.

El análisis bioinformático confirmó, que al igual que en la prevalencia, no existe un patrón de secuencia distintivo entre patogrupos de *E. coli*. Esto concuerda con lo encontrado por diversos autores quienes han reportado una falta de relación entre las secuencias de OmpA de una colección de cepas de *E. coli* invasivo-adherentes y comensales. Por ejemplo, Liao *et al.* (2017) observaron en un grupo de 78 cepas de *E. coli* variaciones en 10 diferentes posiciones de la estructura de OmpA; de estas diferencias, cuatro grupos de combinaciones posibles se repetían en todas las cepas, mostrando diferencias en su capacidad de adherencia. Por otro lado, Camprubí-Font *et al.* (2019)

reportaron un cambio del aminoácido alanina por valina en la posición 200, a la que le atribuyeron las diferencias en la capacidad de adhesión e invasión a células intestinales que tuvieron las diferentes cepas de *E. coli*. Mientras que, Nielsen *et al.* (2020) secuenciaron el gen *ompA* de 399 cepas ExPEC e identificaron 25 polimorfismos, de los que 7 podrían ser específicos a este grupo de cepas de *E. coli* patógenas.

VII. Conclusiones.

En el presente estudio se reporta que OmpA es el componente de los extractos de estructuras de superficie bacteriana y de los LBs de cepas UPEC que mostró una mayor inmunorreactividad contra el suero de pacientes tratados con un LB autólogo.

La presencia del gen *ompA* en las cepas de *E. coli* analizadas no se asoció a ningún origen en particular, ya que tanto cepas UPEC como asiladas de heces y de origen animal albergaban el gen en niveles similares. Además, se observó que las diferencias entre las secuencias nucleotídicas de *ompA* no están relacionadas a los diferentes grupos de *E. coli*.

Finalmente, debido a que las interacciones patógeno-hospedero en las IVUs es compleja y a que la inmunoprotección no está explicada únicamente por la inmunorreactivad., se promueve la realización de más trabajos en donde se analicen los componentes de diferentes LBs con la finalidad de identificar una mayor cantidad de inmunógenos. Estos resultados serán indispensables para finalmente alcanzar un mejor tratamiento para las IVUs recurrentes y persistentes.

VIII. Referencias.

- Ahumada-Cota, R. E., Olalde-Ramírez, S., Hernández-Chiñas, U., & C. A. Eslava. 2020. Infección de Vías Urinarias en México, análisis de la información generada en los últimos 12 años relacionada con la Etiología y Resistencia a Antimicrobianos. Manuscrito enviado.
- Abraham, S. N., & Y. Miao. 2015. The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat Rev Immunol.* 15:655–663. doi:10.1038/nri3887.
- Alteri, C. J., S. N. Smith, & H. L. T. Mobley. 2009. Fitness of *Escherichia coli* during urinary tract infection requires gluconeogenesis and the TCA cycle. *PLoS Pathog.* 5:e1000448. doi:10.1371/journal.ppat.1000448.
- Alteri, C. J., & H. L. T. Mobley. 2007. Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infect. Immun.* 75:2679–2688. doi:10.1128/IAI.00076-06.
- Alteri, C. J., & H. L. T. Mobley. 2015. Metabolism and Fitness of Urinary Tract Pathogens. *Microbiol. Spectr.* 3. doi:10.1128/microbiolspec.MBP-0016-2015.
- Altschul, S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, & D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol.* 215:403–410. doi:10.1016/S0022-2836(05)80360-2.
- Ausubel, F. M., Brent, R., Kingston, R. E., Moore, D. D., Seidman, J.G., Smith, J. A., & K. Struhl. 2003. Current Protocols in Molecular Biology 3rd ed. Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, US.
- Bauer, H. W., V. W. Rahlf, P. A. Lauener, & G. S. S. Bleßmann. 2002. Prevention of recurrent urinary tract infections with immuno-active *E. coli* fractions: a meta-analysis of five placebo-controlled double-blind studies. *International Journal of Antimicrobial Agents.* 19:451–456. doi:10.1016/S0924-8579(02)00106-1.

- Bauer, H. W., S. Alloussi, G. Egger, H.-M. Blümlein, G. Cozma, & C. C. Schulman. 2005. A Long-Term, Multicenter, Double-Blind Study of an *Escherichia coli* Extract (OM-89) in Female Patients with Recurrent Urinary Tract Infections. *European Urology*. 47:542–548. doi:10.1016/j.eururo.2004.12.009.
- Bessler, W. G., U. vor dem Esche, A. Zgaga-Griesz, & R. Ataullakhanov. 2010. Immunostimulatory properties of the bacterial extract OM-89 in vitro and in vivo. *Arzneimittelforschung*. 60:324–329. doi:10.1055/s-0031-1296295.
- Bien, J., O. Sokolova, & P. Bozko. 2012. Role of Uropathogenic *Escherichia coli* Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *Int J Nephrol*. 2012. doi:10.1155/2012/681473.
- Braun, V., V. Bosch, E. R. Klumpp, I. Neff, H. Mayer, & S. Schlecht. 1976. Antigenic determinants of murein lipoprotein and its exposure at the surface of Enterobacteriaceae. *Eur. J. Biochem*. 62:555–566.
- Camprubí-Font, C., B. Ruiz del Castillo, S. Barrabés, L. Martínez-Martínez, & M. Martínez-Medina. 2019. Amino Acid Substitutions and Differential Gene Expression of Outer Membrane Proteins in Adherent-Invasive *Escherichia coli*. *Front. Microbiol*. 10. doi:10.3389/fmicb.2019.01707.
- Carrión-López, P., J. Martínez-Ruiz, L. Librán-García, J. M. Giménez-Bachs, H. Pastor-Navarro, & A. S. Salinas-Sánchez. 2020. Analysis of the Efficacy of a Sublingual Bacterial Vaccine in the Prophylaxis of Recurrent Urinary Tract Infection. *Urol Int*. 104:293–300. doi:10.1159/000505162.
- Chauhan, B., G. Kumar, N. Kalam, & S. H. Ansari. 2013. Current concepts and prospects of herbal nutraceutical: A review. *Journal of Advanced Pharmaceutical Technology & Research*. 4:4. doi:10.4103/2231-4040.107494.
- Chávez-Valencia, V., S. Gallegos-Nava, & A. Arce-Salinas. 2010. Patrones de resistencia antimicrobiana y etiología en infecciones urinarias no complicadas. *Gac. Médica México*. 146:269–273.

Clermont, O., J. K. Christenson, E. Denamur, & D. M. Gordon. 2013. The Clermont *Escherichia coli* phylo-typing method revisited: improvement of specificity and detection of new phylo-groups. Environ Microbiol Rep. 5:58–65. doi:10.1111/1758-2229.12019.

Confer, A. W., & S. Ayalew. 2013. The OmpA family of proteins: Roles in bacterial pathogenesis and immunity. Veterinary Microbiology. 163:207–222. doi:10.1016/j.vetmic.2012.08.019.

Cordeiro, M. A., C. H. Werle, G. P. Milanez, & T. Yano. 2016. Curli fimbria: an *Escherichia coli* adhesin associated with human cystitis. Braz J Microbiol. 47:414–416. doi:10.1016/j.bjm.2016.01.024.

Coura, F. M., A. N. Diniz, C. A. Oliveira Junior, A. P. Lage, F. C. F. Lobato, M. B. Heinemann, R. O. S. Silva, F. M. Coura, A. N. Diniz, C. A. Oliveira Junior, A. P. Lage, F. C. F. Lobato, M. B. Heinemann, & R. O. S. Silva. 2018. Detection of virulence genes and the phylogenetic groups of *Escherichia coli* isolated from dogs in Brazil. Ciéncia Rural. 48. doi:10.1590/0103-8478cr20170478.

da Silva, L. C., A. C. de Mello Santos, & R. M. Silva. 2017. Uropathogenic *Escherichia coli* pathogenicity islands and other ExPEC virulence genes may contribute to the genome variability of enteroinvasive E. coli. BMC Microbiology. 17:68. doi:10.1186/s12866-017-0979-5.

Das, P. 2002. Vaginal vaccine for recurrent urinary-tract infections. The Lancet Infectious Diseases. 2:68. doi:10.1016/S1473-3099(02)00200-1.

De Benedetto, F., & G. Sevieri. 2013. Prevention of respiratory tract infections with bacterial lysate OM-85 bronchomunal in children and adults: a state of the art. Multidisciplinary Respiratory Medicine. 8:33. doi:10.1186/2049-6958-8-33.

Diagnóstico y tratamiento antibacteriano de infecciones de vías urinarias (IVU). Guías MAPPA (Manejo Antibacteriano de Procesos infecciones en el Paciente Adulto) Disponible en:
https://cmu.org.mx/media/cms_page_media/57/GUIAS_MAPPA_IVU.pdf

- Duraiswamy, S., J. L. Y. Chee, S. Chen, E. Yang, K. Lees, & S. L. Chen. 2018. Purification of Intracellular Bacterial Communities during Experimental Urinary Tract Infection Reveals an Abundant and Viable Bacterial Reservoir. *Infection and Immunity*. 86. doi:10.1128/IAI.00740-17.
- Ewers, C., G. Li, H. Wilking, S. Kiessling, K. Alt, E.-M. Antão, C. Laturnus, I. Diehl, S. Glodde, T. Homeier, U. Böhnke, H. Steinrück, H.-C. Philipp, & L. H. Wieler. 2007. Avian pathogenic, uropathogenic, and newborn meningitis-causing *Escherichia coli*: how closely related are they? *Int J Med Microbiol.* 297:163–176. doi:10.1016/j.ijmm.2007.01.003.
- Flores-Mireles, A. L., J. N. Walker, M. Caparon, & S. J. Hultgren. 2015. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat. Rev. Microbiol.* 13:269–284. doi:10.1038/nrmicro3432.
- Foxman, B. 2010. The epidemiology of urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* 7:653–660. doi:10.1038/nrurol.2010.190.
- Foxman, B. 2014. Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect. Dis. Clin. North Am.* 28:1–13. doi:10.1016/j.idc.2013.09.003.
- Grandi, G. 2001. Antibacterial vaccine design using genomics and proteomics. *Trends Biotechnol.* 19:181–188. doi:10.1016/S0167-7799(01)01600-6.
- Grischke, E. M., & H. Rüttgers. 1987. Treatment of Bacterial Infections of the Female Urinary Tract by Immunization of the Patients. *Urol. Int.* 42:338–341. doi:10.1159/000281988.
- Gu, H., Y. Liao, J. Zhang, Y. Wang, Z. Liu, P. Cheng, X. Wang, Q. Zou, & J. Gu. 2018. Rational Design and Evaluation of an Artificial *Escherichia coli* K1 Protein Vaccine Candidate Based on the Structure of OmpA. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fcimb.2018.00172.

- Guan, Q., Xiao Wang, Xiumin Wang, D. Teng, R. Mao, Y. Zhang, & J. Wang. 2015. Recombinant outer membrane protein A induces a protective immune response against *Escherichia coli* infection in mice. *Appl Microbiol Biotechnol.* 99:5451–5460. doi:10.1007/s00253-014-6339-6.
- Gupta, K., M. Y. Chou, A. Howell, C. Wobbe, R. Grady, & A. E. Stapleton. 2007. Cranberry products inhibit adherence of p-fimbriated *Escherichia coli* to primary cultured bladder and vaginal epithelial cells. *J. Urol.* 177:2357–2360. doi:10.1016/j.juro.2007.01.114.
- Hamilton, C., L. Tan, T. Miethke, & P. K. Anand. 2017. Immunity to uropathogens: the emerging roles of inflammasomes. *Nature Reviews Urology.* 14:284–295. doi:10.1038/nrurol.2017.25.
- Hofstra, H., & J. Dankert. 1980. Major Outer Membrane Proteins: Common Antigens in Enterobacteriaceae Species. *Microbiology.*, 119:123–131. doi:10.1099/00221287-119-1-123.
- Holmgren, J., & C. Czerkinsky. 2005. Mucosal immunity and vaccines. *Nature Medicine.* 11:S45–S53. doi:10.1038/nm1213.
- Howell, A. B., J. D. Reed, C. G. Krueger, R. Winterbottom, D. G. Cunningham, & M. Leahy. 2005. A-type cranberry proanthocyanidins and uropathogenic bacterial anti-adhesion activity. *Phytochemistry.* 66:2281–2291. doi:10.1016/j.phytochem.2005.05.022.
- Johnson, J. R., & A. L. Stell. 2000. Extended virulence genotypes of *Escherichia coli* strains from patients with urosepsis in relation to phylogeny and host compromise. *J Infect Dis.* 181:261–272. doi:10.1086/315217.
- Kaper, J. B., J. P. Nataro, & H. L. T. Mobley. 2004. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature Reviews Microbiology.* 2:123–140. doi:10.1038/nrmicro818.

- Kawahara, M., L. G. Human, J. S. Winningham, & G. J. Domingue. 1994. Antibodies to *Escherichia coli* O6 Porins Cross-React with Urinary Pathogens. *Immunobiology*. 192:65–76. doi:10.1016/S0171-2985(11)80408-0.
- Klein, R. D., & S. J. Hultgren. 2020. Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nature Reviews Microbiology*. 18:211–226. doi:10.1038/s41579-020-0324-0.
- Koebnik, R., K. P. Locher, & P. Van Gelder. 2000. Structure and function of bacterial outer membrane proteins: barrels in a nutshell. *Mol Microbiol*. 37:239–253. doi:10.1046/j.1365-2958.2000.01983.x.
- Kot, B. 2019. Antibiotic Resistance Among Uropathogenic *Escherichia coli*. *Pol J Microbiol*. 68:403–415. doi:10.33073/pjm-2019-048.
- Kumar, S., G. Stecher, M. Li, C. Knyaz, & K. Tamura. 2018. MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across Computing Platforms. *Mol Biol Evol*. 35:1547–1549. doi:10.1093/molbev/msy096.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227:680–685.
- Li, D., B. Liu, M. Chen, D. Guo, X. Guo, F. Liu, L. Feng, & L. Wang. 2010. A multiplex PCR method to detect 14 *Escherichia coli* serogroups associated with urinary tract infections. *J. Microbiol. Methods*. 82:71–77. doi:10.1016/j.mimet.2010.04.008.
- Lacerda Mariano, L., & M. A. Ingersoll. 2020. The immune response to infection in the bladder. *Nature Reviews Urology*. 17:439–458. doi:10.1038/s41585-020-0350-8.
- Liao, C., X. Liang, F. Yang, M. L. Soupir, A. C. Howe, M. L. Thompson, & L. R. Jarboe. 2017. Allelic Variation in Outer Membrane Protein A and Its Influence on Attachment of *Escherichia coli* to Corn Stover. *Front. Microbiol*. 8. doi:10.3389/fmicb.2017.00708.

Lombardo-Aburto, E. 2018. Abordaje pediátrico de las infecciones de vías urinarias. *Acta Pediatr Mex.* 39:85–90.

Lorenzo-Gómez, M. F., B. Padilla-Fernández, M. B. García-Cenador, Á. J. Virseda-Rodríguez, I. Martín-García, A. Sánchez-Escudero, M. J. Vicente-Arroyo, & J. A. Mirón-Canelo. 2015. Comparison of sublingual therapeutic vaccine with antibiotics for the prophylaxis of recurrent urinary tract infections. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 5. doi:10.3389/fcimb.2015.00050.

Lorenzo-Gómez, M. F., B. Padilla-Fernández, F. J. García-Criado, J. A. Mirón-Canelo, A. Gil-Vicente, A. Nieto-Huertos, & J. M. Silva-Abuin. 2013. Evaluation of a therapeutic vaccine for the prevention of recurrent urinary tract infections versus prophylactic treatment with antibiotics. *Int Urogynecol J.* 24:127–134. doi:10.1007/s00192-012-1853-5.

Luna-Pineda, V. M., J. P. Reyes-Grajeda, A. Cruz-Córdova, Z. Saldaña-Ahuactzi, S. A. Ochoa, C. Maldonado-Bernal, V. Cázares-Domínguez, L. Moreno-Fierros, J. Arellano-Galindo, R. Hernández-Castro, & J. Xicohtencatl-Cortes. 2016. Dimeric and Trimeric Fusion Proteins Generated with Fimbrial Adhesins of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 6. doi:10.3389/fcimb.2016.00135.

Lycke, N. 2012. Recent progress in mucosal vaccine development: potential and limitations. *Nat Rev Immunol.* 12:592–605. doi:10.1038/nri3251.

Mann, R., D. G. Mediati, I. G. Duggin, E. J. Harry, and A. L. Bottomley. 2017. Metabolic Adaptations of Uropathogenic *E. coli* in the Urinary Tract. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7. doi:10.3389/fcimb.2017.00241.

Mazariego-Espinosa, K., A. Cruz, M. A. Ledesma, S. A. Ochoa, & J. Xicohtencatl-Cortes. 2010. Longus, a Type IV Pilus of Enterotoxigenic *Escherichia coli*, Is Involved in Adherence to Intestinal Epithelial Cells. *J. Bacteriol.* 192:2791–2800. doi:10.1128/JB.01595-09.

Molloy, M. P., B. R. Herbert, M. B. Slade, T. Rabilloud, A. S. Nouwens, K. L. Williams, & A. A. Gooley. 2000. Proteomic analysis of the *Escherichia coli* outer membrane. *Eur J Biochem.* 267:2871–2881. doi:10.1046/j.1432-1327.2000.01296.x.

Nicholson, T. F., K. M. Watts, & D. A. Hunstad. 2009. OmpA of Uropathogenic *Escherichia coli* Promotes Postinvasion Pathogenesis of Cystitis. *Infection and Immunity.* 77:5245–5251. doi:10.1128/IAI.00670-09.

Nielsen, D. W., N. Ricker, N. L. Barbieri, H. K. Allen, L. K. Nolan, & C. M. Logue. 2020. Outer membrane protein A (OmpA) of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*. *BMC Res Notes.* 13. doi:10.1186/s13104-020-4917-5.

NORMA Oficial Mexicana NOM-087-ECOL-SSA1-2002, Protección ambiental - Salud ambiental - Residuos peligrosos biológico-infecciosos - Clasificación y especificaciones de manejo. Disponible en línea en:
<http://www.salud.gob.mx/unidades/cdi/nom/087ecolssa.html>

Novinrooz, A., T. Z. Salehi, R. Firouzi, S. Arabshahi, & A. Derakhshandeh. 2017. In-silico design, expression, and purification of novel chimeric *Escherichia coli* O157:H7 OmpA fused to LTB protein in *Escherichia coli*. *PLOS ONE.* 12:e0173761. doi:10.1371/journal.pone.0173761.

O'Brien, V. P., T. J. Hannan, H. V. Nielsen, & S. J. Hultgren. 2016. Drug and Vaccine Development for the Treatment and Prevention of Urinary Tract Infections. *Microbiol. Spectr.* 4. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0013-2012.

Ortiz-Suarez, M. L., F. Samsudin, T. J. Pigget, P. J. Bond, & S. Khalid. 2016. Full-Length OmpA: Structure, Function, and Membrane Interactions Predicted by Molecular Dynamics Simulations. *Biophysical Journal.* 111:1692–1702. doi:10.1016/j.bpj.2016.09.009.

Osman, K. M., A. D. Kappell, F. ElHofy, A. Orabi, A. S. Mubarak, T. M. Dawoud, I. M. Moussa, & A. M. Hessain. 2018. Urinary tract infection attributed to

Escherichia coli isolated from participants attending an unorganized gathering. Future Microbiol. 13:757–769. doi:10.2217/fmb-2017-0304.

Pagès, C., P. Princé, & J.-M. Pagès. 1987. Immunological comparison of major outer membrane proteins from different strains of *Escherichia coli*. Ann. Inst. Pasteur Microbiol. 138:393–406. doi:10.1016/0769-2609(87)90057-3.

Poggio, T. V., J. L. La Torre, & E. A. Scodeller. 2006. Intranasal immunization with a recombinant truncated FimH adhesin adjuvanted with CpG oligodeoxynucleotides protects mice against uropathogenic *Escherichia coli* challenge. Can. J. Microbiol. 52:1093–1102. doi:10.1139/w06-065.

Pore, D., & M. K. Chakrabarti. 2013. Outer membrane protein A (OmpA) from *Shigella flexneri* 2a: a promising subunit vaccine candidate. Vaccine. 31:3644–3650. doi:10.1016/j.vaccine.2013.05.100.

Reid, G. 2016. Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. Best Pract. Res. Clin. Gastroenterol. 30:17–25. doi:10.1016/j.bpg.2015.12.001.

Reusch, R. N. 2012. Insights into the structure and assembly of *Escherichia coli* outer membrane protein A. FEBS J. 279:894–909. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08484.x.

Roberts, J. A., M. B. Kaack, G. Baskin, M. R. Chapman, D. A. Hunstad, J. S. Pinkner, & S. J. Hultgren. 2004. Antibody responses and protection from pyelonephritis following vaccination with purified *Escherichia coli* PapDG protein. J. Urol. 171:1682–1685. doi:10.1097/01.ju.0000116123.05160.43.

Robins-Browne, R. M., K. E. Holt, D. J. Ingle, D. M. Hocking, J. Yang, & M. Tauschek. 2016. Are *Escherichia coli* Pathotypes Still Relevant in the Era of Whole-Genome Sequencing? Front. Cell. Infect. Microbiol. 6. doi:10.3389/fcimb.2016.00141.

Rusch, K., & A. Schwierz. 2007. Candida autovaccination in the treatment of vulvovaginal *Candida* infections. International Journal of Gynecology & Obstetrics. 96:130–130. doi:<https://doi.org/10.1016/j.ijgo.2006.11.003>.

Rusch, V., D. Ottendorfer, K. Zimmermann, F. Gebauer, W. Schrödl, P. Nowak, H. Skarabis, & R. Kunze. 2001. Results of an open, non-placebo controlled pilot study investigating the immunomodulatory potential of autovaccine. Arzneimittelforschung. 51:690–697. doi:[10.1055/s-0031-1300104](https://doi.org/10.1055/s-0031-1300104).

Salazar Jiménez, E. P. (2018) Evaluación de la respuesta inmune humoral contra componentes de superficie de cepas de *Escherichia coli* Uropatógenas (UPEC) en pacientes con infección crónica de vías urinarias [Tesis de maestría, Universidad Autónoma de Sinaloa]. Repositorio de la Universidad Autónoma de Sinaloa

Saylor, K., F. Gillam, T. Lohneis, & C. Zhang. 2020. Designs of Antigen Structure and Composition for Improved Protein-Based Vaccine Efficacy. Front. Immunol. 11. doi:[10.3389/fimmu.2020.00283](https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00283).

Schwenger, E. M., A. M. Tejani, & P. S. Loewen. 2015. Probiotics for preventing urinary tract infections in adults and children. Cochrane Database of Systematic Reviews. doi:[10.1002/14651858.CD008772.pub2](https://doi.org/10.1002/14651858.CD008772.pub2).

Serrano Valdez, M. I. (2017) Detección y análisis de superficie de cepas de *Escherichia coli* Uropatógenas [Tesis de licenciatura, Instituto Politécnico Nacional]. Repositorio del Instituto Politécnico Nacional

Sihra, N., A. Goodman, R. Zakri, A. Sahai, & S. Malde. 2018. Nonantibiotic prevention and management of recurrent urinary tract infection. Nature Reviews Urology. 15:750–776. doi:[10.1038/s41585-018-0106-x](https://doi.org/10.1038/s41585-018-0106-x).

Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica. 2019. Boletín Epidemiológico. Sistema Único de Información. Bol. Epidemiológico. 37.

Smith, S. G. J., V. Mahon, M. A. Lambert, & R. P. Fagan. 2007. A molecular Swiss army knife: OmpA structure, function and expression. *FEMS Microbiol Lett.* 273:1–11. doi:10.1111/j.1574-6968.2007.00778.x.

Stapleton, A. E., M. Au-Yeung, T. M. Hooton, D. N. Fredricks, P. L. Roberts, C. A. Czaja, Y. Yarova-Yarovaya, T. Fiedler, M. Cox, & W. E. Stamm. 2011. Randomized, Placebo-Controlled Phase 2 Trial of a *Lactobacillus crispatus* Probiotic Given Intravaginally for Prevention of Recurrent Urinary Tract Infection. *Clin. Infect. Dis. Off. Publ. Infect. Dis. Soc. Am.* 52:1212–1217. doi:10.1093/cid/cir183.

Subashchandrabose, S., & H. L. T. Mobley. 2015. Virulence and Fitness Determinants of Uropathogenic *Escherichia coli*. *Microbiol. Spectr.* 3. doi:10.1128/microbiolspec.UTI-0015-2012.

Terlizzi, M. E., G. Gribaudo, & M. E. Maffei. 2017. UroPathogenic *Escherichia coli* (UPEC) Infections: Virulence Factors, Bladder Responses, Antibiotic, and Non-antibiotic Antimicrobial Strategies. *Front. Microbiol.* 8. doi:10.3389/fmicb.2017.01566.

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

Wagenlehner, F. M. E., T. E. Bjerklund Johansen, T. Cai, B. Koves, J. Kranz, A. Pilatz, & Z. Tandogdu. 2020. Epidemiology, definition and treatment of complicated urinary tract infections. *Nature Reviews Urology.* 17:586–600. doi:10.1038/s41585-020-0362-4.

Wu, H.-H., Y.-Y. Yang, W.-S. Hsieh, C.-H. Lee, S.-J. C. Leu, & M.-R. Chen. 2009. OmpA is the critical component for *Escherichia coli* invasion-induced astrocyte activation. *J Neuropathol Exp Neurol.* 68:677–690. doi:10.1097/NEN.0b013e3181a77d1e.

- Wurpel, D. J., D. G. Moriel, M. Totsika, D. M. Easton, & M. A. Schembri. 2015. Comparative analysis of the uropathogenic *Escherichia coli* surface proteome by tandem mass-spectrometry of artificially induced outer membrane vesicles. *J. Proteomics.* 115:93–106. doi:10.1016/j.jprot.2014.12.005.
- Wurpel, D. J., M. Totsika, L. P. Allsopp, R. I. Webb, D. G. Moriel, & M. A. Schembri. 2016. Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells. *J. Proteomics.* 131:177–189. doi:10.1016/j.jprot.2015.11.001.
- Yang, B., & S. Foley. 2018. First experience in the UK of treating women with recurrent urinary tract infections with the bacterial vaccine Uromune®. *BJU International.* 121:289–292. doi:<https://doi.org/10.1111/bju.14067>.
- Zhang, L., B. Foxman, & C. Marrs. 2002. Both Urinary and Rectal *Escherichia coli* Isolates Are Dominated by Strains of Phylogenetic Group B2. *J. Clin. Microbiol.* 40:3951–3955. doi:10.1128/JCM.40.11.3951-3955.2002.