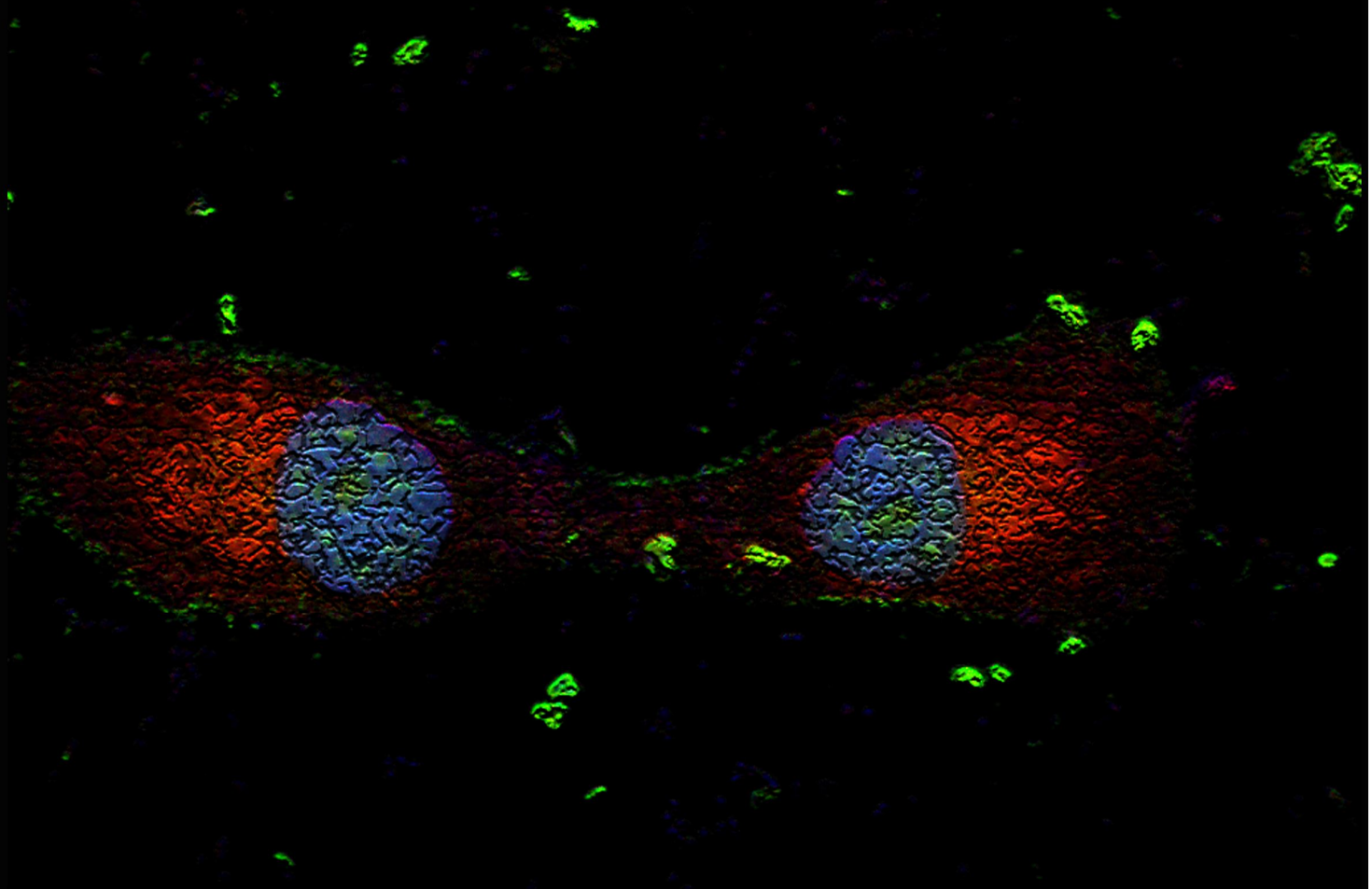


Tesis de Doctorado, PEDECIBA, Biología

# Papel de las fimbrias MR/P y flagelos de *Proteus mirabilis* en la colonización del tracto urinario

Mag. Paola Scavone



Orientador: Dr. Pablo Zunino

Co-orientador: Dr. Alejandro Chabalgoity

Departamento de Microbiología  
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable



Papel de las fimbrias MR/P y flagelos de *Proteus mirabilis*  
en la colonización del tracto urinario

**Mag. Paola Scavone**

**Depto. de Microbiología**

**Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable**

Tribunal

Dra. Magela Laviña

Dr. Otto Pritsch

Dra. Lucía Yim

Tesis de Doctorado

PEDECIBA- Área Biología

Sub-Área Microbiología

Orientador: Dr. Pablo Zunino

Co-orientador: Dr. Alejandro Chabalgoity



*Quiero dedicarle estos años de trabajo y esta tesis  
a dos grandes mujeres que hoy no están físicamente conmigo  
a Sonia E. Guillermo Pintos, mi madre inspiradora,  
y a Mónica Toirán, otra gran madre que se nos fue.*

## **AGRADECIMIENTOS**

a Pablo y Alejandro por haber aceptado nuevamente ser mis orientadores.

a Anita por seguirme en todas las ideas relacionadas con *Proteus* y por soportarme todo este tiempo... viste que si se puede!

a mis compañeros de La Colonia, los que están y ya llevan años conmigo (Claudia, Martín, Karina), a la new generation (Germán y su delicioso café, Matilde y su música inspiradora), a los nuevos (Virginia, Daniela, Belén, Sofía A, Sofía F, Paula, Martina, Gabriela, Loreley, Magalí y Sabrina), y a los que se fueron en busca de nuevos horizontes (Analía, Geraldine, Majo, Bruno, Karen y Vanessa). Gracias por todo este tiempo compartido!

a Steffen Härtel por enseñarme todo lo que sé de análisis de imágenes y por invitarme a pasar un año en su Scian-Lab en Santiago de Chile.

a mis amigas chilenas del Scian: Yoya, Ale G, Ale C y Paulina.

al Dr. Guido Mora, a la Dra Paula Rodas Garrido y a la Dra. Nicole Trombert de la Universidad Andrés Bello, Santiago de Chile, por colaborar en la puesta a punto de los ensayos de invasión.

a Silvia Villar por enseñarme y ayudarme con la muerte celular y la microscopía de barrido y porque descubrí una gran persona y amiga!

a todos los integrantes del Departamento de Desarrollo Biotecnológico pero en especial a Analía Rial y a Juan Martín Marqués por ayudarme a comprender un poco más la inmunología y ayudarme con las citometrías y RT-PCR.

a mi Padre y hermanos (Caro y Fabi) por creer en mí y apoyarme en todas mis decisiones. Los quiero!

a Seba, que me apoya y alienta a continuar todo el tiempo, te quiero mi chiqui!

a mi amiga del alma, Lety, que siempre pero siempre está ahí y me banca la cabeza como nadie. Gracias amiga!

a los amigos...

a los que no están físicamente... y se extrañan...

y obviamente una tesis no es posible sin apoyo financiero, por lo que agradezco a la ANII por la beca de doctorado, al FCE (2007-226) por financiar parte de esta tesis, a PEDECIBA-Biología por financiarme pasantías, congresos y cursos en el exterior y al Proyecto Anillo ACT 47 Redes, FONDECYT 1060890 (Chile) que financió mi estadía en el Scian-Lab.

y a todos los que me han acompañado de una forma u otra, GRACIAS!

**Tabla de contenido**

<b>Agradecimientos .....</b>	<b>3</b>
<b>Resumen .....</b>	<b>8</b>
<b>Introducción.....</b>	<b>9</b>
Infecciones del Tracto Urinario (ITU) .....	9
<i>Proteus mirabilis</i> .....	10
Factores de virulencia.....	11
Adhesión mediada por fimbrias .....	13
Fimbrias MR/P.....	15
Flagelos y movilidad " <i>swarming</i> " .....	18
Vacunas y respuesta inmune contra ITU .....	22
<b>Hipótesis.....</b>	<b>26</b>
<b>Objetivos .....</b>	<b>26</b>
Objetivos específicos.....	26
<b>Materiales y Métodos.....</b>	<b>27</b>
1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo .....	27
2. Líneas celulares y condiciones de cultivo.....	28
3. Generación de una cepa mutante aflagelada de <i>P. mirabilis</i> 2921 .....	28
3.1 Extracción de ADN genómico .....	28
3.2 Amplificación de ADN (PCR).....	29
3.3 Electroforesis en geles de agarosa.....	29
3.4 Extracción de ADN a partir de geles de agarosa.....	29
3.5 Extracción de ADN plasmídico.....	29
3.6 Digestión enzimática .....	30
3.7 Ligación.....	30
3.8 Preparación de células competentes .....	30
3.9 Transformación de <i>E. coli</i> SM10 $\lambda$ pir .....	30
3.10 Conjugación .....	31
4. Evaluación de características fenotípicas y genotípicas de las cepas mutantes .....	31
4.1 Movilidad <i>swarming</i> .....	31
4.2 Curva de crecimiento.....	32
4.3 PCR .....	32
4.4 Efecto hemolítico .....	32
4.5 Hemaglutinación .....	32
4.6 Evaluación de la expresión de flagelos mediante SDS-PAGE y Western blot .....	33

5. Caracterización de la infección experimental pro <i>P. mirabilis</i> .....	34
5.1 Animales .....	34
5.2 Modelo de infección experimental clásico en ratón .....	34
5.3 Cuantificación de bacterias en el tracto urinario (TU) .....	34
5.4 Cuantificación de células inmunes en orina.....	35
5.5 Respuesta celular en el TU a tiempos iniciales de infección evaluada por citometría de flujo .....	35
5.6 Evaluación de marcadores de inflamación mediante PCR en tiempo real.....	36
5.7 Cortes histológicos de riñones y vejigas .....	38
5.8 Escala de daño histológico.....	39
5.9 Localización bacteriana en el TU mediante inmunofluorescencia .....	39
5.10 Epifluorescencia y Microscopía Laser Confocal.....	40
5.11 Análisis de imágenes .....	41
6. Ensayos de adhesión bacteriana a líneas celulares .....	41
6.1 Preparación de líneas celulares .....	41
6.2 Preparación de cultivos bacterianos .....	42
6.3 Protocolo de adhesión a líneas celulares.....	42
6.4 Microscopía óptica .....	42
6.5 Microscopía electrónica de barrido .....	43
7. Ensayos de invasión celular, protección celular con gentamicina .....	43
7.1 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de gentamicina .....	43
7.2 Protocolo de invasión (protección con gentamicina).....	43
7.3 Inmunofluorescencia de ensayo de protección con gentamicina y MLC .....	44
8. Evaluación de la inducción de apoptosis en cultivos celulares .....	45
8.1 Inducción de apoptosis, evaluación por triple tinción y epifluorescencia .....	45
8.2 Efecto citotóxico y genotóxico: técnica del cometa .....	45
9. Co-inmunización de proteínas fimbriales y flagelos .....	46
9.1 Obtención y purificación de la proteína fimbrial MrpA .....	46
9.2 Obtención de flagelos nativos de <i>P. mirabilis</i> .....	47
9.3 Protocolo de inmunización .....	47
9.4 Toma de muestras.....	47
9.5 Desafío ascendente .....	48
9.6 Determinación de anticuerpos en suero y orina (ELISA).....	48
9.7 Cultivo de esplenocitos y re-estimulación de las células.....	48
9.8 Medición de citoquinas producidas por esplenocitos de ratón mediante ELISA .....	49
9.9 Análisis estadístico.....	50

<b>Resultados .....</b>	<b>51</b>
Capítulo 1: Estudio de la dinámica de la ITU por <i>P. mirabilis</i> en un modelo experimental en ratón .....	51
Introducción.....	51
Resultados.....	53
Construcción de la cepa mutante no flagelada <i>P. mirabilis</i> AF .....	53
Evaluación de la movilidad <i>swarming</i> .....	54
Curvas de crecimiento .....	54
Evaluación de la mutación en la cepa <i>P. mirabilis</i> AF por PCR.....	55
Hemólisis .....	56
Hemaglutinación .....	56
Expresión de flagelos .....	56
Caracterización de la infección experimental por <i>P. mirabilis</i> .....	57
Cuantificación de bacterias en el TU .....	57
Cuantificación de células inmunes en orina .....	61
Repuesta celular en el TU a tiempos iniciales de infección evaluada por citometría de flujo .....	65
Evaluación de citoquinas y quimioquinas por RT-PCR en el TU .....	70
Localización bacteriana en el TU .....	75
Escala de daño histológico .....	79
Discusión.....	83
Capítulo 2: Aspectos de la interacción entre <i>P. mirabilis</i> y células eucariotas; papel de fimbrias MR/P y flagelos .....	93
Introducción.....	93
Resultados.....	96
Adhesión de <i>P. mirabilis</i> a células eucariotas.....	96
Sensibilidad a gentamicina (CIM) de las cepas de <i>P. mirabilis</i> .....	98
Invasión bacteriana en células eucariotas .....	99
Evaluación de la inducción de apoptosis .....	107
Efecto citotóxico y genotóxico.....	108
Discusión .....	110
Capítulo 3: Papel de los flagelos como inmunoadyuvantes de mucosas en coinmunizaciones con proteínas fimbriales .....	117
Introducción.....	117
Resultados.....	119

Obtención y purificación de MrpA y flagelina de <i>P. mirabilis</i> .....	119
Inducción de la producción de anticuerpos específicos en suero y orina .....	119
Colonización bacteriana del TU .....	121
Inducción de citoquinas en células de esplenocitos re-estimuladas con MrpA y flagelina .....	123
Discusión .....	125
<b>Conclusiones.....</b>	<b>129</b>
<b>Perspectivas.....</b>	<b>130</b>
<b>Referencias .....</b>	<b>131</b>
<b>Anexo I .....</b>	<b>148</b>
<b>Anexo II.....</b>	<b>170</b>
<b>Anexo III .....</b>	<b>179</b>



## **RESUMEN**

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se encuentran entre las infecciones más frecuentes en el ser humano constituyendo un grave problema sanitario, social y económico. *P. mirabilis* es una causa importante de infecciones oportunistas y nosocomiales. Aunque no sea la causa más frecuente de ITU, puede causar infecciones severas particularmente en pacientes cateterizados y/o con anormalidades del TU. Presenta una especial afinidad por el TU superior, donde puede provocar grave daño renal. Pielonefritis, bacteremia, fiebre, formación de cálculos vesicales y renales u obstrucción de catéteres son las complicaciones más comunes en los casos de ITU por *P. mirabilis*. Es probable que la patogenicidad de *P. mirabilis* esté relacionada con la acción de diversos factores de virulencia que actuarían de forma concertada. Estos factores incluyen la producción de hemolisinas, ureasa, secreción de proteasas que clivan inmunoglobulinas (Ig) A e IgG, sistemas de captación de hierro, invasividad celular, movilidad mediada por flagelos y expresión de distintas fimbrias implicadas en la adhesión a las células epiteliales.

Diversos autores han propuesto que la fimbria MR/P estaría implicada en la patogénesis de *P. mirabilis* y contribuiría a la infección renal por facilitamiento de la colonización del TU. *P. mirabilis* es además un microorganismo móvil que posee flagelos peritricos y es capaz de diferenciarse de una célula vegetativa en forma de bastón (célula *swimmer*) a una célula elongada multi-flagelada (célula *swarmer*). Una de las características distintivas de las células *swarmer* es la sobreproducción de flagelos. El rol de los flagelos y las células *swarmer* en la virulencia de *P. mirabilis* está aún en discusión.

La respuesta inmune que se desarrolla en respuesta a la entrada de uropatógenos en el TU es particularmente compleja. Entre los mecanismos de la inmunidad innata, la inflamación tendría un rol importante en las ITU. El papel de los distintos mecanismos de la respuesta inmune adaptativa en la resolución de la infección es actualmente un tema de debate.

La hipótesis del presente proyecto plantea que las fimbrias MR/P y los flagelos de *P. mirabilis* juegan un papel relevante en la colonización y en la inducción de la respuesta inmune en el tracto urinario. El objetivo general consistió en analizar el papel de las fimbrias MR/P y flagelos de *P. mirabilis* en las distintas etapas de la infección experimental, así como sus implicancias en la interrelación bacteria-célula eucariota y en la generación de una respuesta inmune en el tracto urinario.

Los resultados mostraron que las fimbrias MR/P y los flagelos de *P. mirabilis* son estructuras relevantes durante la infección, que están involucradas en la adhesión, colonización e invasión y que inducen distintas respuestas en el hospedero y estarían involucradas en la inducción de apoptosis y daño celular.

## **INTRODUCCIÓN**

### **Infecciones del Tracto Urinario (ITU)**

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se describen como aquellas condiciones en las que microorganismos colonizan y se multiplican en el tracto urinario (TU), ya sea en vejiga, próstata, sistema colector o riñones (Kunin *et al.*, 2002; Nicolle, 2001). Las ITU se han clasificado de acuerdo a la sintomatología (asintomáticas y sintomáticas), al sitio de infección (cistitis o ITU inferior y pielonefritis o ITU superior) o a la existencia de complicaciones (complicadas y no complicadas). El término ITU complicada se utiliza para describir la infección en individuos que presentan factores que dificultan la erradicación efectiva de los uropatógenos del TU (Naber, 1999). Tales factores pueden ser la anomalía estructural o funcional del tracto urogenital, terapia prolongada con antibióticos, ITU originada por más de un patógeno o por patógenos multiresistentes, así como personas cateterizadas o inmunocomprometidas (Nicolle, 2002; O'Donnell *et al.*, 2002, Tice, 1999).

El grupo de riesgo en contraer ITU lo constituyen recién nacidos, niñas en edad escolar, mujeres sexualmente activas, embarazadas y hombres en edad adulta (Mobley, 2000; Sobell & Kayle, 2000). La incidencia de las ITU es realmente elevada, ya que el 40% de las mujeres y un 12% de los hombres experimentarán una ITU sintomática en su vida y aproximadamente un cuarto de las mujeres afectadas tendrán una ITU recurrente dentro de los siguientes 6 a 12 meses (O'Hanley, 1996).

Las ITU se encuentran entre las infecciones más frecuentes en el ser humano, constituyendo un grave problema sanitario, social y económico (Krieger, 2002; O'Hanley, 1996). En cuanto a los costos que le demandan al sistema de salud, las ITU se ubican entre las principales enfermedades urológicas sobrepasando los gastos en transplantes y diálisis (Mobley, 2000). En 2006, se estimó que las ITU fueron la causa de más de 11 millones de visitas médicas, 1.7 millones de ingresos en emergencia y más de medio millón de hospitalizaciones en los Estados Unidos con un costo anual estimado de 3.5 billones de dólares sólo en dicho país (Litwin & Saigal 2007; DeFrances *et al.*, 2008). Aún así, es difícil determinar la incidencia de las ITU con precisión ya que existen muchos casos no reportados (Foxman, 2003) y en otros países no existen registros de la incidencia ni de los costos de las mismas.

Las ITU asociadas a catéteres son las infecciones nosocomiales más comunes, con más de un millón de casos en hospitales en los Estados Unidos. El riesgo de contraer una ITU se incrementa a medida que aumenta el tiempo de cateterización (Maki & Tambyah, 2001). En poblaciones de adultos mayores no hospitalizados, las ITU se ubican entre las infecciones más frecuentes (Nicolle, 2002).

Las ITU son generalmente tratadas con antibióticos, siendo la segunda causa de prescripción de antibióticos luego de la otitis media (Foxman, 2010). Dichos tratamientos resultan exitosos en el caso de ITU no complicadas, aunque su efectividad disminuye en las ITU recurrentes, en pacientes cateterizados o con anomalías anatómicas en el TU o cuando existen cálculos que actúan como nichos de persistencia bacteriana (Johnson, 1996). La emergencia de resistencia a antibióticos ha sido reconocida como un serio problema en Salud Pública y las bacterias uropatógenas en particular han mostrado un lento pero constante aumento de la resistencia a diferentes antimicrobianos en las últimas décadas (Gales *et al.*, 2002). Por esta razón, la magnitud del problema que constituyen las ITU claramente justificaría el desarrollo de vacunas que pudieran prevenir este tipo de patologías (Warren, 1996).

La etiología de las ITU no complicadas ha permanecido constante en las dos últimas décadas aunque con un incremento notable de la resistencia a antimicrobianos (Ronald, 2002). Entre los agentes etiológicos más frecuentes se encuentran *Escherichia coli*, la causa más común de ITU, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* entre otros (Warren, 1996).

*E. coli* es el agente causal del 80% de las ITU no complicadas mientras que en el caso de ITU complicadas la frecuencia es mucho menor (37%). *K. pneumoniae*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa* causan un 34% de las infecciones complicadas y el restante 29% se debe a una amplia variedad de microorganismos (Warren, 1996). Un trabajo realizado para estudiar la etiología de las ITU y susceptibilidad a antimicrobianos en Latinoamérica mostró que los agentes responsables de las ITU bajas no complicadas fueron *E. coli* (82%), *P. mirabilis* y *K. pneumoniae* (4,5%), *Staphylococcus saprophyticus* (4,1%) y otros microorganismos (5,3%) (Casellas *et al.*, 2003). De los 100 aislamientos provenientes de Uruguay, el 89% correspondió a *E. coli*, 5% a *P. mirabilis* y 2% a *Klebsiella* spp. El resultado de resistencia de *E. coli* a amoxicilina fue muy amplio, encontrándose los valores más elevados en los aislamientos provenientes de Bolivia, Paraguay y Uruguay. La resistencia a amoxicilina-sulbactam también presentó un amplio rango, siendo los valores más elevados los encontrados en aislamientos de Perú, Argentina y Uruguay (Casellas *et al.*, 2003). Este estudio muestra claramente un aumento de la prevalencia de los aislamientos de *P. mirabilis* y un aumento de la resistencia a antimicrobianos observada en cepas de *E. coli* en nuestro país.

### ***Proteus mirabilis***

El género *Proteus* fue nombrado por Hauser en 1885 inspirado en Proteo, el personaje de la Odisea de Homero que poseía el poder de asumir diferentes formas para escapar a las distintas

amenazas (Hoeniger, 1965). El género *Proteus* lo constituyen bastones Gram negativos móviles y ureasa positivos, pertenece a la familia de las enterobacterias y consta de cuatro especies: *Proteus vulgaricus*, *P. mirabilis*, *P. penneri* y *P. myxofaciens* (Penner, 1984).

Tres de las características que distinguen a los miembros del género respecto a otros miembros de esta familia son la desaminación oxidativa de aminoácidos, producción de ureasa y la movilidad de tipo *swarming* (Farmer *et al.*, 1985; Allison *et al.*, 1994). Los microorganismos incluidos en este género están ampliamente distribuidos en el medio ambiente; típicamente se encuentran de forma libre en la naturaleza en aguas contaminadas, suelo y excremento y participan en la descomposición de la materia orgánica de origen animal (Rozalski *et al.*, 1997). A excepción de *Proteus myxofaciens*, un patógeno de insectos, todas las demás especies son potenciales patógenos de humanos (Cosenza *et al.*, 1966). Un amplio rango de infecciones son causadas por estos microorganismos oportunistas dentro de las cuales se han reportado infecciones urinarias, respiratorias, en heridas, quemaduras, dermatitis, otitis, entre otras (Campos *et al.*, 1995; Donati *et al.*, 1993; Hornick *et al.*, 1991; Senior, 1978; Smolin, 1974).

*P. mirabilis* es una causa importante de infecciones oportunistas y nosocomiales (Stamm *et al.*, 1997) y aunque no sea la causa más frecuente de ITU, puede causar infecciones severas particularmente en pacientes cateterizados y/o con anormalidades del TU (Warren *et al.*, 1982). Este patógeno presenta una especial afinidad por el TU superior, donde puede provocar grave daño renal (Senior, 1978; Mobley & Hausinger, 1989). Pielonefritis, bacteremia, formación de cálculos vesicales y renales u obstrucción de catéteres son las complicaciones más comunes en los casos de ITU causadas por *P. mirabilis*.

### **Factores de virulencia**

Es probable que la patogenicidad de *P. mirabilis* esté relacionada con la acción de diversos factores de virulencia que actuarían de forma concertada (Fig. 1). Estos factores incluyen la producción de hemolisinas (Welch, 1987), ureasa (Mobley *et al.*, 1989), secreción de proteasas que clivan inmunoglobulinas (Ig) A e IgG (Loomes *et al.*, 1990), sistemas de captación de hierro (Shand *et al.*, 1985), invasividad celular (Peerbooms *et al.*, 1983), movilidad mediada por flagelos (Latta *et al.*, 1999) y expresión de distintas fimbrias implicadas en la adhesión a las células epiteliales (Wray *et al.*, 1986).

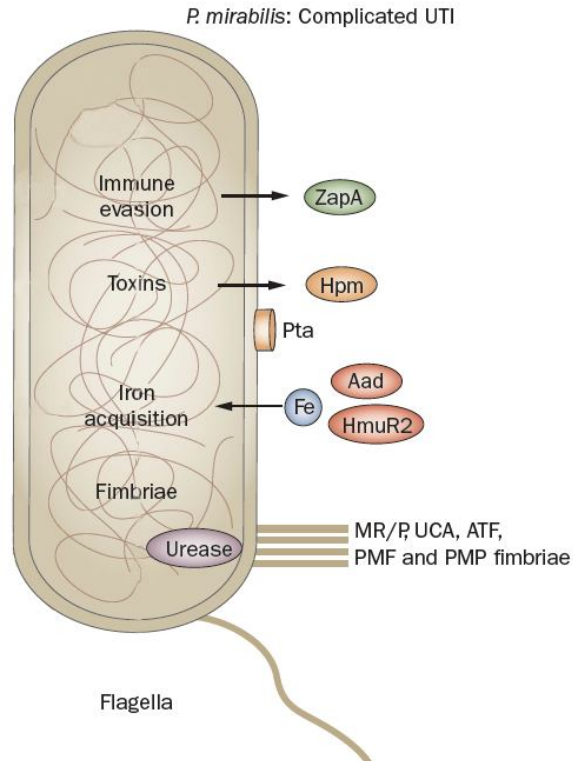


Figura 1. Representación esquemática de los factores de virulencia de *P. mirabilis* (Tomado de Nielubowicz & Mobley, 2010 con modificaciones). ZapA: metaloproteasa, Hpm: hemolisina, Pta: proteasa, Aad: desaminasa, HmuR2: receptor de hemina

Algunos de estos factores de virulencia serían importantes en el establecimiento de la infección en diferentes partes del tracto urinario. Estos factores incluyen la adherencia a la superficie mucosal del huésped, daño e invasión del tejido, evasión de la respuesta inmune así como sistemas de adquisición de hierro. Puede considerarse que algunos de estos factores de virulencia sean cruciales en la colonización del tracto urinario, como por ejemplo la producción de ureasa que le permite hidrolizar la urea y la expresión de flagelos que le permitirían ascender a riñones (Coker *et al.*, 2000). La expresión de estos factores de virulencia estaría espacial y temporalmente regulada. La bacteria gana acceso al tracto urinario a través de la uretra, coloniza la vejiga y asciende por los uréteres hasta los riñones en donde coloniza y mantiene la infección (Coker *et al.*, 2000). Estos eventos requieren que el microorganismo exprese diferentes adhesinas y flagelos de acuerdo a los cambios morfológicos de célula vegetativa del tipo *swimmer* a hiperflagelada (*swarmer*), exprese toxinas y evada la respuesta inmune (Coker *et al.*, 2000).

### Adhesión mediada por fimbrias

La secuenciación del genoma de *P. mirabilis* HI4320 reveló que tiene el potencial de expresar diversas fimbrias. El genoma predice la existencia de 17 operones fimbriales y 13 genes fimbriales adicionales huérfanos, no asociados con operones completos (Pearson *et al.*, 2008). De estos, solo algunos han sido extensamente estudiados como es el caso de las fimbrias MR/P (del inglés: *mannose-resistant Proteus-like*), UCA (*uroepithelial cell adhesin*), ATF (*ambient temperature fimbriae*) y PMF (*Proteus mirabilis fimbriae*).

La adhesión bacteriana a las células hospederas es considerada como uno de los mecanismos de patogenicidad de los uropatógenos y sería el primer paso para establecer una infección (Alamuri *et al.*, 2010). Sería además un pre-requisito para la colonización e infección sobre todo en sistemas de flujo como el tracto urinario (Reid & Sobel, 1987).

El proceso de adhesión de los uropatógenos se inicia cuando las estructuras de superficie conocidas como adhesinas se unen a sus ligandos específicos de la célula hospedera o a proteínas de la matriz extracelular (Alamuri *et al.*, 2010). Las estructuras bacterianas involucradas en la adhesión son las fimbrias, hemaglutininas y otras proteínas no fimbriales.

Las fimbrias son apéndices bacterianos que protruyen de la superficie celular, tienen diversos tamaños y consisten de subunidades repetidas de polipéptidos con una adhesina en el extremo. Las fimbrias se localizan de manera peritrica en la célula bacteriana pero pueden expresarse de manera polar. Son estructuras finas, cortas y más numerosas que los flagelos (Edwards & Puente, 1998). Una de las primeras fimbrias aisladas fue UCA, la cual se aisló a partir de cultivos de *P. mirabilis* en medio mínimo (Wray *et al.*, 1986). Ésta favorece la unión a las células uroepiteliales a través de la unión de factores como los asialo-GM1, asialo-GM2, lactosil ceramida y galection-3 (Altman *et al.*, 2001; Wray *et al.*, 1986). En 1995 se propuso el nombre de fimbria no-aglutinante (NAF de su sigla en inglés: *Non-agglutinating fimbriae*) para distinguir a la fimbria UCA de otras que *P. mirabilis* expresa (Tolson *et al.*, 1995). Las bacterias que expresan estas fimbrias se adhieren fuertemente a distintas líneas celulares *in vitro*, incluyendo líneas uroepiteliales. La unión de *P. mirabilis* es marcadamente reducida cuando se pre-incuba las bacterias con anticuerpos específicos anti-NAF (Tolson *et al.*, 1997).

Las fimbrias PMF se inducen cuando un cultivo bacteriano es repicado y mantenido de forma estática sin aireación durante 48 hs a 37°C.. Massad y Mobley describieron el “cluster” de genes *pmf*, el cual está codificado en una región de 5655 pb y predice 5 polipéptidos: PmfA, PmfC, PmfD, PmfE y PmfF (Massad y Mobley, 1994). Estos autores observaron que el operón *pmf* comparte ciertas características con “clusters” fimbriales de bacterias entéricas pero posee características únicas. Por otro lado, Zunino y colaboradores observaron que mutantes para



*pmfA* incapaces de expresar la fimbria PMF poseen una capacidad significativamente reducida de adherirse a células uroepiteliales comparadas con la cepa salvaje. En el mismo estudio, mutantes *pmfA* mostraron ser incapaces de competir con la cepa salvaje no sólo en la colonización de vejigas sino que también en riñones en un modelo murino de co-desafío ascendente. Estos resultados sugieren que PMF juega un rol en la adhesión y colonización del tracto urinario al menos durante los estadios iniciales de la infección (Zunino *et al.*, 2003).

Las fimbrias ATF tienen una expresión óptima a temperatura ambiente y no se expresan a 42°C o en medio sólido (Massad *et al.*, 1994). La primera caracterización del operon fimbrial *atf* realizada por Massad y colaboradores en 1996 describe el operón compuesto de sólo 3 genes (*atfABC*) pero luego de la secuenciación del genoma se observó la presencia de 3 genes adicionales (*atfABCDEJ*) (Pearson *et al.*, 2008). *atfJ* es un gen parálogo a *mrpJ*, el cual es un gen represor de la movilidad bacteriana. Recientemente se ha demostrado que *P. mirabilis* posee 10 genes parálogos a *mrpJ* (Pearson & Mobley, 2008). La mayoría de los parálogos de *mrpJ* reprimen la movilidad cuando son sobreexpresados; sin embargo, el rol exacto de *atfJ* aún no es claro. En nuestro Departamento se demostró que esta fimbria no posee un rol en la ITU experimental cuando se emplea un modelo murino de infección (Zunino *et al.*, 2000).

La fimbria MR/P es la más estudiada de estos organelos en *P. mirabilis*. Fue aislada y purificada por primera vez por Sareneva y colaboradores en 1990 a partir de la cepa *P. mirabilis* 3087 (Sareneva *et al.*, 1990). Esta cepa era capaz de aglutinar eritrocitos humanos de forma manosa resistentes, lo que es indicativo de la presencia de las fimbrias MR/P. Un año después, Bahrani y colaboradores purificaron y caracterizaron la fimbria MR/P de una cepa de *P. mirabilis* aislada de un paciente con pielonefritis aguda (Bahrani *et al.*, 1991).

En el año 2008, Pearson y colaboradores publicaron la secuenciación completa del genoma de una cepa uropatógena de *P. mirabilis*, HI4320, la cual fue aislada de un paciente con cateterización prolongada (Pearson *et al.*, 2008). Dicho estudio reveló la existencia de 12 operones fimbriales adicionales a los 5 previamente identificados, lo que hace que *P. mirabilis* pueda potencialmente expresar 17 fimbrias diferentes codificadas en el cromosoma bacteriano. Estos autores encontraron varios genes que codifican para adhesinas, dos de las cuales poseen un 46 y un 31% de identidad con el gen *ail* (del inglés: *attachment and invasion locus*) de *Yersinia enterocolitica* (Pearson *et al.*, 2008). Seis potenciales autotransportadores (sistema de secreción de tipo V) están codificados en el genoma de *P. mirabilis* HI4320, tres de los cuales son miembros de las familias de autotransportadores triméricos y serían adhesinas. De acuerdo a estos hallazgos *P. mirabilis* codifica para la mayor cantidad de fimbrias que ningún otro organismo hasta ahora secuenciado pueda expresar (Pearson *et al.*, 2008).

## Fimbrias MR/P

Diversos autores han propuesto que la fimbria MR/P estaría implicada en la patogénesis de *P. mirabilis* y contribuiría con la infección renal por facilitamiento de la colonización del TU (Baharani *et al.*, 1991 y 1994; Zunino *et al.*, 2001).

La expresión de la fimbria MR/P presenta variación de fase ON/OFF (Baharani *et al.*, 1994) y el ensamblaje de la fimbria MR/P seguiría el modelo de “chaperona-acomodador molecular”, en el cual la exportación secuencial de las subunidades proteicas se produce por la presencia del acomodador (o usher) molecular en la membrana externa y la chaperona que transporta las subunidades proteicas para su ensamble. Dicho modelo predice que la síntesis de la fimbria sería bloqueada en ausencia de la adhesina, lo que también se ha observado en las fimbrias P de *E. coli* (Hultgren *et al.*, 1991).

El operón *mrp* se organiza de manera similar a otros operones fimbriales (Figura 2) y codifica para 10 polipéptidos (MrpI, MrpA, MrpB, MrpC, MrpD, MrpE, MrpF, MrpG, MrpH y MrpJ).

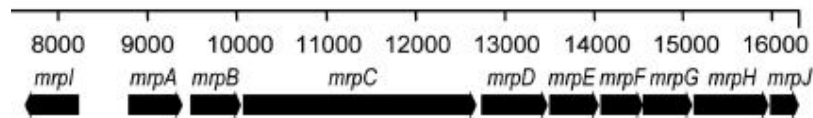


Figura 2. Representación esquemática del operon fimbrial *mrp*  
(Tomado de Pearson y col., 2008)

El gen *mrpI* se encuentra *upstream* con respecto al gen *mrpA*, es transcrito en dirección opuesta al resto del operón y codifica para una recombinasa específica de sitio (Figura 2). En la región intergénica entre *mrpI* y *mrpA* se encuentra un elemento invertible de 252 pb que contiene un promotor canónico  $\sigma 70$  (Zhao *et al.*, 1997). Este elemento invertible está flanqueado por fragmentos repetidos invertidos idénticos de 21 pb sobre los cuales actúa MrpI. La recombinasa es capaz de invertir la región promotora haciendo que el sistema de biogénesis fimbrial se transcriba (ON) o se inhiba (OFF). En la posición ON el promotor es capaz de dirigir la expresión del operón pero en la posición OFF, en la cual el promotor se encuentra en la orientación opuesta, la expresión no ocurre (Jansen *et al.*, 2004). Este sistema de control determina la variación de fase de la fimbria MR/P (Baharani *et al.*, 1993) descrita también para la fimbria tipo 1 de *E. coli*, entre otras (Abraham *et al.*, 1985). En la cepa de *P. mirabilis* HI4320 se encontró la existencia de una duplicación del operón *mrp*, pero no posee el elemento invertible en el promotor, lo que sugiere que la expresión de este operón no sería debida a la recombinasa MrpI (Pearson *et al.*, 2008).

El siguiente gen fimbrial es *mrpA* y codifica para la subunidad estructural principal de la fimbria. *mrpB* se encuentra *downstream* con respecto a *mrpA* y cumple la función de terminador del ensamblaje fimbrial (Li & Mobley, 1998). *mrpB* es seguido por *mrpC*, que codifica para una proteína de membrana externa que forma la base de la fimbria (“usher” o acomodador molecular) cuya función es “anclar” la fimbria a la membrana externa y acomodar las distintas subunidades fimbriales participando en su transporte a través de la membrana. Le sigue *mrpD*, cuyo producto (MrpD) es una chaperona que se encarga de transportar las subunidades proteicas hasta MrpC para su correcto ensamblaje. *mrpD* es seguido por *mrpE*, *mrpF* y *mrpG*, que codifican para subunidades proteicas menores (Bahrani *et al.*, 1994), y *mrpH* codifica para una adhesina funcional localizada en el extremo de la fimbria (Figura 3).

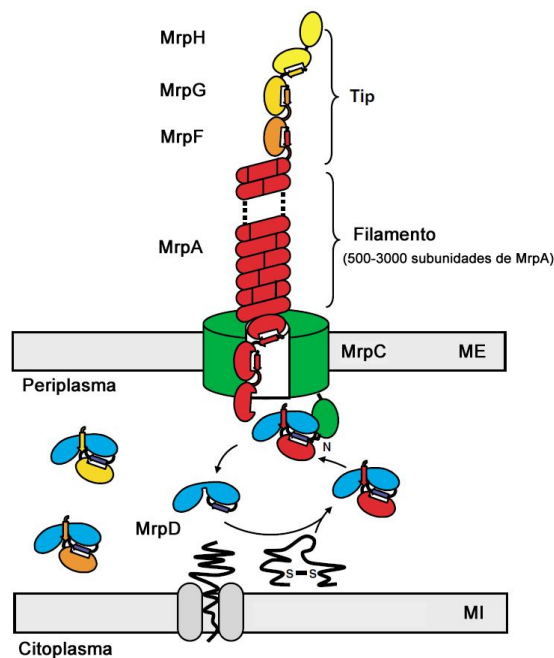


Figura 3: Esquema de ensamblaje de la fimbria MR/P el cual sigue el modelo chaperona-acomodador molecular. La chaperona periplásmica MrpD forma complejos estequiométricos con las distintas subunidades fimbriales translocadas. MrpC reconoce los complejos, MrpD es liberada nuevamente al periplasma y la subunidad ingresa al poro de translocación en donde interactúa con la subunidad incorporada previamente. ME, membrana externa; MI, membrana interna (tomado de Nishiyama *et al.*, 2005 con modificaciones)

MrpH tendría la función de adhesina y posee una secuencia carboxi-terminal única que produce una interacción con la chaperona MrpD. De dicha interacción surge el complejo MrpD-MrpH, el cual abre la “puerta” del acomodador MrpC, comenzando así el proceso de ensamblado fimbrial. La adhesina MrpH es requerida para la biogénesis fimbrial ya que sin ella no se forma la estructura (Figura 4, Li *et al.*, 1999). *mrpJ* codifica para la proteína MrpJ, se localiza al final

del operon fimbrial y cuando es sobreexpresado disminuye la movilidad mediada por flagelos (Li *et al.*, 2001).

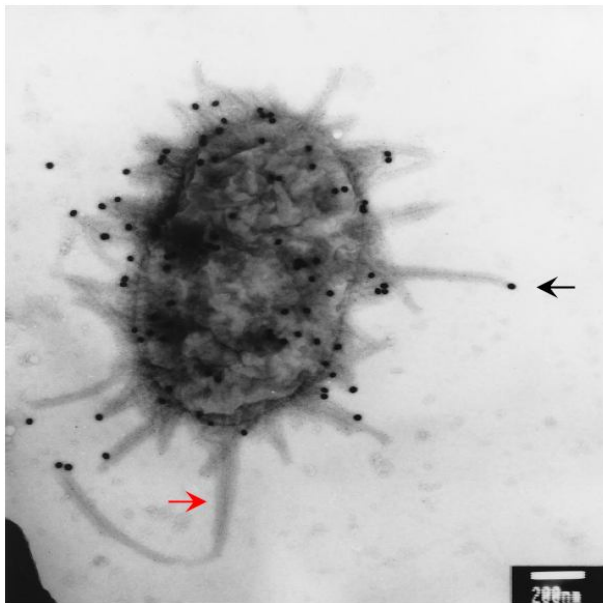


Figura 4: Microscopía electrónica de *P. mirabilis* en condiciones de cultivo para la expresión de fimbrias. Se empleó un suero anti-MrpH y un anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 30 nm de diámetro y con un suero anti-MrpA y anticuerpo secundario conjugado con partículas de oro de 5 nm de diámetro. La flecha en negro muestra la ubicación de MrpH y en rojo la de MrpA en todo lo largo de la fimbria (Li *et al.*, 1999)

El rol de este tipo de fimbrias en la colonización del TU ha sido abordado por medio de diferentes estrategias. Bahrani y colaboradores generaron un mutante en *mrpA* por reemplazo alélico y realizaron ensayos de infectividad comparando la cepa mutante con la cepa salvaje en un modelo de ITU ascendente en ratón (Bahrani *et al.*, 1994). Los resultados mostraron una disminución significativa de la infectividad de la cepa mutante con respecto a la salvaje. La cepa mutante causó menos daño en el uroepitelio y en riñones comparado con la salvaje. Dichos autores plantean que la fimbria MR/P contribuiría a la infección renal facilitando la colonización del TU, aunque la atenuación no previene la infección. Zunino y colaboradores, trabajando con una cepa mutante *mrpA*, también obtuvieron una disminución significativa de la infectividad en un modelo de infección hematogena. Por otra parte, la co-infección del mutante con la cepa salvaje también mostró una disminución significativa de la infectividad de la cepa incapaz de expresar fimbrias MR/P en un modelo de ITU ascendente en ratón. Cuando se evaluó la adhesividad *in vitro* de la cepa mutante a células uroepiteliales se observó una disminución significativa de la adhesión de esta cepa con respecto a la cepa salvaje (Zunino *et al.*, 2001). Los resultados obtenidos por estos autores sugieren que las fimbrias MR/P podrían jugar un papel fundamental en la colonización del tracto urinario.

En los últimos años, estrategias de estudio de patogénesis molecular han confirmado la relevancia de la fimbria MR/P en las ITU. Pearson y colaboradores estudiaron el transcriptoma de *P. mirabilis* durante la infección empleando un modelo de ITU ascendente (Pearson *et al.*, 2011). Los resultados mostraron que la expresión *in vivo* de los genes del operon *mrp* se encuentra aumentada unas 13806 veces con respecto a la expresión *in vitro*. Además se encontró que los genes que codifican para la fimbria MR/P son de expresión elevada en las bacterias recuperadas de orina de ratones infectados (Pearson *et al.*, 2011). Por otro lado, en estudios realizados en nuestro Departamento, se observó que cepas de *P. mirabilis* de diversos orígenes (clínico y no clínico) poseen el gen *mrpA* y expresan la fimbria MR/P (Sosa *et al.*, 2006). Independientemente del origen, todas las cepas fueron capaces de colonizar el TU de ratones. Estos resultados mantienen la hipótesis de que tanto aislamientos de origen clínico como no clínico representan una población solapada que posee capacidades similares de causar ITU. Además, la distribución de la fimbria MR/P entre las cepas de diversos orígenes refleja la naturaleza oportunista de este microorganismo.

### Flagelos y movilidad *swarming*

*P. mirabilis* es un microorganismo móvil que posee flagelos peritricos y es capaz de diferenciarse de una célula vegetativa en forma de bastón (célula *swimmer*) a una célula elongada multi flagelada (célula *swarmer*) (Figura 5), siendo ésta una de las características distintivas de las células *swarmer* (Hoeniger, 1965).



Figura 5: Flagelos y movilidad *swarming*. Izquierda: micrografía electrónica de una célula *swarmer* de *P. mirabilis* multi flagelada (Zunino *et al.*, 1999). Derecha movilidad *swarming* de *P. mirabilis* en agar infusión cerebro-corazón.

Los genes que codifican para los componentes del flagelo se encuentran en una región de 54 kb. La localización de todos los genes flagelares en locus contiguos es inusual en bacterias (Pearson

*et al.*, 2008). En dicho locus se encuentran 50 genes involucrados en la estructura, regulación, quimiotaxis flagelar y 5 genes que codifican para proteínas cuya función aún es desconocida (Figura 6, Pearson *et al.*, 2008).

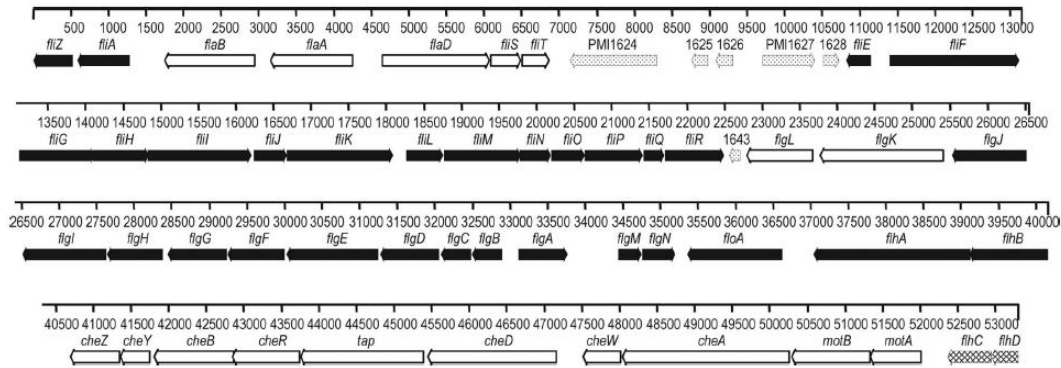


Figura 6: Mapa de los genes involucrados en la estructura, regulación y quimiotaxis flagelar (tomado de Pearson *et al.*, 2008).

Estudios del genoma de *P. mirabilis* demostraron la presencia de dos genes estructurales en tandem, *flaA* y *flaB*, con una alta homología, los cuales codifican para la flagelina (Belas & Flaherty, 1994). Dichos genes presentan un porcentaje de identidad del 80% mientras que las regiones adyacentes a los extremos 5' y 3' son 100% idénticos, lo que sugiere que serían sitios de recombinación homóloga entre ambos genes (Manos & Belas, 2004). Además, *flaB* no se transcribe por lo que sería un alelo silencioso (Belas, 1994). Los resultados de mutagénesis mostraron que la mutación en *flaA* generaba cepas no móviles, mientras que la disrupción de *flaB* no tenía efecto sobre la movilidad (Belas, 1994). Uno de los hallazgos más interesantes del trabajo de Belas consistió en que los mutantes en *flaA* eran inestables y algunas veces revertían a un fenotipo móvil mostrando la típica movilidad *swarming* y *swimming* de la cepa salvaje. Los revertantes móviles poseían un flagelo antigénicamente distinto al salvaje y no era reconocido por el antisuero anti-FlaA. Esto demuestra que se produce un flagelo codificado posiblemente por el rearreglo y expresión de *flaB* o como se demostró posteriormente, que flagelinas con distintas secuencias aminoacídicas son generadas a partir de híbridos de los genes *flaAB* (Manos & Belas, 2004).

El flagelo bacteriano está compuesto por 3 partes: el cuerpo basal, el gancho y el filamento (Figura 7, Panel B). El cuerpo basal está constituido por un motor de rotación reversible y el aparato de exportación de proteínas que transloca los componentes flagelares y algunos factores de virulencia bacterianos, mientras que el gancho y el filamento funcionan como conector y propulsor respectivamente (Terashima *et al.*, 2008).





glicolípidos/gangliósidos monosialidogangliosidos (GM1), asialoGM1 y diasialidogangliosido (GD1a) (Feldman *et al.*, 1998) y los receptores del tipo Toll 5 (TLR5 del inglés: *Toll Like Receptor*) (Hayashi *et al.*, 2001). La flagelina bacteriana puede interactuar con ambos tipos de receptores y activar respuestas innatas en distintos tipos celulares que expresan TLR5 como monocitos, fibroblastos, células epiteliales, entre otros, produciendo citoquinas como TNF- $\alpha$  (Factor de necrosis tumoral  $\alpha$ ), IL-1 (Interleuquina-1) e IL-8 (Moors *et al.*, 2001). La interacción de TLR5 con flagelina activa la cascada de señalización que involucra el reclutamiento y activación de IRAK (quinasa asociada al receptor de IL-1), a través de MyD88 (proteína mielóide adaptadora de la respuesta diferencial primaria), lo que lleva a la activación de quinasas MEK e I $\kappa$ B, las cuales en última instancia activan la producción de proteínas inflamatorias a través de las vías NF- $\kappa$ B y MAPK (proteína quinasa activadora de mitógeno) (Hayashi *et al.*, 2001; Berin *et al.*, 2002). Recientemente se demostró que la flagelina posee un mecanismo de activación que es TLR5 independiente, el cual depende del reconocimiento de la misma vía dos receptores intracelulares Naip5 (proteína inhibidora de la apoptosis 5) e Ipaf (factor activador de la proteasa ice). Estos receptores son miembros de la familia de receptores NLR (receptores NACHT- que contienen repetidos ricos en leucina) (Miao *et al.*, 2006; Ren *et al.*, 2006).

La flagelina de *Salmonella* es capaz de activar los dos mecanismos de señalización (TLR5-dependiente e independiente) e inducir una respuesta inflamatoria. Para el caso de la señalización vía TLR5-independiente el efecto predominante es la activación de caspasas, lo que lleva a la apoptosis, pero también se inducen respuestas pro-inflamatorias (Duan *et al.*, 2012).

Una de las potenciales aplicaciones de la flagelina y que ha sido motivo de diversos estudios es su uso como adyuvante. Cuando se empleó flagelina de *Salmonella enterica* en ensayos de coimmunización con antígenos de *Yersinia pestis*, se observó un potente efecto adyuvante en el desarrollo de una respuesta inmune humoral contra *Y. pestis* tanto en un modelo murino como en primates (Honko *et al.*, 2006). Los mismos autores plantean en un trabajo previo que la flagelina podría ser considerado un adyuvante seguro pues no observaron inflamación sistémica ni local luego de la inmunización intranasal en ratones (Honko & Mizel, 2004). Además del potencial rol adyuvante de la flagelina se ha postulado que ésta podría inducir proliferación y entrada en el ciclo celular de cultivos de fibroblastos (Hasan *et al.*, 2005). La flagelina activaría directamente la expresión de genes anti-apoptóticos y una gran variedad de otros mecanismos citoprotectores cuya acción indirecta sería la de reducir la apoptosis de las células epiteliales (Vijay-Kumar *et al.*, 2006). Diversas flagelinas de varios microorganismos han sido empleadas con éxito como inmunoadyuvantes y sus mecanismos de acción son ampliamente conocidos. Para el caso de la flagelina de *P. mirabilis* aún no se ha evaluado el potencial inmunoadyuvante.

Además, el rol de los flagelos y las células *swarmer* en la virulencia de *P. mirabilis* está aún en discusión. En nuestro laboratorio se observó que una cepa no flagelada de *P. mirabilis* poseía la misma capacidad de colonización que una cepa flagelada en los modelos de ITU ascendente y hematógena en ratón (Zunino *et al.*, 1994). Allison y colaboradores sugieren que en el modelo de ITU ascendente en ratón las células *swarmer* son capaces de infectar el TU y los riñones (Allison *et al.*, 1994). Asimismo, en un trabajo previo estos autores sugirieron que las células *swarmer* eran más invasivas que las vegetativas, usando una línea celular de uroepitelio humano (Allison *et al.*, 1992). Sin embargo Chippendale y colaboradores, usando un cultivo celular primario de células renales, sugirieron que las células *swarmer* no son más invasivas que las vegetativas (Chippendale *et al.*, 1994).

Por otro lado, estudios realizados con un mutante isogénico no móvil flagelo-negativo (mutación en el gen *flaD*) mostraron que dicha cepa era significativamente menos capaz de colonizar el TU de ratones comparada con la cepa parental (Mobley *et al.*, 1996).

En el caso de *P. mirabilis*, si bien se ha observado que ni los flagelos ni las células *swarmers* son requeridas por *P. mirabilis* en la infectividad (Legnani-Fajardo *et al.*, 1996) y que los flagelos no serían absolutamente necesarios para la virulencia en el modelo murino experimental clásico (Zunino *et al.*, 1994), el papel de los flagelos y de la flagelina de *P. mirabilis* en la respuesta inmune y sus implicancias en la respuesta adaptativa aún no se han estudiado.

### **Vacunas y respuesta inmune contra ITU**

Las ITU son comúnmente tratadas con antibióticos, los cuales generalmente son efectivos para los casos de ITU no complicadas. Cuando hay cepas resistentes a antibióticos, ITU recurrente, pacientes cateterizados o con anomalías en el TU o presencia de cálculos que actúan como foco de persistencia bacteriana, el éxito de la terapia antibiótica es menos efectiva (Johnson, 1996). El principal inconveniente de la actual antibiótico-terapia es la emergencia y rápido aumento de la resistencia a antibióticos. Las causas de la misma es la presión selectiva de las sustancias antimicrobianas en diversos ambientes (Wagenlehner & Naber, 2004). Considerando esta situación la generación de vacunas efectivas resulta crucial.

Diversos autores han sugerido que la recuperación tras un episodio de ITU no genera inmunidad protectora natural, lo que ha sido demostrado mediante electroforesis de campo pulsado en casos de ITU recurrente, en los cuales se determinó que una misma cepa causa los sucesivos episodios infecciosos. A diferencia de otras infecciones de mucosas como el cólera, en donde una sola exposición al agente etiológico resulta en inmunidad protectora de por vida, la

resolución de una ITU no resulta en inmunidad protectora (Russo *et al.*, 1995). La magnitud de las ITU claramente justifica el esfuerzo para desarrollar estrategias preventivas. En particular, *P. mirabilis* posee un número elevado de antígenos de superficie conservados que no difieren significativamente entre cepas de distinto origen, los cuales podrían contribuir al desarrollo exitoso de este tipo de estrategias (Mobley & Chippendale, 1990; Mobley, 1997).

Existen algunas vacunas para la prevención de las ITU en Europa, las cuales se recomiendan en pacientes con ITU no complicada recurrente. Están formuladas a partir de extractos proteicos complejos de diversas cepas bacterianas, lo que produce efectos secundarios importantes, y no son capaces de producir respuestas mucosales fuertes contra los antígenos relacionados a la virulencia (O'Hanley, 1996). Además, hasta el momento no existen licencias para vacunas contra ITU disponibles en los Estados Unidos. Estudios clínicos extensivos son necesarios para determinar la efectividad de estas vacunas.

Diversas estrategias se han desarrollado en los últimos años para prevenir las ITU producidas por *P. mirabilis*, dirigidas principalmente contra subunidades bacterianas definidas. En los primeros estudios desarrollados por Pazin y Braude, flagelos purificados fueron empleados para inmunizar ratas por la vía parenteral. Dichos autores demostraron que el suero inmovilizaba a las bacterias a través de la unión a flagelos y que prevenía la diseminación de un riñón al otro (Pazin *et al.*, 1969). Moayeri y colaboradores mostraron que la inmunización de ratones BALB/c con preparación de proteínas de membrana externa protegía a los animales frente al desafío intravesical homólogo (Moayeri *et al.*, 1991). Legnani-Fajardo y colaboradores demostraron que la inmunización parenteral con preparaciones fimbriales protegía a los ratones luego del desafío hematógeno tanto con cepas homólogas como heterólogas (Legnani-Fajardo *et al.*, 1991).

En estudios más recientes realizados en nuestro Departamento, Pellegrino y colaboradores purificaron antígenos fimbriales recombinantes de *P. mirabilis* (MrpA, PmfA y UcaA) y los emplearon para ensayos de vacunación y protección frente al desafío hematógeno y ascendente. En dicho trabajo se pudo observar que MrpA protegió a los ratones inmunizados subcutáneamente frente a ambos desafíos (Pellegrino *et al.*, 2003).

Por otro lado, la inmunización intranasal con la adhesina MrpH de la fimbria MR/P o con el dominio N-terminal de unión al receptor protege a los ratones frente a una ITU experimental (Li *et al.*, 2004). Los autores evaluaron 4 rutas de inmunización diferentes y concluyen que la ruta intranasal produce la respuesta de anticuerpos más amplia, con títulos de anticuerpos específicos en suero, orina, lavados vaginales y en bilis (Li *et al.*, 2004<sup>a</sup>; Li *et al.*, 2004b).

Las vacunas de mucosas deberían inducir la producción de anticuerpos de mucosa y sistémicos así como respuestas inmunes celulares. Tienen la ventaja de ser seguras, de bajo costo y de tener menos efectos secundarios que las vacunas sistémicas (Otczyk & Cripps, 2010).

En nuestro Departamento hemos evaluado dos vías mucosales de inmunización (nasal y vesical) así como la inducción de anticuerpos específicos contra MrpA, UcaA y PmfA en suero y orina y la protección frente a una ITU experimental ascendente en ratón. A partir de los resultados se pudo determinar que los animales inmunizados por la vía nasal desarrollaron una respuesta fuerte de anticuerpos IgG e IgA en suero cuando fueron inmunizados con MrpA. Asimismo se reportó una disminución significativa en el número de bacterias recuperadas en riñones y vejigas luego de la infección experimental (Scavone *et al.*, 2004). Sin embargo, no se pudo establecer una correlación significativa entre la inducción de anticuerpos específicos y la reducción de la colonización bacteriana.

Por otro lado, la respuesta inmune que se desarrolla a partir de la entrada de uropatógenos en el TU es particularmente compleja. Entre los mecanismos de inmunidad, la inflamación tendría un rol importante en las ITU. El papel de los distintos mecanismos en la respuesta inmune adaptativa en la resolución de la infección urinaria es actualmente un tema de debate (Nielubowicz & Mobley, 2010). A partir de la entrada de uropatógenos se produce una respuesta temprana en el hospedero que incluye el reclutamiento y activación de células efectoras en el sitio de infección, resultando en una respuesta inflamatoria cuya magnitud y localización explica muchas de las manifestaciones clínicas de las ITU (Kunin, 1987). Esta respuesta depende de receptores celulares presentes en el uroepitelio que reconocen PAMPs altamente conservados en distintos microorganismos (Schilling *et al.*, 2001) y pueden ser reconocidos por el sistema inmune innato que limita la acción de los mecanismos de evasión microbiana y permite la detección del agente infeccioso a partir de un número limitado de receptores celulares. Se ha determinado que la detección de los PAMP por los TLR es crucial para la activación de la respuesta inmune innata así como para el control de la respuesta inmune adaptativa que se produce posteriormente (Bowie *et al.*, 2005). Varios trabajos han demostrado que las células epiteliales de la vejiga, al igual que los macrófagos, expresan TLR4, el cual media una respuesta rápida de citoquinas (Bäckhed *et al.*, 2001; Schilling *et al.*, 2001). En macrófagos, el reconocimiento de los LPS requiere de un co-receptor CD14 (Wright *et al.*, 1990), el cual no está presente en células uroepiteliales. Se ha demostrado también que TLR4 reconoce a las fimbrias independientemente de la presencia del co-receptor CD14 (Frendeus *et al.*, 2001).

El último TLR identificado y caracterizado es el TLR11, el cual se expresa específicamente en las células renales murinas (Zhang *et al.*, 2004). El PAMP que reconoce dicho TLR aún no fue

identificado pero en ensayos *in vitro* se observó que reconoce algún motivo presente en cepas de *E. coli* uropatogénica (Lauw *et al.*, 2005). Además, en ratones *knockout* para el TLR11, se ha observado una infección masiva de los riñones al desafiar los animales con una cepa de *E. coli* uropatogénica. Estos autores sugieren que el TLR11 tiene un papel en la respuesta inmune innata específicamente contra bacterias uropatógenas (Zhang *et al.*, 2004). En humanos el gen del TLR11 está presente pero no se expresa debido a la existencia de un codón de terminación en el marco de lectura. Este hallazgo abre nuevas interrogantes pues la ausencia de dicho TLR podría ser uno de los motivos de la particular susceptibilidad que presentan los seres humanos a las ITU.



## **HIPÓTESIS**

Las fimbrias MR/P y los flagelos de *P. mirabilis* juegan un papel relevante en la colonización y en la inducción de la respuesta inmune en el tracto urinario.

El conocimiento de los mecanismos de interacción bacteria-célula, de persistencia bacteriana y de aspectos de la respuesta inmune en el tracto urinario puede contribuir al desarrollo de estrategias de control de las ITU.

## **OBJETIVOS**

El objetivo general de la presente tesis consiste en analizar el papel de las fimbrias MR/P y flagelos de *P. mirabilis* en las distintas etapas de la infección experimental, así como sus implicancias en la interrelación bacteria-célula eucariota y en la generación de una respuesta inmune en el tracto urinario.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Caracterizar la dinámica de las primeras etapas de la ITU en un modelo murino experimental analizando en particular el papel de las fimbrias MR/P y flagelos de *P. mirabilis*.
2. Dilucidar distintos aspectos de la respuesta de células eucariotas ante la interacción con *P. mirabilis*, efecto de las fimbrias MR/P y flagelos.
3. Analizar el potencial papel adyuvante de los flagelos de *P. mirabilis* en inmunizaciones con la proteína fimbrial MrpA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### 1. Cepas bacterianas, plásmidos y condiciones de cultivo

Las cepas bacterianas y plásmidos empleados y generados en el presente trabajo se detallan en la Tabla 1. En nuestro laboratorio contamos con la cepa salvaje de *P. mirabilis* 2921 obtenida de un aislamiento clínico, la cual ha sido ampliamente caracterizada, y el mutante isogénico en la fimbria MR/P (cepa *P. mirabilis* MSD2) (Zunino *et al.* 2000; Zunino *et al.*, 2001).

Tabla 1: Cepas y plásmidos empleados en el presente trabajo. Amp, ampicilina; Tet, tetraciclina, Ery, eritromicina; Pol, polimixina; Kan, kanamicina.

Cepa o plásmido	Características relevantes	Fuente o referencia
<i>P. mirabilis</i> 2921	Salvaje (Amp <sup>S</sup> , Tet <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> , Pol <sup>R</sup> , Swarming <sup>+</sup> , hemolisina <sup>+</sup> , ureasa <sup>+</sup> )	Zunino <i>et al.</i> , 2000
<i>P. mirabilis</i> 990	Salvaje (Amp <sup>S</sup> , Tet <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> , Pol <sup>R</sup> , Swarming <sup>+</sup> , hemolisina <sup>+</sup> , ureasa <sup>+</sup> )	Legnani-Fajardo <i>et al.</i> , 1996
<i>P. mirabilis</i> M9	Mutante <i>flaA-flaB</i> de 990 (Amp <sup>S</sup> , Tet <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> , Pol <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> Swarming <sup>-</sup> , hemolisina <sup>+</sup> , ureasa <sup>+</sup> )	Legnani-Fajardo <i>et al.</i> , 1996
<i>P. mirabilis</i> MSD2	Mutante <i>mrpA</i> de 2921 (Tet <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> , Pol <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> , Swarming <sup>+</sup> , hemolisina <sup>+</sup> , ureasa <sup>+</sup> )	Zunino <i>et al.</i> , 2001
<i>P. mirabilis</i> AF	Mutante <i>flaA-flaB</i> de 2921 (Amp <sup>S</sup> , Tet <sup>R</sup> , Ery <sup>R</sup> , Pol <sup>R</sup> , Kan <sup>R</sup> Swarming <sup>-</sup> , hemolisina <sup>+</sup> , ureasa <sup>+</sup> )	Este estudio
<i>E. coli</i> SM10 $\lambda$ pir	<i>thi thr leu tonA lacY supE</i> <i>recA::RP4-2-Tc::Mu Kan<sup>R</sup> <math>\lambda</math>pir</i>	Simon <i>et al.</i> , 1983
<i>E. coli</i> BL21 $\lambda$ DE3(pEM1)	Cepa de expresión de MrpA recombinante	Pellegrino <i>et al.</i> , 2003
pEM1	pET-21 <sup>a</sup> (+) <i>mrpA</i>	Pellegrino <i>et al.</i> , 2003
pCVD442	R6Kori, <i>mobRP4</i> , SacB, Amp <sup>R</sup>	Donnenberg & Kaper, 1991
pCVD442:fkf	Plásmido conteniendo el fragmento 3' <i>flaA</i> , casete de resistencia a kanamicina- <i>flaB5'</i> .	Este estudio

Para el cultivo bacteriano se empleó el medio líquido Luria-Bertani (LB) [triptona 10 g/l, extracto de levadura 5 g/l y NaCl 5 g/l, pH 6.8], el cual se suplementó con agar al 1.5% cuando fue necesario emplear el medio sólido. Para evitar la movilidad *swarming* se empleó medio agar nutriente (NA) sin NaCl y agar al 2% [extracto de carne 3g/l, peptona 5 g/l, agar 20 g/l, pH 7].

Los medios fueron suplementados con los antibióticos ampicilina (100 µg/ml), kanamicina (40 µg/ml) si las cepas bacterianas lo requerían.

## 2. Líneas celulares y condiciones de cultivo

En nuestro Departamento contamos con líneas celulares T24, proveniente de carcinoma de epitelio de transición de vejiga humana (ATCC HTB-4<sup>TM</sup>), y Vero, proveniente de riñón de mono verde africano *Cercopithecus aethiops* (ATCC CCL-81<sup>TM</sup>), las cuales se mantuvieron en el medio D-MEM completo conteniendo 4.5 g/l de glucosa, 110 mg/ml de piruvato de sodio, 4 mM de L-Glutamina y suplementado previo a su uso con 10% de suero fetal bovino, 1.5 g/l de bicarbonato de sodio y antibiótico/antimicótico (Gibco®). Las líneas celulares se cultivaron a 37°C, 5% de CO<sub>2</sub>.

## 3. Generación de una cepa mutante aflagelada de *P. mirabilis* 2921

La estrategia empleada para la construcción de la cepa mutante aflagelada isogénica de *P. mirabilis* 2921 consistió en primer lugar en amplificar la región 3' *flaA-kan-flaB5'* de la cepa mutante *P. mirabilis* M9 isogénica de *P. mirabilis* 990, previamente construida en nuestro Departamento (Legnani-Fajardo *et al.*, 1996). El fragmento amplificado (3' *flaA-kan-flaB5'*) se ligó con el vector pCVD442, un vector suicida que posee el gen *mob* para la movilización de plásmidos y es replicativo sólo en cepas que producen la proteína  $\pi$ . De esta manera, el producto de ligación entre pCVD442 y 3' *flaA-kan-flaB5'* (llamado pCVD442:fkf) se introdujo en la cepa *E. coli* SM10 $\lambda$ pir. Esta cepa expresa la proteína  $\pi$  y contiene los genes *tra* del plásmido RP4 lo que permite la conjugación. Una vez transformada la cepa de *E. coli* se procedió a realizar la conjugación con *P. mirabilis* 2921. Dadas las características de las cepas y plásmidos, la mutación se generó por doble recombinación (intercambio alélico) entre *P. mirabilis* 2921 y el plásmido pCVD442:fkf. Las colonias mutantes se seleccionaron por su resistencia a Tet, Kan (generada por la mutación) y crecimiento en sacarosa. La cepa de *E. coli* SM10 $\lambda$ pir es sensible a la sacarosa por la presencia del gen *sacB*.

### 3.1 Extracción de ADN genómico

A partir de un cultivo de la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 en medio sólido, cultivado a 37°C durante 18-22 horas se realizó una suspensión de la misma en agua ultrapura. La suspensión se calentó a 100°C durante 10 minutos y luego se centrifugó a 10.000 rpm durante 15 minutos. El sobrenadante conteniendo el ADN genómico se conservó a -20 °C hasta su empleo.

### 3.2 Amplificación de ADN (PCR)

En nuestro Departamento contamos con la cepa de *P. mirabilis* M9, mutante aflagelado derivado de la cepa salvaje *P. mirabilis* 990 (Legnani-Fajardo *et al.*, 1996). Para la construcción del mutante isogénico aflagelado derivado de *P. mirabilis* 2921 se partió amplificando el fragmento de la cepa M9 que contiene el extremo 3' del gen *flaA*, el casete de resistencia a kanamicina y el extremo 5' del gen *flaB*. Los cebadores empleados para la amplificación fueron FLIC1-5 (5'-AACTCAAACAGCATGCACAAATCTCGGG-3') y FLIC2-3 (5'-TGGTACTTGGTTTTCTAGAGCAAGCACAGC-3') previamente empleados en la generación de la cepa mutante M9. Ambos cebadores contienen sitios únicos para las enzimas de restricción *SphI* y *XbaI* respectivamente, los cuales se subrayan en la secuencia. La mezcla de reactivos empleada para la amplificación fue la siguiente: buffer 10X, dNTPs 0.4 mM, MgCl<sub>2</sub> 1 mM, cebadores 0.3 μM, Taq Polimerasa Platinum (Invitrogen ®), ADN 1 μl y agua ultrapura para completar un volumen final de 25 μl. El programa de ciclado consistió en un primero paso a 95°C, 5 minutos, 2 minutos a 94°C, 1 minuto a 60°C y 2 minutos, 30 segundos a 72°C. Estos últimos 3 pasos se repitieron durante 28 ciclos para culminar con 10 minutos a 72°C. La amplificación se realizó en un termociclador Biometra ®.

### 3.3 Electroforesis en geles de agarosa

La visualización de los distintos fragmentos de ADN se realizó mediante electroforesis en geles de agarosa. Los geles de agarosa se prepararon disolviendo 0.8 g de agarosa en 100 ml de solución TBE [54 g/l de tris base, 27.5 g/l de ácido bórico y 20 ml de 0.5 M EDTA pH 8]. Las muestras se mezclaron con solución de carga 5X (BioRad) previo a la siembra en el gel. Una vez colocadas las muestras se realizó la corrida empleando como solución de corrida TBE 1X y voltaje constante. Luego de realizada la electroforesis el gel se tiñó con bromuro de etidio para permitir la visualización de las bandas de ADN.

### 3.4 Extracción de ADN a partir de geles de agarosa

La extracción de ADN a partir de los geles de agarosa se realizó empleando el kit comercial QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) siguiendo las recomendaciones del fabricante.

### 3.5 Extracción de ADN plasmídico

A partir de 3 ml de cultivo bacteriano en medio LB suplementado con el antibiótico adecuado e incubado a 37°C durante 18 hs se realizó la extracción de plásmidos empleando el kit comercial GeneJet™ Plasmid Miniprep Kit (Fermentas). La extracción de los plásmidos se corroboró mediante visualización en geles de agarosa.

### 3.6 Digestión enzimática

Las enzimas empleadas para la digestión enzimática del fragmento de ADN amplificado y los plásmidos fueron SphI y XbaI (New England BioLabs Inc). El protocolo se realizó de acuerdo a las recomendaciones del fabricante, el cual consistió en realizar una mezcla conteniendo: 24 ng de ADN o 36 ng de plásmido, 20 U/ $\mu$ l XbaI, 5 U/ $\mu$ l SphI, seroalbúmina bovina 100  $\mu$ g/ml, buffer (10X) y agua ultra pura hasta completar un volumen de reacción de 30  $\mu$ l. La reacción se realizó en baño de agua a 37°C durante toda la noche. Posteriormente se realizó la inactivación enzimática a 65°C durante 20 minutos. Las distintas reacciones de digestión se visualizaron y corroboraron mediante corrida electroforética en geles de agarosa.

### 3.7 Ligación

La reacción de ligación del fragmento amplificado y el plásmido, ambos previamente digeridos con las mismas enzimas, se realizó empleando la enzima T4 DNA ligasa (Fermentas) siguiendo las instrucciones del fabricante. La reacción se realizó a 4°C durante toda la noche.

### 3.8 Preparación de células competentes

A partir de una placa de cultivo de *E. coli* SM10 $\lambda$ pir incubado a 37°C durante toda la noche se inocularon 50 ml de caldo LB y se incubó a 37°C en baño con agitación. Cuando la DO<sub>600</sub> alcanzó un valor de 0.4 se centrifugó el cultivo a 4000 rpm, durante 10 minutos a 4°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 25 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM previamente refrigerado. Se realizó una nueva centrifugación en iguales condiciones que la primera y el sedimento se resuspendió en 20 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. La suspensión bacteriana se incubó en hielo durante 30 minutos. Transcurrido dicho tiempo se volvió a centrifugar y el sedimento se resuspendió en 2 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM y se adicionó glicerol 10% final. Se prepararon alícuotas de 200  $\mu$ l y se conservaron a -80°C hasta su uso.

### 3.9 Transformación de *E. coli* SM10 $\lambda$ pir

Para realizar la transformación de *E. coli* SM10 $\lambda$ pir con el plásmido pCVD442:fkf (producto de la ligación del fragmento 3'*flA*-casete de kanamicina-*flaB*5' con el plásmido pCVD442) se mezclaron 200  $\mu$ l de células competentes con 8  $\mu$ l de de la mezcla de ligación y se incubaron durante una hora en hielo. Se realizó un shock térmico a 42°C durante 80 segundos luego del cual se adicionó 1 ml de caldo LB y se incubó a 37°C durante una hora y media. Alícuotas de 100  $\mu$ l se colocaron en placas de LB agar suplementadas con antibiótico y se incubaron a 37°C durante 18 h. Las colonias que crecieron en el medio fueron subcultivadas en medio LB agar durante 18 h a 37°C luego del cual se cultivaron en medio liquido LB para realizar extracción

del plásmido, visualización en geles de agarosa y de esta forma corroborar la presencia del mismo. Los clones seleccionados se conservaron a -80°C hasta su uso.

### 3.10 Conjugación

A partir de cultivos de *E. coli* SM10λpir (pCVD442:fkf) y de *P. mirabilis* 2921 realizados en medio LB e incubados a 37°C durante 18 horas se realizaron suspensiones en 1 ml de PBS. Dichas suspensiones bacterianas se centrifugaron y resuspendieron varias veces para eliminar los restos de antibióticos. Luego de la última centrifugación se prepararon suspensiones para que la relación de ambos microorganismos fuera 1:1. Se tomaron 100 µl de cada microorganismo y se colocaron en el centro de una placa de petri con medio LB agar sin NaCl y con MgCl<sub>2</sub> 10 mM y se incubó durante 6 horas a 37°C. Transcurrido el período de incubación se levantaron las bacterias, se resuspendieron en PBS y se repicaron en medio LB agar sin NaCl, 2% agar, kanamicina (40 µg/ml), tetraciclina (10 µg/ml) y sacarosa al 10%. Se sembraron varias diluciones seriadas de la mezcla de conjugación, además de las cepas parentales empleadas para controlar que no crecieran en dicho medio.

Las colonias transconjugantes (abortivas) crecen y se replican en el medio conteniendo kanamicina. El plásmido pCVD442 contiene el gen *sacB* que codifica la exoenzima levanosucrasa, su expresión en presencia de sacarosa resulta tóxica para un gran número de bacterias Gram-negativas. Los mecanismos de toxicidad aún no han sido completamente dilucidados, pero se propone que la acumulación de levanos (polímeros de fructosa de alto peso molecular sintetizados por la levanosucrasa) en el periplasma de las bacterias Gram-negativas resultaría tóxico (Steinmetz *et al.*, 1983). El empleo de los antibióticos apropiados y sacarosa en el medio de cultivo permite la selección de los eventos de doble entrecruzamiento en el cual el gen salvaje se ha remplazado por su alelo mutante y el vector suicida se ha perdido.

## 4. Evaluación de características fenotípicas y genotípicas de las cepas mutantes

### 4.1 Movilidad *swarming*

La primera característica evaluada en las colonias mutantes seleccionadas fue la ausencia de la movilidad *swarming* típica de *P. mirabilis* y mediada por flagelos. Las colonias seleccionadas se colocaron en el centro de una placa de petri con medio LB con 1.5 % de agar suplementado con kanamicina y se incubaron a 37°C durante 18 hs para observar la movilidad y formación de halos. La ausencia de movilidad *swarming* es indicativo de la ausencia de flagelos.

## 4.2 Curva de crecimiento

A partir de cultivos bacterianos en medio sólido se realizó una suspensión en PBS estéril con una  $DO_{660}$  de 0.4. Se tomaron 0.1 ml de la suspensión y se inocularon 50 ml de caldo LB, el cual se incubó a 37°C con agitación vigorosa. La curva de crecimiento se realizó tomando muestras por triplicado de los cultivos cada 2 horas y midiendo su  $DO_{660}$ . Se consideró el tiempo inicial ( $t_0$ ) aquel inmediatamente posterior al que se inocula la suspensión bacteriana en el medio. Las tres cepas de *P. mirabilis* (2921, MSD2 y AF) fueron evaluadas en el mismo ensayo y bajo las mismas condiciones.

## 4.3 PCR

Si el evento de recombinación sucedió de forma correcta la cepa mutante tendrá el gen mutado por lo que su presencia se verificó mediante amplificación con los cebadores y condiciones que se describieron en la sección 3.2. La extracción de ADN genómico se realizó a partir de un cultivo fresco de *P. mirabilis* AF como se describió en la sección 3.1. También se amplificó el fragmento *flaA-flaB* de *P. mirabilis* 2921. Los resultados se visualizaron mediante geles de agarosa y posterior tinción con bromuro de etidio.

## 4.4 Efecto hemolítico

El efecto hemolítico se evaluó en placas de Agar Sangre (TSA II 5% SB, BBL<sup>TM</sup>). A partir de un cultivo fresco en medio LB agar se seleccionó una colonia la que se repicó en el medio Agar Sangre y se incubó a 37°C durante 18 horas. El efecto hemolítico se visualizó como zonas translúcidas en el agar. Como control se empleó la cepa de *P. mirabilis* 2921.

## 4.5 Hemaglutinación

Las bacterias se repicaron en caldo LB a partir de una placa de LB agar incubada a 37°C durante 18 horas. El cultivo se mantuvo durante 48 hs a 37°C sin agitación. Transcurrido dicho tiempo se tomaron 1.5 ml del cultivo y se centrifugaron a 10.000 rpm durante 10 min. El sobrenadante se descartó y el sedimento bacteriano se resuspendió en 0.5 ml de PBS.

Los glóbulos rojos se prepararon a partir de sangre bovina (Biokey), se tomaron 3.5 ml de sangre y se centrifugó a 2500 rpm durante 10 min a 10°C. El sobrenadante se descartó y el sedimento de glóbulos rojos se resuspendió suavemente en igual volumen de PBS. La suspensión se volvió a centrifugar y el sedimento se guardó a 4°C hasta su uso.

En el momento de realizar la hemaglutinación se realizó una suspensión de glóbulos rojos al 3%. De dicha suspensión se tomaron 100  $\mu$ l y se mezclaron con igual volumen de bacterias. La

mezcla se colocó en una placa para hemaglutinación y se dejó durante unos minutos en agitador orbital. Como control negativo se colocaron 100 µl de PBS.

#### 4.6 Evaluación de la expresión de flagelos mediante SDS-PAGE y Western blot

La evaluación de la expresión de flagelos en la cepa mutante AF se realizó mediante crecimiento en medio LB con agitación durante 3 hs a 37°C. Transcurrido dicho tiempo se tomó una alícuota del cultivo de 1.5 ml, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet bacteriano se resuspendió en *buffer* de muestra para electroforesis (Tris-HCl 124 mM, pH 6.75, glicerol 20%, SDS 4%, β-mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0.01%) y se calentó a 100°C durante 5 min. El extracto de proteínas totales así producido se evaluó mediante corrida electroforética en geles de poliacrilamida al 15% y posterior Western blot. Como controles se emplearon la cepa de *P. mirabilis* 2921 y flagelina purificada.

Los geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) se realizaron de acuerdo al protocolo de Sambrook (Sambrook *et al.*, 1989). Para la preparación de los geles se usó una relación de acrilamida/bisacrilamida de 29:1 respectivamente. El gel concentrador fue utilizado en todos los casos a una concentración de acrilamida del 5%. El gel separador se preparó a una concentración final de acrilamida del 15%. La solución tampón utilizada para la electroforesis fue Tris-glicina (Tris 0.3%, glicina 1.9%, SDS 1%). La corrida electroforética se realizó en una cuba Mini Protean II de Bio-Rad a 100 V hasta que el frente de corrida llegó al gel separador y luego se continuó a 140 V. Cuando las proteínas estaban en solución se usó un buffer de muestra al doble de concentración inicial (2X). Las bandas proteicas se visualizaron por tinción de los geles con azul brillante de Coomassie (0.25 g de azul brillante de Coomassie en 90 ml de etanol absoluto al 50% en agua destilada y 10 ml de ácido acético glacial) y posterior decoloración de los mismos con solución decolorante (etanol 25%, ácido acético 8%). Para la estimación del peso molecular (PM) de la proteína se empleó el marcador de PM estándar de amplio rango de Bio-Rad.

Luego de realizada la corrida electroforética las proteínas se transfirieron a una membrana de nitrocelulosa de 0.45 µm (Bio-Rad) utilizando una cuba de transferencia Mini Trans-blot (Bio-Rad). Una vez finalizada la transferencia la membrana se bloqueó con TBS-Tween (Tris-HCl 20 mM pH 7.5, NaCl 200 mM, Tween 20 al 0.5%) 3% BSA durante 1 h a temperatura ambiente (TA). Posteriormente, la membrana se incubó con suero de conejo anti-MrpA (para la detección de la proteína recombinante MrpA) o anti-flagelos (para la detección de flagelina) de forma independiente a una dilución 1/100 en TBS-T-1% BSA durante 1 h a 37°C. El conjugado anti-IgG de conejo acoplado a fosfatasa alcalina (SIGMA, dilución 1/30.000) se incubó 1 h a 37°C. El revelado se realizó agregando a la solución tampón (Tris 100 mM pH 9.5, NaCl 100 mM, MgCl<sub>2</sub> 50 mM) BCIP (15 mg/ml) y NBT (30 mg/ml) como sustrato cromogénico de la fosfatasa



alcalina. Las membranas se incubaron a temperatura ambiente hasta que las bandas fueron visibles, deteniéndose la reacción con una solución de EDTA al 0.05% en agua destilada.

## **5. Caracterización de la infección experimental por *P. mirabilis***

### **5.1 Animales**

En todos los procedimientos que involucraron animales se utilizaron ratones hembras CD-1 de unos 20 a 25 g de peso, los cuales se mantuvieron en condiciones de cautiverio en el bioterio del IIBCE. Los animales se alimentaron con agua y ración *ad libitum*. Los protocolos fueron aprobados previamente por la Comisión de Ética de uso de animales (CEUA) del IIBCE.

### **5.2 Modelo de infección experimental clásico en ratón**

El modelo de infección experimental ascendente que se empleó fue desarrollado por Zunino y colaboradores y consistió en instilar transuretralmente los animales con 50  $\mu$ l de una suspensión bacteriana de  $2 \times 10^8$  ufc/animal (Zunino *et al.*, 2000). Los animales fueron previamente anestesiados con xilazina (10 mg/kg) y ketamina (50 mg/kg) y sus vejigas fueron vaciadas con suaves masajes abdominales. Por medio de la introducción de un catéter de polietileno (0.61 mm de diámetro externo) en la uretra se les administró lentamente la suspensión bacteriana con el fin de evitar el reflujo vesicoureteral. El protocolo clásico desarrollado por Zunino y colaboradores (2000) establece que los animales se sacrifiquen a los 7 días de realizada la infección. En el presente trabajo se evaluaron diversos aspectos de la colonización bacteriana a distintos tiempos post infección.

El sacrificio de los ratones se realizó por medio de dislocación cervical y se extrajeron en forma aséptica los riñones y vejigas para realizar las distintas determinaciones que se detallan a continuación.

### **5.3 Cuantificación de bacterias en el tracto urinario**

La cuantificación de bacterias recuperadas luego de la infección urinaria ascendente se realizó mediante recuento en placa a distintos tiempos. Cada grupo de animales (n=14, 14 y 17 para cada cepa) fue previamente infectado con cada una de las cepas a estudiar (*P. mirabilis* 2921, MSD2 y AF). Para determinar la cinética de infección los ratones fueron sacrificados a los días 1, 3, 5 y 7. Los órganos extraídos aseptícamente se colocaron en 10 ml de PBS estéril y se homogeneizaron en Stomacher 80 (Seward). Luego se realizaron diluciones seriadas en PBS y se sembraron en medio NA para inhibir el *swarming* y poder contar colonias aisladas.

#### 5.4 Cuantificación de células inmunes en orina

Para analizar la presencia y reclutamiento de células inmunes incluidos polimorfonucleares (PMN) en orina luego de la infección experimental los animales fueron masajeados suavemente en la región suprapúbica para poder colectar la orina. Este procedimiento se realizó en los días 1 (a las 0, 6 y 24 hs), 2, 3, 5, 7 posteriores a la infección y las orinas fueron colectadas de forma individual para cada animal de los grupos infectados como se describió en 5.3. Una vez obtenidas las mismas, se realizó recuento de células empleando una cámara de Neubauer para establecer la cantidad de células por volumen de orina. Para la identificación de las células inmunes se tuvo en cuenta el pequeño tamaño, la forma circular y la refringencia de las células inmunes bajo el microscopio óptico respecto a las células de descamación de vejiga presentes en las muestras. También se realizaron extendidos en portaobjetos para tinción con hematoxilina y eosina y posterior visualización mediante microscopía óptica.

#### 5.5 Respuesta celular en el tracto urinario a tiempos iniciales de infección evaluada por citometría de flujo

La evaluación del reclutamiento de células inmunes en el tracto urinario a tiempos iniciales de infección (2 y 24 hs) se realizó mediante citometría de flujo. El protocolo consistió primeramente en realizar la infección experimental como se describió anteriormente. Se emplearon 4 grupos de animales (n=4 para cada grupo) los cuales fueron infectados con las cepas *P. mirabilis* 2921, MSD2 y AF. El cuarto grupo de animales (n=4) no se infectó para establecer los niveles basales de células en el TU. Transcurridas las 2 hs, la mitad de los animales se sacrificaron y se extrajeron riñones y vejigas. Este procedimiento se repitió a las 24 hs con el resto de los animales. Todos los órganos se colocaron en tubos conteniendo 500 µl de medio RPMI frío. A continuación, cada órgano se dividió en fragmentos de 2 mm aproximadamente con tijera estéril. Una vez obtenidos los fragmentos se agregó 0.5 ml de medio de digestión (0.5 ml RPMI termostatzado a 37°C, 15 mg de colagenasa Gibco, ADNasa I (10 mg/ml) y se incubó durante 30 min a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%. Para disgregar completamente los fragmentos de los órganos se utilizó una pipeta Pasteur y luego se filtró cada muestra utilizando filtros BD de 70 µm de diámetro de poro lavando con PBS-EDTA 5 mM. La mezcla obtenida se colectó en tubos y se centrifugó a 250 x g durante 4 min. Cada sedimento celular se resuspendió en medio FACS EDTA (PBS libre de Ca<sup>++</sup> y Mg<sup>++</sup>, BSA 1,0%, EDTA 0.1 M, NaN<sub>3</sub> 0.1%) para alcanzar una concentración de células de 2.0 x 10<sup>7</sup> células/ml. Las suspensiones celulares se marcaron con anticuerpos específicos diluidos 1/50 durante 30 min a 4°C en oscuridad. Los distintos anticuerpos empleados se muestran en la Tabla 2. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, las células se lavaron 3 veces con PBS sin BSA y se centrifugaron durante 3 min a 300 x g. Posteriormente se agregaron 50 µl de formol al 4% en

PBS, se homogenizó y se incubó durante 20 min a temperatura ambiente (TA). Finalmente se realizaron 3 lavados en medio FACS EDTA y cada muestra se procesó mediante citómetro de flujo FACS Canto II. Dicho citómetro cuenta con un láser de argón (488 nm), cuyos filtros son LP735 + BP780/60 (750-810), LP670, BP 585/42, BP 530/30 y un láser diodo rojo (635nm) con los filtros BP 780/60 y BP 660/20. El programa utilizado para la adquisición y análisis de datos fue FACSDiva v6.1.3 (BD, Bioscience, San Diego, USA). Primeramente las células se clasificaron de acuerdo a su tamaño y granulosidad y se calculó la cantidad de células de cada tipo marcadas respecto al número total de células y respecto a la cantidad de células CD45+.

El protocolo se volvió a realizar para determinar los distintos tipos celulares (neutrófilos, linfocitos T y B,  $\gamma\delta$ ) presentes en las vejigas a las 24 hs de infección y se emplearon 5 animales por grupo.

Tabla 2: Anticuerpos empleados en citometría de flujo (BD Biosciences, San Diego, USA). FitC: Isocianato de fluoresceína, PE: ficoeritrina, PerCP: proteína clorofilperidina, APC: alofococianina, PE-Cy7: tándem ficoeritrina-cianina 7, PerCP-Cy5.5: tándem proteína clorofilperidina-cianina 5.5

Marcador	Células blanco
CD45-FitC	Pan leucocitario
Ly6G-PE	Neutrófilos
CD11c-APC	Macrófagos/dendríticas
CD3-PE-Cy7	Linfocitos T
CD19-PerCP-Cy5.5	Linfocitos B
$\Gamma\delta$ -FitC	Linfocitos T $\gamma\delta$

### 5.6 Evaluación de marcadores de inflamación mediante PCR en tiempo real

Para la evaluación de la expresión de distintos marcadores de inflamación en el TU, se realizó una infección experimental en 4 grupos de animales. Cada uno de los grupos fue infectados con *P. mirabilis* 2921 (n=5), MSD2 (n=4) y AF (n=5) y un grupo control sin infectar (n=6). Transcurridas 2 y 24 hs se realizó el sacrificio de los animales para realizar la extracción de riñones y vejigas. Cada uno de los órganos se homogeneizó en 500  $\mu$ l de TRIzol (Invitrogen, California, USA) y se disgregaron de forma mecánica con Ultra Turrax (IKA-Werke, Staufen-Germany) y se mantuvieron congelados a -80°C hasta su utilización.

La extracción de ARN de cada tejido se realizó según el protocolo que se detalla a continuación. A cada una de las muestras se le adicionó 200  $\mu$ l de cloroformo y se centrifugó a 10.000 x g

durante 15 minutos a 4°C. El ARN presente en el sobrenadante se precipitó con isopropanol en una relación 1:1 y el sedimento obtenido se lavó con 1 ml de etanol 75%. Las muestras se centrifugaron a  $7500 \times g$  durante 5 min a 4 °C y se descartó el sobrenadante. Los restos de sobrenadante se eliminaron colocando los tubos a 55°C durante 10 minutos. Finalmente el ARN se resuspendió en 40 µl de agua libre de ARNasas.

La cantidad de ARN obtenida se cuantificó midiendo absorbancia a 260 nm con Nanodrop (Thermo Scientific) y la calidad del producto se evaluó calculando la relación absorbancia a 260 nm/280 nm.

El ADNc se sintetizó a partir de 1.0 µg de ARN total. Previo a la retrotranscripción se realizó un tratamiento con ADNasa I (0.35 U, Invitrogen, California, USA) de forma de eliminar posibles contaminaciones por ADN en las muestras. Para esto el ARN se diluyó al 1/5 en H<sub>2</sub>O y se agregó la siguiente mezcla: 1.0 µl de buffer de ADNasa I, 0.4 µl de ADNasa I y 3.0 ul de H<sub>2</sub>O. La mezcla se incubó durante 15 min a TA, luego de transcurrido dicho tiempo se adicionó 1.0 µl de EDTA 25 mM a cada tubo y se calentó a 65°C durante 10 min.

Para la retrotranscripción se emplearon *random primers* y la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, California, USA). La mezcla de reacción consistió en 200 ng de *random primers*, 1.0 mM de dNTPs, 400 U RNaseOUT (Invitrogen), 200 U de la enzima M-MLV 1X y 20 mM de DTT. La amplificación se realizó en el termociclador Gradient Palm-Cycler™ High Performance Thermal Cycler (Corbett Life Science) y se utilizó el siguiente ciclado: 10 min a 25°C, 50 min a 37°C y 15 min a 70°C. El ADNc fue diluido al 1/5 en agua y conservado a -20°C hasta su uso.

El ADNc obtenido se empleó como molde en las reacciones de PCR en tiempo real. Para ello se utilizó el kit comercial QuantiTect® SYBR® Green (Qiagen, Hilden, Germany) y el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science). Las mezclas de reacción consistieron en 2.0 µl de ADNc, 0.9 µM de cada primer, 1.2 µl de H<sub>2</sub>O estéril y 5.0 µl del Mix de reacción (Qiagen). Los primers utilizados en este ensayo fueron diseñados y cedidos por el Dr. Juan Martín Márques del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene y se detallan en la tabla 3. El protocolo de amplificación empleado para todos los genes evaluados fue el siguiente: 15 min a 95°C seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 1 min a 60°C. La lectura de la fluorescencia se realizó en este último paso.

La especificidad de la reacción se analizó mediante las curvas de disociación de cada producto. Dichas curvas se obtuvieron subiendo la temperatura de a 1°C partiendo de 60°C hasta alcanzar los 95°C y midiendo la fluorescencia en cada cambio de temperatura.

Los resultados de amplificación se expresaron como el valor umbral (Ct), el cual representa el número de ciclos necesarios para que la fluorescencia emitida sea mayor a un umbral predefinido. Los resultados se expresaron como el aumento relativo de los niveles de ARNm en cada muestra respecto a las muestras control mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  (Livak & Schmittgen, 2001).

Tabla 3: Secuencias de los distintos primers empleados para RT-PCR

Primers	Secuencias
m $\beta$ -actina Forward	5- GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT -3
m $\beta$ -actina Reverse	5- CGT CAT CCA TGG CGA ACTG -3
mCCL20 Forward	5- TTT TGG GAT GGA ATT GGA CAC -3
mCCL20 Reverse	5- TGC AGG TGA AGC CTT CAA CC -3
mCXCL1 Forward	5- CTT GGT TCA GAA AAT TGT CCA AAA -3
mCXCL1 Reverse	5- ACG GTG CCA TCA GAG CAG TCT -3
mIL-6 Forward	5- GTT CTC TGG GAA ATC GTG GAA A -3
mIL-6 Reverse	5- AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA -3
mCXCL10 Forward	5- GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT -3
mCXCL10 Reverse	5- GCT TCC CTA TGG CCC TCA TT -3
mIFN $\gamma$ Forward	5- TCA GCA ACA GCA AGG CGA AA -3
mIFN $\gamma$ Reverse	5- CCG CTT CCT GAG GCT GGA T -3
mIL17a Forward	5- CTC CAG AAG GCC CTC AGA CTA C-3
mIL17a Reverse	5- GGG TCT TCA TTG CGG TGG-3
mIL17f Forward	5- CCC ATG GGA TTA CAA CAT CAC TC-3
mIL17f Reverse	5- CAC TGG GCC TCA GCG ATC-3

### 5.7 Cortes histológicos de riñones y vejigas

Tres animales por grupo se procesaron de forma diferente para realizar cortes histológicos de los órganos a distintos tiempos de infección. Primeramente los órganos se fijaron en paraformaldehído al 4% y se crioprotegieron con una solución de sacarosa al 20% para su correcta conservación a -80°C hasta realizar los cortes histológicos. Dichos cortes se realizaron en crióstato (Leica CM1800) a un tamaño de 12 micras.

### 5.8 Escala de daño histológico

Primeramente, los cortes colocados en portaobjetos se tiñeron con hematoxilina y eosina para su examinación al microscopio óptico en donde se evaluó el daño histológico según el criterio establecido por Alamuri y colaboradores (2009). La inflamación renal se evaluó a los 7 días de infección y se expresó como la severidad de la inflamación pelvis renal y severidad de la cistitis (Alamuri *et al.*, 2009). La severidad de la inflamación de la pelvis renal se categorizó en 0: no inflamación, 1: agrupamientos multifocales de polimorfonucleares (PMNs), 2: PMNs rodeando toda o la mayoría de la pelvis y 3: intensa inflamación neutrofílica que se extiende a los tejidos peripélvicos. La severidad de la cistitis se categorizó en 0: no cistitis, 1: ocasional infiltrado de células inflamatorias en la submucosa, 2: generalización del infiltrado de células inflamatorias en la submucosa con extensión mínima al tejido muscular o epitelio y 3: inflamación perivascular expandida, distribución transmural y células inflamatorias intraepiteliales.

### 5.9 Localización bacteriana en el TU mediante inmunofluorescencia

A partir de los cortes histológicos descritos en el apartado 5.7, también se realizó inmunofluorescencia para localizar las bacterias en los órganos. Los cortes correspondientes a los días 1 y 7 de los 3 grupos de animales infectados, además de cortes de órganos de animales sin infectar, se procesaron de la siguiente forma. Los cortes en los portaobjetos fueron primeramente sometidos a permeabilización con *buffer* de permeabilización (BP: Sero Albúmina bovina 2%, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM, Tritón X100 0.3% en PBS con Ca/Mg) durante 20 min a TA. Transcurrido dicho tiempo se realizaron 2 lavados con PBS. Las bacterias se marcaron con una sonda para el ARNr 16S de eubacterias (Mix Eub 338 I, II, III, IDT) acoplada a FitC (Daims *et al.*, 1999). La sonda, a una concentración de 8 ng/μl en *buffer* de hibridación (NaCl 900 mM, Tris-HCl 20 mM, formamida 35% y SDS 0.01%) se colocó sobre los cortes y se incubó una hora y media a 46°C en cámara húmeda, en oscuridad. Luego, se lavaron los cortes con *buffer* de lavado (NaCl 70 mM, Tris-HCl 20 mM, EDTA 5 mM, SDS 0.01%) durante 15 min a 46°C. Las células eucariotas de los tejidos se marcaron con Hoechst 33342 (1/100) y rodamina-faloidina (1/100) los cuales marcan ácidos nucleicos y actina respectivamente. Las especificaciones de todos los fluoróforos empleados en la presente tesis se detallan en la Tabla 4. Los cortes se colocaron en *buffer* A (0.05 ml Tritón X100, azida de sodio 0.05 g, DL-Lisina 0.05 g en 50 ml de PBS pH 7.4) conteniendo los marcadores fluorescentes y se incubaron durante 1 h a TA en oscuridad. Luego se realizó un lavado con PBS y otro con agua destilada. Los portaobjetos se secaron y se montaron con CitiFluor y se sellaron con un cubre objetos. Los portaobjetos se mantuvieron a -20°C hasta su observación en microscopio de epifluorescencia y confocal.

Tabla 4: Lista de moléculas acopladas a fluoróforos.

Moléculas	Blanco	$\lambda_{exc}/\lambda_{em}$
Eub 338 I, II, III acoplada a FitC (IDT)	ARNr eubacterias	488/520
Anti-IgG ratón acoplado a FitC (Molecular Probes)	IgG	488/520
Rodamina-faloidina (Molecular Probes)	f-actina	540/565
Hoechst 33342 (Molecular Probes)	ADN, ARN	350/460
FDA (Molecular Probes)	Proteínas intracelulares	488/520
IP (Molecular Probes)	ADN, ARN	543/617

### 5.10 Epifluorescencia y Microscopía Laser Confocal

La localización de las bacterias en los distintos cortes se realizó mediante 2 aproximaciones. La primera consistió en la observación de los cortes en el microscopio de epifluorescencia invertido Olympus IX81 con cámara CCD modelo DP71. Dicho microscopio cuenta con distintos objetivos (4X, 20X, 40X y 100X) y los filtros de excitación y emisión que se detallan a continuación: UMNIBA3 (Ex:470-495nm Em: 510-550nm); U-MWIB3(Ex: 460-495nm Em: 510nm); UMWG2 (Ex:510-550nm Em: 590nm); U-MWIY2 (Ex: 545-580nm Em: 610nm) y U-MWU2 (Ex: 330-385nm Em: 420nm). Dichos filtros permiten la observación de todos los fluoróforos empleados. Las imágenes se capturaron y procesaron con el programa Cell F (Olympus).

La otra aproximación consistió en la observación de los distintos cortes de los tejidos infectados en un microscopio láser confocal (MLC) directo Olympus BX-61 FV300 y usando el software Olympus Fluoview Versión 4.3 disponible en el IIBCE. La visualización se realizó con un objetivo de inmersión en aceite 100X, apertura numérica 1.35 y empleando los 4 láseres disponibles (Kr 488nm, He-Ne 633nm, He-Ne 543nm y Diodo 405nm). La MLC permite la obtención de secciones ópticas consecutivas, las que se denominan *stacks*. A partir de las secciones ópticas se obtiene información del interior de los cortes, lo que permite la observación de forma no invasiva. Además con la MLC se obtienen imágenes más nítidas pues se elimina el fuera de foco. Los *stacks* obtenidos en el eje z tuvieron un *step size* (distancia entre un imagen y la siguiente) de 0.3  $\mu\text{m}$  y el tamaño de imagen fue de 1024 x 1024 pixeles. El tamaño de píxel fue de 0.070  $\mu\text{m}$  y el número total de imágenes en cada *stack* varió de acuerdo al tamaño e información que contuviera cada uno.

## 5.11 Análisis de imágenes

Con el fin de reconstruir y calcular parámetros a partir de las imágenes obtenidas mediante MLC se emplearon varios software desarrollados para tal fin. Primeramente se procedió a la deconvolución de la imágenes. Este proceso revierte la distorsión óptica producida por el microscopio, principalmente en el eje z, reduciendo el ruido fotónico y las zonas borrosas, fenómeno conocido también como *blurring*. Las imágenes de los *stacks* se deconvolucionaron usando el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands – www.svi.nl). Posteriormente se procedió a la segmentación de las imágenes, lo que consiste en distinguir objetos que contienen información biológica relevante de aquellos que representan el "fondo". Las imágenes deconvolucionadas se segmentaron de manera manual empleando el software ScianSoft desarrollado en el Laboratorio de Análisis de Imágenes Científicas (ScianLab) de la Universidad de Chile, Facultad de Medicina, el cual fue gentilmente cedido por el Dr. Steffen Härtel. El programa incluye herramientas interactivas de segmentación de diferentes regiones de interés para la visualización, reconstrucción 3D y determinación de descriptores matemáticos morfo-topológicos. La segmentación se realizó aplicando varias técnicas: *thresholding* (umbral), destaque de bordes, y diversos filtros. Durante el proceso de *thresholding* se determinó un valor umbral a partir de histogramas creados con las intensidades de los píxeles y se etiquetaron píxeles individuales como objetos cuando sus valores fueron mayores al umbral (asumiendo que un objeto es más brillante que el fondo); los otros objetos se etiquetaron como fondo. En este caso la convención es “por encima del umbral”. Finalmente, se creó una imagen binaria coloreando cada píxel de color blanco o negro, dependiendo de la etiqueta del mismo (valor 1 para un objeto, valor 0 para fondo). Otro método de segmentación empleado consistió en encontrar los píxeles pertenecientes a los bordes de los objetos y resaltarlos (*deviation kernel*). También se emplearon filtros como *fill remove*, que rellena hoyos en objetos, *touch border*, que elimina objetos que se encuentran conectados al borde de la imagen, entre otros.

## 6. Ensayos de adhesión bacteriana a líneas celulares

### 6.1 Preparación de líneas celulares

Las líneas celulares se cultivaron en botellas de 5.0 ml conteniendo medio DMEM completo hasta semi-confluencia. El medio de cultivo se retiró y se procedió a levantar la monocapa de células mediante el agregado de 1 ml de Tripsina/EDTA 1X (PAA) e incubación durante 3 min en estufa de CO<sub>2</sub>. Una vez desprendidas las células, se adicionó medio DMEM completo para inactivar la tripsina y se realizó recuento de células en cámara de Neubauer para estimar la concentración celular. Para realizar este ensayo es necesario colocar en cada pocillo 1 x 10<sup>5</sup> células. Luego de estimada la concentración y ajustado el volumen, las células se colocaron en



placas de 6 pocillos conteniendo un cubreobjetos estéril en su interior. La suspensión de células se colocó sobre el vidrio para facilitar la adhesión al mismo. Las placas se colocaron en estufa de CO<sub>2</sub> durante 24 hs. Previo a la realización del ensayo las células se lavaron con PBS termostatzado a 37°C para eliminar los restos de antibiótico del medio empleado.

## 6.2 Preparación de cultivos bacterianos

Las tres cepas de *P. mirabilis* (2921, MSD2 y AF) se repicaron a 20 ml de medio LB (con los antibióticos adecuados) a partir de un cultivo fresco en medio LB agar. Los cultivos bacterianos se incubaron a 37°C durante 48 hs encontrándose en la fase estacionaria del crecimiento bacteriano. Dichas condiciones son las óptimas para la expresión de las fimbrias MR/P (Bahrani & Mobley, 1994). Transcurrido dicho tiempo, los cultivos se centrifugaron a 10.000 rpm, 15 min, 4°C, se descartó el sobrenadante y las bacterias contenidas en el sedimento se resuspendieron en 10 ml de PBS. Las suspensiones bacterianas se volvieron a centrifugar en iguales condiciones a las descritas anteriormente y se resuspendieron en 1 ml de PBS. En dicho volumen hay  $2 \times 10^8$  ufc y para la realización del ensayo de adhesión se colocaron  $2 \times 10^6$  ufc/pocillo. La suspensión bacteriana final se preparó en DMEM sin antibiótico/antimicótico.

## 6.3 Protocolo de adhesión a líneas celulares

Una vez realizada la suspensión bacteriana y el lavado de las células eucariotas se procedió a colocar las suspensiones bacterianas en los pocillos. Los tiempos de adhesión empleados fueron de 5, 10 y 15 min a 37°C. En cada placa se dejó un pocillo sin bacterias, conteniendo sólo medio de cultivo como control del ensayo. Transcurrido el tiempo de incubación se procedió al lavado de la monocapa con PBS frío para eliminar las bacterias no adheridas. Los cubreobjetos fueron fijados con PFA 4% durante 20 min en hielo. Luego se retiró el PFA y se lavó con PBS. La adhesión bacteriana a las células se evaluó mediante conteo en microscopio óptico. Para la mejor visualización y conteo de bacterias y células se realizó una tinción con azul de metileno. El experimento se repitió 3 veces.

## 6.4 Microscopía óptica

La visualización y conteo de las bacterias adheridas a las células se realizó en el microscopio óptico invertido Olympus IX81. Se registraron 20 campos en cada condición (aumento 100X) y se contaron solamente las bacterias que se encontraron adheridas a las células. Los resultados obtenidos se compararon mediante el test estadístico de Duncan considerando un  $P \leq 0.05$  como significativo. *P. mirabilis* posee la capacidad de adherirse a superficies abióticas, es por dicha propiedad que se optó por el conteo mediante microscopía a la realización del clásico ensayo de adhesión mediante recuento en placa.

## 6.5 Microscopía electrónica de barrido

Además de la observación y conteo de los cubreobjetos al microscopio óptico, se realizó microscopía de barrido para la observación de cambios estructurales sobre la superficie de las células y visualización de la interacción bacteria-célula eucariota. Para dicho fin se tomaron los cubreobjetos correspondientes al tiempo 15 min de adhesión para cada una de las cepas y se colocaron en 2.5% de glutaraldehído (Sigma) para su fijado, durante 30 min. Una vez transcurrido dicho tiempo se procedió a la deshidratación de las muestras mediante el remplazo del agua por acetonas en distintas proporciones (50, 70, 90 y 100%). Los cubreobjetos se mantuvieron 10 min en cada acetona. Por último se realizó el secado de punto crítico en donde se remplaza la acetona por CO<sub>2</sub>. Para la visualización de las muestras fue necesario metalizar las muestras con una fina capa de oro, que es el material conductor. Luego los cubreobjetos se observaron al microscopio de barrido. Todos los procedimientos descritos en esta sección se realizaron en colaboración con la Mag. Silvia Villar del Servicio de Microscopía Electrónica de Barrido, Núcleo de Servicios de Alta Tecnología de la Facultad de Ciencias, UdelAR.

## 7. Ensayos de invasión celular, protección celular con gentamicina

### 7.1 Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) de gentamicina

En los ensayos de protección celular frente a gentamicina se emplea dicho antibiótico ya que es incapaz de ingresar en las células eucariotas y muchos microorganismos aún tienen sensibilidad a él. Con el fin de establecer la CIM para las cepas de *P. mirabilis* estudiadas se realizaron cultivos de las 3 cepas (2921, MSD2, AF) en medio LB, incubados a 37°C durante 48 hs. Luego, se procedió a centrifugar los cultivos bacterianos a 10.000 rpm, 10 min, 4°C y el sedimento bacteriano se resuspendió en 1 ml de PBS estéril. Estos cultivos contienen aproximadamente  $2 \times 10^8$  ufc/ml. En una placa de microtitulación estéril de 96 pocillos se realizaron diluciones seriadas de gentamicina en LB partiendo de una concentración inicial de 200 µg/ml. Una vez realizadas todas las diluciones se colocaron 5 µl de la suspensión bacteriana ( $1 \times 10^7$  ufc/pocillo). Cada cepa se ensayó por triplicado en cada una de las diluciones y como control se dejaron pocillos conteniendo medio LB sin inocular. La placa se incubó durante 24 hs a 37°C luego del cual se midió la DO<sub>660</sub>. Una vez realizadas las medidas de la DO<sub>660</sub>, se tomaron 5 µl de cada pocillo y se colocaron en medio AN para evaluar el efecto bacteriostático.

### 7.2 Protocolo de invasión (protección con gentamicina)

Tanto los cultivos bacterianos como las líneas celulares se prepararon como se describió en el ensayo de adhesión. En este caso las líneas celulares se colocaron en placas de microtitulación estériles de 96 pocillos. Se tomaron 100 µl de las de las suspensiones bacterianas preparadas en medio DMEM sin antibióticos para obtener un MOI (multiplicidad de infección) de 10

bacterias/célula, se colocaron sobre la monocapa celular y se incubaron por 30 min a 37°C. Transcurrido dicho tiempo la monocapa se lavó con PBS con el fin de eliminar todas las bacterias que no se hayan adherido. En paralelo a los lavados se preparó medio DMEM conteniendo gentamicina (50 µg/ml). Una vez retirado el PBS se colocaron 100 µl del medio con antibiótico y se incubó por otros 30 min a 37°C. La cuantificación de las bacterias que ingresaron a las células eucariotas y que por lo tanto sobreviven al tratamiento con gentamicina se realizó por recuento en placa en medio AN. Finalizada la última incubación se procedió a retirar el medio, lavar la monocapa con PBS y lisar las células eucariotas con 100 µl/pocillo de desoxicolato de sodio al 0.05% en PBS. En otra placa de microtitulación se colocaron 90 µl de PBS y se realizaron diluciones seriadas tomando 10 µl de la suspensión de lisis. Luego cada una de las diluciones se plaquearon siguiendo el método de la micro-gota en medio AN. Cada una de las cepas se ensayó por triplicado y los resultados obtenidos se compararon con el test estadístico de Duncan.

### 7.3 Inmunofluorescencia de ensayo de protección con gentamicina y MLC

El ensayo de protección con gentamicina se realizó también para observar las bacterias en el interior celular mediante inmunofluorescencia y visualización mediante microscopía laser confocal. El protocolo fue el que se describió previamente pero realizado en placas de 6 pocillos conteniendo cubreobjetos como en los ensayos de adhesión. Se mantuvieron todas las condiciones del protocolo descrito previamente.

El protocolo de inmunofluorescencia consistió primeramente en realizar el fijado de las células con PFA al 4% en PBS durante 15 min a TA. Luego se realizó una incubación con el *buffer* de no permeabilización NP (BSA 2%, NH<sub>4</sub>Cl 50 mM en PBS Ca/Mg) durante 20 min a TA. Los cubre objetos se lavaron 3 veces con PBS y las células se permeabilizaron con *buffer* de permeabilización (Tritón X100 al 0.3% en *buffer* NP) durante 15 min. Luego de 3 lavados con PBS, se procedió al marcado con el anticuerpo primario policlonal anti-*Proteus* de ratón diluído 1/100 en *buffer* NP. Los cubre objetos se incubaron 1 h a TA. Transcurrido dicho tiempo se procedió a eliminar los restos de anticuerpo no unidos realizando 3 lavados con PBS. Posteriormente, se realizó la segunda incubación con el anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FitC (1/100), rodamina-faloidina (marcado de actina) y Hoescht 33342 (para ácidos nucleicos). La mezcla de anticuerpos y fluoróforos se incubó durante 30 min a TA en oscuridad. Finalmente se realizó un lavado con PBS para eliminar los restos de fluoróforos no unidos y se montaron los cubre objetos sobre portaobjetos con una gota de CitiFluor. Los preparados se mantuvieron a 4°C en oscuridad hasta su visualización en MLC. Las condiciones de adquisición de imágenes fueron las mismas descritas previamente. El procesamiento de imágenes fue el mismo que en la sección 5.11.

## 8. Evaluación de la inducción de apoptosis en cultivos celulares

### 8.1 Inducción de apoptosis, evaluación por triple tinción y epifluorescencia

La triple tinción con Ioduro de propidio (IP), diacetato de fluoresceína (FDA) y Hoechst 33342 (HO) (Proietti *et al.*, 2000) es usualmente empleada para medir la inducción de apoptosis en cultivos celulares. Esta tinción permite diferenciar entre 3 categorías de células. Las que tengan su membrana intacta (vivas) se observarán con su citoplasma verde y núcleo azul. Las células que pierdan permeabilidad tendrán su núcleo teñido con rojo, estas células se encontrarán en estado necrótico o en el último estado apoptótico. Las células que presenten su citoplasma de color verde claro y núcleo azul fragmentado serán células apoptóticas.

El protocolo para estudiar la inducción de apoptosis por las cepas de *P. mirabilis* 2921, MSD2 y AF se evaluó luego de incubar las bacterias en las líneas celulares por 30 min empleando un MOI de 10 bacterias/célula. Transcurrido dicho tiempo se procedió a lavar las células con PBS y colocar la mezcla de fluoróforos (0.5 µg/ml de IP, 5 µg/ml de FDA, 1 µg/ml HO) preparada en PBS. Las placas se incubaron algunos minutos y se llevaron al microscopio de epifluorescencia invertido para su observación. Se registraron 200 células al azar en cada condición. Como control de la viabilidad celular se emplearon células sin bacterias. La evaluación de la apoptosis se realizó en 3 experimentos independientes. Se calcularon los porcentajes de células en cada categoría (vivas, apoptóticas, necróticas) respecto al total de células. Los resultados se compararon usando el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney y se consideró significativo cuando  $P \leq 0.05$ .

### 8.2 Efecto citotóxico y genotóxico; técnica del cometa

El ensayo del cometa permite la detección del daño a nivel del ADN de células aisladas (rupturas doble y simple hebra, sitios álcali lábiles, entrecruzamientos, etc). El ensayo se realizó al mismo tiempo que se evaluó la apoptosis pues ambos son complementarios. Para ello los cultivos infectados durante 30 minutos con las distintas cepas de *P. mirabilis* (MOI de 10 bacterias/célula) fueron despegados del soporte mediante adición de tripsina. A los 3 minutos se inactivó la tripsina y se centrifugó el volumen total de muestra (15 min, 3000 rpm). El sobrenadante se descartó y el sedimento se resuspendió en 240 µl de agarosa de bajo punto de fusión (0.5% en *buffer* fosfato pH 7.5). Las muestras se incubaron durante 30 min a 37°C.

Previamente se prepararon portaobjetos cubiertos con agarosa de punto de fusión normal (1.5% en *buffer* fosfato pH7.5). Finalizado el tiempo de incubación se colocaron 100 µl de las muestras sobre los portaobjetos y se les colocó un cubreobjetos para que la muestra se extendiera de forma homogénea. Los portaobjetos con las muestras se colocaron a 4°C hasta que la agarosa se solidificó. Una vez sucedido esto se retiraron los cubreobjetos y se colocaron los

portaobjetos en la solución de lisis (NaCl 2.5M, EDTA 100 mM, Tris 10 mM, Tritón X100 1% y DMSO 10%, pH 10) a 4°C, en oscuridad (para evitar daño del ADN por acción de la luz UV) durante 1 h.

Los portaobjetos (microgeles) se colocaron en una cuba horizontal de electroforesis a la cual se le adicionó *buffer* de electroforesis (NaOH 300 mM, EDTA 1 mM pH=13), se incubó durante 20-30 min para permitir que el ADN se desnaturalizara. Luego, se realizó una corrida electroforética a 20 V, 250 mA, durante 20-30 min. Finalizada la corrida se retiró el *buffer* y se colocó *buffer* de neutralización (Tris 0.4 M pH=7.5) durante 15 min. A continuación los microgeles se colocaron en etanol absoluto para su deshidratación y se dejaron secar a TA. Los microgeles se tiñeron con 10 µg/ml de IP o 50 µl de bromuro de etidio. La visualización de los cometas se realizó mediante observación al microscopio invertido de epifluorescencia y registro empleando el software Comet Score. El concepto subyacente de esta técnica consiste en que el ADN no dañado conserva su asociación precisamente organizada con las proteínas de la matriz del núcleo. Cuando ocurre daño dicha organización se altera, las hebras de ADN pierden su estructura compacta y se relajan. Cuando se aplica un campo eléctrico sobre el ADN cargado negativamente, se moverán hacia el polo positivo. Las hebras de ADN que no estén dañadas son demasiado grandes para moverse en la agarosa, en tanto que los fragmentos pequeños se moverán libremente. Por ello, la cola del cometa es una medida del daño en el ADN (Singh *et al.*, 1998, Collins *et al.*, 1997).

## 9. Co-inmunización de proteínas fimbriales y flagelos

### 9.1 Obtención y purificación de la proteína fimbrial MrpA

A partir de un cultivo de *E. coli* BL21(λDE3)(pEM1) en LB/Amp incubado durante toda la noche a 37°C, se transfirieron 500 µl a 100 ml de LB/Amp, el cual se incubó a 37°C con agitación vigorosa (200 rpm) en baño de agua. El crecimiento bacteriano se controló midiendo la densidad óptica a una DO<sub>600</sub>. Cuando el cultivo alcanzó una DO<sub>600</sub> entre 0.4 y 0.8 (aproximadamente a las 3 hs) se agregó IPTG (isopropil-β-D-tiogalactopiranosido) a una concentración final de 1 mM para inducir la expresión de la proteína recombinante. El cultivo se incubó a 37°C con agitación durante 3 hs y luego se centrifugó a 10.000 x g durante 15 min a 4°C. La expresión de la proteína recombinante en las muestras antes y después de la inducción se controló en geles de poliacrilamida al 15% en condiciones desnaturizantes. Para la purificación de la proteína MrpA se utilizó el protocolo de purificación descrito por QIAGEN®. La purificación se realizó bajo condiciones desnaturizantes.

Las células inducidas se incubaron 15 min a TA. Luego, se resuspendieron en 5 ml de solución A (Urea 8M, Tris 0.01 M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M, pH 8) por gramo de peso húmedo durante 1 h a TA

con agitación. A continuación el lisado se centrifugó a 10.000  $xg$  durante 15 min a 4°C. Se colectó el sobrenadante y se mezcló con 5 ml de resina con Ni<sup>2+</sup> al 50% en solución A. Luego de 45 min a TA, la columna se cargó cuidadosamente y se ajustó el flujo de salida en 10-15 ml/hora. La columna se lavó con solución A hasta que la absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) de la solución de lavado fue menor a 0.01. Finalmente la columna se lavó con solución C (Urea 8M, Tris 0.01M, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1M, pH 6.3) hasta que  $A_{280}$  fue menor a 0.01. La proteína unida a la columna a través de los residuos de histidina fue eluída al agregar la solución C con Imidazol a una concentración final de 500 mM. Se colectaron fracciones de 5 ml del líquido eluído las que se analizaron en SDS-PAGE al 15%.

El producto eluído se dializó contra agua destilada por 72 hs a 4°C utilizando una membrana de diálisis que retiene proteínas de PM mayor a 12 kDa (Sigma).

### **9.2 Obtención de flagelos nativos de *P. mirabilis***

La purificación de flagelina (proteína estructural del flagelo) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Allison y colaboradores (1985) con modificaciones. Placas de BHI suplementado con 1.5% de agar se sembraron con la cepa de *P. mirabilis* 2921 y se incubaron a 37°C durante 24 hs. A continuación las células se recuperaron con ansa estéril, se resuspendieron en PBS y se centrifugaron a 5000  $x g$  durante 15 min a 4°C. El sedimento bacteriano obtenido se resuspendió en PBS estéril en una relación 100 ml cada 6 g de peso húmedo de células y los flagelos se desprendieron utilizando una licuadora a máxima velocidad durante 30 segundos. Posteriormente, el homogeneizado se centrifugó a 16.000  $x g$  durante 15 min y a 4°C. El sobrenadante conteniendo los flagelos se centrifugó una vez más a 40.000  $x g$  durante 1 h y 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante y el sedimento rico en flagelos se resuspendió en PBS estéril. La posible contaminación con LPS fue evaluada previamente por Umpiérrez (2011) no observándose contaminación significativa.

### **9.3 Protocolo de inmunización**

Cuatro grupos de ratones hembras se inmunizaron intranasalmente los días 0 (primera dosis), 3, 10, 17 y 24. El volumen de cada inóculo fue de 30  $\mu l$  por animal (15  $\mu l$  en cada narina). Los diferentes grupos de animales se inmunizaron con 30  $\mu g$  de proteína MrpA, 30  $\mu g$  de proteína MrpA y 7  $\mu g$  flagelos, 7  $\mu g$  flagelos, y con PBS.

### **9.4 Toma de muestras**

Para las distintas determinaciones de anticuerpos mediante ELISA se tomaron muestras de orina (mediante masajes suprapúbicos suaves) y sangre (de la vena caudal). La toma de muestra se

realizó antes de comenzar la inmunización (día 0) y 6 días después de la última inmunización (día 30).

### **9.5 Desafío ascendente**

Los animales fueron desafiados transuretralmente 7 días después de la última inmunización con 50  $\mu$ l de una suspensión bacteriana de *P. mirabilis* 2921 en PBS ( $5 \times 10^8$  ufc/animal) como se describió anteriormente en el apartado 5.2. Los ratones se sacrificaron a los 7 días de realizada la infección experimental. Los riñones y las vejigas de cada animal fueron extraídos asepticamente y homogeneizados en PBS para realizar el recuento de ufc recuperadas de los órganos. Los resultados se compararon mediante el test estadístico no paramétrico de Mann-Whitney y se considero significativo cuando  $P \leq 0.05$ . También se extrajeron los bazos para realizar cultivo de esplenocitos y posterior medición de citoquinas (Pellegrino *et al.*, 2003; Scavone *et al.*, 2004; Scavone *et al.*, 2007).

### **9.6 Determinación de anticuerpos en suero y orina (ELISA)**

Las placas de microtitulación para ELISA (Greiner) se sensibilizaron con 5  $\mu$ g/ml de proteína MrpA suspendida en tampón carbonato ( $\text{NaHCO}_3$  0.1M pH 9.6) en un volumen final de 100  $\mu$ l por pocillo. Las placas se incubaron toda la noche a TA en cámara húmeda con agitación. Una vez sensibilizadas, las placas se bloquearon con 200  $\mu$ l PBS-Tween 20-BSA 5% y se incubaron toda la noche a TA en cámara húmeda con agitación.

Las diluciones de suero y orina (1/100 y 1/2 respectivamente) se realizaron en PBS-Tween 20 0.1%-BSA 1%. Luego de sembrar el suero y la orina de cada animal (100  $\mu$ l por pocillo), las placas se incubaron durante 90 min a 37°C en cámara húmeda. Después de lavar las placas con PBS-Tween 20 0.1%, se agregaron 100  $\mu$ l del conjugado (anti-IgG o anti-IgA) de ratón acoplado a fosfatasa alcalina, (Sigma) diluído en PBS-Tween 20-BSA 1% a una dilución 1/31.000 para IgG y 1/41.000 para IgA. La incubación del conjugado fue de 90 min a 37°C. El revelado de las placas se realizó agregando el sustrato de la enzima fosfatasa alcalina (p-nitrofenil fosfato disódico, Sigma) en solución tampón para dicha enzima ( $\text{NaHCO}_3$  0.05M,  $\text{MgCl}_2$  0.001M, pH 9.3) y se incubaron durante 45 min a TA en agitador orbital o hasta que se observó desarrollo de color. La reacción se detuvo agregando NaOH 3N a cada pocillo y se midió la absorbancia a 415 nm. Los resultados se compararon mediante el test estadístico de Duncan y se consideró como significativo cuando  $P \leq 0.05$ .

### **9.7 Cultivo de esplenocitos y re-estimulación de las células**

Al momento del sacrificio de los animales para recuento de bacterias en riñones y vejiga, los bazos de los animales fueron extraídos asepticamente y procesados de la siguiente manera. Los



bazos de cada grupo de animales se agruparon en una muestra compuesta y se homogeneizaron en medio RPMI empleando un colador y un émbolo estéril. Las células así disgregadas se centrifugaron a 256 x g durante 8 min. El sedimento celular se resuspendió en 1 ml de solución Gey/bazo y se incubó en hielo por 4 minutos con el fin de lisar los glóbulos rojos. La solución Gey se preparó en el momento de realizar la lisis mezclando 20 partes de solución A (35 g/l NH<sub>4</sub>Cl, 1.85 g/l KCl, 1.5 g/l Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>-12H<sub>2</sub>O, 0.12 g/l KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 g/l glucosa, 50 mg/l rojo fenol), 5 partes de solución B (0.42 g MgCl<sub>2</sub>-6H<sub>2</sub>O, 0,14 g MgSO<sub>4</sub>-7H<sub>2</sub>O, 0.34 g CaCl<sub>2</sub> para 100 ml), 5 partes de solución C (2.25 g NaHCO<sub>3</sub> para 100 ml) y 70 partes de agua destilada. Para inactivar la lisis se agregó hasta un volumen de 40 ml de PBS al tubo, se centrifugó a 256 x g durante 8 minutos y el sedimento se lavó nuevamente con PBS.

Una vez obtenidas las células se contaron en cámara de Neubauer, se resuspendieron en medio RPMI a una concentración final de 2.5 x 10<sup>6</sup> cél/ml y se colocaron 200 µl de la suspensión celular/pocillo en placas de microtitulación de fondo plano. El experimento se diseñó de forma que cada lote de animales correspondiera a una fila de la placa. Para re-estimular las células se agregaron 5 µg de antígeno por pocillo (MrpA o flagelina), un control negativo sin adicionar antígeno y un control positivo colocando concanavalina A (1 µg/pocillo). Esto se realizó en columnas y por triplicado.

Las placas se incubaron en estufa a 37°C y 5% de CO<sub>2</sub>. Luego de 4 días de incubación se retiraron 60 µl del sobrenadante de cada pocillo, se colocaron en una nueva placa de microtitulación y se conservaron a -80°C hasta que se realizó la medición de la producción de citoquinas.

### **9.8 Medición mediante ELISA de citoquinas producidas por esplenocitos de ratón**

Los sobrenadantes de los cultivos de esplenocitos de ratón de cada uno de los grupos tratados en las inmunizaciones que fueron re-estimulados con MrpA o flagelina se emplearon para medir la producción IFN-γ, IL-4 e IL-10. Para ello se emplearon los kits comerciales BD OptEIA™ (BD Bioscience) y se siguieron las recomendaciones del fabricante para cada una de las citoquinas. El protocolo consiste en la realización de un ELISA de captura. Las placas se sensibilizaron con 2 µg/ml de anticuerpo de captura en *buffer* carbonato/bicarbonato pH 9.6 y se incubaron a 4°C durante toda la noche. Luego se procedió al bloqueo con PBS-BSA 3% durante 2 hs a TA. Posteriormente se agregaron 50 µl por pocillo de la muestra a ensayar y se realizaron las diluciones correspondientes para cada estandar de citoquina en PBS-BSA 3%. Las placas se incubaron durante 2 hs a TA. El siguiente paso consistió en el agregado del anticuerpo de captura biotinilado a una concentración de 2 µg/ml en PBS-BSA 3% y se incubó durante 2 hs a TA. Posteriormente se agregó la enzima estreptavidina-peroxidasa en una relación 1/1000 en PBS-BSA 3% y se incubó durante 45 min. El sustrato OPD 0.4 mg/ml-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> se adicionó y se



incubó durante 15 min adicionales. La reacción se detuvo mediante el agregado de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> y la lectura se realizó en espectrofotómetro a una  $\lambda$  de 450 nm.

### **9.9 Análisis estadísticos**

La comparación de los valores de ufc en el tracto urinario se realizó empleando el test no paramétrico de Mann-Whitney. Para la comparación de los valores de PMN en orina se empleó también el test de Mann-Whitney. El número de células presentes en vejigas se compararon mediante el test de Mann-Whitney. La expresión relativa de ARNm de los distintos genes estudiados entre los distintos grupos se comparó mediante el test de Student. Los valores de adhesión e invasión bacteriana e inducción de apoptosis se compararon empleando el Test de Mann-Whitney. El efecto citotóxico y genotóxico se comparó mediante el test de Student. Los valores de anticuerpos se compararon con el Test de Duncan. En todos los casos se consideró significativo cuando  $P \leq 0.05$ .

## RESULTADOS

### **Capítulo 1.- Estudio de la dinámica de la ITU por *P. mirabilis* en un modelo experimental en ratón.**

#### **Introducción**

Las ITU se ubican entre las infecciones más comunes en humanos (Foxman, 2003). Los síntomas de la cistitis se caracterizan por producir frecuencia y urgencia por orinar y disuria. Si no es tratada, esta infección puede progresar al TU alto y producir pielonefritis la cual se asocia con fiebre, náuseas, vómitos y dolor. Este tipo de infecciones posee el riesgo de progresar a bacteremia (Foxman, 2003). Las bacterias presentes en el intestino colonizan primeramente la zona periuretral, para luego acceder a la vejiga (Johnson, 1996). La adhesión de los patógenos a la superficie epitelial es considerada el primer paso en la patogénesis de las ITU (Langermann *et al.*, 1997), por lo tanto el estudio de los eventos en los estadios iniciales de la infección resultan cruciales. El proceso de adhesión es mediado por estructuras bacterianas como adhesinas, fimbrias, adhesinas no fimbriales y/o flagelos. En nuestro Departamento, así como en otros grupos de investigación, se han desarrollado modelos experimentales de ITU ascendente en ratón. Estos modelos se basan en general en el descrito por Hagberg y colaboradores (1983), planteado para el estudio de las infecciones por *E. coli* (Hagberg *et al.*, 1983). Posteriormente, Hopkins y colaboradores (1994) mejoraron el modelo para *E. coli* con el fin de simular la iniciación de la infección en humanos (Hopkins *et al.*, 1994). Para el estudio de *P. mirabilis* se han propuesto dos modelos de infección, el hematógeno y el ascendente, los que han sido extensivamente usados para el estudio de cepas uropatógenas. El desarrollo de estos modelos ha sido un paso muy importante en el estudio de los factores de virulencia y patogénesis de diferentes microorganismos, incluido *P. mirabilis*. En nuestro Departamento hemos desarrollado ambos modelos con éxito, los que nos han permitido avanzar en el estudio de este patógeno bacteriano (Zunino *et al.*, 1994). El modelo de infección ascendente clásico desarrollado por Zunino y colaboradores (1994) consiste en realizar la ITU con una suspensión bacteriana de  $6 \times 10^8$  ufc/ml empleando un catéter de polietileno blando. Los niveles de infección son evaluados a los 7 días de realizada la misma mediante recuento en placa de los homogeneizados de los órganos (riñones y vejigas). El mismo modelo ha sido desarrollado y empleado también por Li y colaboradores (1999) en varios experimentos siendo en todos los casos la evaluación de la infectividad y colonización del TU analizada a los 7 días de infección (Li *et al.*, 1999). Hasta el momento sólo un trabajo de Jansen y colaboradores (2003) ha evaluado y cuantificado la presencia de distintos morfotipos bacterianos mediante microscopía confocal a tiempos más cortos de infección (2 y 4 días posteriores a la misma) (Jansen *et al.*,

2003). Sin embargo, hasta el momento no se ha evaluado la cinética de infección a tiempos más cortos y la respuesta inmunitaria que las bacterias inducen en el hospedero.

La estrategia que se planteó en esta etapa de la tesis consistió primeramente en generar una cepa mutante isogénica aflagelada a partir de la cepa salvaje de *P. mirabilis* 2921.

En nuestro Departamento contamos con una cepa mutante aflagelada (*P. mirabilis* M9) construida mediante remplazo alélico a partir de la cepa salvaje de *P. mirabilis* 990 (Legnani-Fajardo *et al.*, 1996). Los autores generaron el mutante mediante delección de los extremos 3' del gen *flaA* y 5' del gen *flaB* e inserción de un casete de kanamicina. *P. mirabilis* posee dos copias de los genes para flagelina, por lo que es necesario mutar ambos genes para que no se produzcan rearreglos que permitan la producción de flagelina (Manos & Belas, 2004).

La generación del mutante isogénico aflagelado a partir de la cepa salvaje de *P. mirabilis* 2921 se realizó amplificando por PCR los genes flagelares mutados en la generación de la cepa de *P. mirabilis* M9. El amplicón obtenido se introdujo en el plásmido conjugativo pCVD442. Posteriormente se realizó la conjugación entre las cepas de *E. coli* SM10 $\lambda$ pir (pCVD442fkf) con la cepa de *P. mirabilis* 2921. Los mutantes resultantes fueron seleccionados y evaluados fenotípica y genotípicamente para la producción de flagelos.

A partir de la obtención de la cepa mutante isogénica aflagelada se procedió a estudiar la dinámica de la infección en el modelo de infección urinaria ascendente en ratón empleando la cepa salvaje de *P. mirabilis* 2921, el mutante para la fimbria MR/P (*P. mirabilis* MSD2) y el mutante para flagelos (*P. mirabilis* AF). Se determinó la presencia de bacterias en los órganos a distintos tiempos posteriores a la infección (a los días 1, 3, 5 y 7) y se analizó el daño celular en cortes histológicos empleando la escala descrita por Alamuri y colaboradores (2009) a los 7 días de infección. Los correlatos inmunológicos evaluados fueron el recuento de PMN en orina, la evaluación de la presencia de células inmunes en vejiga a tiempos tempranos de infección mediante citometría de flujo y el estudio de la expresión de citoquinas mediante RT-PCR. Además se realizó la localización de las bacterias en los órganos a distintos tiempos mediante inmunofluorescencia y microscopía confocal.

## Resultados

### Construcción de la cepa mutante no flagelada *P. mirabilis* AF

Para la construcción de la cepa mutante aflagelada *P. mirabilis* AF se amplificó inicialmente el fragmento de la cepa *P. mirabilis* M9 que contenía el extremo 5' del gen *flaA*, el gen de resistencia a kanamicina y el extremo 3' del gen *flaB*. *flaA* y *flaB* son genes estructurales de la flagelina de *P. mirabilis* situados en tandem. Los *primers* empleados para la amplificación por PCR del fragmento fueron diseñados con sitios de restricción para las enzimas *SphI* y *XbaI* con el fin de posibilitar la posterior digestión enzimática. Luego de obtenido el fragmento por PCR se procedió a digerirlo con las enzimas de restricción antes mencionadas (Figura 8).

El plásmido pCVD442 es un vector suicida que permite la inserción de fragmentos de ADN mediante intercambio alélico. Contiene un origen de replicación derivado de R6k, el cual requiere de la proteína  $\pi$  (codificada por el gen *pir*). En las cepas que no tienen dicha proteína el plásmido se convierte en suicida dado que no puede replicarse. Por lo tanto, el vector debe ser mantenido en cepas que poseen el gen *pir*. Además, el plásmido posee el gen *bla* de resistencia a ampicilina, una region *mob* para una eficiente transferencia por movilización conjugativa, y el gen *sacB*, que confiere sensibilidad a sacarosa en bacterias Gram negativas, y sitios de restricción para varias enzimas (entre ellas *SphI* y *XbaI*). Previo a la ligación del plásmido con el fragmento amplificado se realizó la digestión del plásmido con las mismas enzimas que el fragmento amplificado para luego ligarlos (Figura 8).

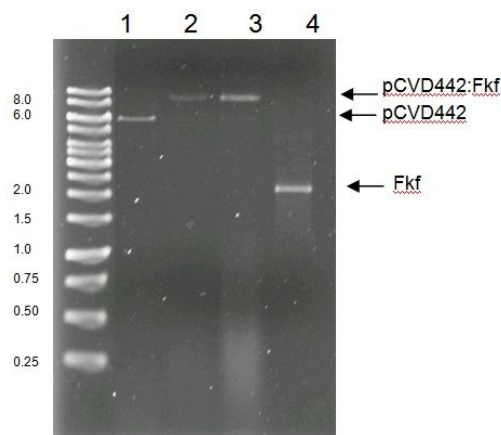


Figura 8: Amplificación de Fkf y purificación del plásmidos pCVD442. Gel de agarosa 0.8% en el cual se muestra en el carril 1 el plásmido conjugativo pCVD442 (6.3 Kb) purificado y digerido con *SphI* y *XbaI*, carriles 2 y 3 plásmidos pCVD442:fkf luego de la ligación, carril 4: fragmento *fkf* amplificado por PCR (2 kb). A la izquierda de la figura se muestra el marcador de peso molecular.

El plásmido resultante se introdujo en la cepa de *E. coli* SM10 $\lambda$ pir por transformación química y las colonias se seleccionaron por su resistencia a kanamicina. Además, a las colonias seleccionadas se les realizó la extracción y digestión del plásmido para corroborar su estructura recombinante. Se identificó el plásmido buscado y se lo denominó pCDV442:Fkf (Figura 8). Luego de esto se realizó la conjugación con *P. mirabilis* 2921 dado que la cepa *E. coli* SM10 $\lambda$ pir contiene el plásmido RP4-Tc el cual aporta funciones conjugativas que permite la movilización del plásmido pCVD442:Fkf. Las colonias seleccionadas se evaluaron por ausencia de movilidad *swarming*, capacidad de crecimiento, hemólisis, hemaglutinación y su incapacidad de producir flagelos. También se evaluó la mutación mediante PCR.

### Evaluación de la movilidad *swarming*

La cepa mutante no fue capaz de realizar la típica movilidad *swarming* como se observa en la Figura 9. La cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 presentó los típicos anillos concéntricos mientras que la cepa mutante no presentó movilidad *swarming* (Figura 9).

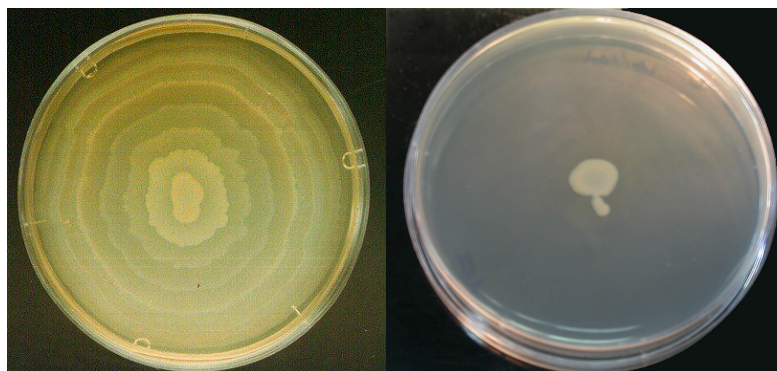


Figura 9: Movilidad *swarming* de las cepas *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF. En el panel de la izquierda se muestra la cepa de *P. mirabilis* 2921 crecida en medio LB agar produciendo el característico *swarming*, en el panel de la derecha se muestra la cepa *P. mirabilis* AF mutante isogénica en la cual hay ausencia de *swarming* resultado de la ausencia de flagelos.

### Curvas de crecimiento

Al realizar las curvas de crecimiento en caldo LB con agitación se pudo observar que las tres cepas de *P. mirabilis* (2921, MSD2 y AF) presentaron un comportamiento similar. Estos resultados mostraron que las mutaciones introducidas en las cepas, tanto en el mutante para

MR/P (*P. mirabilis* MSD2) como para flagelos (*P. mirabilis* AF), no afectaron la dinámica de crecimiento bacteriano (Figura 10).

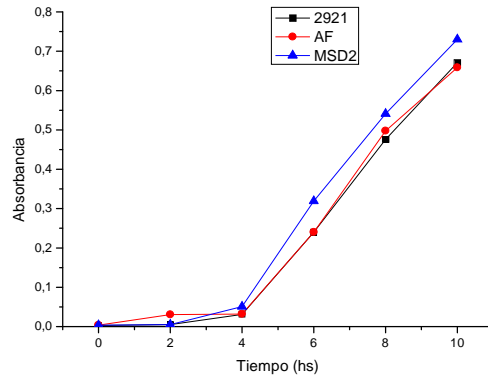


Figura 10: Curvas de crecimiento de las tres cepas de *P. mirabilis* en medio LB.

### Evaluación de la mutación en la cepa *P. mirabilis* AF por PCR

Por medio de PCR se verificó el rearrreglo genético en el mutante *P. mirabilis* AF como consecuencia de la delección de parte de los genes *flaA* y *flaB* así como la inserción del cassette de resistencia a kanamicina. También se amplificó el fragmento *flaA-flaB* de la cepa salvaje de *P. mirabilis* 2921 para comparar los tamaños de los amplicones. Como se puede observar en la figura 11 se obtuvieron los fragmentos con el tamaño esperado. Para el caso de la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 el fragmento fue de 2.4 kb mientras que el de la cepa mutante fue de 2.1 kb.

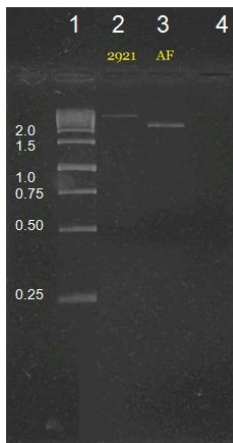


Figura 11: Evaluación de los genes *flaA-flaB* por PCR. Gel de agarosa 1.5% en la cual se muestra en el carril 1 el marcador de peso molecular 1 kb (Fermentas), carril 2: fragmento amplificado a partir del ADN de la cepa *P. mirabilis* 2921 (tamaño esperado 2.4 kb), carril 3: fragmento amplificado a partir del ADN de la cepa mutante *P. mirabilis* AF (tamaño esperado 2.1 kb) y carril 4: control negativo de la reacción de PCR sin ADN.

### **Hemólisis**

La capacidad hemolítica se evaluó en placas de agar sangre, y se pudo comprobar la capacidad hemolítica de la cepa *P. mirabilis* AF por la presencia de halos de hemólisis alrededor de la colonia. La cepa parental *P. mirabilis* 2921 es hemolítica y esta característica se mantuvo en la cepa mutante *P. mirabilis* AF (datos no mostrados).

### **Hemaglutinación**

La cepa mutante para flagelos *P. mirabilis* AF mostró poseer la capacidad de hemaglutinar eritrocitos al igual que la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921, un fenotipo asociado clásicamente a las fimbrias MR/P (datos no mostrados).

### **Expresión de flagelos**

La evaluación de la expresión de flagelos en la cepa mutante *P. mirabilis* AF se realizó mediante Western blot. Las bacterias se cultivaron en medio LB con agitación a 37°C durante 3 hs luego de las cuales se realizó la extracción de proteínas totales.

Primeramente se realizó un SDS-PAGE al 15% (Figura 12, Panel A) en el cual se sembraron y corrieron un extracto de proteínas totales de *P. mirabilis* 2921 (Figura 12, Panel A, carril 1), extractos de proteína totales de *P. mirabilis* AF y flagelina purificada de *P. mirabilis* 2921 (Figura 12, Panel A, carril 3). Luego se realizó el Western blot y se empleó para la detección de los flagelos un anticuerpo de conejo anti-flagelos de *P. mirabilis* lo que se muestra en la figura 12, panel B. El resultado del Western blot mostró la ausencia de la banda correspondiente a flagelina (Figura 12, Panel B, carril 2) en el extracto de proteínas totales correspondiente a *P. mirabilis* AF, mientras que en los carriles correspondientes al extracto total de *P. mirabilis* 2921 y a la flagelina purificada se observó la presencia de una banda 41 kDa aproximadamente, tamaño esperado para la flagelina de *P. mirabilis*.

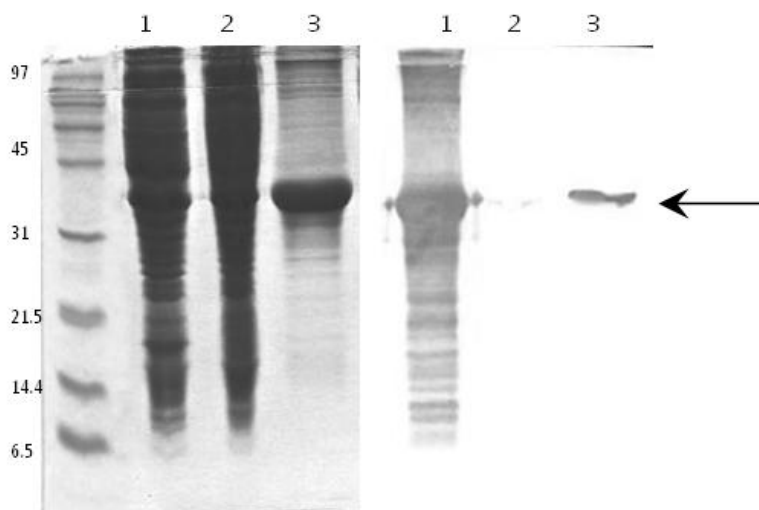


Figura 12: Expresión de flagelos. SDS-PAGE y Western blot realizado con suero anti-flagelina, las bandas corresponden en el carril 1 al extracto de proteínas totales de *P. mirabilis* 2921, carril 2: extracto de proteínas totales de *P. mirabilis* AF y en el carril 3 flagelina purificada de *P. mirabilis* 2921. La flecha indica el tamaño esperado para la flagelina.

### Caracterización de la infección experimental por *P. mirabilis*

Se realizó una infección urinaria experimental en tres grupos de ratones con las cepas *P. mirabilis* 2921 (N=15), *P. mirabilis* MSD2 (N=14) y *P. mirabilis* AF (N=17), según se explica en la sección 5.2 de materiales y métodos.

### Cuantificación de bacterias en el tracto urinario

La cuantificación de la colonización bacteriana de riñones y vejigas se realizó en los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la infección experimental. En dichos tiempos los animales se sacrificaron y se realizó el recuento bacteriano en placa de los órganos homogeneizados. Los resultados mostraron que la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 se recuperó a las 24 hs luego de la infección con recuentos elevados tanto en riñones como en vejigas. Los valores de recuentos bacterianos (Figura 13) presentaron variaciones a lo largo del ensayo en los valores de las ufc recuperadas en los órganos aunque no fueron significativas tanto en los riñones como en las vejigas de los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 ( $P > 0.05$  para todos los casos).



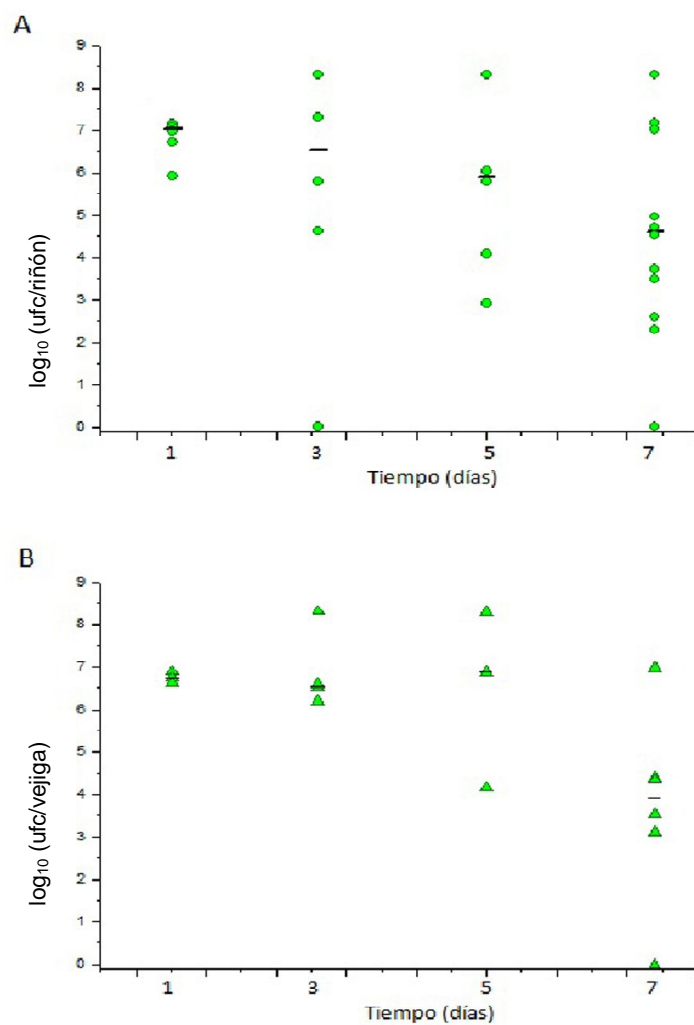


Figura 13: Gráficas de recuentos bacterianos para la cepa *P. mirabilis* 2921 en riñones (A) y vejigas (B). Las barras indican los valores de las medianas.

En la cuantificación de la colonización por *P. mirabilis* MSD2, se pudo observar la presencia de bacterias en riñones a las 24 hs pero con valores significativamente menores a los de la cepa salvaje tanto en riñones como en vejigas (Figura 14, Tabla 5). La variación a lo largo del tiempo de los valores de ufc para la cepa *P. mirabilis* MSD2 en ninguno caso fue significativa ( $P > 0.05$ , Figura 14).

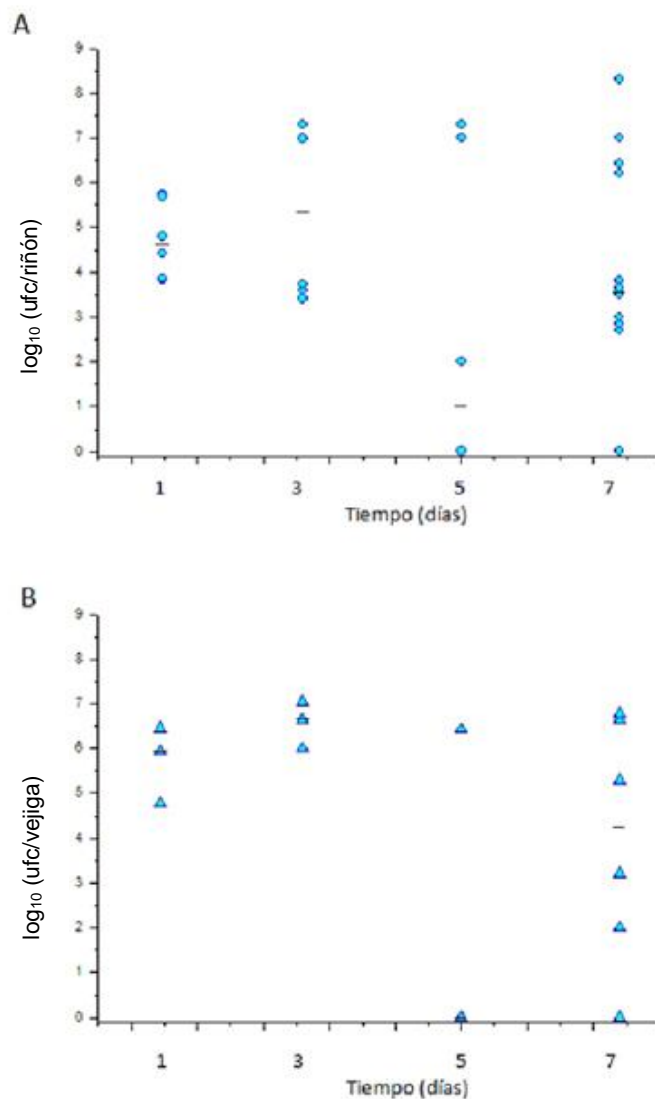


Figura 14: Gráficas de recuentos bacterianos de la cepa *P. mirabilis* MSD2 en riñones (A) y vejigas (B). Las barras indican los valores de las medianas.

Los resultados de la cuantificación de la infección por *P. mirabilis* AF revelaron la presencia de bacterias a las 24 hs en riñones y vejigas, con valores significativamente menores a los de la cepa salvaje pero no a los de *P. mirabilis* MSD2 (Figura 15, Tabla 5). La variación de los valores de recuento obtenidos en el tiempo mostró una tendencia al incremento de los recuentos en el transcurso de los días. Al comparar los valores de ufc recuperadas en riñones entre los distintos tiempos, se observó un incremento significativo de los valores al día 7 comparado con los obtenidos al día 1 ( $P=0.001$ ) y lo mismo se observó en el caso de las vejigas ( $P=0.014$ , Test de Mann-Whitney).

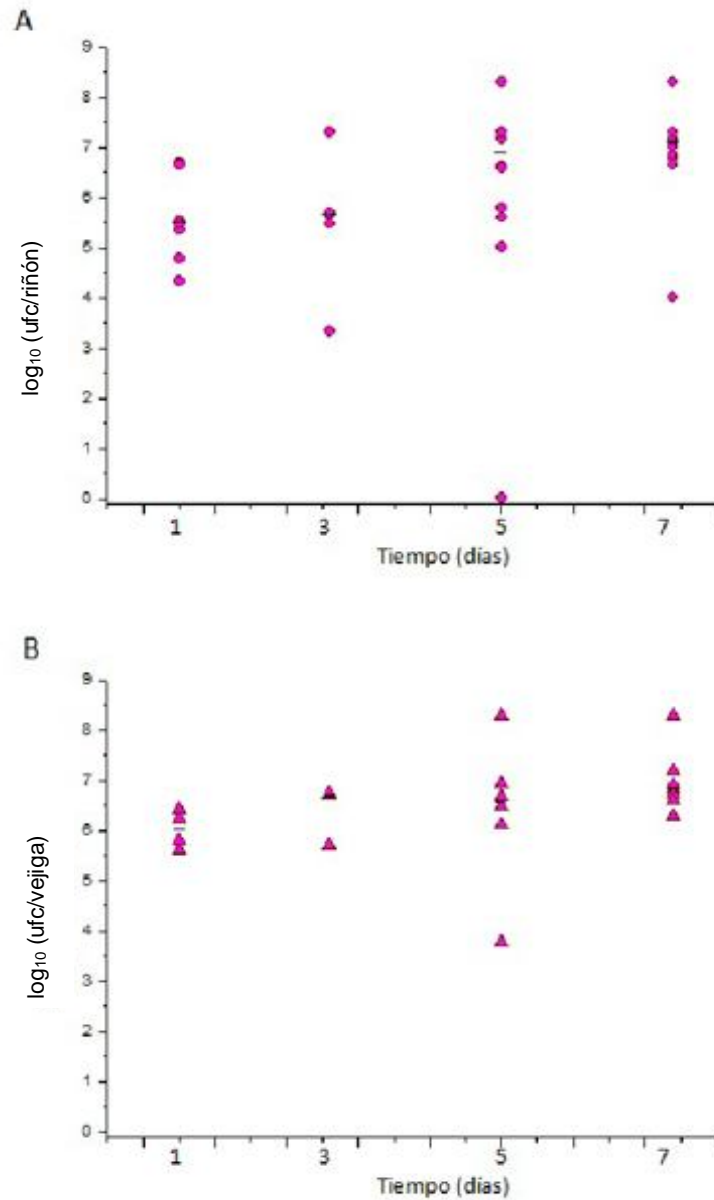


Figura 15: Gráficas de recuentos bacterianos de la cepa *P. mirabilis* AF en riñones (A) y vejigas (B). Las barras indican los valores de las medianas.

Al comparar los recuentos de las distintas cepas en los diferentes tiempos del ensayo se observó que un día después de la infección la cepa salvaje se recuperó de forma significativamente mayor que ambos mutantes, tanto en riñones como en vejigas (Tabla 5). En los días 3 y 5 posteriores a la infección no se observan diferencias significativas entre las tres cepas. Al día 7 se observó que la cepa mutante para flagelos *P. mirabilis* AF se recuperó de forma significativamente mayor que la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 y que el mutante para MR/P *P.*

*mirabilis* MSD2 (Tabla 5). Al comparar los valores de recuento obtenidos a dicho tiempo entre las cepas *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* MSD2, no se obtuvieron diferencias significativas.

Tabla 5: Valores de *P* de la colonización bacteriana en los órganos a distintos tiempos entre las cepas. NS: No significativo (Test de Mann-Whitney)

Tiempo (días)	Cepas	<i>P</i> riñones	<i>P</i> vejigas
1	2921-MSD2	0.003	0.049
	2921-AF	0.016	0.049
	MSD2-AF	NS	NS
3	No hubo diferencias significativas		
5	No hubo diferencias significativas		
7	AF-2921	0.032	0.022
	AF-MSD2	0.001	0.022
	2921-MSD2	NS	NS

### Cuantificación de células inmunes en orina

Inmediatamente antes de la infección experimental con *P. mirabilis* 2921, *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF y a las 6 hs posteriores se colectó orina de los animales para realizar el recuento de células en orina. La cuantificación de las células en orina se realizó además en los días 1, 3, 5 y 7 posteriores a la infección. Los resultados mostraron un aumento significativo de las células a las 24 hs ( $P=0.009$ ) y 48 hs ( $P=0.009$ ) posteriores a la infección en los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 respecto a los valores de células obtenidos antes de la infección. Resultados similares se obtuvieron en el caso de los animales infectados con *P. mirabilis* MSD2, observándose un aumento significativo sólo a las 24 hs ( $P=0.006$ ). En el caso de los animales infectados con *P. mirabilis* AF se obtuvieron aumentos significativos de las células a las 24 hs ( $P=0.009$ ) y a los 3 días de infección ( $P=0.028$ ) posteriores a la infección (Figuras 16-18).

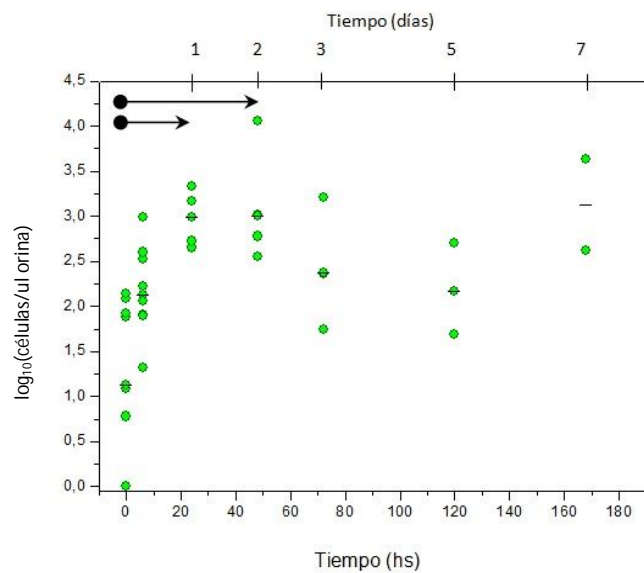


Figura 16: Gráfico de los valores de  $\log_{10}$  (células/ $\mu\text{l}$  de orina) en los animales infectados con la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 durante los 7 días de infección. Las flechas muestran los casos en donde se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , Test de Mann-Whitney). Las barras indican los valores de las medianas.

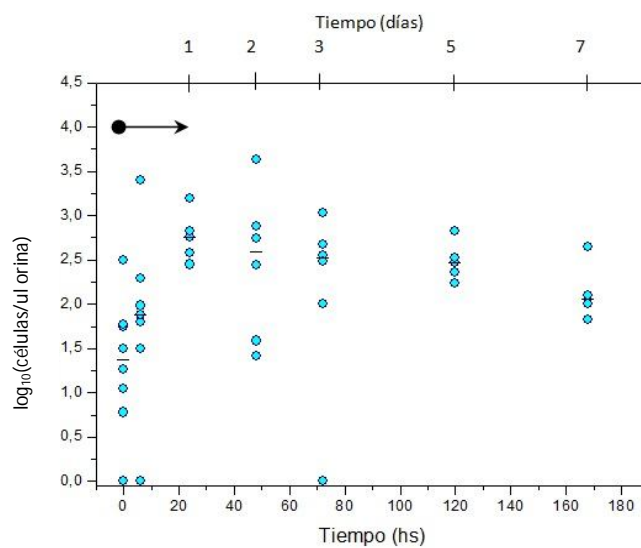


Figura 17: Gráfico de los valores de  $\log_{10}$  (células/ $\mu\text{l}$  de orina) en los animales infectados con la cepa mutante *P. mirabilis* MSD2 durante los 7 días de infección. La flecha indica diferencias significativas entre los tiempos ( $P \leq 0.05$ , Test de Mann-Whitney). Las barras indican los valores de las medianas.

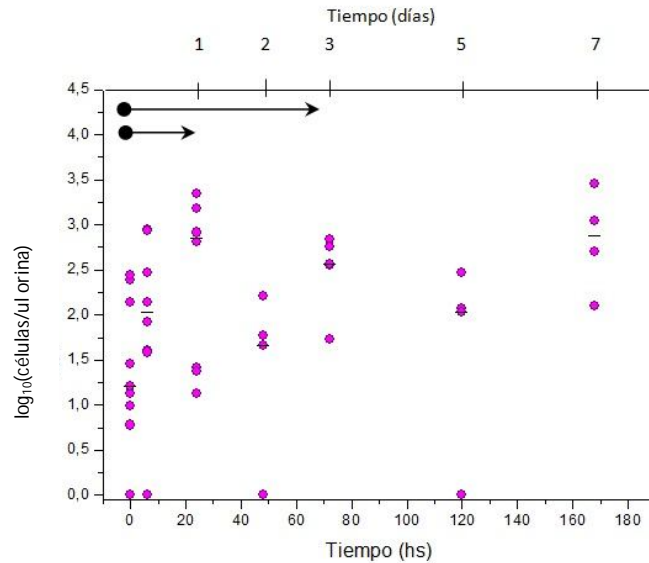


Figura 18: Gráfico de los valores de  $\log_{10}$ (células/ $\mu$ l de orina) en los animales infectados con la cepa mutante *P. mirabilis* AF durante los 7 días de infección. Las flechas indican los casos en donde se observaron diferencias significativas ( $P \leq 0,05$ , Test de Mann-Whitney). Las barras indican los valores de las medianas.

Al comparar los valores de  $\log_{10}$ (células/ $\mu$ l orina) correspondientes a la administración de cada una de las cepas de *P. mirabilis* en cada uno de los tiempos evaluados se observaron diferencias significativas solo a las 48 hs entre los valores de los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 y AF ( $P=0,025$ ) siendo los de la cepa salvaje significativamente mayores que los de la cepa mutante *P. mirabilis* AF.

Las preparaciones de las orinas también se observaron al microscopio óptico, con el fin de evaluar la presencia de PMN (Figura 19 y Anexo I). En el panel de imágenes se puede observar la presencia de células pequeñas redondeadas correspondientes a los PMN y células de mayor tamaño poligonales que corresponde a células uroepiteliales de descamación. A las 6 horas post infección se observó la presencia de PMN y bacterias. En la orina de los animales infectados con *P. mirabilis* MSD2 y AF se observó la presencia de células uroepiteliales de descamación mientras que en la cepa salvaje se observó predominancia de los PMN (Figura 19). Tanto a las 6 como a las 24 hs se observó la posible formación de NETs (del inglés: *Neutrophil Extracellular Traps*) por parte de los PMN. Los NETs han sido recientemente descritos como estructuras extracelulares producidas por los propios PMN, compuestos de cromatina y proteínas de los gránulos de los neutrófilos. Son estructuras flexibles que rodean a los neutrófilos de los cuales provienen. En la Figura 19 se puede apreciar la presencia de fibras que protruyen de los PMN y en las cuales hay bacterias adheridas. La función de los NETs sería la de atrapar y matar los

microorganismos presentes, lo cual explicaría la presencia de bacterias adheridas a las fibras que se observan en las imágenes (Ver Anexo I).

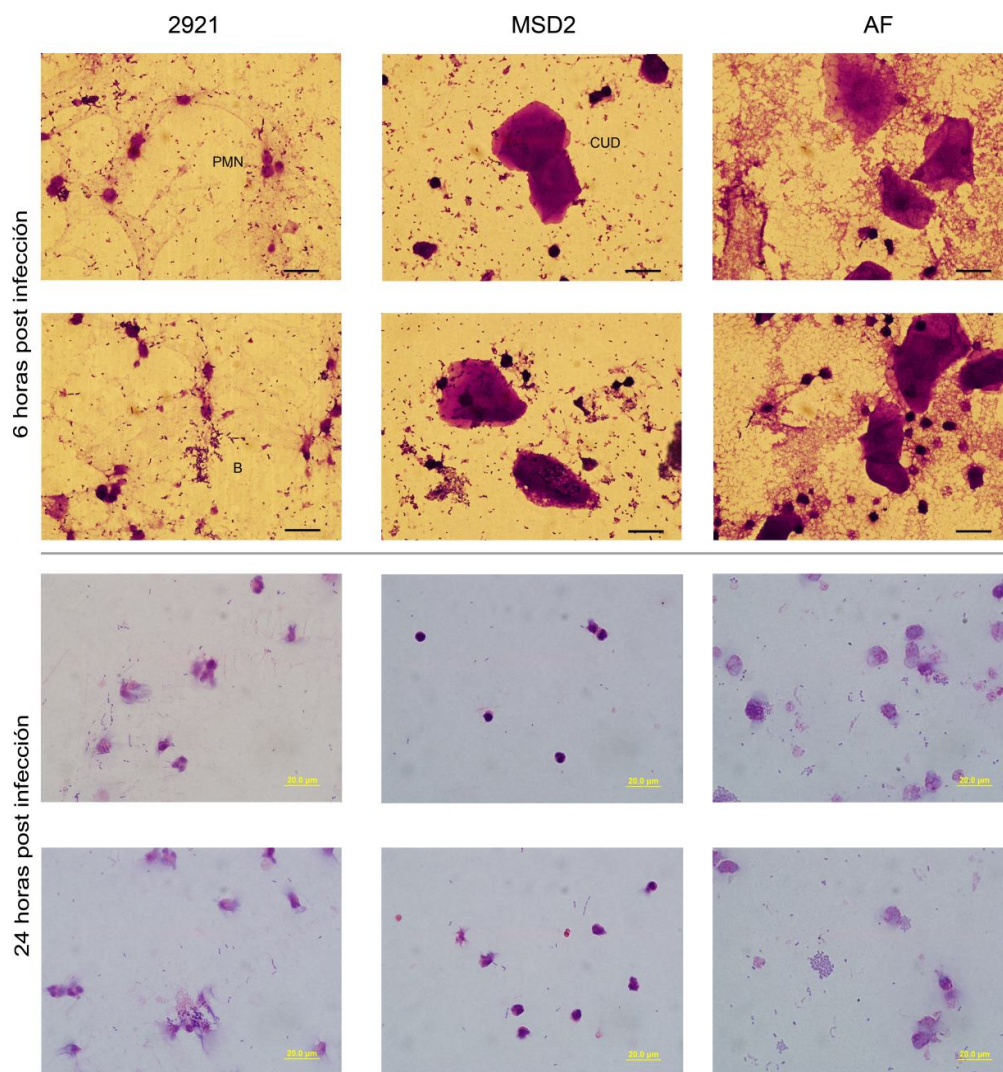


Figura 19: Orinas fijadas y teñidas con cristal violeta (paneles de 6 horas) y con hematoxilina y eosina (paneles de 24 hs). La barra corresponde a la escala de 20  $\mu\text{m}$ , las imágenes fueron tomadas con el aumento 100X en microscopio óptico. PMN: células polimorfonucleares, CUD: células uroepiteliales de descamación, B: bacterias. (Anexo I).

## Respuesta celular en el tracto urinario a tiempos iniciales de infección evaluada por citometría de flujo

Para evaluar el reclutamiento de células inmunes en el tracto urinario por citometría de flujo se realizó la infección de ratones con las cepas de *P. mirabilis* 2921, *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF y se incluyó además un grupo control sin infectar. El reclutamiento celular se evaluó en primera instancia a las 2 y 24 hs posteriores a la infección tanto en riñones como en vejigas. Los marcadores empleados en esta oportunidad fueron CD45-FitC, Ly6G-PE, CD11C-APC.

Los resultados de la primera citometría de flujo realizada a partir de las células de las vejigas de los ratones con 2 y 24 hs de infección mostraron que el mayor reclutamiento de células se dio a las 24 hs, siendo mayoritarios los neutrófilos (Ly6G+) en todos los grupos de animales infectados (N=3 para cada tiempo y cepa bacteriana). Los linfocitos se identificaron por su ubicación en el gráfico side scatter vs CD45 (Ver Anexo II). En la Figura 20 se muestran los resultados obtenidos pudiéndose apreciar claramente el aumento en el número de células detectadas. También se observó la presencia de células CD11c+ en las vejigas de los animales a las 24 hs de la infección.

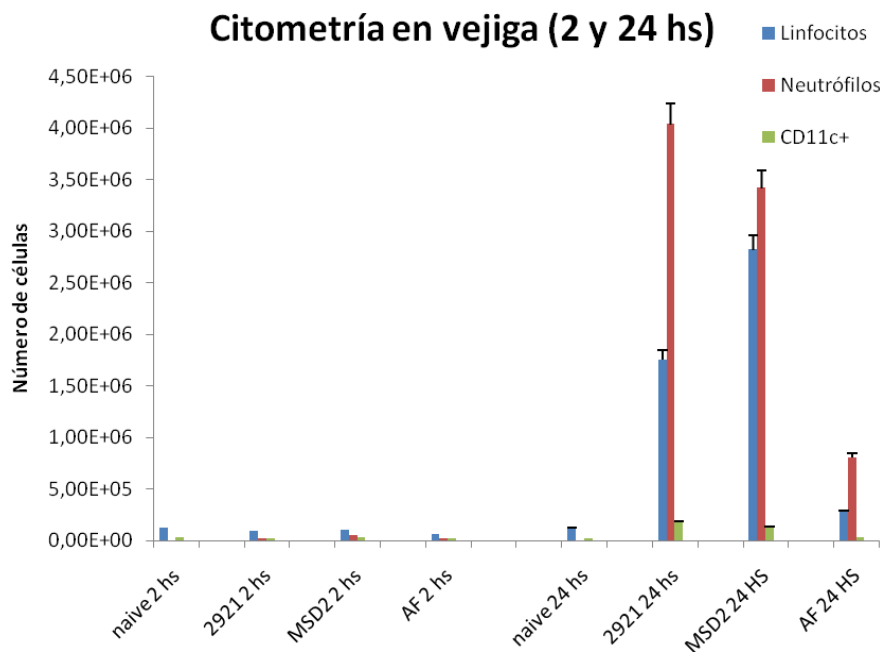


Figura 20: Gráfico del número de células de vejiga en los distintos grupos de animales a las 2 y 24 pos infección (N=3 para cada tiempo y cepa bacteriana). Las barras representan los promedios de los valores obtenidos para cada tipo celular junto con su desvío estándar.



En los riñones no se observó ningún aumento significativo en los tipos celulares marcados ni a las 2 ni a las 24 hs posteriores a la infección (Figura 21).

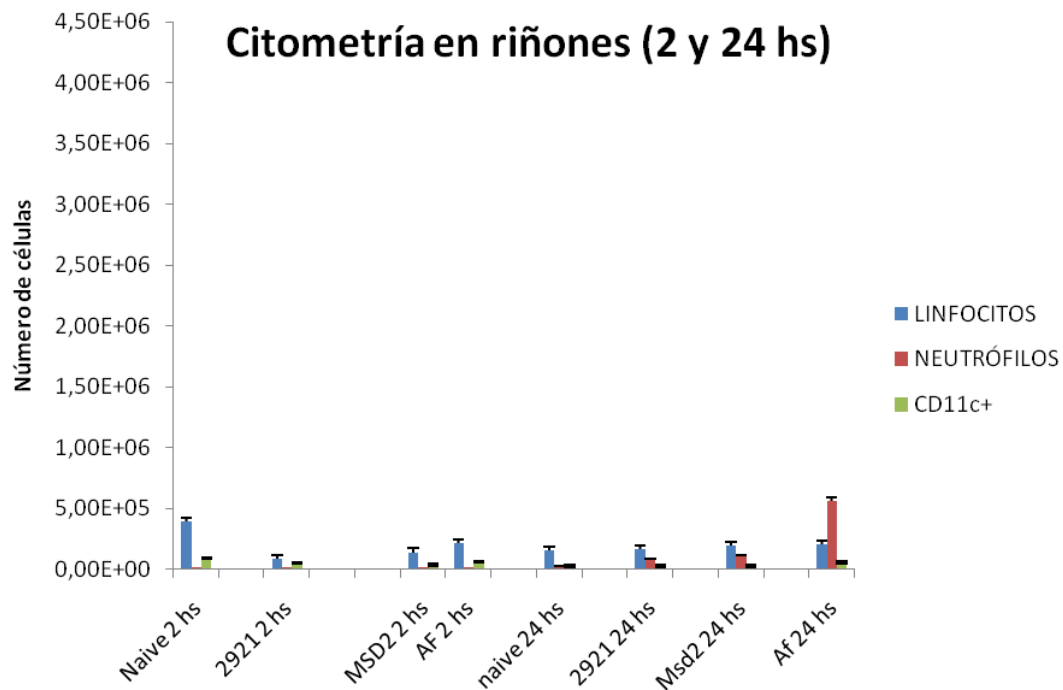


Figura 21: Gráfico del número de células de riñón en los distintos grupos de animales a las 2 y 24 post infección (N=3 para cada tiempo y cepa bacterina). Las barras representan los promedios de los valores obtenidos para cada tipo celular junto con su desvío estándar.

De acuerdo a los resultados obtenidos se repitió la citometría a las 24 hs realizando un marcado para identificar la población de linfocitos con marcadores específicos para células B (CD19) y T (CD3 y  $\gamma\delta$ ), además de neutrófilos (Ly6G). La citometría se realizó solamente en las células provenientes de vejiga de acuerdo a los resultados del primer ensayo. A partir de las células provenientes de las vejigas se realizó recuento de células viables empleando un colorante vital (Tripán blue) para poder luego cuantificar los distintos tipos celulares de acuerdo a los porcentajes de los distintos observados en la citometría.

Los resultados mostraron un incremento significativo en el total de células viables provenientes de los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 respecto a los demás grupos (Figura 22)

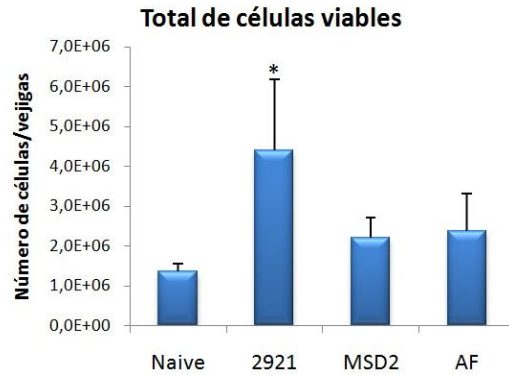


Figura 22: Células viables en vejiga. Gráfico del total de células viables obtenidas de cada una de las vejigas, las barras representan los promedios para cada grupo con sus desvíos estándares. El \* indica diferencias significativas entre los grupos  $P \leq 0.05$  Test de Mann-Whitney.

Luego se analizaron las células CD45<sup>+</sup> correspondientes al pan leucocitario (Figura 23). Los resultados mostraron que la infección con las tres cepas indujo un aumento significativo de células CD45<sup>+</sup> con respecto al estado normal sin infección (animales naive). Además se observó un incremento significativo de las células CD45<sup>+</sup> provenientes de las vejigas infectadas con *P. mirabilis* 2921 respecto a las obtenidas en los animales infectados con *P. mirabilis* MSD2 ( $P=0.016$ ). También se observó un incremento significativo entre las células CD45<sup>+</sup> provenientes de las vejigas de los animales infectados con *P. mirabilis* AF y las obtenidas en los infectados con *P. mirabilis* MSD2 ( $P=0.016$ , Figura 23 A).

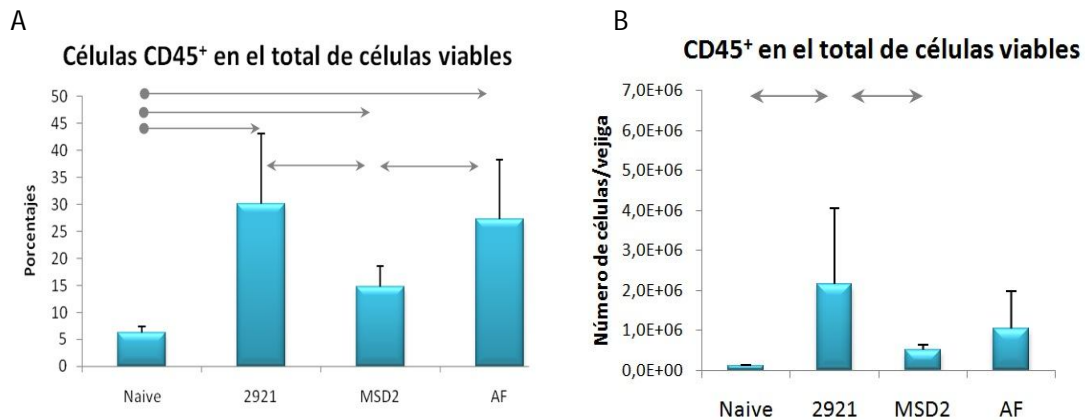


Figura 23: Células CD45<sup>+</sup>. (A) Porcentajes de células CD45<sup>+</sup> en el total de células viables provenientes de las vejigas de los distintos animales. Las barras representan el promedio de los valores obtenidos para cada grupo de ratones junto con el desvío estándar. Se emplearon 5 animales por grupo y 4 para el grupo naive sin infectar. Las flechas indican los casos en donde hubo diferencias significativas ( $P \leq 0.05$  Test de Mann-Whitney). (B) Cantidad de células CD45<sup>+</sup> en el total de viables, las barras representan los promedios para cada uno de los grupos con sus desvíos estándares respectivos. El número de células CD45<sup>+</sup> se calculó con los

porcentajes obtenidos en las citometrías respecto al número de células viables obtenidas de cada vejiga. . Las flechas indican diferencias significativas entre los grupos  $P \leq 0.05$  Test de Duncan.

Al comparar el número de células  $CD45^+$  en el total de células viables obtenidas de las vejigas observamos que los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 presentaron un aumento en el número de células  $CD45^+$  (Figura 23 B).

Al analizar la distribución de las distintas poblaciones celulares en el total de células  $CD45^+$  pudimos observar primeramente la aparición de un incremento significativo en las células  $Ly6G^+$  (neutrófilos) en los tres grupos de animales infectados respecto a los animales sin infectar (grupo naíve) (Figura 24). En los tres grupos de animales infectados los porcentajes de células  $Ly6G^+$  fueron similares, observándose diferencias significativas entre los 3 grupos infectados y el grupo sin infectar ( $P < 0.05$ , Figura 24).

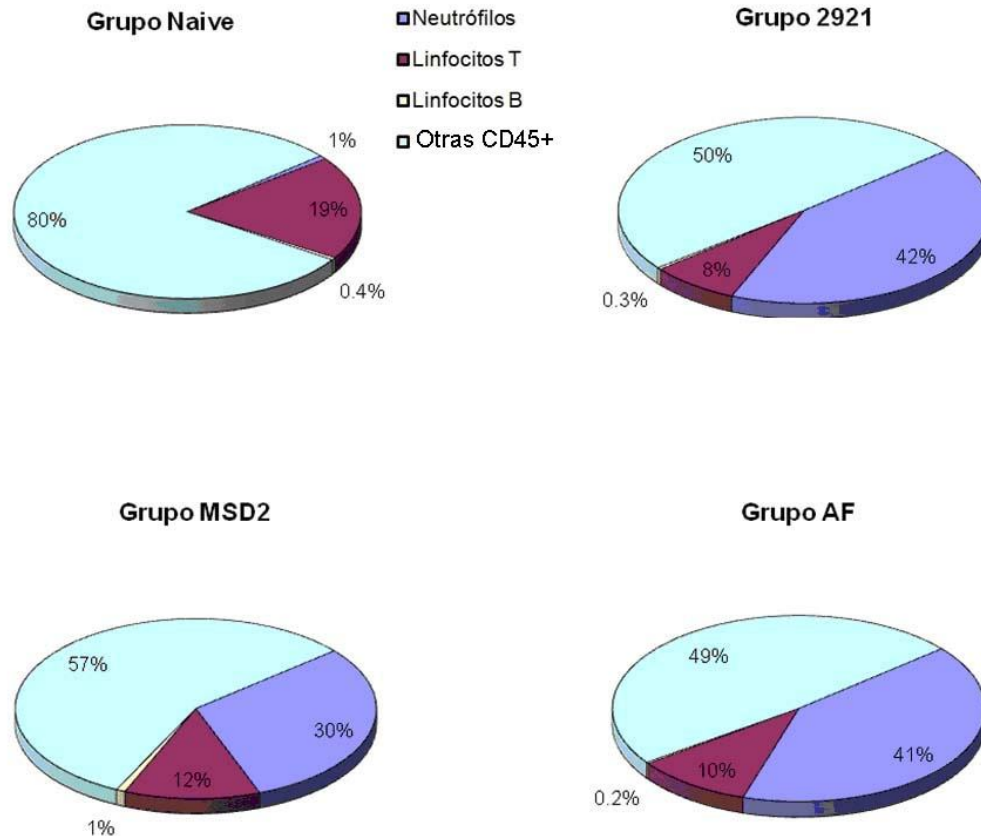


Figura 24: Distribución de las distintas poblaciones celulares en el infiltrado de células  $CD45^+$  en los distintos grupos de animales infectados y naíve a las 24 hs de infección. Los valores corresponden a los promedios de los porcentajes obtenidos en cada grupo de animales.

Además, en los tres grupos de animales infectados se observó la presencia de porcentajes similares de células B y T (Figura 24).

En cuanto a la población de neutrófilos en  $CD45^+$  se pudo observar un incremento significativo en este tipo celular en los tres grupos de animales infectados comparados con el grupo sin infectar ( $P < 0.05$ , Figura 25).

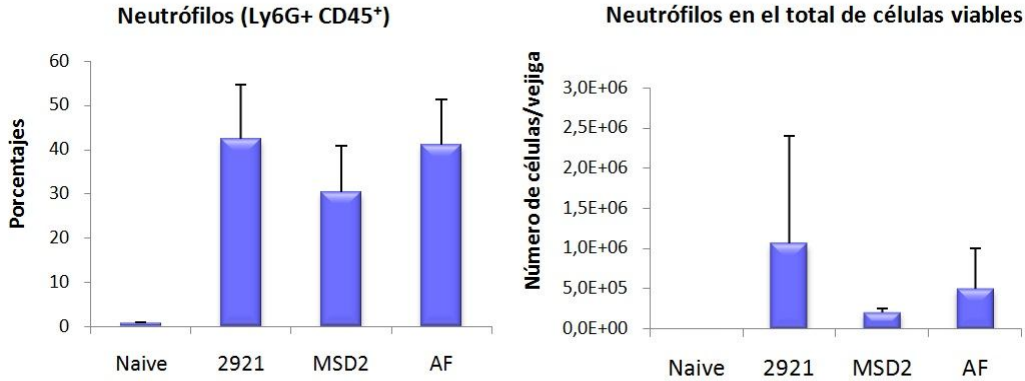


Figure 25: Porcentajes de células  $Ly6G^+$  en el infiltrado de células  $CD45^+$  y número de neutrófilos en el total de células viables.

Los porcentajes de neutrófilos calculados en los totales de células viables por vejiga mostraron que los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 presentaron un aumento significativo en el número de neutrófilos con respecto a los no infectados ( $P=0.03$ ). Si bien se observaron diferencias entre los grupos de animales infectados, las mismas no fueron significativas en el total de células viables ( $P=0.06$  para *P. mirabilis* 2921-MSD2 y  $P=0.193$  para *P. mirabilis* 2921-AF).

Al evaluar la cantidad de linfocitos T ( $CD3^+$ ) en el total de células viables se observó un incremento significativo en su número entre los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF con respecto a los animales sin infectar ( $P=0.0005$ ,  $P=0.01$  respectivamente, Figura 26).

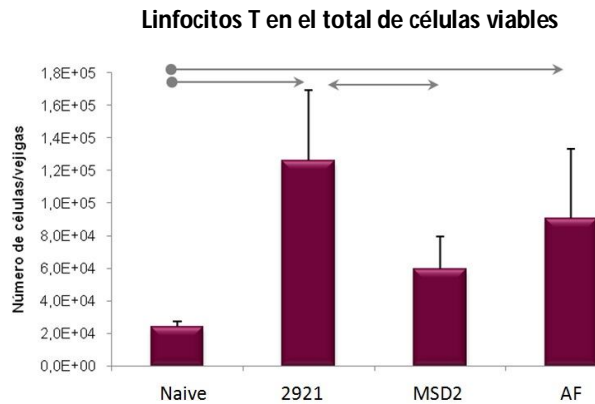


Fig 26: Número de células CD3+ en el total de células viables. Las barras representan los promedios para cada grupo con su respectivo desvío estándar. Las flechas indican los casos en donde hubo diferencias significativas  $P \leq 0.05$  Test de Mann-Whitney.

Además se observaron diferencias significativas entre el número de linfocitos T recuperados de los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* MSD2 ( $P=0.009$ ). Al comparar los valores de los linfocitos T en los animales infectados con *P. mirabilis* AF y *P. mirabilis* 2921 o *P. mirabilis* MSD2, no se observaron diferencias significativas ( $P=0.121$  y  $P=0.171$  respectivamente).

En cuanto a la presencia de linfocitos B se pudo observar un incremento significativo de los mismos en los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 respecto al grupo naive ( $P=0.009$ ). Además se observaron diferencias significativas entre los valores de *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF ( $P=0.03$ , Figura 27).

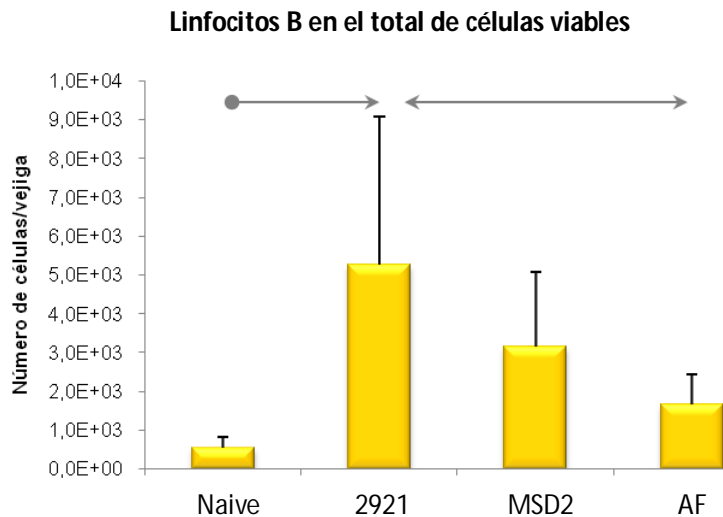


Fig 27: Número de células CD19+ en el total de células viables, las flechas indican los casos en donde se obtuvieron diferencias significativas ( $P \leq 0.05$ , Test de Mann-Whitney).

### Evaluación de citoquinas y quimioquinas por RT-PCR en el tracto urinario

La expresión de genes correspondientes a citoquinas y quimioquinas de la respuesta inmune innata en el tracto urinario (riñones y vejigas) se evaluó mediante la técnica de PCR en tiempo real. Se utilizaron tres grupos de animales ( $n=6$ ) los cuales se infectaron transureteralmente con *P. mirabilis* 2921, *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF y se analizó la inducción de la expresión de distintas citoquinas y quimioquinas a las 2 y 24 hs posteriores a la infección (Figuras 28, 29 y 30). Un cuarto grupo de animales no se infectó y se utilizó como control basal de la expresión de los genes. El procesamiento de cada muestra se realizó de acuerdo al

protocolo descrito en Materiales y Métodos. Las curvas de amplificación y las de disociación de las muestras analizadas en este ensayo se muestran en el Anexo III.

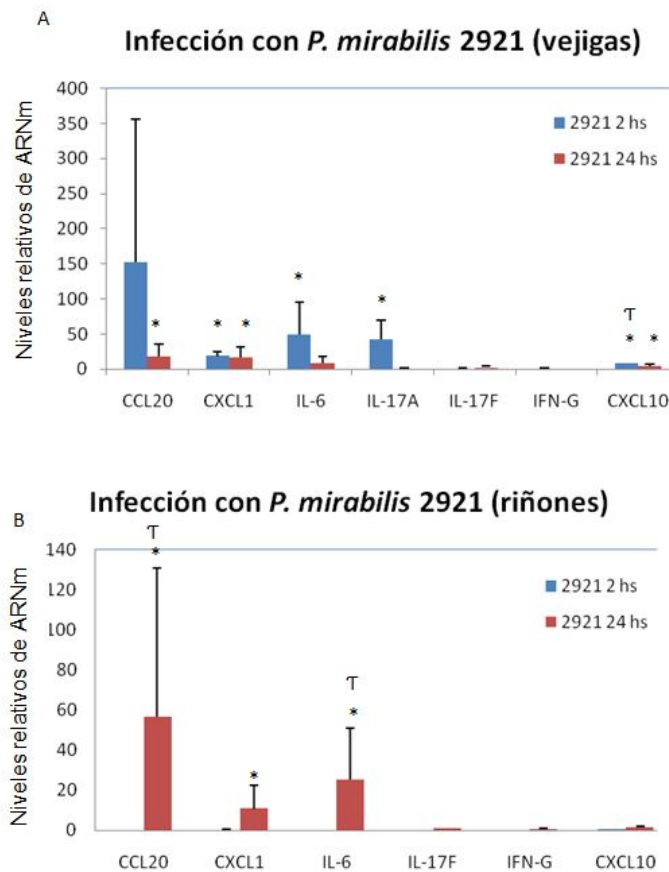


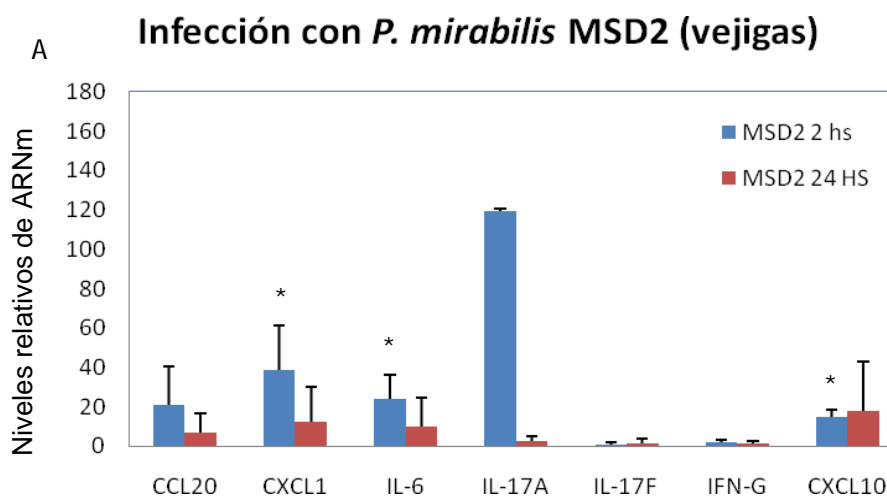
Figura 28: Expresión relativa de ARNm de quimioquinas en vejigas (A) y riñones (B) murinas a las 2 y 24 hs posteriores a la infección con la cepa de *P. mirabilis* 2921 respecto a los órganos de los animales no infectados (naive). El gen de la  $\beta$ -actina se utilizó como normalizador. Los asteriscos indican los casos en donde hubo diferencias significativas respecto a los animales control sin infectar ( $P < 0.05$ , T-Student), el símbolo T indica los casos en donde se observaron diferencias significativas entre los valores obtenidos y los de *P. mirabilis* AF.

En los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 se observó que a las 2 hs de infección se produjo un aumento significativo de la expresión relativa de ARNm de CXCL1, IL-6, IL-17A y CXCL10 en vejigas con respecto a los valores obtenidos en los animales naive sin infectar (Figura 28, A). Además se observó un incremento de CCL20, pero la dispersión de los valores fue muy elevada por lo que no se observaron diferencias significativas. A las 24 hs posteriores a la infección se observó que la expresión relativa de ARNm en vejigas disminuyó con respecto a los valores obtenidos a las 2 hs, pero para CXCL1, CXCL10 y CCL20 los valores obtenidos aumentaron en forma significativa con respecto a los animales naive (Figura 28, A).

En los riñones de los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 no se observó inducción de la expresión relativa de ARNm para ninguno de las citoquinas ni quimioquinas estudiadas a las 2 hs de infección. Sin embargo, a las 24 hs de infección se observó un aumento significativo de la expresión relativa de ARNm para CCL20, CXCL1 e IL-6 con respecto a los valores obtenidos en los riñones de los animales sin infectar (Figura 28, B).

En las vejigas de los animales infectados con *P. mirabilis* MSD2 se observó que a las 2 hs de infección hubo un aumento significativo de la expresión relativa de CXCL1, IL-6 y CXCL10 con respecto a los animales sin infectar. A las 24 hs de infección los valores disminuyeron no observándose diferencias significativas en caso alguno (Figura 29, A).

En los riñones, a las 2 hs de infección con *P. mirabilis* MSD2 no se observó incremento en ninguno de los marcadores evaluados. A las 24 hs se observó un aumento significativo de la expresión relativa de ARNm de CCL20, CXCL1 e IL-6 respecto a los animales sin infectar (Figura 29, B).



B

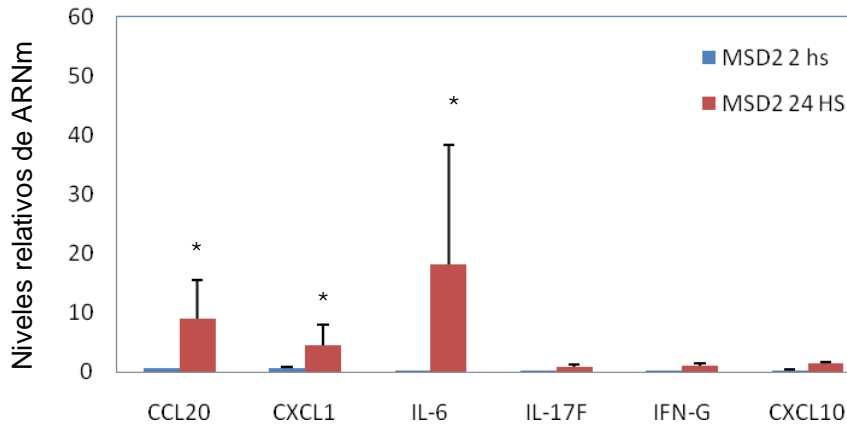
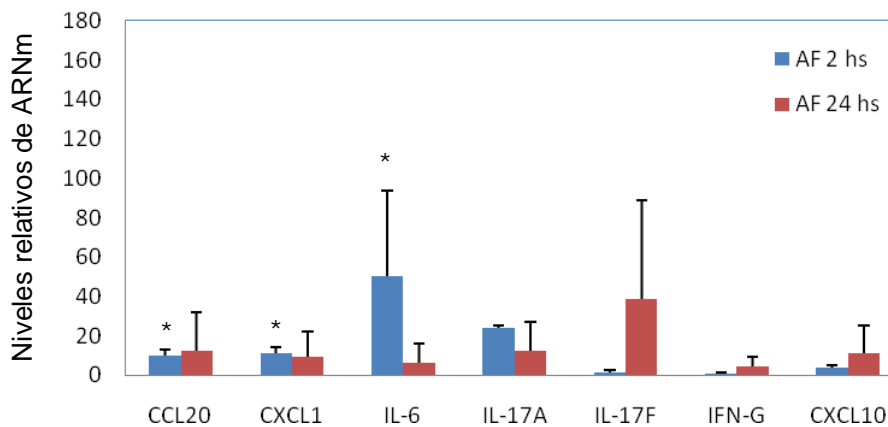
**Infección con *P. mirabilis* MSD2 (riñones)**

Figura 29: Expresión relativa de ARNm de quimioquinas en vejigas (A) y riñones (B) murinas a las 2 y 24 hs post-infección con la cepa de *P. mirabilis* MSD2 respecto a las vejigas no infectadas (naive). El gen de la  $\beta$ -actina se utilizó como normalizador. Los asteriscos indican los casos en donde hubo diferencias significativas respecto a los animales control sin infectar ( $P < 0.05$ , T-Student)

En las vejigas de los animales infectados con *P. mirabilis* AF se observó un aumento significativo de la expresión relativa de ARNm para CCL20, CXCL1 e IL-6 respecto a los valores de los animales sin infectar a las 2 hs de infección. A las 24 hs los valores descendieron y no se observaron diferencias significativas (Figura 30, A).

A

**Infección con *P. mirabilis* AF (vejigas)**



B

### Infección con *P. mirabilis* AF (riñones)

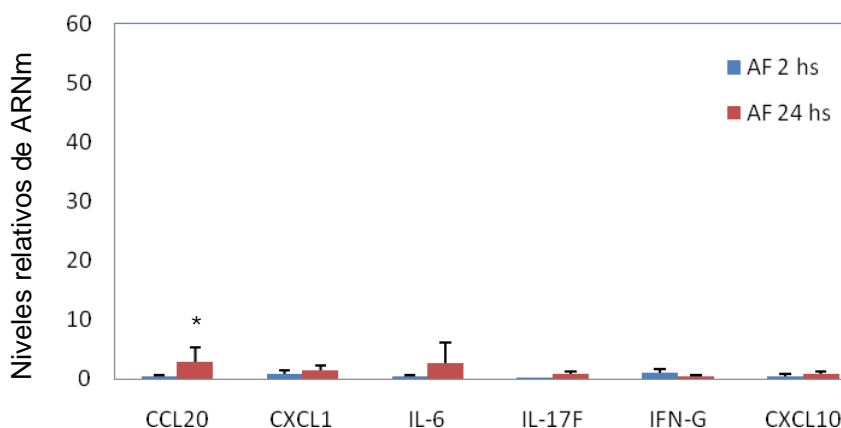


Figura 30: Expresión relativa de ARNm de quimioquinas en vejigas murinas a las 2 y 24 hs post-infección con la cepa de *P. mirabilis* AF respecto a las vejigas no infectadas (naive). El gen de la  $\beta$ -actina se utilizó como normalizador. Los asteriscos indican los casos en donde hubo diferencias significativas respecto a los animales control sin infectar ( $P < 0.05$ , T-Student)

En los riñones de los animales infectados con *P. mirabilis* AF a las 2 hs de infección no se observaron incrementos significativos en ninguno de los marcadores estudiados. Este comportamiento se observó también a las 24 hs, excepto en el caso de CCL20 cuya expresión de ARNm aumentó significativamente con respecto a los animales sin infectar (Figura 30, B).

Al comparar los valores de expresión relativa de ARNm entre los distintos grupos de animales infectados, se observaron diferencias entre los valores obtenidos a las 2 hs para CXCL10 en vejigas entre los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 respecto a los infectados con *P. mirabilis* AF. En los riñones se observaron diferencias en la expresión relativa de CCL20 e IL-6 a las 24 hs de infección entre estos mismos grupos de animales.

En resumen, los animales infectados con la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 presentaron un incremento en la expresión relativa de ARNm para CCL20, CXCL1, IL-6, IL-17A y CXCL10 en vejiga, el cual se mantuvo hasta las 24 hs de infección salvo para IL-6 e IL-17A cuyos valores descendieron. A nivel de riñones dicho grupo de animales respondió a la presencia de *P. mirabilis* 2921 luego de 24 hs de infección presentando un incremento significativo en la expresión relativa de CCL20, CXCL1 e IL-6 (Figura 28).

Los animales infectados con *P. mirabilis* MSD2 exhibieron a nivel de vejigas un incremento en la expresión relativa de ARNm para CXCL1 e IL-6 solamente a las 2 hs de infección. En los riñones la respuesta se observó sólo a las 24 hs con un incremento de la expresión relativa de

CCL20, CXCL1 e IL-6, de menor magnitud a la observada en los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 (Figura 29).

En el caso de los animales infectados con *P. mirabilis* AF se observó un incremento en la expresión relativa de CCL20, CXCL1, e IL-6 en vejiga a las 2 hs de infección y luego la expresión de los distintos marcadores disminuyó. En los riñones de dichos animales no se observó incremento alguno en la expresión relativa de ARNm a las 2 hs de infección. A las 24 hs sólo se observó un aumento significativo en la expresión de CCL20 pero la magnitud de dicha respuesta fue inferior a las observadas en los riñones de los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* MSD2.

### **Localización bacteriana en el tracto urinario**

Con el fin de visualizar la localización de las bacterias en los órganos en distintos períodos posteriores a la infección, se realizó inmunofluorescencia en cortes de vejigas y riñones. Una vez extraídos, los órganos se crioprotegieron y se realizaron cortes histológicos de 12  $\mu\text{m}$ . La tinción se realizó sobre cada uno de los cortes y en esta oportunidad se empleó un marcador de actina (rodamina-faloidina), un marcador de ADN (Hoescht 33342), una sonda para el ARNr 16S de eubacterias acoplada a FitC. Una vez concluida la marcación se procedió a la visualización en microscopio de epifluorescencia.

Primeramente se evaluó la tinción en cortes de tejidos de animales sin infectar empleando todos los fluoróforos (Figura 31). Se observó que en el canal correspondiente a la fluorescencia de FitC (verde) hubo emisión de autofluorescencia de los tejidos. Las bacterias se marcaron con una sonda específica para bacterias acopladas a FitC, por lo que el canal verde correspondió a la emisión de fluorescencia de la sonda para bacterias. Al observar las imágenes de autofluorescencia no se encontraron estructuras correspondiente (en tamaño y forma) a bacterias. Igualmente se procedió a trabajar con dichos marcadores pues no hubo marcación inespecífica en los cortes de los animales control sin infectar por parte de la sonda para bacterias. La emisión de autofluorescencia tuvo siempre los mismos valores y se muestran en el histograma de intensidad de fluorescencia realizado empleando el software ImageJ (Figura 32). Además, la tinción empleada permitió visualizar correctamente las distintas capas que conforman el tejido vesical (Figura 33).

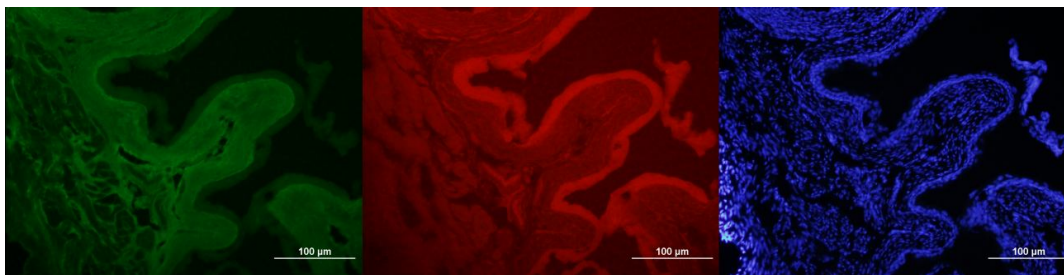


Figura 31: Imágenes inmunofluorescencia de cortes histológicos de vejigas de un animal control sin infectar. Panel correspondiente a los 3 canales en los cuales se adquirió cada una de las imágenes. En verde se observa la autofluorescencia, en rojo la tinción correspondiente a actina y en azul para ADN. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 20X.

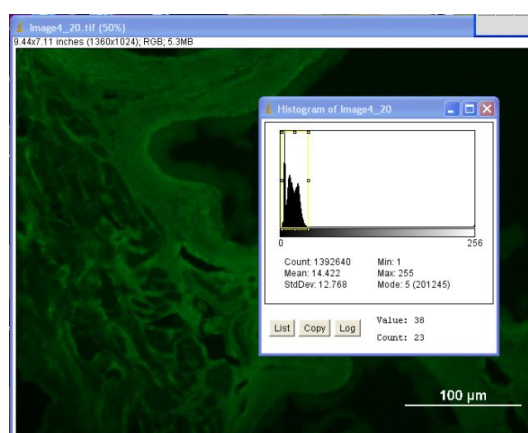


Figura 32: Imagen correspondiente al canal verde de un animal control con su histograma de intensidades correspondiente. En el histograma se puede apreciar que los valores de intensidades de fluorescencia van de 1 a 38, valores considerados bajos y atribuibles a la autofluorescencia.

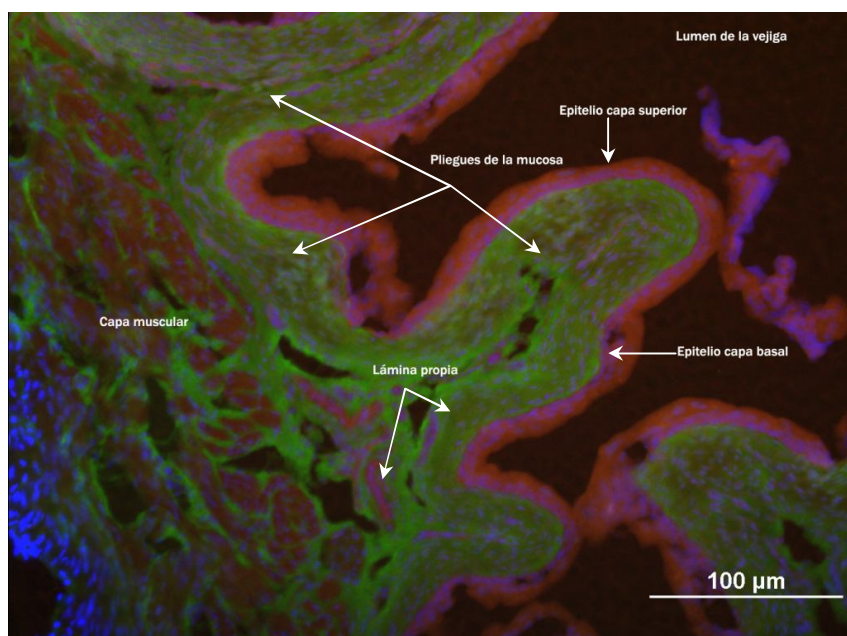


Figura 33: Composición de imagen superponiendo los tres canales de la figura 31. En la imagen se muestran las distintas zonas claramente identificadas en el tejido vesical.

En los cortes de tejido vesical de los animales control se pudo identificar el lumen, el epitelio de transición compuesto por algunas capas de célula conformando la capa superior y la basal (Figura 33). En la imagen fue posible visualizar claramente los pliegues de la mucosa así como la lámina propia y la capa muscular compuesta por la capa muscular lisa interior, circular exterior y la longitudinal externa. En algunos casos fue posible identificar la capa adventicia. Luego de haber identificado las distintas estructuras histológicas, se procedió a la evaluación de la localización de las distintas cepas bacterianas en los cortes de tejido vesical a los días 1 y 7. Al día 1 se pudo observar la presencia de *P. mirabilis* 2921 en la vejiga (Figura 34, canal verde), las que se ubicara de forma dispersa por distintas zonas del epitelio vesical. Al día 7 la presencia de bacterias fue mayor y se pudo visualizar además de la marcación específica de la sonda, señal más intensa de actina en la zona de bacterias y un aumento de la densidad celular por mayor presencia de núcleos (Figura 34).

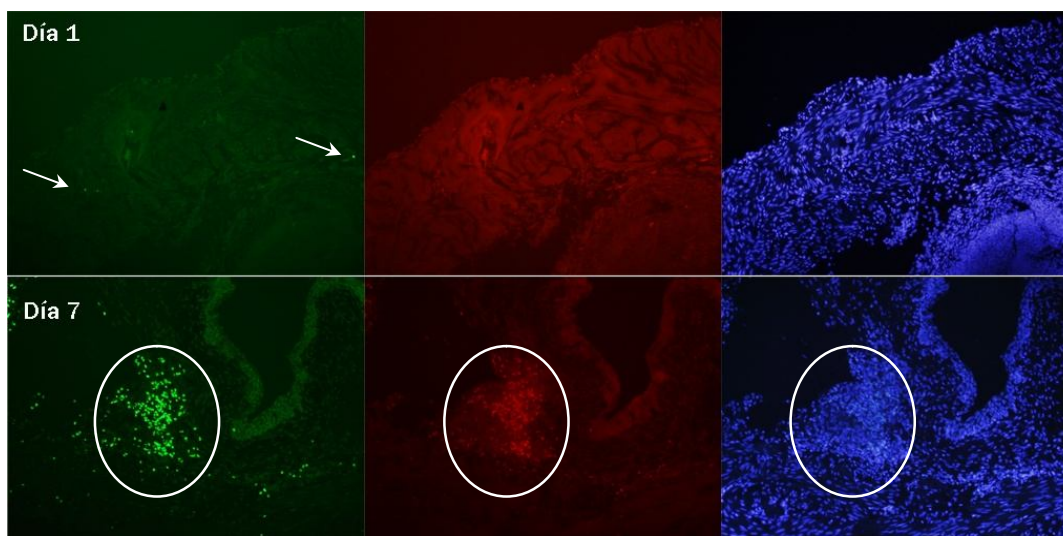


Figura 34: Imágenes de inmunofluorescencia de cortes histológicos de vejigas correspondientes a animales con uno y siete días de infección. Panel correspondiente a los 3 canales en los cuales se adquirió cada una de las imágenes correspondientes a cortes de vejiga de animales con 1 y 7 días de infección por *P. mirabilis* 2921. En verde se observa autofluorescencia y bacterias con mayor intensidad de fluorescencia, en rojo se observa la actina y en azul ADN. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 20X.

Posteriormente se procedió a realizar la reconstrucción histológica de la vejiga mediante la superposición de las imágenes individuales. El mosaico resultante se muestra en la Figura 35 y permitió visualizar que al día 1 posterior a la infección, *P. mirabilis* 2921 no se ubicó en el lumen epitelial y que se encontró principalmente en la lámina propia o en las capas más externas (muscular). Además se observó un aumento en las capas del epitelio de transición (Figura 35).

El mosaico del día 7 de infección mostró la presencia de un mayor número de bacterias y en zonas cercanas a la lámina propia (Figura 35) y algunas en la zona muscular. También se observó una mayor concentración celular por un aumento de la densidad celular visualizada como zonas más densas en el canal azul (Figura 34, zona marcada con círculo) así como un aumento de la intensidad de la señal en el canal rojo en las zonas donde hubo marcación para bacterias.

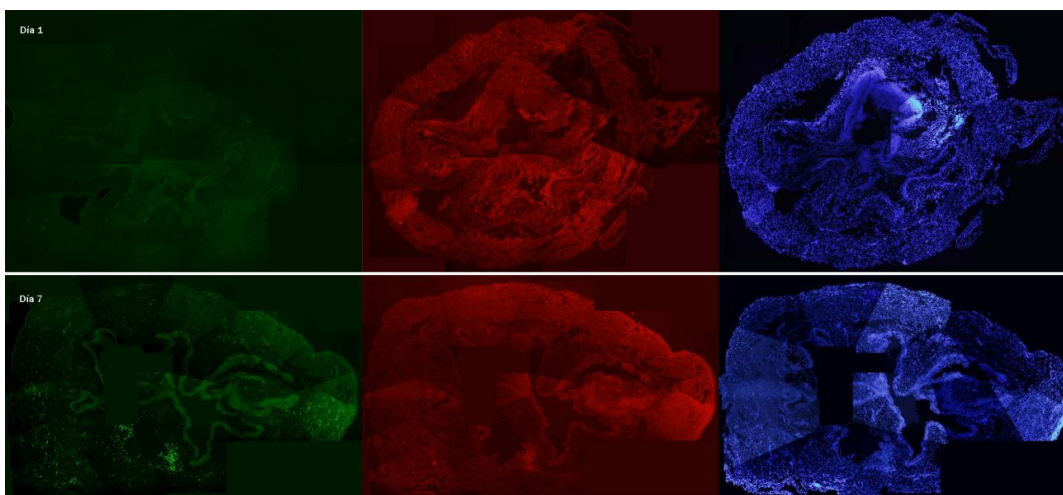


Figura 35: Paneles correspondiente a vejigas completas con 1 y 7 días de infección con *P. mirabilis* 2921. Cada canal se armó mediante superposición de todas las imágenes tomadas. En el canal verde se marcaron las bacterias, en rojo actina y en azul ADN.

Cuando se analizaron las vejigas de los animales infectados con *P. mirabilis* MSD2 se pudo observar que a un día posterior a la infección las bacterias se ubicaron mayoritariamente en el lumen del órgano y no se observó aumento del epitelio de transición como en el caso de *P. mirabilis* 2921. A los 7 días de infección las bacterias se encontraron dispersas por todo el tejido vesical, la señal correspondiente a actina se incrementó en las zonas donde se encontraron las bacterias y se observó también un incremento en la densidad celular (Ver Anexo I).

Los resultados para la cepa de *P. mirabilis* AF mostraron transcurrido un día de infección que las bacterias se encuentran en menor número respecto a las otras dos cepas bacterianas, lo que coincidió con los resultados obtenidos en la cuantificación de las bacterias en el TU. Además se observó que su localización en dicho tiempo fue sólo a nivel del lumen de la vejiga. A los 7 días de infección las bacterias se encuentran dispersas por toda la vejiga y se observaron modificaciones a nivel del epitelio vesical con menor cantidad de pliegues de la mucosa y gran cantidad de células de descamación (Anexo I).

En los riñones de los animales con un día de infección no se observaron modificaciones en el tejido si bien se pudo constatar la presencia de las bacterias en el mismo y la localización fue a



nivel de la corteza renal. Para el caso de las cepas mutantes de *P. mirabilis* (MSD2 y AF) se pudo observar la presencia de las bacterias en poca cantidad y se localizaron principalmente en los espacios intertubulares. A los 7 días de infección en los cortes de riñón infectados tanto con *P. mirabilis* 2921 y MSD2 se observó un daño masivo en el órgano y la presencia de grandes infiltrados celulares (Figura 36). Para el caso de *P. mirabilis* AF, si bien se observó presencia de bacterias no se pudo constatar el mismo nivel de daño (Anexo I).

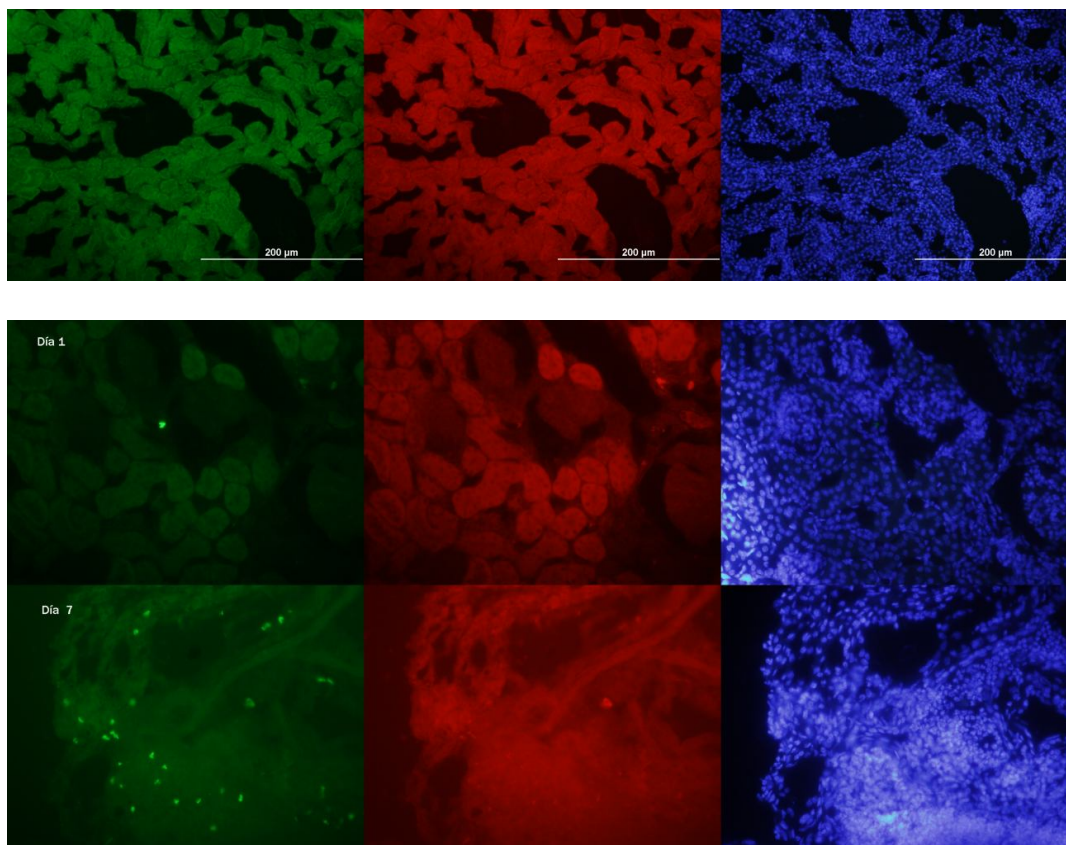


Figura 36: Los tres paneles superiores corresponden a un corte de riñón de un animal control sin infectar. Los 2 paneles inferiores corresponden a cortes de riñones de animales infectados con *P. mirabilis* 2921, con 1 y 7 días de infectado.

### Escala de daño histológico

La escala de daño histológico se realizó empleando cortes de riñones y vejigas teñidos con hematoxilina y eosina con 7 días de infección. Las imágenes representativas de riñones y vejigas se muestran en las figuras 37 y 38.

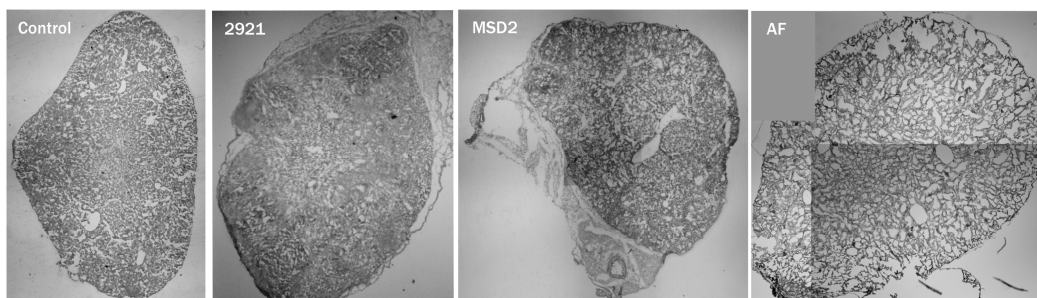


Figura 37: Cortes de riñón teñidos con hematoxilina y eosina, imágenes adquiridas al aumento panorámico 4X. Cuando fue necesario se realizaron superposiciones de las imágenes para completar el órgano (riñón AF).

Mediante la observación de los cortes histológicos de riñón se pudo corroborar los resultados obtenidos de localización bacteriana en donde se observaron grandes zonas de daño histológico (Figura 38, recuadros rojos).

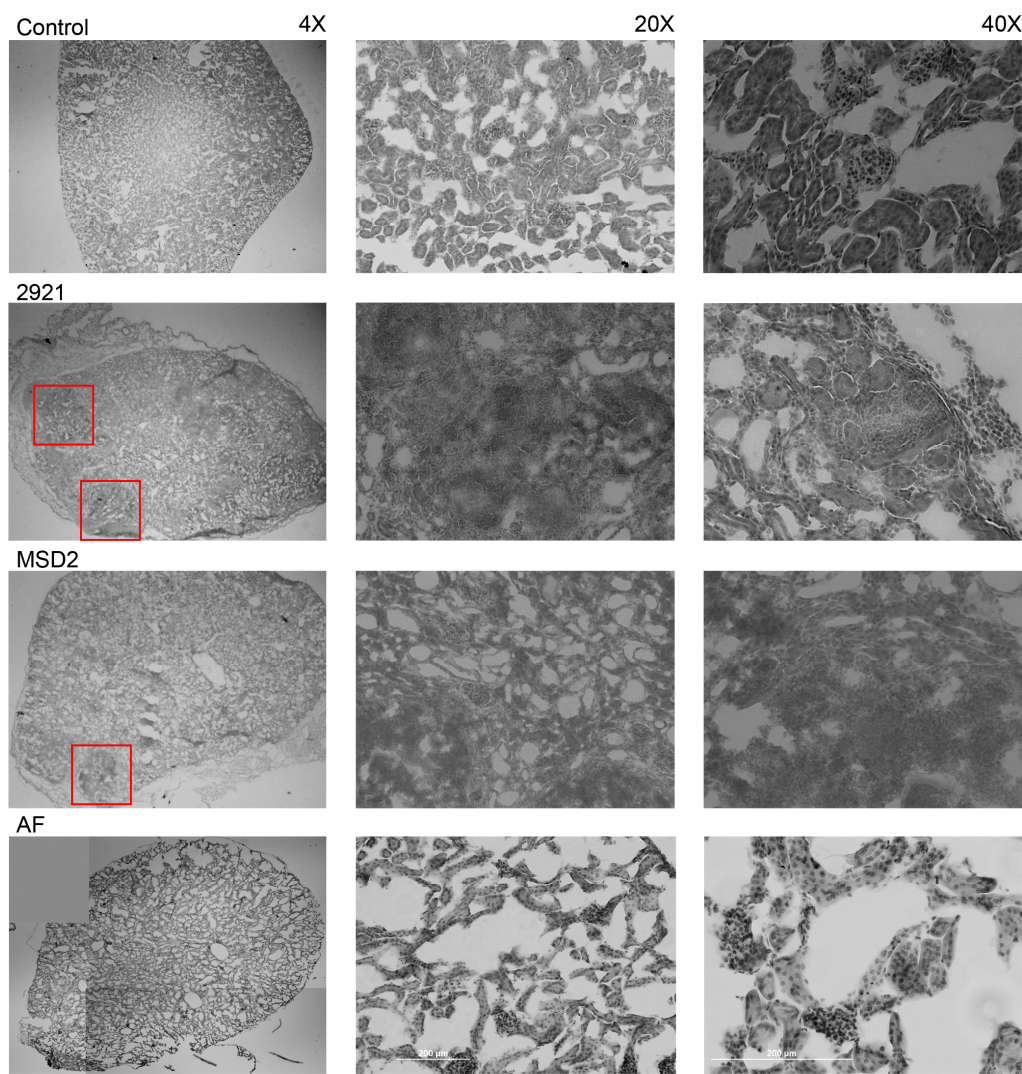




Figura 38: Cortes de riñón de animales control y con 7 días de infección con *P. mirabilis* 2921, MSD2 y AF. Los recuadros indican alguna de las zonas de daño observadas. Las imágenes fueron tomadas en microscopio óptico, empleando los objetivos 4x, 20x y 40x. La tinción empleada fue hematoxilina y eosina.

En las vejigas se observó claramente el aumento del epitelio de transición en el caso de los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 (Figura 39).

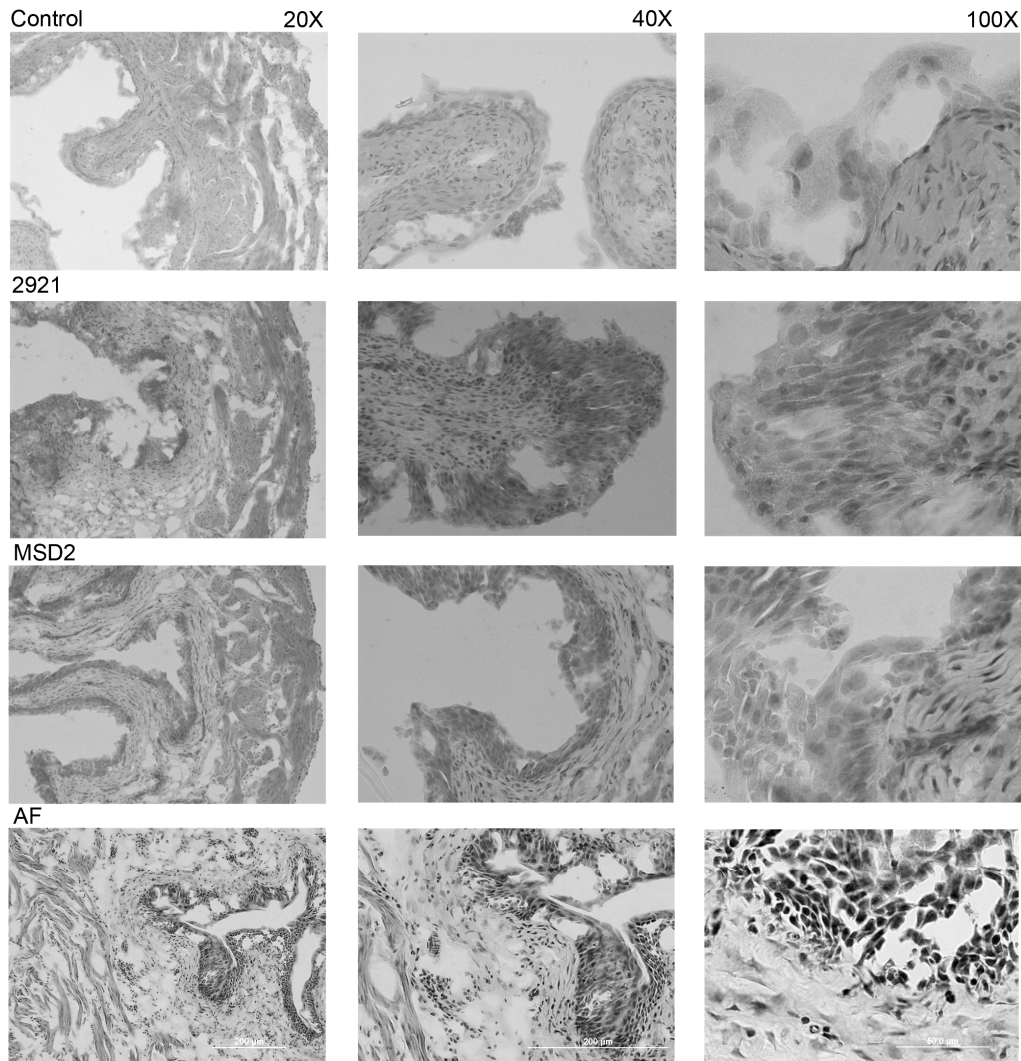


Figura 39: Cortes de vejigas de animales control y con 7 días de infección con *P. mirabilis* 2921, MSD2 y AF. Las imágenes fueron tomadas en microscopio óptico, empleando los objetivos 20x, 40x y 100X. La tinción empleada fue hematoxilina y eosina.

La escala de daño histológico se realizó de acuerdo al criterio establecido por Alamuri y colaboradores (2009) por medio del cual se evaluó primeramente la severidad de la inflamación pélvica a los 7 días de infección. Se emplearon entre 4 a 7 animales por grupo y se catalogó como 0 cuando no presentó inflamación, 1 presencia de agrupamientos de PMNs, 2: PMNs



rodeando toda o la mayoría de la pelvis renal y 3: intensa inflamación extendida a los tejidos peripelvicos. Los resultados se muestran en la figura 40. Claramente la infección con la cepa *P. mirabilis* 2921 produce mayor daño histológico como se observó mediante las técnicas de microscopía. Al comparar los resultados obtenidos entre las cepas se pudo observar que *P. mirabilis* 2921 induce un daño histológico significativamente más severo que las cepas mutantes *P. mirabilis* MSD2 y AF ( $P=0.023$ ,  $P=0.004$  respectivamente).

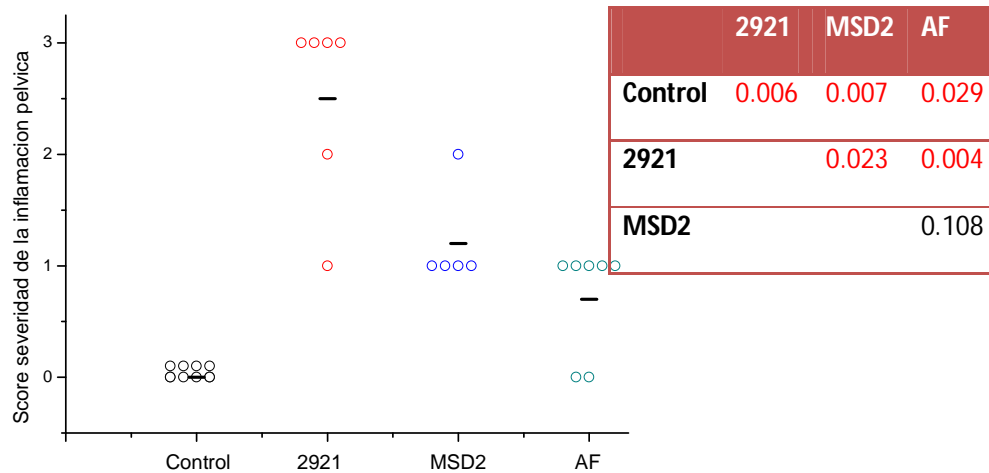


Figura 40: Escala de daño histológico en riñones a los 7 días de infección y tabla con los valores de P (Test de Mann-Whitney).

En cuanto a la severidad de la cistitis las tres cepas presentaron infiltrados de células inflamatorias en la submucosa con extensión mínima a los tejidos musculares y al comparar los valores de la escala no se observaron diferencias significativas entre las cepas pero si con respecto a los controles.

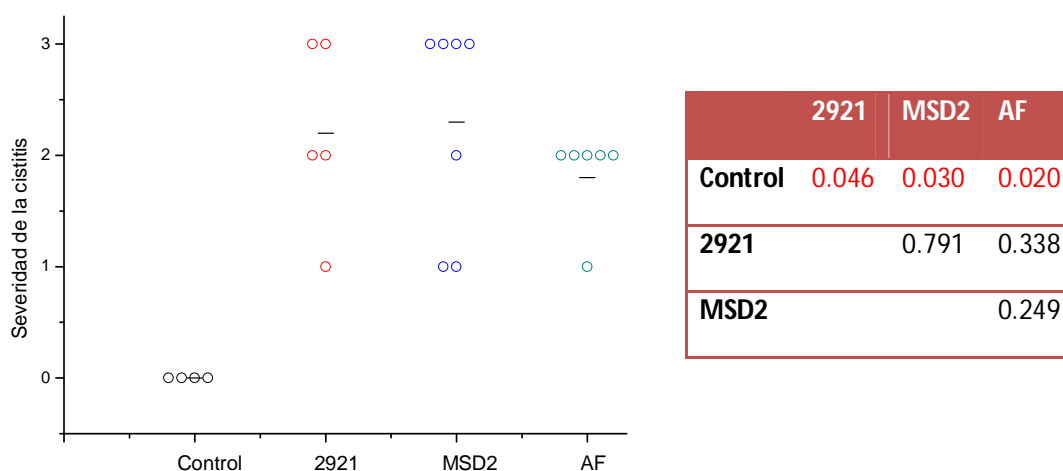


Figura 41: Escala de severidad de la cistitis a los 7 días de infección y tabla con los valores de P (Test de Mann-Whitney).

## Discusión

El objetivo del presente capítulo consistió en dilucidar la dinámica de las primeras etapas de las ITU en un modelo de infección experimental en ratón y en particular analizar el papel de las fimbrias MR/P y flagelos en las distintas aproximaciones empleadas. Para ello primeramente se construyó una cepa mutante aflagelada isogénica a partir de la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921. Legnani y colaboradores construyeron una mutante aflagelada isogénica a partir de la cepa de *P. mirabilis* 990. En dicho trabajo los autores demostraron que la cepa mutante era incapaz de sintetizar flagelos, de diferenciarse a una célula *swarmer* y poseía la capacidad de hemaglutinar eritrocitos. Los resultados obtenidos con la cepa mutante *P. mirabilis* AF concuerdan con los obtenidos por Legnani y colaboradores (1996). Los autores también evaluaron la capacidad infectiva de la cepa mutante observando que mantiene la capacidad infectiva de la cepa parental cuando se realiza el modelo de infección urinaria ascendente clásico (Legnani *et al.*, 1996).

La fimbria MR/P contribuiría a la infección renal facilitando la colonización del TU (Bahrani *et al.*, 1994). Su rol en la patogenicidad ha sido previamente evaluado en nuestro Departamento en donde se observó que la mutante para *mprA* (*P. mirabilis* MSD2) fue desplazada por la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 en ensayos de co-infección (Zunino *et al.*, 2001). En el presente trabajo se obtuvieron más evidencias del rol de la fimbria MR/P al observarse que la cepa mutante tiene disminuida su capacidad de colonizar el TU alto en niveles similares a la cepa mutante a tiempos tempranos de infección. Los recuentos recuperados de la cepa *P. mirabilis* MSD2 durante los 7 días de infección siempre fueron menores que los obtenidos para la cepa

salvaje y para la cepa mutante aflagelada. Estas observaciones confirman el rol importante de la fimbria MR/P en los primeros estadios de la infección.

Para algunos autores los flagelos no serían absolutamente necesarios para la virulencia de *P. mirabilis* en modelos clásicos de infección experimental en ratón (Zunino *et al.*, 1994; Legnani-Fajardo *et al.*, 1996). Sin embargo, para otros autores estas estructuras contribuirían en la patogenicidad bacteriana pues proveen de movilidad a los microorganismos (Duan *et al.*, 2012). Esta característica quedó evidenciada en los ensayos de infección, pues la cepa mutante para flagelos colonizó en menor número respecto a la cepa salvaje luego de transcurrido un día de infección, por lo que claramente la ausencia de los flagelos afecta la movilidad de la cepa de *P. mirabilis* y la capacidad de colonizar el tracto urinario a tiempos temprano de infección. En trabajos realizados en nuestro Departamento se observó que al co-infectar ratones con la cepa salvaje (*P. mirabilis* 2921) y la cepa aflagelada (*P. mirabilis* AF), el mutante fue desplazada por la salvaje (Umpiérrez, 2011), lo que refuerza la idea de que la ausencia de flagelos compromete los estadios iniciales de la infección. Por otro lado, luego de transcurridos 7 días de infección, el mutante aflagelado se recuperó en mayor número que la cepa salvaje y el mutante para MR/P. Si bien estos resultados fueron inesperados, los flagelos son capaces de activar respuestas inmunes pro-inflamatorias a través del TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001) por lo que la ausencia de estas estructuras bacterianas podría estar confiriéndole una ventaja a la bacteria en el momento de proliferar y mantenerse en el órgano como se observó a los 7 días de infección, pues no se estarían activando dichos mecanismos al no expresar flagelos.

En otros modelos, como en *Salmonella* Enteritidis, se ha observado que la expresión de flagelos modifica la naturaleza de la infección causada por *S. Enteritidis* en ratas (Robertson *et al.*, 2003). Por ejemplo, a las 24 hs iniciales de infección en un modelo en ratas, los mutantes aflagelados fueron capaces de colonizar el tracto gastrointestinal y dispersarse de igual manera que sus contrapartes flageladas. Sin embargo, a las 72 hs, el número detectable de bacterias aflageladas en el estómago y yeyuno se redujo. La respuesta inflamatoria disparada en el intestino delgado por *S. Enteritidis* fue menos marcada en el caso de las cepas aflageladas. Más aún, las cepas aflageladas no fueron encontradas en hígado y bazo a las 24 hs posteriores a la infección. Sin embargo, los niveles bacterianos aumentaron luego de las 72 hs, siendo hasta igual de elevados que las cepas flageladas (Robertson *et al.*, 2003). Si bien los modelos de infección y los patógenos son diferentes, existe cierto paralelismo en donde podemos establecer que la falta de flagelos es importante, le brinda ventajas al microorganismo en los estadios tardíos de infección en donde las bacterias flageladas resultan más infectivas. Dado que los flagelos son un estímulo potente para el hospedero y disparan respuestas pro-inflamatorias a

través de la activación de TLR5 e Ipaf (Ramos *et al.*, 2004), se podría proponer que su ausencia en estadios más avanzados podría resultar ventajoso para la permanencia en el hospedero.

Al estudiar la presencia de células inmunes (polimorfonucleares) en la orina de los animales infectados, observamos que hay un rápido incremento de éstas, el cual se mantiene durante los 7 días de infección y con un máximo de PMN desde las 24 hs a las 48 hs de infección. El grupo de animales que presentó mayor número de PMN a las 24 hs posteriores a la infección fue el infectado con la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921, seguido de *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF, observándose diferencias significativas entre la cepa salvaje y la mutante para flagelos. Dentro del grupo de PMN, los neutrófilos han sido descriptos como los causantes del daño en los tejidos e implicados en las defensas antibacterianas en el TU (Kunin, 1987). El reclutamiento de neutrófilos al TU infectado es iniciado cuando las bacterias estimulan las células epiteliales a secretar quemoquinas (CXCL-6 y CXCL-8) y sus receptores (Akira *et al.*, 2006). En respuesta al gradiente quemotáctico, los neutrófilos dejan la circulación para atravesar la submucosa y llegan a la barrera epitelial, la cual atraviesan de forma quemo-dependiente (Hang *et al.*, 1999). Claramente los resultados obtenidos de células PMN estarían mostrando que la presencia de estas células se da a partir de las 6 hs de infección confirmando la rápida respuesta a la infección. A su vez estos resultados fueron corroborados mediante citometría de flujo en donde se pudo identificar a los neutrófilos (Ly6G+) como el grupo mayoritario de células CD45+ presentes a las 24 hs de infección. Las tres cepas de *P. mirabilis* ensayadas tuvieron la capacidad de inducir el reclutamiento de neutrófilos y si bien se observaron diferencias entre las cantidades de células que se indujeron las mismas no fueron significativas. Estos resultados podrían en parte explicarse en base a que el reclutamiento de neutrófilos se da mediante la señalización vía TLR4 (Sivick & Mobley, 2010). Este receptor es expresado por las células epiteliales de riñones y vejigas (Samuelsson *et al.*, 2004) y promueve la respuesta vigorosa de citoquinas y quemoquinas que se da en el TU frente a bacterias Gram negativas (Schilling *et al.*, 2001). Para la mayoría de las células periféricas, la señalización vía TLR4 depende de la presencia de moléculas accesorias como la proteína de unión a LPS anclada a GPI (CD14) y MD-2 (Triantafilou & Triantafilou, 2002). Interesantemente, el TLR4 en el uroepitelio no requiere de CD14 para disparar la señalización en respuesta a por ejemplo UPEC dado que las células uroepiteliales no expresan CD14 y por lo tanto no responden a LPS (Samuelsson *et al.*, 2004). La adhesión es el paso inicial en el ataque por parte de los patógenos en las superficies mucosales. A nivel molecular la especificidad se podría explicar por la interacción entre las fimbrias y los receptores de la superficie celular (Ragnarsdottir *et al.*, 2008). Por lo tanto, los receptores de fimbrias actuarían como co-receptores y junto con la activación de TLR4 en las células epiteliales operarían específicamente a nivel de mucosas, aumentando los niveles de control del reconocimiento de MAMPs (Sirard *et al.*, 2006). En

humanos, algunas cepas de *E. coli* pueden replicarse en el TU sin causar una respuesta inflamatoria, lo que produce bacteriuria asintomática. Dichas cepas generalmente no poseen fimbrias P. La expresión de fimbrias P es suficiente para activar una respuesta innata en el hospedero (tanto en modelos murinos como en humanos). En modelos de ITU experimental, las cepas de *E. coli* que expresan fimbrias P mostraron una respuesta rápida de neutrófilos pero aquellas que no expresan dichas fimbrias no produjeron una respuesta significativa (Ragnarsdottir *et al.*, 2008).

En nuestro modelo pudimos observar que las 3 cepas de *P. mirabilis* producen un rápido reclutamiento de neutrófilos no observándose diferencias entre las cepas. Cabe destacar que *P. mirabilis* posee en su genoma 17 operones fimbriales y 13 genes fimbriales huérfanos no asociados con operones completos (Pearson *et al.*, 2008). De acuerdo a estos hallazgos *P. mirabilis* codificaría para la mayor cantidad de fimbrias que ningún otro microorganismo hasta ahora secuenciado pueda expresar (Pearson *et al.*, 2008). Esto explicaría que el mutante para la fimbria MR/P haya sido capaz de activar una respuesta de neutrófilos, pues la ausencia de una fimbria no afectaría la expresión de las otras.

Los neutrófilos juegan un rol esencial en la resolución de las infecciones microbianas para lo cual están equipados con un arsenal de antimicrobianos (Nathan, 2006). Los neutrófilos son las primeras células inmunes que se reclutan en el sitio de infección. Luego del contacto con los microorganismos, éstos son fagocitados por los neutrófilos y dirigidos hacia la vacuola fagocítica conocida como fagosoma. Subsecuentemente, los fagosomas se fusionan con los gránulos intracelulares formando los fagolisosomas. Dentro de estos fagolisosomas, los microorganismos son eliminados mediante una combinación de mecanismos oxidativos y no oxidativos (Nathan, 2006). Además de estos mecanismos para eliminar los microorganismos de forma intracelular, los neutrófilos liberan gránulos proteicos y cromatina. Estos componentes forman fibras llamadas trampas extracelulares de neutrófilos (NET del inglés *neutrophil extracellular traps*) (Urban *et al.*, 2006). La presencia de microorganismos es suficiente para inducir la formación y liberación de los NET. Los componentes principales son ADN e histonas y los mecanismos para facilitar la muerte bacteriana consisten en concentrar el arsenal antimicrobiano en el sitio de infección y prevenir la dispersión desde el sitio inicial (Urban *et al.*, 2006). Por otro lado, Kobayashi y colaboradores (2003), estudiando la respuesta transcripcional de los neutrófilos demostraron que la ingestión (*engulfment*) de los patógenos resulta en la inducción de apoptosis en los neutrófilos (Kobayashi *et al.*, 2003). Estos autores sugieren que la apoptosis de los neutrófilos, es crucial para resolver la infección y que los patógenos induzcan una apoptosis prematura sería un mecanismo de evasión de la respuesta de neutrófilos (Urban *et al.*, 2006).

Las bacterias han evolucionado para poder subvertir la batería de armas que poseen los neutrófilos. Entre las estrategias desarrolladas por los microorganismos se encuentran: inducción de una respuesta de estrés general, evitando el contacto, previniendo la fagocitosis, sobreviviendo dentro del neutrófilo, promoviendo muerte celular y evitando la muerte en los NET (Urban *et al.*, 2006). Los ensayos realizados de infección, recuento de PMN y observación de las orinas nos permitieron confirmar que *P. mirabilis* (tanto la cepa salvaje como los mutantes) permanece en los órganos durante los 7 días de infección, el número de PMN se mantiene durante todo el período de infección y en algunos casos se observaron potenciales formaciones de NET en las orinas infectadas. Si bien la respuesta de PMN se mantiene durante todo el tiempo estudiado, ésta no fue suficiente para eliminar la infección, por lo que mecanismos de evasión de la respuesta inmune podrían estar sucediendo. *P. mirabilis* es capaz de expresar diversos factores de virulencia que podrían estar vinculados con la evasión de la respuesta inmune, dentro de las cuales encontramos la producción de ureasa, la hemolisina HpmA, una aglutinina tóxica de *Proteus* (Pta) y la metaloproteasa ZapA (Nielubowicz & Mobley, 2010). Esta metaloproteasa es capaz de clivar un amplio rango de proteínas del hospedero dentro de las cuales se encuentran IgA1, IgA2, IgG, proteínas del complemento y péptidos antimicrobianos; además se ha detectado actividad de ZapA en la orina de pacientes infectados (Senior *et al.*, 1991, Belas *et al.*, 2004). La expresión de estos factores de virulencia posiblemente colabore en la evasión de la respuesta de neutrófilos, no resultando eficiente para la erradicación de la infección.

La mucosa del TU normal contiene pocas células T. Dentro del uroepitelio se pueden encontrar escasamente células T CD8<sup>+</sup> y en menor cantidad células T CD4<sup>+</sup> en la lámina propia así como en la submucosa (Christmas, 1994; Gardiner *et al.*, 1986). Sin embargo, en ratas se ha demostrado la existencia de una respuesta de células T en ITU inferiores y superiores (Hjelm, 1984). Por otro lado, una supresión marcada de la respuesta inmune celular ha sido descrita como parte de la patogénesis de la pielonefritis (Miller *et al.*, 1986). Este efecto es atribuido a factores celulares intrínsecos y serológicos generados en la respuesta inflamatoria temprana, los que afectarían la función de los linfocitos T durante la infección. En el modelo estudiado, a las 24 hs de infección se observó en los animales naive una baja presencia de células T. En los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF dicha población celular se incrementó significativamente, no siendo significativa para la cepa mutante para MR/P. Estos resultados estarían indicando un potencial relacionamiento entre la expresión de la fimbria MR/P y el reclutamiento de células T.

Ensayos realizados en ratones inmunodeficientes en células T y B mostraron una mayor susceptibilidad a las ITU por *E. coli* con respecto a animales normales (Hopkins *et al.*, 1993). Estos autores también demostraron que la resistencia a las ITU en este tipo de ratones puede

aumentarse si se transfieren células del bazo (linfocitos B y T) de animales inmunocompetentes. Se ha observado que ratones atímicos deficientes sólo en células T  $\alpha\beta$  tienen tasas de ITU equivalentes a las obtenidas en ratones inmunocompetentes. Sin embargo, ratones *knockout* deficientes en células T  $\gamma\delta$  son más susceptibles a las ITU experimentales que los ratones control (Jones-Carson *et al.*, 1999). Estos resultados sugieren que las células T  $\gamma\delta$ , que constituyen la mayoría de las células T presentes en la mucosa epitelial en los ratones normales y en los atímicos, contribuirían en la resistencia contra las ITU (Jones-Carson *et al.*, 1999; Roberts, 1999), mientras que los linfocitos T  $\alpha\beta$  no participarían en la respuesta inmune convencional frente a una ITU. Cabe destacar que, en nuestro modelo de infección, no fue posible detectar células T  $\gamma\delta$  en ninguno de los grupos de animales evaluados (infectados y naïve).

La respuesta del hospedero y el repertorio de mediadores de la inflamación estaría influenciado por los factores de virulencia bacterianos y las distintas interacciones moleculares con los receptores celulares del hospedero perturbarían las distintas vías de señalización del mismo (Svanborg *et al.*, 2001). Las células epiteliales sensan la presencia de las bacterias y responden a la infección secretando quemoquinas, las cuales aumentan la defensa antimicrobiana temprana reclutando células inflamatorias desde la circulación a las mucosas (Godaly *et al.*, 2007).

La evaluación de la expresión relativa de distintas citoquinas evidenció la expresión rápida de IL-6 en los tres grupos de animales infectados con cada una de las cepas de *P. mirabilis*. En pacientes con cistitis o pielonefritis, IL-6 e IL-8 se encuentran presentes en la orina, lo que sugiere un rol potencial de éstas en la patogénesis de las ITU (Agace *et al.*, 1993). Las células epiteliales de la vejiga y los riñones serían la fuente principal de estas citoquinas cuando hay una infección por UPEC (Hedges *et al.*, 1992). IL-6 es una citoquina pleiotrópica con una gran variedad de funciones inmunoregulatoras, entre las que se encuentran la amplificación de la señal involucrada en el reclutamiento de neutrófilos (Kopf *et al.*, 1995). Nuestros resultados mostraron que a las 2 hs posteriores a la infección ya existe una activación de la expresión de IL-6 en vejigas lo que posiblemente se relacione también con la presencia de los PMN en orina y en las vejigas a las 6 y 24 hs.

A las 24 hs de infección los niveles de expresión de IL-6 descendieron a niveles comparados a los de los animales naïve. Este efecto podría estar indicando una supresión de la respuesta inmune por parte de *P. mirabilis*. En aislamientos de UPEC se ha visto que existe una supresión de la activación de los componentes de la respuesta inmune innata en el TU. En particular las cepas NU14 y CFT073 de UPEC suprimen la activación NF- $\kappa$ B, la secreción de IL-6 e IL-8 tanto en células uroteliales como no uroteliales (Klumpp *et al.*, 2006). Los mecanismos involucrados en la actividad supresora de UPEC en la respuesta inmune innata urotelial es aún poco entendida (Billips *et al.*, 2008). La observación de estos mecanismos de supresión de la

respuesta inmune innata en UPEC y los resultados obtenidos en el modelo de *P. mirabilis* posiblemente estén indicando la existencia de mecanismos comunes en los uropatógenos que les permite modular la respuesta y por lo tanto persistir en el TU.

La superfamilia de las quemoquinas se subdivide en 2 grupos principales. Las quemoquinas del tipo CC que no actúan sobre neutrófilos pero atraen monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos (Baggiolini, 2001). El otro subgrupo lo componen las quemoquinas del tipo CXC las que a su vez pueden subdividirse dependiendo de la presencia de las secuencias ELR (ácido glutámico-leucina-arginina). Las quemoquinas que contienen ELR son quemoquinas para neutrófilos como es el caso de GRO- $\alpha$ /CXCL1 e IL-8/CXCL8; por el contrario las que no contienen dichas secuencias actúan sobre los linfocitos (MIG/CXCL9, IP-10/CXCL10). Por lo tanto el repertorio de quemoquinas locales determina la calidad del infiltrado inflamatorio y las funciones efectoras importantes para la defensa del hospedero (Godaly *et al.*, 2007).

Los resultados obtenidos de la expresión relativa de CCL20 mostraron que existe un aumento de su expresión en los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 a las 2 y 24 hs de infección en vejigas y en los infectados con *P. mirabilis* AF sólo a las 2 hs. En los riñones se observó la inducción de dicha quemoquina solamente a las 24 hs de infección con las tres cepas de *P. mirabilis* empleadas. Estos resultados podrían estar relacionados con los resultados observados en la citometría de flujo en donde se observó que en los animales infectados hay una población celular de un 50% de células CD45+ las cuales no fueron identificadas como neutrófilos, T ó B. La infección por *P. mirabilis* estaría induciendo una rápida expresión de la quemoquina CCL20, la que podría producir el reclutamiento de células dendríticas, monocitos, eosinófilos, basófilos y linfocitos T.

En cuanto a la expresión de quemoquinas quemoquinas quemoquinas para neutrófilos se observó el aumento significativo de CXCL1 y CXCL10 en los animales infectados con *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* MSD2 a las 2 hs de infección. Estos resultados están en acuerdo con los observados para la presencia de neutrófilos en vejigas y PMN en orina, los cuales se observaron a partir de las 6 hs de infección. En los animales infectados con *P. mirabilis* AF sólo se observó el aumento de la expresión relativa de CXCL1 a las 2 hs de infección en las vejigas. Dadas estas observaciones podría relacionarse la presencia de flagelos con el incremento de la expresión de ambas quemoquinas ya que la cepa mutante para flagelos no es capaz de inducir la expresión de ambas quemoquinas. Más aún, en los riñones de los animales infectados con *P. mirabilis* AF no se induce ninguna de las dos quemoquinas ni a las 2 ni a las 24 hs de infección, mientras que con las cepas *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* MSD2 hay una inducción significativa de CXCL1 a las 24 hs. Godaly y colaboradores especulan que el sensado de las distintas adhesinas que expresan los microorganismos podría influenciar en la respuesta del tejido del hospedero para



ajustar la respuesta de quemoquinas y el infiltrado inflamatorio para combatir de forma eficiente a la cepa infectante (Godaly *et al.*, 2007). En nuestro modelo, la ausencia de flagelos produce en el hospedero una respuesta de marcadores de inflamación mucho menor tanto a nivel de vejiga como de riñones que las cepas que si poseen la capacidad de expresarlos.

En cuanto al efecto de las fimbrias MR/P en la inducción de la expresión de quemoquinas, los resultados mostraron un comportamiento similar a la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921. Cabe recordar que *P. mirabilis* posee 17 potenciales operones fimbriales diferentes, por lo que la ausencia o presencia de las mismas puede tener efectos redundantes. Lo que no sería el caso de UPEC, en el cual se ha visto que la respuesta de quemoquinas en el TU es modificada por la expresión de distintas fimbrias. Cepas que expresan fimbrias de tipo 1 producen principalmente una respuesta de CXCL1 y CXCL8, mientras que las que expresan fimbrias P producen CCL2 y CCL5. Además las fimbrias P de clase II inducen respuestas mayores de CXCL8 y CCL2 mientras que las de clase III estimulan CCL5 (Godaly *et al.*, 2007).

La citoquina proinflamatoria IL17 es producida por las células Th17, linaje recientemente descrito el cual se ha visto confiere protección contra bacterias extracelulares y hongos en particular en las superficies epiteliales (Bettelli *et al.*, 2007). Además de la IL17, este linaje produce IL21 e IL23 y dispara la producción de otras citoquinas (IL6, factor de estimulación de granulocitos-macrófagos), quemoquinas (CXCL1, CXCL2, CXCL5, CXCL8) y metaloproteinasas en un amplia rango de tipos celulares (Kolls & Linden, 2004). Una respuesta controlada, precisa y coordinada de células T promueve la erradicación de los patógenos y minimiza la diseminación de los mismos y por lo tanto protegen al hospedero de la infección (Curtis & Way, 2009). Otros autores han demostrado que la citoquina IL17 estaría involucrada en las respuestas inmunes mediadas por neutrófilos (Shibata *et al.*, 2007). El rol de IL17 en las ITU producidas por *E. coli* ha sido estudiado por Sivick y colaboradores (2010) empleando un modelo murino de infección. Estos autores observaron que IL17A se encuentra regulada positivamente en respuesta a antígenos de UPEC en las células del tejido linfóide secundario de los animales infectados. Además, los transcritos de IL17A también se encontraron expresados de forma elevada en las vejigas de los animales infectados (Sivick & Mobley, 2010). En nuestro modelo de ITU por *P. mirabilis* observamos que a las 2 hs de infección se produce un incremento significativo de la expresión de ARNm de IL17A. A las 24 hs posteriores a la infección ninguno de los grupos infectados por *P. mirabilis* presentaron incrementos significativos en IL17. Sivick y colaboradores establecieron que IL17 tendría un rol en el control de la ITU por *E. coli*, lo que podría relacionarse con los resultados obtenidos con *P. mirabilis*. La disminución de la expresión de IL17 podría por lo tanto relacionarse con la

capacidad de la bacteria de permanecer en el TU sin ser erradicada y que la respuesta inmune que se monta frente a la infección no resulte efectiva.

En el modelo empleado de infección urinaria experimental ascendente evaluado a distintos tiempos se pudo observar que *P. mirabilis* rápidamente coloniza la vejiga y ya a tiempos cortos, las mismas se encuentran en las capas más externas del tejido. Esto probablemente sea un mecanismo para poder colonizar el órgano y evadir los mecanismos intrínsecos que posee la vejiga para la eliminación de los microorganismos como lo son el flujo de orina constante y la exfoliación de las células uroepiteliales (Sivick & Mobley, 2010).

Se pudo constatar que la cepa mutante para MR/P a un día de realizada la infección aún se encuentra en el lumen de la vejiga mientras que la cepa salvaje no. Estas observaciones están de acuerdo a los demás resultados obtenidos de número de bacterias recuperadas, dado que si permanece más tiempo en la luz probablemente sea eliminada a través del flujo de orina. Si bien no se han identificado los receptores celulares para la fimbria MR/P, su ausencia hace que la bacteria probablemente no pueda adherirse al epitelio usando esa fimbria o que tenga que emplear otros mecanismos de adhesión para colonizar el tejido.

En el caso de la cepa mutante para flagelos se observó también una localización a nivel del lumen vesical a tiempos cortos de infección. Si bien en este caso la cepa es capaz de expresar la fimbria MR/P, la ausencia de flagelos claramente está afectando su movilidad, esencial para alcanzar el tejido y poder luego adherirse para colonizar el órgano. Esto se evidenció en varios de los experimentos realizados dado que la cepa mutante *P. mirabilis* AF se recuperó en menor número a tiempos cortos respecto a la salvaje y que se observó mayoritariamente en la luz de la vejiga.

A los 7 días de infección las bacterias se observaron en todo el tejido vesical y rodeadas de acúmulos celulares posiblemente “focos inflamatorios”. Esto concuerda con los resultados de PMN en orina en donde se evidenció la presencia de este tipo celular durante los 7 días de infección. A nivel de riñones se observó un daño masivo para los órganos infectados con las cepas salvaje y la mutante para MR/P, no así en el caso de AF. Estos resultados son consistentes con los obtenidos al evaluar el daño vesical y renal mediante la escala de daño histológico. Los resultados mostraron que la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 es la que produce mayor daño a nivel renal y vesical, seguida por la mutante para MR/P y la que induce menor daño es la cepa mutante para flagelos.

Otros autores han mostrado que en ensayos de infección por *P. mirabilis* HI4320, se recuperaron bacterias en vejigas, uréteres y riñones a los 2 y 4 días de infección empleando un inóculo de  $10^8$ - $10^9$  ufc/0.05 ml de PBS (Jansen *et al.*, 2003). En nuestro trabajo conseguimos

recuperar bacterias a las 24 hs de infección, observándose en tiempos cortos así como prolongados diferencias significativas con las cepas mutantes. En un trabajo posterior, Jansen y colaboradores observaron que la mayoría de las bacterias que se encontraban infectando el TU expresaban la fimbria MR/P tanto a los 2 como a los 4 días de infección (Jansen *et al.*, 2004). Estos resultados, como los obtenidos en este trabajo confirman la importancia de la fimbria MR/P en la colonización del TU.

En cuanto al daño histológico inducido por la presencia de *P. mirabilis*, Alamuri y colaboradores, empleando la cepa HI4320 y mutantes para la hemolisina HpmA y la aglutinina Pta, establecieron que la cepa mutante para HpmA produce igual daño histológico que la cepa parenteral salvaje, no así en el caso de el mutante para la aglutinina (Alamuri *et al.*, 2009). En nuestra evaluación la cepa que produjo menor daño a nivel histológico fue el mutante para flagelos *P. mirabilis* AF. Como se mencionó anteriormente los flagelos disparan fuertes respuestas inmunológicas a través de la activación de TLR5; la ausencia de estas estructuras podría producir una menor respuesta y por lo tanto un menor daño histológico.

En resumen, en esta primera aproximación evidenciamos que la infección por *P. mirabilis* 2921 produce una respuesta rápida en el hospedero caracterizada por la inducción de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, la presencia de neutrófilos y daño en el TU. Además, *P. mirabilis* 2921 sería capaz de modular la respuesta inflamatoria para poder persistir en los órganos. Las fimbrias MR/P estarían involucradas en los estadios iniciales de la infección y su ausencia produciría que la bacteria sea menos infectiva e induzca un menor reclutamiento de células en la vejiga. En cuanto al perfil de citoquinas y quimioquinas las cepas mutantes para MR/P indujeron sólo la expresión relativa de CXCL1 e IL-6 a las 2 hs de infección en las vejigas mientras que en los riñones recién a las 24 hs se observó incremento de la expresión de estos marcadores y de CCL20. Los flagelos también serían importantes en los primeros estadios de la infección y la expresión de citoquinas y quimioquinas sería menor cuando estas estructuras están ausentes. Sin embargo a los 7 días de infección las cepas mutantes para flagelos fueron más infectivas que la cepa salvaje. Cabe destacar que *P. mirabilis* presenta un arsenal de factores de virulencia que actuarían de manera concertada y que la ausencia de un solo factor (en este caso las fimbrias MR/P o los flagelos) no imposibilita la colonización del TU pero sí disminuye su potencial infectivo en las primeras horas de infección.

## **Capítulo 2.- Aspectos de la interacción entre *P. mirabilis* y células eucariotas; papel de fimbrias MR/P y flagelos.**

### **Introducción**

La adhesión de las bacterias patógenas a las células hospederas representa el paso crucial para el establecimiento de la infección. Los eventos subsecuentes incluyen la colonización de los tejidos, y en algunos casos la invasión celular seguido de la multiplicación intracelular y/o persistencia (Alamuri *et al.*, 2010).

La colonización del epitelio es el primer paso en la patogénesis de *P. mirabilis* y ha sido demostrado por medio de aproximaciones *in vitro* e *in vivo* (Rozalski *et al.*, 1997). Sin embargo, los mecanismos mediante los cuales *P. mirabilis* se adhiere a las células epiteliales no están completamente dilucidados (Bahrani & Mobley, 1994; Rozalski *et al.*, 1997). Para algunos patógenos como *E. coli* la capacidad de adhesión a las líneas celulares HeLa o HEp-2 se expresa según patrones específicos. En la adhesión localizada, las bacterias se adhieren a la superficie de la célula de forma agrupada. La adhesión agregativa (AA) describe cuando las bacterias se adhieren con un patrón agrupado y ordenado formando agregados sobre la superficie celular y/o vidrio. Por último, la adhesión difusa que refiere a la adhesión de forma aislada sobre la superficie celular (Scaletsky *et al.*, 1984; Nataro *et al.*, 1987). El patrón AA es característico de las cepas de *E. coli* enteroagregativas (EAEC). Para *P. mirabilis* han sido estudiados los patrones de adhesión a las líneas celulares HEp-2 y LLC-MK2. En estos estudios se observó que con cepas de *P. mirabilis* aisladas de pacientes con ITU luego de 6 hs de incubación con las líneas HEp-2 y LLC-MK2 presentaron el característico patrón AA (Rocha *et al.*, 2007).

Las fimbrias son estructuras proteicas que protruyen de la superficie bacteriana. El tamaño es variable con un diámetro de entre 2 a 8 nm y están compuestas por distintas subunidades proteicas de bajo peso molecular (Duguid *et al.*, 1955). Los genes fimbriales que codifican para las diferentes subunidades se encuentran localizados en operones de diferentes tamaños y complejidad, los cuales se pueden localizar en el cromosoma o en plásmidos.

Diversos autores han observado que la expresión del flagelo bacteriano es requerido para una máxima adherencia bacteriana, colonización y la subsecuente invasión (Duan *et al.*, 2012). El flagelo podría estar influenciando en la virulencia de los patógenos entéricos aumentando las propiedades de adhesión, colonización e invasión. En *E. coli* enterotoxigénica (ETEC) se observó que los flagelos purificados son capaces de unirse directamente a células HeLa en cultivo, y los mutantes en *fliC* son defectivos al momento de adherirse a las líneas celulares epiteliales *in vitro* (Giron *et al.*, 2002). Además la importancia de los flagelos en la invasión de

células epiteliales ha sido reportado para varios microorganismos (Dons *et al.*, 2004; Parthasarathy *et al.*, 2007).

El flagelo bacteriano sería además un tipo especial de Sistema de Secreción de Tipo III (SST3), el cual deriva de un sistema ancestral común y comparte al menos nueve componentes homólogos asociados a la virulencia de los SST3 (Duan *et al.*, 2012). Se creía que el sistema de exportación del flagelo era responsable solamente de la secreción de proteínas involucradas en la biogénesis del filamento. Sin embargo, evidencias recientes mostraron que el aparato de exportación del flagelo posee una función dual de exportación de proteínas involucradas en la biogénesis del flagelo y en la secreción de proteínas incluyendo factores de virulencia (Duan *et al.*, 2012).

Para el caso de *P. mirabilis*, además de la adhesión mediada por las fimbrias, Oelschlaeger y Tall (1996) demostraron que la bacteria era capaz de invadir células eucariotas en cultivo pero los mecanismos y estructuras bacterianas involucrados en dicho proceso no se han dilucidado por completo aún. Por otro lado, Alamuri y colaboradores (2010) describieron un autotransportador que mediaría la adhesión e invasión en células uroepiteliales humanas en cultivo (Alamuri *et al.*, 2010). También se demostró que la enzima UDP-ácido glucurónico descarboxilasa estaría involucrada en la invasión de células uroteliales (Jiang *et al.*, 2010).

Una de las respuestas intrínsecas a los organismos multicelulares consiste en el sacrificio de la célula infectada en beneficio de las células remanentes (Ashida *et al.*, 2011). Los mecanismos principales de muerte celulares consisten en muerte por apoptosis, necrosis y piroptosis y son mecanismos críticos de defensa contra las infecciones microbianas. En respuesta a la infección bacteriana los programas de muerte celular, como la apoptosis, se inducen como parte de los mecanismos de respuesta inmune innata. La muerte celular puede a su vez beneficiar a los patógenos, por ejemplo al inducir la muerte de las células infectadas lo que le permite a la bacteria salir de forma eficiente de la célula hospedera, evadir la respuesta inmune, dispersarse a células vecinas y obtener nutrientes. Además, muchos patógenos, en particular los que pueden invadir y multiplicarse dentro de la célula hospedera, usan múltiples mecanismos para manipular la muerte celular, así como rutas para sobrevivir y mantenerse en sus compartimentos (Behar *et al.*, 2010; Kim *et al.*, 2010, Lamkanfi & Dixit, 2010). Existen reportes de diversos microorganismos patógenos capaces de inhibir la muerte celular, así como de inducir mecanismos de apoptosis, necrosis y piroptosis (Ashida *et al.*, 2011). Varias estructuras bacterianas se han identificado y relacionado con los distintos mecanismos de muerte celular, por ejemplo la flagelina de *Legionella pneumophila* es capaz de inducir piroptosis (Amer *et al.*, 2006), lo mismo para la flagelina de *S. Typhimurium*, y en *Yersinia* las proteínas Yop inducen apoptosis (Ashida *et al.*, 2011).

Otros mecanismos desarrollados por los microorganismos para poder mantener la infección consisten en la inducción de citotoxicidad y genotoxicidad. La identificación de los factores bacterianos que causan daño celular en el hospedero resulta crucial para el desarrollo de estrategias de prevención y neutralización de los mismos. *P. mirabilis* expresa la hemolisina HpmA, la cual ha sido identificada como una citotoxina (Alamuri *et al.*, 2009). Esta citotoxina es secretada por *P. mirabilis* en la fase exponencial tardía del crecimiento bacteriano y forma poros en las membranas (Braun & Focareta, 1991). HpmA también es inducida durante la diferenciación de las células *swarmer* y durante la infección, lisando células nucleadas y eritrocitos (Fraser *et al.*, 2002). Por otro lado, la aglutinina tóxica de *Proteus* (PTA) es una serin-proteasa calcio dependiente asociada a la superficie bacteriana, con función de autotransportador que exhibe un efecto citotóxico en cultivos de células epiteliales (Alamuri & Mobley, 2008). Si bien es conocida la capacidad de *P. mirabilis* de producir citotoxinas, el rol de las fimbrias MR/P y los flagelos en la inducción de citotoxicidad y genotoxicidad no han sido aún evaluados.

El objetivo del presente capítulo consistió en analizar el posible papel de las fimbrias MR/P y flagelos en los primeros aspectos generales de la interrelación bacteria-célula eucariota. En nuestro Departamento contamos con líneas celulares de vejiga (T24) y de riñón (Vero) que nos permiten estudiar la respuesta de las células a la presencia bacteriana. En primer lugar nos planteamos estudiar la adhesión bacteriana a las células en cultivo. Dado que *P. mirabilis* es capaz de adherirse a superficies tanto abióticas como bióticas, el protocolo clásico de adhesión (Zunino *et al.*, 2001) fue modificado y se realizó la cuantificación mediante microscopía óptica contando las bacterias adheridas a las células. La adhesión celular se evaluó a tiempos cortos con el fin de evaluar sólo el efecto de las fimbrias MR/P y flagelos y evitar la acumulación de otros factores de virulencia potenciales que la bacteria puede secretar al medio, lo que camuflaría los resultados. La capacidad de *P. mirabilis* de invadir células eucariotas se evaluó mediante el protocolo de protección a gentamicina, en donde se cuantificaron las bacterias que ingresaron a las células mediante recuento en placa de viables. Estos ensayos, además de cuantificarse, se observaron al microscopio confocal y al microscopio electrónico de barrido. Ambas técnicas permiten la observación de distintos aspectos de la interacción bacteria-célula, así como modificaciones inducidas en membranas y citoesqueleto. Otro de los aspectos evaluados fue la inducción de apoptosis dado que la muerte celular es un mecanismo intrínseco de defensa frente a la infección. Cabe destacar que hasta el momento no está descrito si *P. mirabilis* es capaz de inducir mecanismos de muerte celular programada. En todos los experimentos se emplearon las 3 cepas de *P. mirabilis* para así poder observar diferencias entre la cepa salvaje y los mutantes incapaces de expresar fimbrias MR/P (*P. mirabilis* MSD2) o flagelos (*P. mirabilis* AF).

## Resultados

### Adhesión de *P. mirabilis* a células eucariotas

La capacidad de adhesión de *P. mirabilis* 2921, *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF se evaluó mediante conteo de las bacterias adheridas a las células eucariotas por microscopía óptica a distintos tiempos (5, 10 y 15 minutos). Los resultados mostraron que a los 5 minutos de adhesión a células Vero, la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 se adhirió en mayor número que las cepas mutantes y en particular la adhesión fue significativamente mayor que la de la cepa mutante *P. mirabilis* AF ( $P=0.034$ , Duncan test, Figura 42). A los 10 minutos la adhesión de las cepas mutantes *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF fue significativamente menor con respecto a adhesión de la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 ( $P=0.041$ ,  $P=0.042$ , respectivamente, Figura 42, panel A). A los 15 minutos los valores de adhesión fueron similares a los obtenidos a los 10 minutos, lo mismo que las diferencias entre las cepas, obteniéndose valores de  $P=0.007$  entre *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* MSD2 y  $P=0.008$  entre *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF (Figura 42, panel A).

La evaluación de la adhesión mediante microscopía óptica permitió observar distintos patrones de acuerdo a la cepa empleada. *P. mirabilis* 2921 presentó el patrón AA (adhesión agregativa) mientras que el mutante para MR/P, *P. mirabilis* MSD2, mostró características de adhesión diferentes, con una reducción intensa del patrón AA, encontrándose mayoritariamente bacterias aisladas adheridas a las células eucariotas. En el caso de *P. mirabilis* AF se observó que el patrón AA tiende a aparecer a tiempos tardíos en la adhesión (Figura 42, panel B y Anexo I).

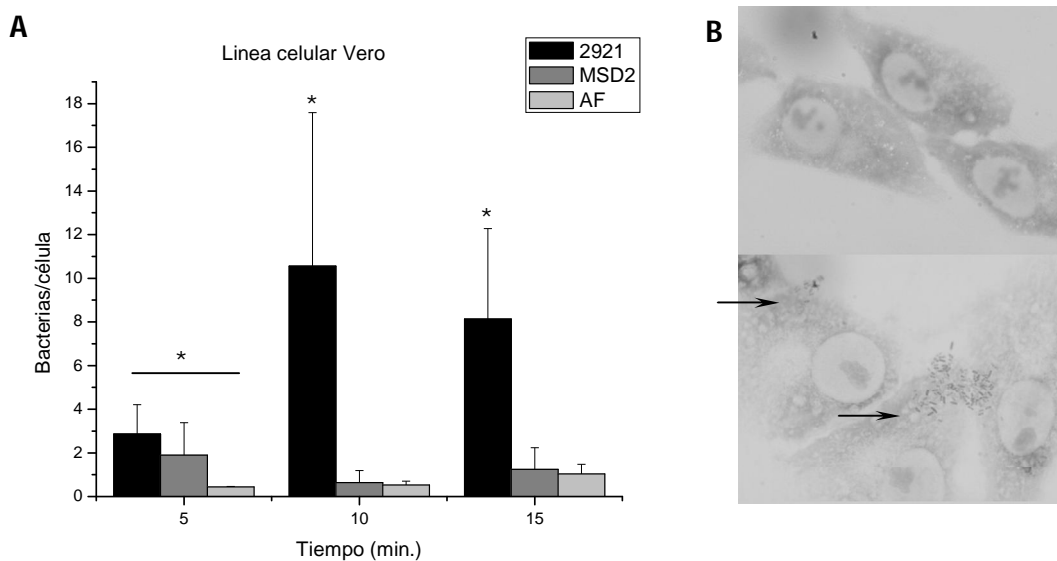


Figura 42: Adhesión de *P. mirabilis* 2921, *P. mirabilis* MSD2, *P. mirabilis* AF a la línea celular Vero (A). Las barras representan el resultado de 3 ensayos independientes con sus respectivas barras de error calculadas como el desvío estándar. El \* representa los casos en donde hubo diferencias significativas entre *P. mirabilis* 2921 y las cepas

mutantes. El caso de la adhesión a los 5 minutos el \* representa diferencias significativas entre *P. mirabilis* 2921 y AF. En el Panel B se muestran 2 imágenes representativas de los ensayos de adhesión, la imagen superior corresponde a la línea celular Vero control sin infectar y la imagen inferior corresponde a 10 minutos de infección por *P. mirabilis* 2921. Las flechas indican la localización de las bacterias. La tinción que se empleó fue con azul de metileno y se usó un objetivo 100X para la adquisición de las imágenes (Ver Anexo I).

Al evaluar la adhesión bacteriana de las tres cepas de *P. mirabilis* a la línea uroepitelial de vejiga T24 se observó que ambas cepas mutantes presentaron adhesión en menor número que la cepa salvaje. Sin embargo, al comparar estadísticamente los valores de adhesión obtenidos a los distintos tiempos y entre las distintas cepas no se observaron diferencias significativas en ninguno de los casos (Figura 43, panel A).

La observación de las imágenes tomadas por microscopía óptica permitió nuevamente visualizar el patrón AA en la cepa *P. mirabilis* 2921, mientras que las cepas mutantes presentaron el mismo patrón de adhesión que en el caso de la línea celular Vero. Además se observó que la presencia de las bacterias afectó a la línea celular T24, en particular con la aparición de vesículas en la membrana plasmática conocidos como *blebs* ya a los 5 minutos de infección (Figura 43, panel B, Anexo I).

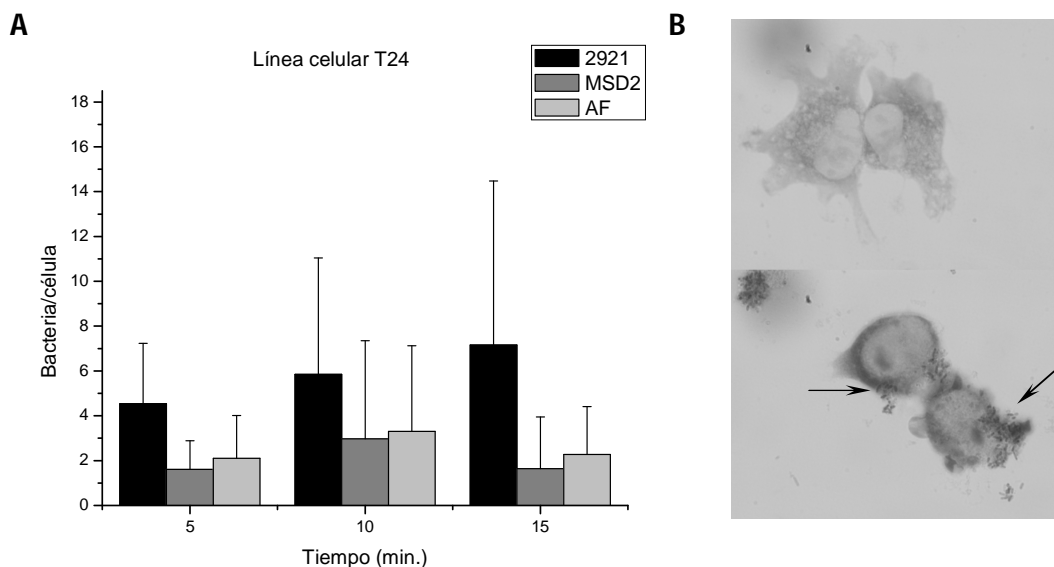


Figura 43: Adhesión de *P. mirabilis* 2921, MSD2, AF a la línea celular T24 (A). Las barras representan el resultado de 3 ensayos independientes con sus respectivas barras de error calculadas como el desvío estándar. En el Panel B se muestran 2 imágenes representativas de los ensayos de adhesión, la imagen superior corresponde a la línea celular T24 control sin infectar y la imagen inferior corresponde a 10 minutos de infección por *P. mirabilis* 2921. Las flechas indican la localización de las bacterias. La tinción que se empleó fue con azul de metileno y se usó un objetivo 100X para la adquisición de las imágenes.



### Sensibilidad a gentamicina (CIM) de las cepas de *P. mirabilis*

El ensayo de Concentración Inhibitoria Mínima para gentamicina para las tres cepas de *P. mirabilis* se realizó dado que en el ensayo de invasión bacteriana a células eucariotas se utiliza dicho antibiótico y por lo tanto fue necesario calcular la concentración de gentamicina a la cual *P. mirabilis* es sensible.

El ensayo se realizó en placas de microtitulación en las cuales se colocaron diluciones seriadas del antibiótico (de 200 a 3.125  $\mu\text{g/ml}$ ) junto con suspensiones de las cepas de *P. mirabilis* en caldo LB. Luego de 24 horas de incubación a 37°C se procedió a la lectura de la absorbancia a 660 nm (Figura 44) y siembra en placas de agar nutritivo para confirmar efecto inhibitorio y observar el efecto antibacteriano.

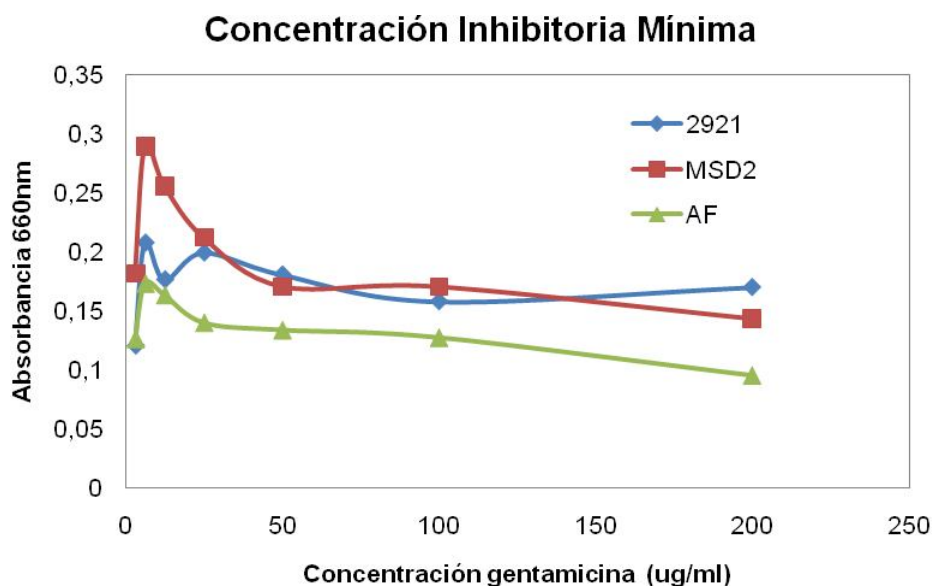


Figura 44: Gráfico de la concentración inhibitoria mínima de gentamicina medida por absorbancia a 660nm.

Los resultados mostraron que existió un efecto inhibitorio del crecimiento bacteriano a partir de la concentración de 25  $\mu\text{g/ml}$ , lo que se correspondió con los resultados en placa. Se observó crecimiento bacteriano sólo en las concentraciones de 3.125 a 12.5  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina. Los protocolos para invasión celular establecen el empleo de 50  $\mu\text{g/ml}$  de gentamicina por lo que de acuerdo a los resultados obtenidos en este ensayo se procedió a emplear dicha concentración de antibiótico.

### Invasión bacteriana en células eucariotas

La capacidad de *P. mirabilis* para invadir células eucariotas se cuantificó mediante recuento de las bacterias que ingresaron a las células y por lo tanto sobreviven en su interior y resisten el tratamiento con gentamicina.

Los resultados mostraron que ambas cepas mutantes (*P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF) invadieron las células eucariotas de forma significativamente menor que la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 en ambas líneas celulares empleando un MOI de 10 bacterias/célula (Figura 45). En todos los casos se realizó el recuento del inóculo inicial.

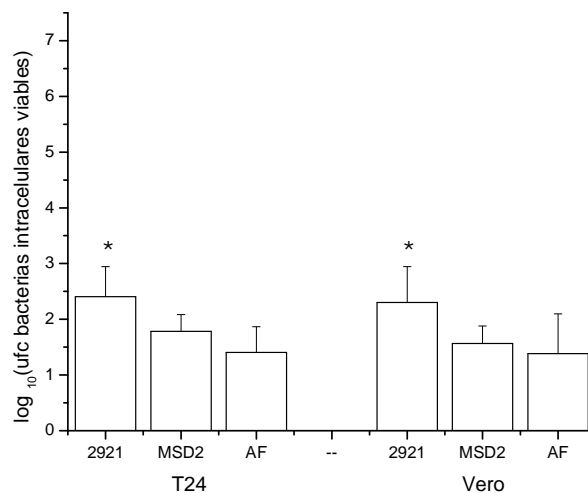


Figura 45: Gráfico del recuento de bacterias expresado como  $\log_{10}$  de las bacterias que ingresaron en los cultivos celulares. El \* indica los casos en donde hubo diferencias significativas entre la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 y las mutantes (Test de Mann-Whitney,  $P \leq 0.05$ ).

La visualización y análisis de las imágenes de microscopía confocal del ensayo de invasión mostraron bacterias en el interior de las células eucariotas en el caso de *P. mirabilis* 2921 y en particular en algunos casos se observaron las bacterias muy próximas al núcleo. En la Figura 46 se muestra el *stack* de imágenes obtenido al MLC en donde en verde se marcaron las bacterias (anticuerpo anti-*P. mirabilis*, con anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FitC), en rojo la actina (rodamina-faloidina) y en azul los ácidos nucleicos (Hoechst 33342). La adquisición de las imágenes al microscopio confocal permitió obtener imágenes consecutivas de distintos planos en el eje z. En la imagen central de la Figura 46, panel A, se muestra el plano xy; en la parte superior, el plano xz y a la izquierda de la imagen el plano yz. En el panel de la izquierda en la figura 46 (panel A) se muestra todo el campo correspondiente a una imagen de 1024 x 1024 píxeles, lo que equivale a 71.68  $\mu\text{m}$  x 71.68  $\mu\text{m}$ . En el panel de la derecha se

observa una ampliación a escala de la imagen central. Este *stack* posee la información de los 3 canales superpuestos: en rojo se observó la marcación de actina que permitió delimitar la célula eucariota, en azul se marcó el ADN y en verde se observó la marcación para bacterias. La imagen de la Figura 46, panel B mostró en el plano xy la presencia de bacterias rodeando el núcleo eucariota. Al realizar el corte en el eje yz se confirmó que la bacteria se encontraba ingresando a la célula eucariota (mitad de la bacteria rodeada de actina y el resto fuera de la célula) y la proximidad de la misma al núcleo. En el plano xz se corroboró la observación anterior y se visualizó la presencia de otra bacteria probablemente en el interior nuclear (Figura 46, B).

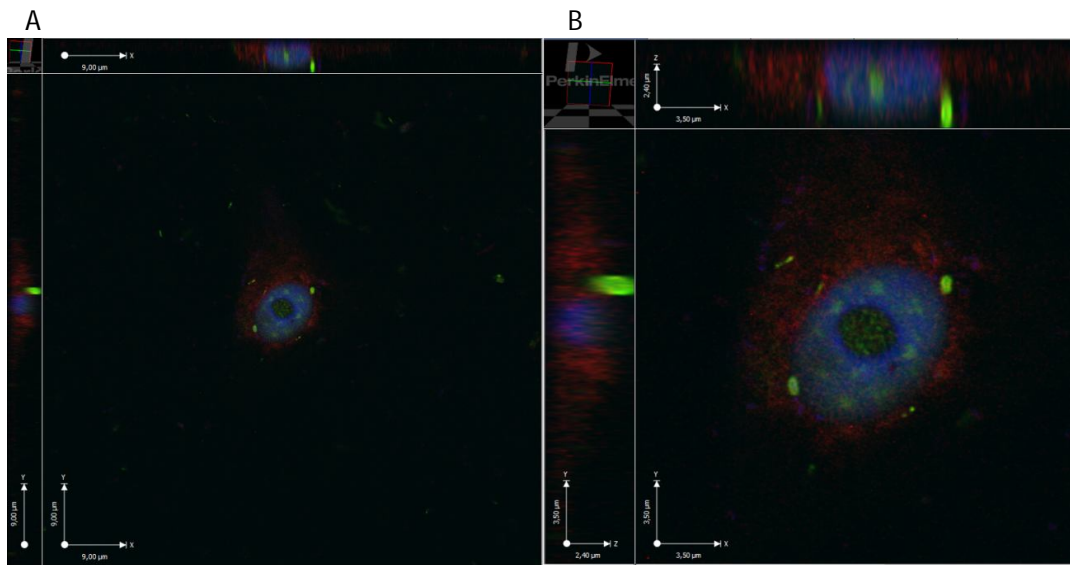


Figura 46: Panel A Imágenes 3D obtenidas mediante MLC en el recuadro central se observa el plano xy mientras que a la izquierda de la imagen se observa el plano zy y en la parte superior el plano zx. Panel B: zoom de la imagen del panel A en donde se puede apreciar las bacterias en estrecha asociación con el núcleo eucariota. Las imágenes fueron adquiridas en MLC Olympus Fluoview FV300, magnificación 100X, la escala correspondiente se muestra en cada imagen.

También se observó que algunas de las bacterias presentaron marcación de actina. La misma se visualizó en el MLC como áreas en las cuales se observó marcación para bacterias en verde y para actina en rojo y la superposición de ambos canales resultó en zonas de color amarillo (Figura 47). Al realizar los modelos de reconstrucción 3D se pudo corroborar que la marcación de actina se encuentra sobre las bacterias (Figura 48, panel I).

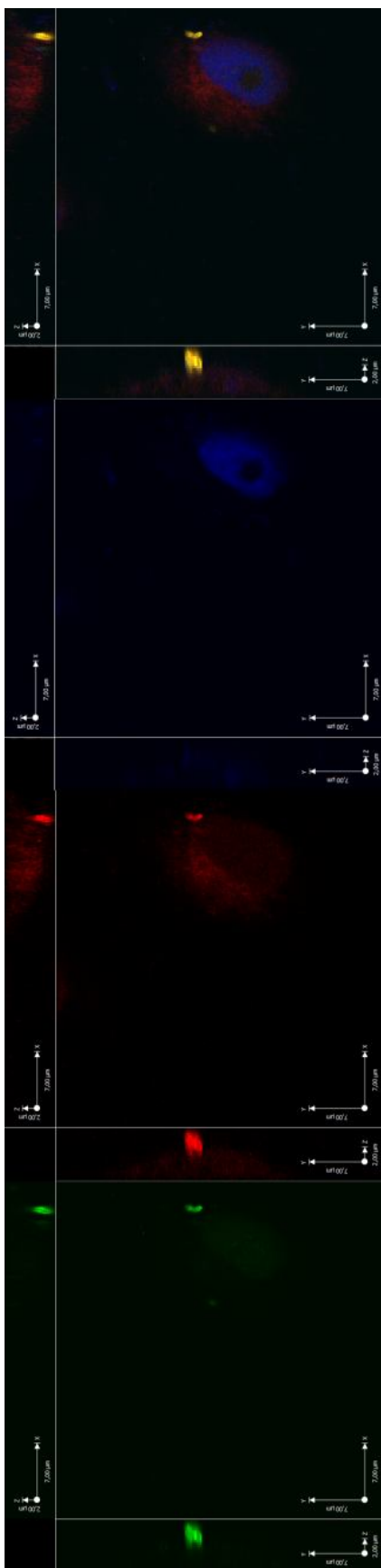


Figura 47: La imagen muestra el *stack* adquirido con el láser 488 (en verde), 543 (rojo) y 405 (azul). La imagen de la derecha corresponde a la superposición de los 3 canales. El modo de adquisición empleado fue el secuencial, lo que elimina el pasaje de fluorescencia de un canal a otro (fenómeno conocido como "*bleedthrough*"). La marcación corresponde en verde a *P. mirabilis* 2921, en rojo a actina y en azul ácidos nucleicos.

Además se visualizó la presencia de grupos de bacterias ingresando en las células como se muestra en la Figura 48. Estos resultados son similares a los obtenidos en el ensayo de adhesión en donde se observó que *P. mirabilis* 2921 posee un patrón de adhesión en grupo (Figura 48, panel D).

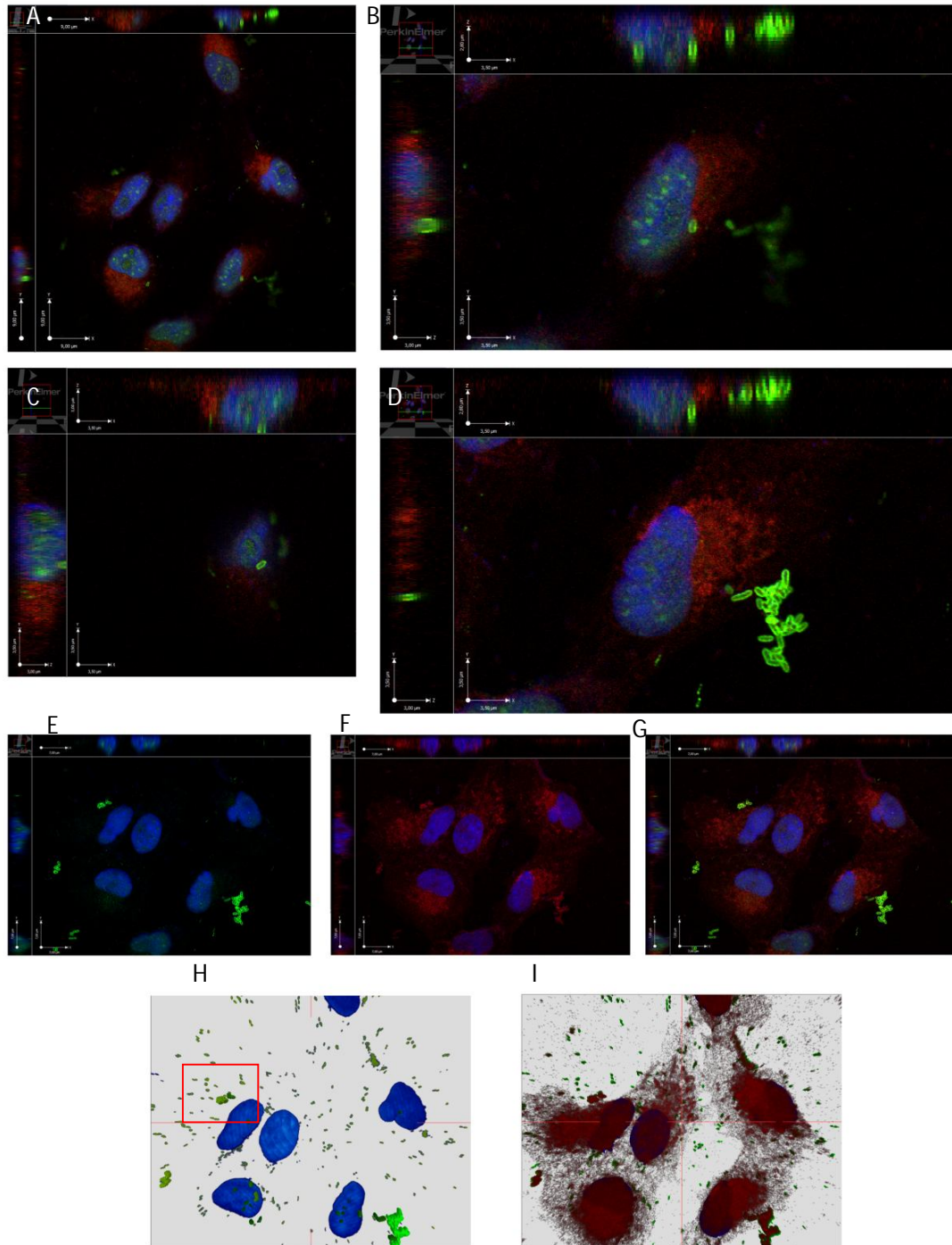


Figura 48: Imágenes de MLC en los paneles A,B,C,D se muestra el mismo campo con distintos zooms para poder apreciar (A) el campo completo, (B y D) bacterias ingresando a la célula (C) bacterias con localización próxima al núcleo. Paneles E, F y G corresponden a las imágenes de los canales 405 y 488, 405 y 543, y los tres canales superpuestos (405, 488, 543). En la imagen F se puede apreciar claramente la marcación de actina que aparece sobre las zonas correspondientes a los grupos bacterianos. Paneles H e I corresponden a los modelos 3D reconstruidos

empleando el software ScianSoft. En la imagen H se puede observar en verde las bacterias y en azul los núcleos los cuales tienen bacterias dentro y sobre su superficie (recuadro rojo). En la imagen I se le adicionó a la imagen H el modelo para la actina. Esto permite confirmar la presencia de actina sobre la superficie bacteriana.

Cabe destacar que se observó la presencia de *P. mirabilis* 2921 no en su forma "swarmer" pero multiflagelada adherida a las células Vero (Figura 49, paneles A-D).

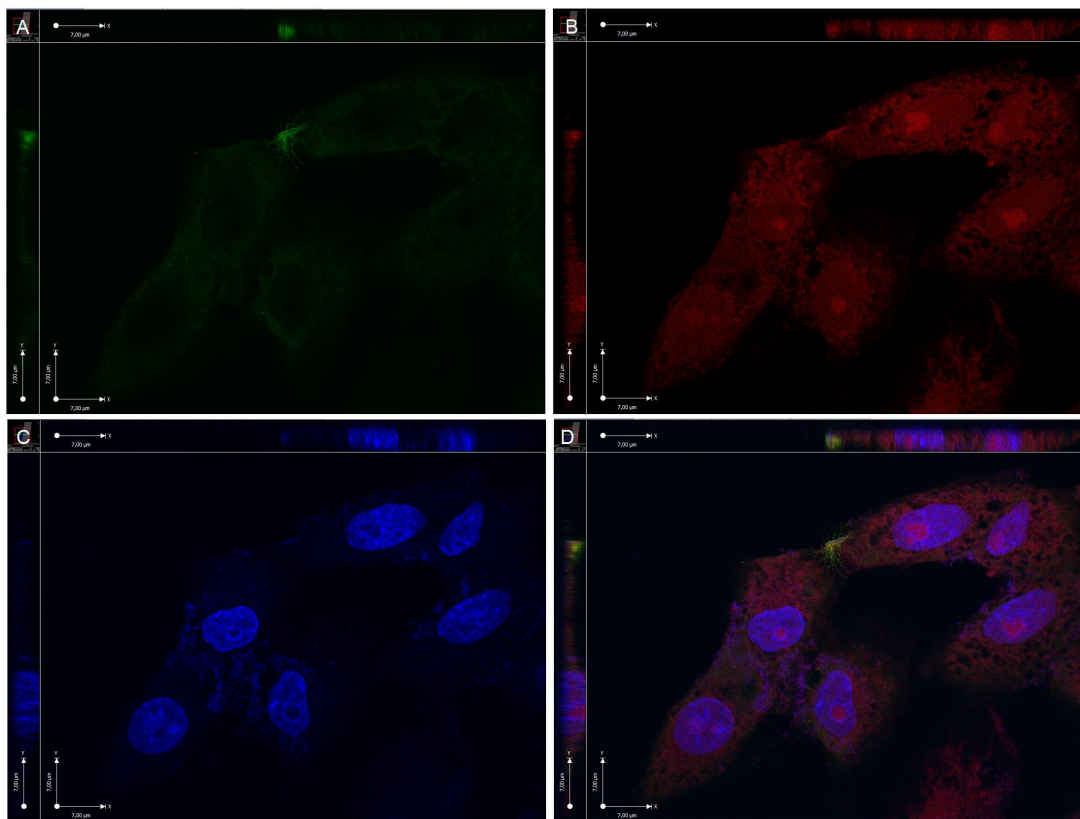


Figura 49: Imágenes de MLC de adhesión de *P. mirabilis* 2921, las bacterias se muestran en el canal verde (A), actina en rojo (B) y ácidos nucleicos en azul (C). En el panel D se muestra la superposición de los tres canales

Está descrito en la literatura que el largo promedio de las bacterias *swarmers* es de unos 10 μm, para corroborar que la bacteria multiflagelada observada en la Figura 49 no era *swarmer*, se midió la longitud de la misma, obteniéndose un largo de 2,72 μm (Figura 50, panel A).



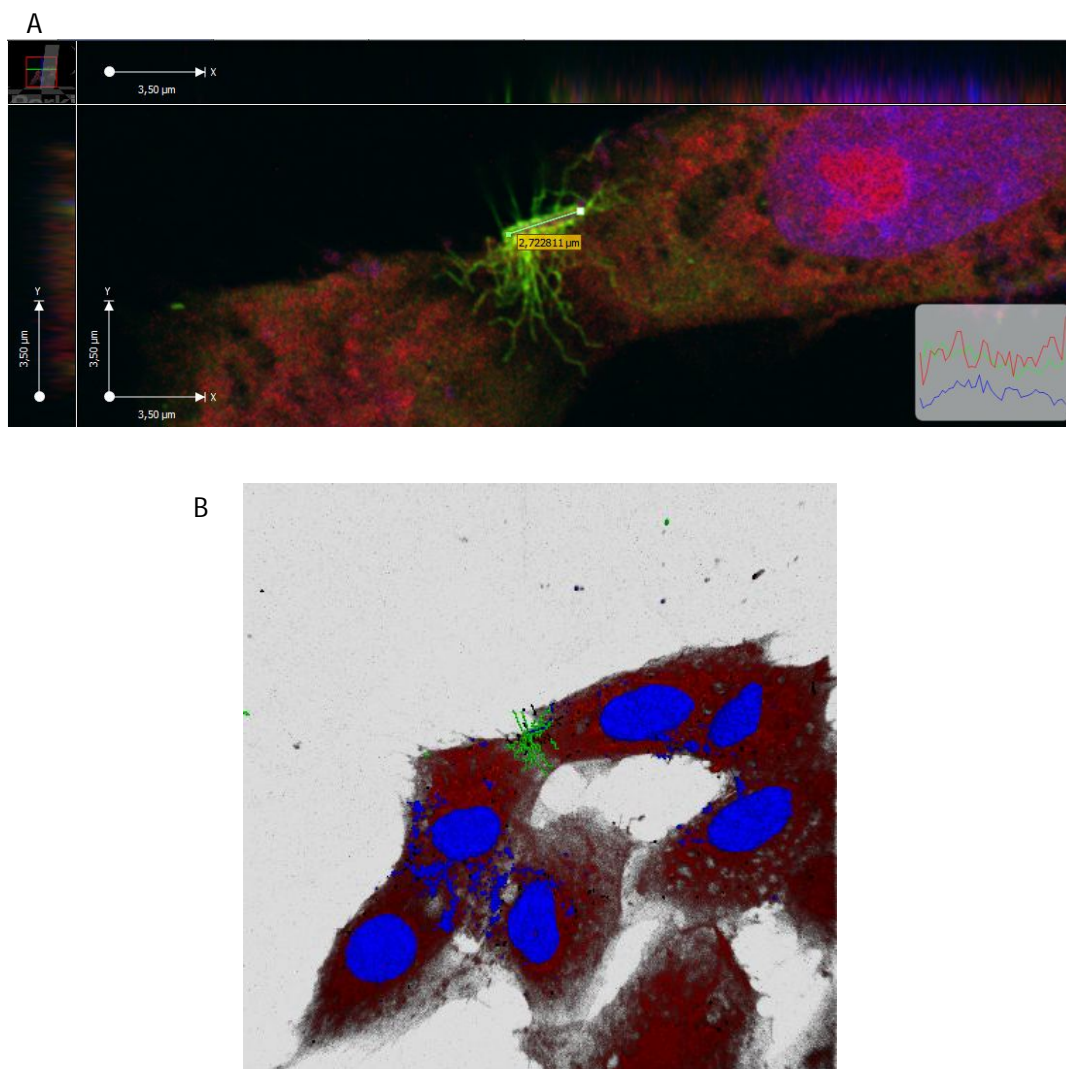


Figura 50: Imagen de MLC, a escala realizada a partir del stack correspondiente a la figura 49, en donde se realizó la medida de la bacteria adherida a la célula (A). En el panel B se muestra el modelo 3D realizado a partir de las imágenes de MLC.

Las imágenes obtenidas permitieron inferir que posiblemente los flagelos de *P. mirabilis* estén involucrados también en los mecanismos de adhesión al menos en las condiciones ensayadas en la presente Tesis.

El protocolo para la visualización de la invasión también se realizó para las cepas mutantes *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF pero no fue exitoso dado los bajos niveles de invasión que presentaron dichas cepas. Si bien las mutantes fueron capaces de invadir al analizar el experimento por MLC la cantidad de bacterias que se encontraron en el interior de las células eucariotas fue muy bajo, lo que no permitió realizar un análisis representativo de las imágenes.

También se observó la invasión bacteriana a las células eucariotas mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) en donde se observó claramente el daño en las membranas eucariotas y las diferencias en forma y tamaño de las células eucariotas al ser invadidas a cuando no están presentes las bacterias (Figura 51). Para el caso de las imágenes de *P. mirabilis* 2921 se vio la presencia de las bacterias en estrecha asociación con el núcleo como se visualizó mediante MLC y se observó la ruptura de la membrana celular a nivel nuclear (Figura 51, paneles B y C). Además las bacterias presentaron nuevamente el patrón de adhesión en grupo AA (Figura 51, paneles D y E). La MEB permitió además la observación de estructuras de la superficie bacteriana probablemente fimbrias y/o nanotubos.

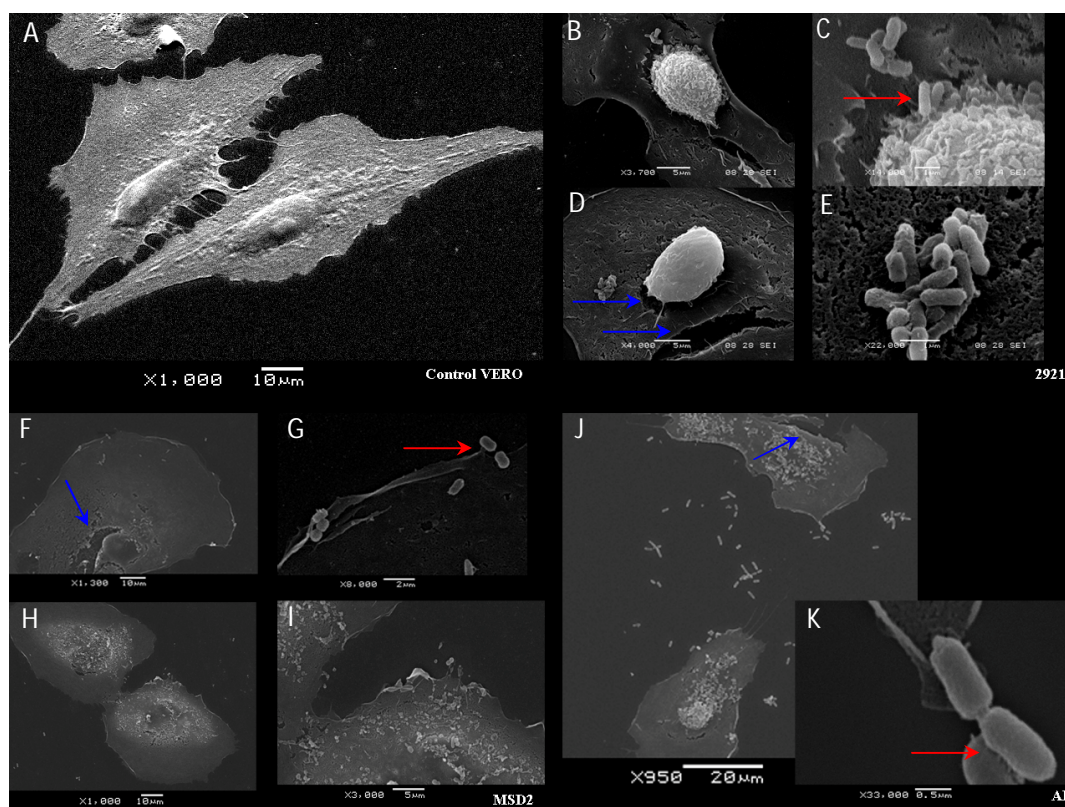


Figura 51: Imágenes del MEB. En el panel A se muestran las células Vero control sin infectar; B y C, D y E: células Vero infectadas con *P. mirabilis* 2921 a distintas magnificaciones; F y G, H e I: células Vero infectadas con *P. mirabilis* MSD2, J y K: células Vero infectadas con *P. mirabilis* AF. Las flechas de color rojo indican la ubicación de las bacterias; las flechas color azul muestran los daños en las células eucariota descritos en el texto.

Para el caso de la línea celular T24 se observó que las células estaban más afectadas estructuralmente que las Vero (Figura 52). La presencia de *P. mirabilis* 2921 indujo la



formación de vesículas en la membrana eucariota (*blebs*) y daño generalizado en las células T24, nuevamente las bacterias se observaron adheridas a la superficie celular en grupos (Figura 52, paneles B y C, D y E). La formación de *blebs* se notó claramente en el caso de la infección con *P. mirabilis* MSD2 en donde se observaron vesículas en los bordes de la membrana eucariota (Figura 52, paneles F y G, H e I). Para el caso de *P. mirabilis* AF las células se vieron afectadas a nivel de las membranas en donde se observó la potencial formación de acúmulos de proteínas de membrana también conocidos como "ruffles".

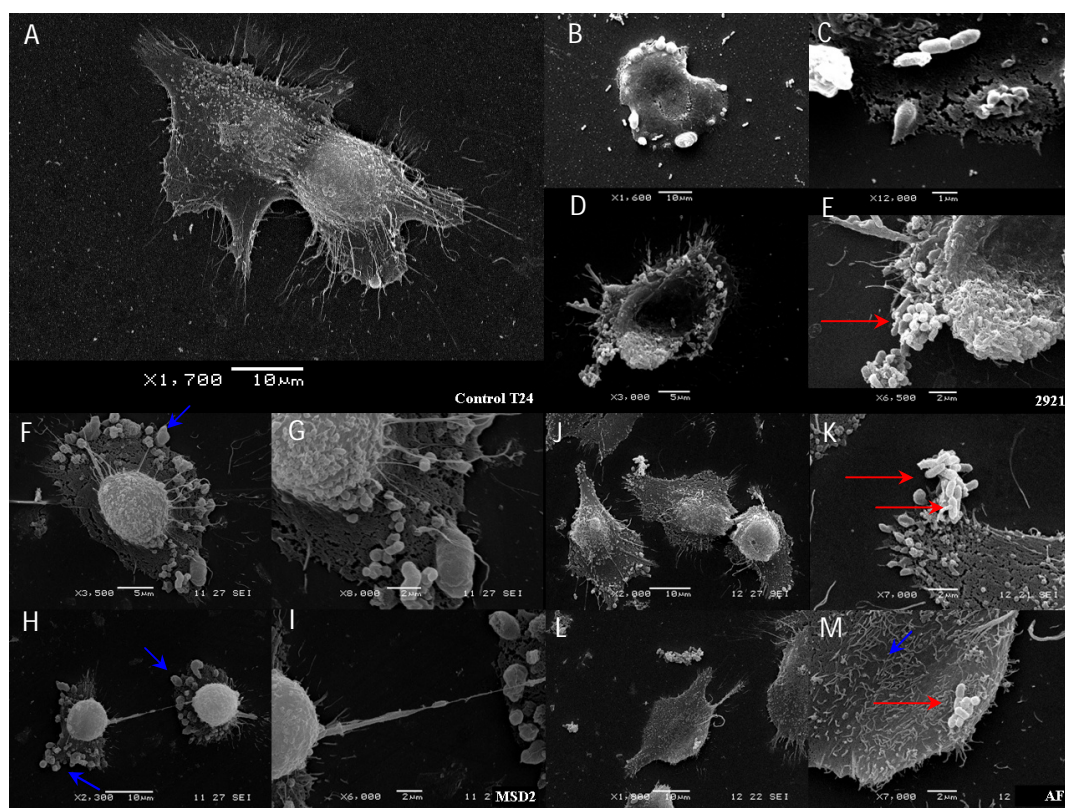


Figura 52: Imágenes del MEB. En el panel A se muestran las células T24 control sin infectar; B y C, D y E: células T24 infectadas con *P. mirabilis* 2921 a distintas magnificaciones; F y G, H e I: células T24 infectadas con *P. mirabilis* MSD2, J y K, L y M: células T24 infectadas con *P. mirabilis* AF. La magnificación empleada se muestra en cada imagen.

## Evaluación de la inducción de apoptosis

La inducción de apoptosis se evaluó a los 30 minutos de infección mediante la técnica de triple tinción, la que permite discriminar entre células apoptóticas, necróticas, presencia de *blebs* y estallidos celulares.

Primeramente se observó una reducción significativa de las células viables cuando se infectó la línea celular Vero con *P. mirabilis* 2921, *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF con respecto al control de células sin infectar ( $P \leq 0.05$  en todos los casos, Figura 53). Los resultados mostraron que la presencia de *P. mirabilis* 2921 aumentó de manera significativa el porcentaje de células apoptóticas y necróticas en relación al control sin bacterias ( $P \leq 0.05$ , Figura 53). Las tres cepas bacterianas indujeron un aumento significativo de este tipo de muerte celular respecto a las células sin infectar. Además, al comparar entre las cepas se observó que la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 indujo un porcentaje significativamente mayor de apoptosis que ambos mutantes ( $P=0.022$  para *P. mirabilis* MSD2 y  $P=0.043$  *P. mirabilis* AF). Los porcentajes de células necróticas aumentaron significativamente respecto al control sin infectar con las tres cepas de *P. mirabilis*. Las cepas *P. mirabilis* MSD2 y *P. mirabilis* AF indujeron la aparición de *blebs* en las células siendo los porcentajes significativamente mayores respecto al control sin infectar y a los porcentajes obtenidos con *P. mirabilis* 2921 ( $P=0.01$  y  $P=1 \times 10^{-6}$  respectivamente). En cuanto a la presencia de estallidos celulares las tres cepas incrementaron de forma significativa este fenómeno con respecto a las células sin infectar.

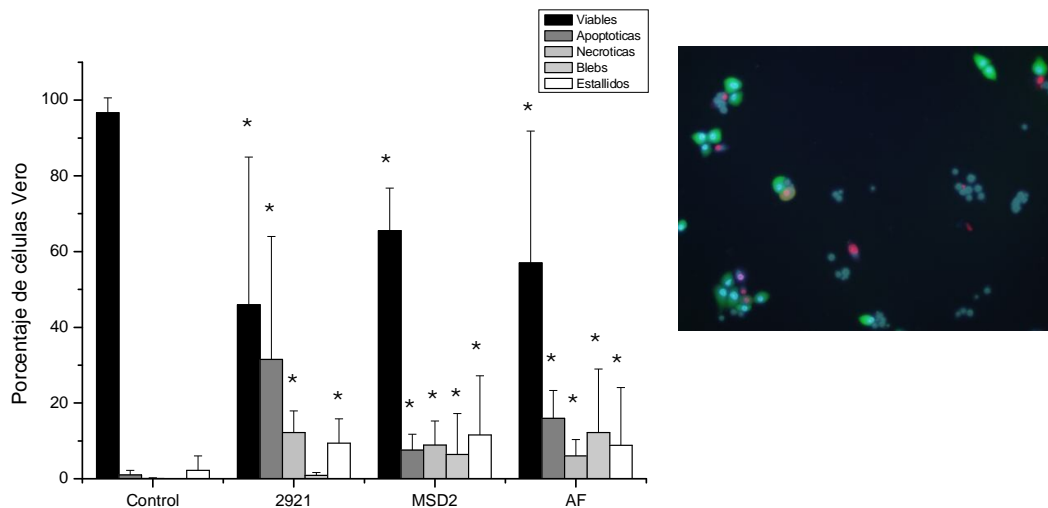


Figura 53: Evaluación de la inducción de muerte celular en células Vero. En el panel A se muestra la gráfica de los porcentajes de células viables, apoptóticas, necróticas, con *blebs* y estallidos en la línea celular Vero. El \* marca las diferencias entre el grupo y el control sin infectar ( $P \leq 0.05$ , Test de Mann-Whitney). En el panel B se muestra una imagen obtenida de la técnica de triple tinción (Ver Anexo I).

La evaluación de la inducción de apoptosis en la línea celular T24 mostró primeramente una reducción significativa de las células viables cuando se infectaron las células con cada una de las cepas de *P. mirabilis* (Figura 54). Los porcentajes de células apoptóticas se incrementaron de manera significativa cuando se empleó cualquiera de las cepas con respecto al control sin infectar, pero no se observaron diferencias significativas entre las cepas. En cuanto a las células necróticas no se observó un incremento significativo con ninguna de las cepas de *P. mirabilis* empleadas. La formación de *blebs* fue significativa con las tres cepas de *P. mirabilis* con respecto al control sin infectar. Más aún, las cepas de *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF produjeron porcentajes significativamente mayores de células con *blebs* que la cepa de *P. mirabilis* MSD2 ( $p=0.0046$  y  $P=1 \times 10^{-6}$ , respectivamente). En cuanto a la presencia de estallidos celulares se observó un incremento significativo de este fenómeno cuando se infectó la línea T24 con *P. mirabilis* MSD2 ( $P=0.042$ ) o con *P. mirabilis* AF ( $P=0.044$ ) respecto al control sin infectar aunque no así para *P. mirabilis* 2921 ( $P=0.398$ ).

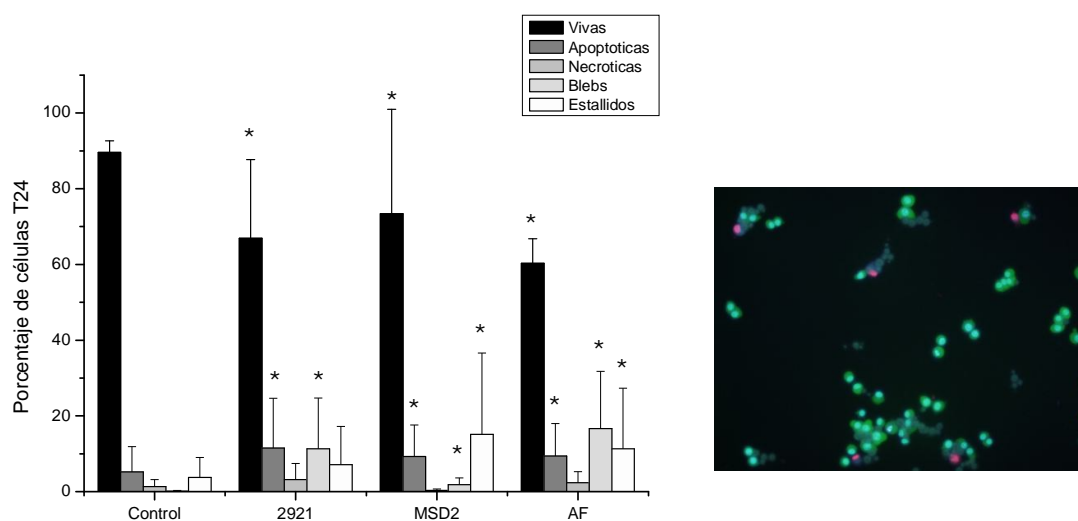


Figura 54: Evaluación de la inducción de muerte celular en células T24. En el panel A se muestra la gráfica de los porcentajes de células viables, apoptóticas, necróticas, con blebs y estallidos en la línea celular T24. El \* marca las diferencias entre el grupo y el control sin infectar ( $P \leq 0.05$ , Test de Mann-Whitney). En el panel B se muestra una imagen obtenida de la técnica de triple tinción (Ver Anexo I).

### Efecto citotóxico y genotóxico

El efecto citotóxico y genotóxico se evaluó mediante la técnica del cometa, por medio de la cual se analizó el efecto de la presencia bacteriana luego de 30 minutos de infección. Cuando existe daño a nivel del ADN en este tipo de ensayos, se visualizan los cometas con cabezas pequeñas o inexistentes y colas largas y difusas.

Por un lado se evaluó la citotoxicidad como la cantidad de células necróticas y apoptóticas en 100 células analizadas y el efecto genotóxico se expresó como el porcentaje de ADN en la cola del cometa.

Los resultados mostraron que de las tres cepas estudiadas, *P. mirabilis* 2921 tuvo el mayor efecto citotóxico sobre la línea celular T24 con valores de 11% y sobre la línea celular Vero de 7% (Tabla 6). Las cepas mutantes produjeron entre un 4 y 5% de citotoxicidad en ambas líneas celulares. En todos los casos se empleó un MOI de 10 bacterias/célula.

Tabla 6: Efecto citotóxico evaluado en 100 células.

	Vero	T24
<b><i>P. mirabilis</i> 2921</b>	7%	<b>11%</b>
<b><i>P. mirabilis</i> MSD2</b>	4%	<b>4%</b>
<b><i>P. mirabilis</i> AF</b>	5%	<b>5%</b>
<b>Control sin infectar</b>	<b>1%</b>	<b>4%</b>

El efecto genotóxico medido como el porcentaje de ADN en la cola del cometa, mostró que *P. mirabilis* 2921 indujo un 9.5 % de daño genético para la línea celular T24 y un 12.05% para la línea celular Vero ( $P \leq 0.05$ ) comparado con los controles sin infectar (Figura 55). En cuanto a la cepa mutante *P. mirabilis* MSD2, se observó un nivel de daño del 2.93% para la línea celular T24 y un 2.14% para la línea celular Vero. Estos valores no presentaron diferencias significativas con los controles respectivos sin infectar. La cepa mutante *P. mirabilis* AF produjo 7.6% de efecto genotóxico en la línea celular T24, siendo significativo respecto al control. En la línea celular Vero se observó un menor efecto genotóxico siendo los valores de 0.36% para dicha cepa mutante (Figura 55).

Al comparar el efecto genotóxico entre las cepas en la línea celular T24 se observaron diferencias significativas entre *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* MSD2 ( $P=0.02$ ) y entre *P. mirabilis* AF y *P. mirabilis* MSD2 ( $P=0.001$ ).

En la línea celular Vero no se observaron diferencias significativas entre las tres cepas de *P. mirabilis*, si bien la cepa salvaje mostró el mayor efecto genotóxico (Figura 55).

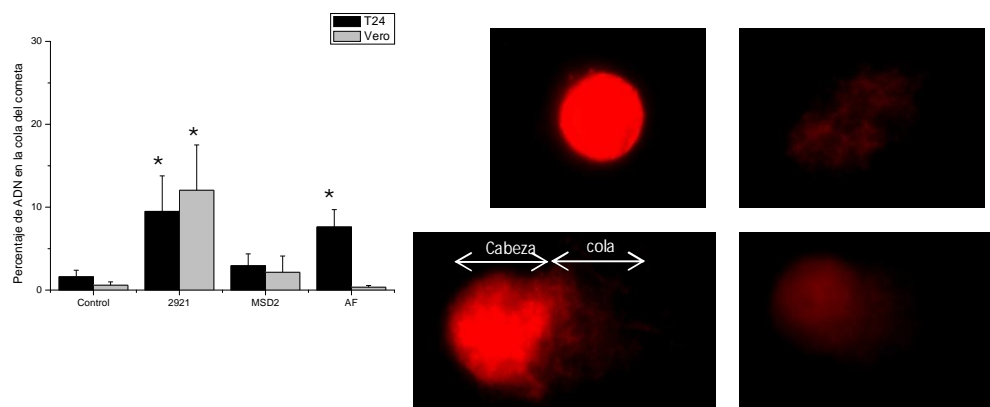


Figura 55: Evaluación del efecto genotóxico. Gráfico del porcentaje del ADN en la cola del cometa en las líneas celulares T24 y Vero infectadas con cada una de las cepas de *P. mirabilis*. Imágenes del ensayo de cometa, de derecha a izquierda en el sentido de las agujas del reloj se muestra: célula normal sin daño ni difusión, una célula apoptótica y dos células con cola de cometa. El \* muestra los casos en donde se observó diferencias significativas entre las células infectadas y sin infectar.  $P \leq 0.05$  Test de Student.

Los resultados obtenidos con la técnica de cometa confirmaron las observaciones del ensayo de apoptosis evaluado por triple tinción a través del cual se visualizó que las células T24 se afectaron por la presencia de *P. mirabilis*.

## Discusión

El objetivo del presente capítulo consistió en analizar el posible papel de las fimbrias MR/P y flagelos en la interrelación bacteria-célula eucariota. Para ello se realizaron ensayos de adhesión, invasión, apoptosis y análisis de los efectos citotóxicos y genotóxicos empleando las tres cepas de *P. mirabilis* (2921, MSD2 y AF) y dos líneas celulares (T24 y Vero).

Los resultados obtenidos mostraron que la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 posee la capacidad de adherirse y lo hace rápidamente mientras que ambas cepas mutantes tienen esta capacidad afectada. Por un lado la cepa *P. mirabilis* MSD2 no expresa la fimbria MR/P, la que claramente estaría involucrada en la adhesión a células eucariotas. En trabajos previos realizados por Zunino y colaboradores se evaluó la adhesión a células uroepiteliales (T24) por cepas mutantes para la fimbria MR/P (*P. mirabilis* PDL11), la fimbria PMF (*P. mirabilis* P2), para el doble mutante MR/P-PMF (*P. mirabilis* DM6), y la cepa salvaje (*P. mirabilis* 2921). En el mismo se observó que las 3 cepas mutantes se adhirieron de manera significativamente menor que la cepa salvaje en una relación entre las cepas mutantes respecto a la salvaje de 2:3 (Zunino *et al.*, 2007). El protocolo clásico de adhesión se realiza mediante recuento en placa de los microorganismos adheridos a las células eucariotas (Zunino *et al.*, 2001; Zunino *et al.*, 2007; Rocha *et al.*, 2007), pero como se ha descrito por varios autores, *P. mirabilis* posee la capacidad de adherirse a diferentes superficies entre ellas al vidrio y plástico (Rocha *et al.*,

2007; Schlapp *et al.*, 2011). De acuerdo a estos antecedentes procedimos a modificar el protocolo y se realizó la cuantificación de la adhesión mediante conteo de las bacterias adheridas a las células mediante microscopía óptica de las células fijadas y teñidas. Además, dado que *P. mirabilis* es capaz de producir hemolisinas, aglutininas y metaloproteasas que podrían afectar la integridad de las células eucariotas (Nielubowicz & Mobley, 2010) se realizaron varios lavados de los cultivos bacterianos para eliminar los restos de toxinas que pudieran haber en los sobrenadantes y la evaluación de la adhesión se realizó a tiempos cortos (5, 10 y 15 minutos).

A los 5 minutos ya se observaron diferencias en la adhesión entre las cepas salvaje y el mutante para flagelos *P. mirabilis* AF. A los 10 minutos estas diferencias fueron más marcadas, observándose diferencias entre la cepa salvaje y ambos mutantes, las que se mantuvieron hasta los 15 minutos. La relación de adhesión entre las cepas mutantes respecto a la salvaje fue de 10:1:1, a los 10 minutos, relación que resultó más elevada que la observada por Zunino y colaboradores (2007). Cabe destacar que los protocolos empleados no fueron los mismos así como los tiempos de adhesión. Además el empleo de esta técnica por microscopía óptica permitió confirmar los patrones de adhesión descritos por Rocha y colaboradores (2007). En dicho trabajo se observó que cepas de *P. mirabilis* aisladas de ITU presentaron el patrón de adhesión AA (adhesión agregativa). Este patrón de adhesión se caracteriza por la adhesión en bloques apilados, formando agregados de bacterias en la superficie de la célula eucariota y sobre el vidrio. La adhesión difusa se describe por la presencia de bacterias adheridas de forma indeterminada sobre la superficie celular (Scaletsky *et al.*, 1984; Nataro *et al.*, 1987). Estos patrones de adhesión han sido descritos para *E. coli* enteroagregativa (EAEC) (Nataro *et al.*, 1987) y Rocha y colaboradores observaron que las cepas aisladas de *P. mirabilis* poseían el patrón AA en la línea celular HEp-2 y que la mutación en *mrpA* en una de dichas cepas produjo un patrón de adhesión no característico con una reducción del patrón AA observado (Rocha *et al.*, 2007). Los resultados obtenidos en el presente trabajo coinciden con los de Rocha y colaboradores ya que la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 presentó el patrón AA mientras que el mutante para MR/P muestra una reducción intensa de dicho patrón y para la mutante en flagelos el patrón AA también se vio disminuido pero con tendencia a aparecer a tiempos tardíos en la adhesión. A partir de estos resultados y los de Rocha y colaboradores podemos confirmar que la presencia de la fimbria MR/P tendría un papel en el patrón de adhesión AA.

Los flagelos bacterianos son estructuras bacterianas que poseen funciones múltiples (Duan *et al.*, 2012). Entre ellas se encuentran: la motilidad (Duan *et al.*, 2012), la promoción de la formación de biofilms (O'Toole *et al.*, 2000), inducir respuestas pro-inflamatorias en el hospedero mediante la señalización vía TLR5 (Hayashi *et al.*, 2001), la translocación de



proteínas de virulencia a la célula hospedera a través de un SST3 especial (Konkel *et al.*, 2004) y promover la adhesión actuando como adhesinas bacterianas (Arora *et al.*, 1998). Los resultados de adhesión evidenciaron el papel de los flagelos de *P. mirabilis* en la adhesión y movilidad, dado que a los 5 minutos ya se observan diferencias significativas entre la cepa mutante *P. mirabilis* AF y la salvaje *P. mirabilis* 2921. Estas diferencias posiblemente se deban a que la bacteria, al no tener flagelos, demora más en aproximarse a la monocapa. Dado que las diferencias se mantienen durante todo el tiempo evaluado podríamos inferir un papel de los flagelos en la adhesión.

La adhesión a la línea celular T24, proveniente de carcinoma de epitelio de transición de vejiga humana, resultó menor a la observada en la línea celular Vero, la cual es de células de riñón. Estos resultados podrían en parte explicarse por la afinidad que posee *P. mirabilis* por el tracto urinario alto en donde causa daño renal severo (Senior, 1978). Los receptores celulares involucrados en la adhesión de *P. mirabilis* no han sido caracterizados y posiblemente expliquen las diferencias observadas tanto *in vitro* en los ensayos de adhesión entre las líneas celulares, así como los resultados *in vivo* en donde hay una predilección del TU alto comparado por ejemplo con las UPEC productoras de ITU bajas (Eto *et al.*, 2006).

Diversos trabajos han reportado distintos aspectos de la capacidad de *P. mirabilis* de invadir líneas celulares. Oelschlaeger & Tall (1996) establecieron la existencia de diferencias importantes en la eficiencia de internalización de cepas de *P. mirabilis* de distintos orígenes (fecal vs. urinarias) dependiendo además de las líneas celulares empleadas (Oelschlaeger & Tal, 1996). Los mecanismos de internalización empleados por las células eucariotas también dependen y varían según la línea celular empleada. Para estos autores los microfilamentos intactos resultarían importantes para la internalización de los aislamientos de origen urinario. En trabajos más recientes Alamuri y colaboradores (2010) identificaron y caracterizaron una proteína designada como AipA (*Adhesion and invasión mediated by the Proteus autotransporter*) la cual media la adhesión e invasión en células uroepiteliales humanas (HEK293) (Alamuri *et al.*, 2010). En UPEC las fimbrias de tipo 1 median la adhesión a células del uroepitelio vesical y se ha demostrado en particular que FimH (la adhesina fimbrial) actúa también como invasina, promoviendo la entrada de las bacterias en las células epiteliales de la vejiga, mastocitos y macrófagos (Baorto *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos de invasión de *P. mirabilis* indican que tanto las fimbrias MR/P como los flagelos resultan necesarios pero este proceso. *P. mirabilis* no es una bacteria intracelular estricta pero como ya han demostrado otros autores posee la capacidad de invadir las células eucariotas y probablemente éste sea un mecanismo de evasión de la respuesta inmune en el tracto urinario. Si bien la ausencia de las fimbrias MR/P y los flagelos no imposibilitó el ingreso



de *P. mirabilis* en las células, los mutantes evidenciaron una disminución significativa de la invasión tanto en la línea celular de vejiga como en la de riñón.

La observación del ensayo de invasión al MLC permitió la visualización de varios fenómenos no descriptos para *P. mirabilis* hasta el momento. Uno de las observaciones consistió en la localización de la cepa salvaje de *P. mirabilis*, la cual se encontró muy próxima al núcleo eucariota. Varios patógenos bacterianos poseen mecanismos para alterar el ciclo celular a través de toxinas y efectores bacterianos los cuales han sido denominados ciclomodulinas (Oswald *et al.*, 2005). Éstas actúan como moduladores genéticos o epigenéticos los cuales se translocan al núcleo. Recientemente se ha denominado a esta familia de factores bacterianos nucleares como nucleomodulinas (Bierne & Cossart, 2012). Una estrategia más directa para influenciar la fisiología nuclear consiste simplemente en invadir el núcleo eucariota. Hasta ahora esta propiedad ha sido reportada en bacterias intracelulares parasitarias en relación simbiótica con las células eucariotas. Las bacterias del género *Holospora* ya habían sido encontradas en el núcleo de cilios por Hafkine en 1890. Estas bacterias endonucleares invaden tanto el macro como micronúcleo de varias especies de *Paramecium* (Fujishima, 2009; Goertz, 2010), pero cómo lo hacen es aún un tema de debate. Diversos estudios sugieren que el direccionamiento hacia el núcleo se daría vía fagosomas que se fusionarían con la envoltura nuclear (Ossipov & Podlipaev, 1977; Görtz & Wiemann, 1989; Fokin *et al.*, 2003). Sin embargo, datos recientes respaldan los mecanismos mediados por actina, y en particular de una proteína bacteriana que contiene motivos de unión a actina la cual sería usada por *Holospora* para moverse del citoplasma al núcleo (Iwatani *et al.*, 2005; Sabaneyeva *et al.*, 2009). *Rickettsia rickettsii* es capaz de generar colonias endonucleares en el núcleo de las células de humanos (Burgdorfer *et al.*, 1968; Ogata *et al.*, 2006). Cómo esta bacteria llega al núcleo aún no ha sido completamente caracterizado, pero la motilidad mediada por la polimerización de actina podría estar involucrada en el tráfico hacia el núcleo (Ogata *et al.*, 2006). Las bacterias endonucleares no tienen efectos obvios sobre la capacidad de división celular. Una hipótesis plausible sería que las bacterias se ubican próximas al núcleo para explotar este medio ambiente rico en nutrientes así como ser protegidas de los sensores inmunes citosólicos y del ataque lisosomal (Bierne & Cossart, 2012). Además, estarían en lugar apropiado para reprogramar la expresión de genes del hospedero para favorecer su parasitismo. Un estudio reciente demostró la transferencia de ADN de *Holospora* del micro núcleo al macro núcleo de paramecios infectados disparando la sobre expresión de genes que codifican para proteínas de resistencia térmica (Hori *et al.*, 2008). Por otro lado las nucleomodulinas pueden causar enfermedades colaterales como inflamación crónica, desordenes autoinmunitarios y cáncer. Estos efectos adversos presumiblemente dependan de la capacidad de las nucleomodulinas para dejar huellas permanentes en las células más allá de la infección.

Otra observación obtenida a partir de las imágenes de MLC fue la presencia de actina sobre las bacterias, tanto en las que se encontraron dentro de la célula como en bacterias extracelulares. Los patógenos intracelulares han desarrollado una variedad de mecanismos para la invasión de células de mamíferos, los de tipo *trigger* (empleado por *Salmonella* y *Shigella*) y de cremallera o *zipper* (empleado por *Yersinia* y *Listeria*) (Cossart & Sansonetti, 2004). Los mecanismos del tipo *trigger* se caracterizan por la formación de dominios ricos en actina en el sitio de adhesión bacteriana. *Shigella* y *Salmonella* utilizan proteínas efectoras y translocadoras de los SST3 para modular los dominios de la membrana y la formación de bolsillos de macropinocitos (Patel & Galan, 2006; Tran Van Nhieu *et al.*, 1999). El reclutamiento de actina en la superficie de patógenos intracelulares ha sido descrito y está mediado por proteínas de membrana externa; por ejemplo en *Shigella* y *Listeria* las proteínas ICSA/VirG y ActA, respectivamente, disparan la polimerización de la actina y la motilidad (Cossart, 1995). En bacterias extracelulares como EPEC se ha visto la formación de pedestales extracelulares dependientes del efector Tir de los SST3 (Kenny *et al.*, 1997). La interacción de Tir con la proteína intimina dispara el reclutamiento del adaptador Nck, el cual recluta y activa N-WASP generando el reclutamiento de Arp2/3 y la subsiguiente polimerización de actina (Kenny *et al.*, 1997, Campellone *et al.*, 2002; Lommen *et al.*, 2001). Los mecanismos de *P. mirabilis* en la invasión y la movilidad dentro de la célula eucariota no han sido extensivamente estudiados pero los resultados observados en la presente tesis mostraron el potencial involucramiento de la actina en alguno de estos mecanismos.

En cuanto a la asociación de las bacterias con las células eucariotas, se observó que *P. mirabilis* 2921 se adhiere en grupos. Estos resultados se observaron tanto en los ensayos de adhesión, confirmando el patrón de adhesión agregativo, como en los ensayos de invasión visualizados mediante MLC. La interacción con las células hospederas formando estructuras multicelulares es una característica común entre las bacterias patógenas y ha sido frecuentemente observado *in vivo* (Menozzi *et al.*, 1994). Muchas bacterias patógenas se adhieren a la superficie celular formando microcolonias o agregados. Estos tipos de asociación se relacionan además con la capacidad de las bacterias de formar biofilms. Es ya conocida la capacidad de *P. mirabilis* de formar biofilms sobre superficies abióticas como los catéteres urinarios (Stickler *et al.*, 1993). En otro patógeno que posee la capacidad de formar biofilms como es *Pseudomonas aeruginosa*, se observó que la bacteria se adhiere a los cultivos celulares formando agregados. Estos agregados son internalizados mediante protrusiones de la membrana de la célula eucariota (Lepanto *et al.*, 2011). Si bien no se observó la formación de protrusiones de las membranas plasmáticas, sí se observó en reiteradas imágenes la presencia de grupos de bacterias sobre e ingresando a la célula.

Uno de los mecanismos de defensa inmunitaria intrínsecos de los organismos multicelulares consiste en sacrificar a la célula infectada en beneficio del resto de las células. Los mecanismos conocidos de muerte celular incluyen apoptosis, necrosis y piroptosis, los cuales son mecanismos de defensa críticos frente a las infecciones microbianas (Lamkanfi & Dixit, 2010). Las células fagocíticas profesionales juegan un rol esencial en sensar las bacterias mediante el reconocimiento de PAMPs o DAMPs (*Danger-associated molecular patterns*) a través de diversos receptores de reconocimiento de patógenos (PRR) entre los que se encuentran los TLR, los de tipo NOD, RIG-I y del tipo lectinas C entre otros (Chen & Nuñez, 2010, Davis *et al.*, 2011). Estos sensores disparan respuestas innatas e incrementan las respuestas de defensa antimicrobianas. Los fagocitos activados en respuesta a la infección fagocitan eficientemente los microorganismos y los transportan a los fagolisosomas en donde son degradados (Ashida *et al.*, 2011). Las células fagocíticas no profesionales como las células epiteliales también actúan como una línea de defensa contra los microorganismos usando varios PRR que reconocen PAMPs y DAMPs. Las células epiteliales que sensan la infección microbiana disparan respuestas de estrés oxidativo, mitocondrial, ER, ADN, respuestas inflamatorias, autofagia, muerte celular y exfoliación (Lamkanfi & Dixit, 2010). Por otro lado, las bacterias han desarrollado mecanismos para manipular las células hospedadoras, mediante el tráfico de membranas, remodelando las vacuolas, modulando la muerte celular, prolongando la longevidad del compartimento replicativo, entre otros, con el fin de sobrevivir y multiplicarse (Kumar & Valdivia, 2009). En ITU producidas por UPEC se ha observado que la apoptosis del urotelio es un evento importante en la patogénesis de las ITU. Mulvey y colaboradores observaron que inhibiendo la apoptosis se reducía la eliminación de la infección por UPEC NU14, lo que sugiere que la apoptosis del urotelio es un mecanismo de defensa para promover la eliminación del patógeno (Mulvey *et al.*, 2001). Sin embargo, otro estudio sugiere que la bacteria se beneficia con la apoptosis de las células superficiales para tener acceso a las capas más internas del tejido y poder establecer reservorios bacterianos (Mysorekar *et al.*, 2002). En el caso de *P. mirabilis* hemos observado que la bacteria es capaz de inducir apoptosis en los cultivos celulares, siendo esta la primera aproximación que muestra que este patógeno urinario posee dicha capacidad y que la ausencia de fimbrias MR/P y flagelos disminuyó la muerte celular. Además, para complementar los ensayos de efecto citotóxico sobre las células se evaluó el efecto genotóxico, observándose que *P. mirabilis* 2921 produce genotoxicidad en las líneas celulares y que las cepas mutantes para MR/P y flagelos producen menor efecto.

En resumen, hemos demostrado que las fimbrias MR/P y los flagelos de *P. mirabilis* estarían involucrados en la adhesión e invasión de las células eucariotas. La cepa de *P. mirabilis* 2921 se adhirió de acuerdo a un patrón del tipo agregativo y este mismo se observó durante la invasión de las células. Además, *P. mirabilis* generó daño en las células eucariotas a nivel de las

membranas y a nivel genético, describiéndose en particular la inducción de apoptosis como uno de los mecanismos de muerte celular que se inducen por la presencia de este uropatógeno. Tanto las fimbrias MR/P y los flagelos podrían estar involucrados en la inducción de apoptosis, posiblemente relacionándose con los receptores celulares que luego mediante transducción de señales y cascadas intracelulares inducen la apoptosis. No sólo se observó la inducción de apoptosis sino que además se evaluó el efecto genotóxico de *P. mirabilis*, encontrándose que esta bacteria induce daño a nivel del ADN.

### **Capítulo 3.- Papel de los flagelos como inmunoadyuvantes de mucosas en coinmunizaciones con proteínas fimbriales.**

La respuesta inmune que se desarrolla en respuesta a la entrada de uropatógenos en el TU es particularmente compleja. Entre los mecanismos de inmunidad, la inflamación tendría un papel importante en las ITU. El papel de los distintos mecanismos en la respuesta inmune adaptativa en la resolución de la infección es actualmente un tema de debate. A partir de la entrada de uropatógenos se produce una respuesta temprana que incluye el reclutamiento y activación de células efectoras en el sitio de infección, resultando en una respuesta inflamatoria cuya magnitud y localización explica muchas de las manifestaciones clínicas de las ITU (Kunin, 1987). Esta respuesta depende de receptores celulares que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). Estos son altamente conservados en distintos microorganismos (Schilling *et al.*, 2001) y pueden ser reconocidos por el sistema inmune innato que limita la acción de los mecanismos de evasión microbiana y permite la detección del agente infeccioso a partir de un número limitado de receptores celulares. Se ha determinado que la detección de los PAMP por los TLR es crucial para la activación de la respuesta inmune innata así como para el control de la respuesta inmune adaptativa que se produce posteriormente (Bowie *et al.*, 2005). Varios trabajos han demostrado que las células epiteliales de la vejiga, al igual que los macrófagos, expresan TLR4, el cual media una respuesta rápida de citoquinas frente a bajas concentraciones de LPS (Bäckhed *et al.*, 2003; Schilling *et al.*, 2001). En macrófagos el reconocimiento de los LPS requiere de un co-receptor CD14 (Wright *et al.*, 1990), el cual no está presente en células epiteliales. Se ha demostrado también que TLR4 reconoce a las fimbrias que median la adhesión bacteriana independientemente de la presencia del co-receptor CD14 (Fredeus *et al.*, 2001). El TLR5 es capaz de reconocer la flagelina de bacterias Gram negativas, modulando tanto la respuesta inmune innata como adaptativa (Honko & Mizel, 2005). Cuando se empleó flagelina de *Salmonella* enterica en ensayos de coinmunización con antígenos de *Yersinia pestis*, se observó un potente efecto adyuvante en el desarrollo de una respuesta inmune humoral contra *Y. pestis* tanto en un modelo murino como en primates (Honko *et al.*, 2006). Los mismos autores plantean en un trabajo previo que la flagelina podría ser considerado un adyuvante seguro pues no observaron inflamación sistémica ni local luego de la inmunización intranasal en ratones (Honko & Mizel, 2004). Además del potencial rol adyuvante de la flagelina se ha postulado que ésta podría inducir proliferación y entrada en el ciclo celular de cultivos de fibroblastos (Hasan *et al.*, 2005). De acuerdo a Vijay-Kumar y colaboradores, la flagelina de *Salmonella* spp. tendría un papel dominante en la activación no solo de la inflamación sino directamente sobre la expresión de genes anti-apoptóticos y una gran variedad de otros mecanismos citoprotectores (Vijay-Kumar *et al.*, 2006).

El papel de la respuesta inmune adaptativa en la resolución de las ITU es aún discutido y limitado (Nielubowicz & Mobley, 2010). Existen evidencias de que la eliminación de UPEC estaría mediada por anticuerpos (Svanborg & Svennerholm, 1978). Tampoco es claro si la respuesta inmune estaría sesgada al tipo  $T_H-1$  o  $T_H-2$  y el papel de las células  $T_{REG}$  no ha sido dilucidado aún (Nielubowicz & Mobley, 2010).

En trabajos previos realizados en nuestro Departamento se ha visto que la proteína estructural de la fimbria MR/P (MrpA) es capaz de inducir una respuesta de anticuerpos IgG e IgA cuando se inmunizaron ratones intranasalmente. Además, los animales mostraron una disminución significativa de la infección por *P. mirabilis* cuando fueron desafiados intravesicalmente (Scavone *et al.*, 2004). Sin embargo, no se pudo establecer una correlación entre la inducción de anticuerpos específicos y la reducción de la colonización bacteriana. Cabe destacar que si bien se redujo la infección de forma significativa en ninguno de los casos se obtuvo una prevención total de la infección.

Si bien estos resultados son sumamente alentadores, la protección no fue total por lo que el uso de adyuvantes de mucosas podría potenciar tanto la respuesta inmune como la protección en el TU. En un trabajo reciente hemos observado que la modulación de la respuesta inmune en el TU resulta compleja pues la inclusión de un potente adyuvante de mucosas (como la toxina colérica), si bien potenció la respuesta de anticuerpos, no se observó una mayor protección de los animales (Scavone *et al.*, 2009). La estrategia de evaluar la flagelina de *P. mirabilis* como adyuvante resulta interesante pues se estarían empleando dos antígenos del mismo microorganismo y uno con potencial de aumentar la respuesta inmune que se desarrolle contra los mismos.

El objetivo del presente capítulo consistió en evaluar la respuesta inmune inducida por la inmunización de ratones con flagelina y la proteína MrpA. Hasta el momento no se ha estudiado esta capacidad en la flagelina de *P. mirabilis*. De acuerdo a los resultados previos nos planteamos realizar la inmunización intranasal con la proteína fimbrial MrpA y con flagelina de *P. mirabilis* como adyuvante. El protocolo de inmunización fue el empleado hasta el momento en nuestro Depto; el cual consistió en 5 dosis a los días 0, 3, 10, 17 y 24. Luego de finalizado el protocolo de inmunización, los animales fueron desafiados transuretralmente con *P. mirabilis* y se evaluaron los niveles de infección en el TU, la inducción de anticuerpos específicos en suero y orina y la producción de citoquinas en células de esplenocitos re-estimuladas con MrpA y flagelina.

## Resultados

### Obtención y purificación de MrpA y flagelina de *P. mirabilis*

Cuando se analizaron los extractos de proteínas totales de la cepa de *E. coli* BL21( $\lambda$ DE3)pEM1 obtenidos antes y después de la inducción con IPTG por SDS-PAGE se observó una banda intensa con respecto al extracto bacteriano de la cepa de expresión sin inducir (Figura 56, panel A), la que correspondió con el peso molecular predicho de MrpA (17.5 kDa). La proteína MrpA recombinante se purificó en columnas de agarosa Ni-NTA y el líquido eluido luego del agregado de imidazol se colectó para su análisis por SDS-PAGE.

Por otro lado, una vez finalizado el protocolo de purificación de flagelina como se describió en materiales y métodos se realizó un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes al 10% (Figura 56, panel B). En la Figura 56 se muestran los gels de poliacrilamida en donde se pudo observar la presencia de la banda con el peso esperado para MrpA de unos 17.5 KDa (Figura 55 carril 4) y para flagelina de aproximadamente 41 KDa (Figura 56, carril 2).

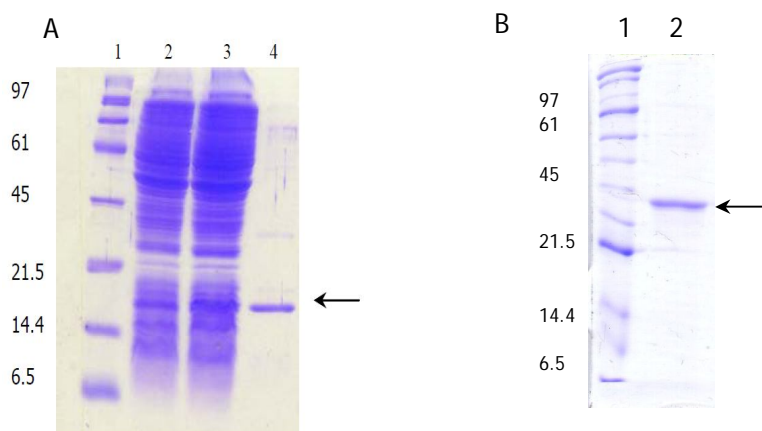


Figura 56: SDS-PAGE control de purificación de las proteínas MrpA y flagelina de *P. mirabilis*. En panel A se muestra el SDS-PAGE 15% , en el cual se colocó en el carril 1 el marcador de peso molecular (kDa), en 2 el extracto total de *E. coli* antes de la inducción, en 3 extracto total de *E. coli* luego de la inducción y en 4 la proteína purificada. En el panel B se muestra SDS-PAGE 10% en el cual se colocó el marcador de peso molecular y flagelina de *P. mirabilis* (1 y 2 respectivamente). Las flechas indican las bandas correspondientes a las proteínas.

### Inducción de la producción de anticuerpos específicos en suero y orina

La inducción de la producción de anticuerpos específicos anti-MrpA y anti-flagelina se evaluó mediante ELISA a los 30 días de finalizado el protocolo de inmunización. El incremento relativo en los anticuerpos específicos se calculó realizando el cociente de los valores de absorbancia a tiempo 30 y tiempo 0 para cada animal. Para cada grupo se calcularon los



promedios y desvíos estándares de los valores de AbsT30/AbsT0 para cada grupo de animales. Los resultados se muestran en la Figura 57 y 58.

Al analizar la respuesta de anticuerpos en suero se observó que los animales inmunizados con la proteína MrpA mostraron un incremento significativo en las IgG específicas anti-MrpA comparado con los animales control (PBS) y con los inmunizados con flagelina o MrpA-flagelina ( $P \leq 0.05$  en todos los casos). En cuanto a los valores de IgA en suero se observaron bajos niveles en todos los grupos de animales. En cuanto a los valores de anticuerpos en orina se observó un incremento en IgG anti-MrpA en los animales inmunizados con MrpA con respecto a los valores de los animales control PBS y los de los MrpA-Fla. No se observaron diferencias significativas entre los valores de IgG en orina de los animales tratados con flagelina y los inmunizados con MrpA pero sí se observaron diferencias significativas entre los valores de IgG en orina de los animales inmunizados con MrpA con respecto a los inmunizados con MrpA-Fla y PBS. En cuanto a los valores de IgA anti-MrpA en orina se observó un aumento de IgA únicamente en el grupo de animales inmunizados con MrpA respecto a los demás grupos tratados (PBS, Fla y MrpA-Fla). Interesantemente los animales inmunizados con MrpA-Fla no presentaron IgA específicas anti-MrpA en orina.

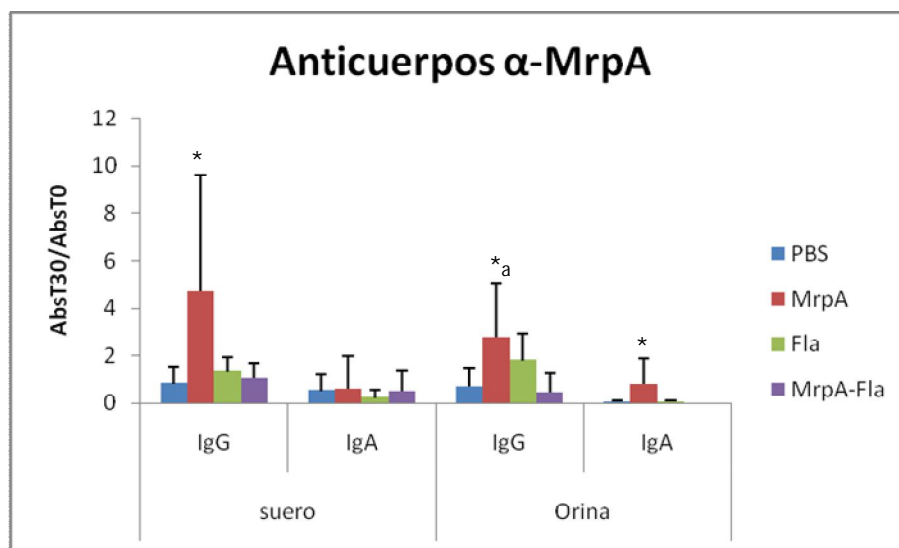


Figura 57: Gráfico de los valores de absorbanciaT30/absorbanciaT0 de anticuerpos (IgG e IgA) anti-MrpA en suero y orina . Las barras representan los promedios para cada grupo con sus respectivos desvíos estándares. El \* indica los casos en donde hubo diferencias significativas con respecto a los demás grupos, \*a indica diferencias significativas respecto a PBS y MrpA-Fla ( $P \leq 0.05$ , Test Duncan).

También se evaluó la inducción de anticuerpos específicos anti-flagelina. Los resultados no mostraron diferencias significativas en los valores de IgG en suero entre ninguno de los grupos

inmunizados. El grupo de animales que presentó los valores más elevados de IgG en suero fue el inmunizado con MrpA, lo que estaría evidenciando cierta reactividad cruzada entre los anticuerpos específicos para MrpA y flagelina (Figura 58). Al analizar la inducción de IgA en suero no se obtuvieron valores detectables de IgA contra flagelina en ninguno de los grupos tratados. Lo mismo se observó en orina al evaluar la inducción de IgG e IgA específicas contra flagelina (Figura 58)

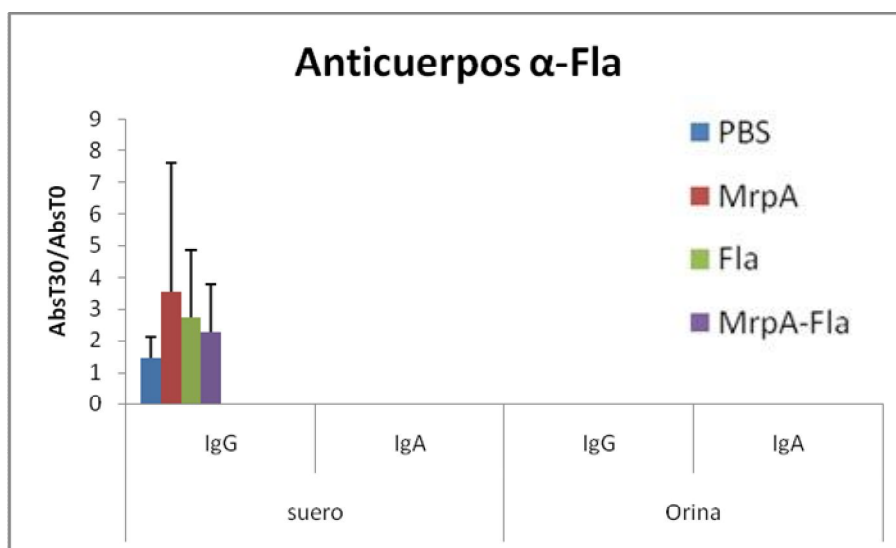


Figura 58: Gráfico de los valores de absorbanciaT30/absorbanciaT0 de anticuerpos (IgG e IgA) anti-Fla en suero y orina. Las barras representan los promedios para cada grupo con sus respectivos desvíos estándares. Para IgA en suero y para IgG e IgA en orina no se detectaron valores cuantificables de dichos anticuerpos.

### Colonización bacteriana del tracto urinario

Para evaluar el potencial papel adyuvante y protector de la flagelina, los distintos grupos de animales se desafiaron con *P. mirabilis* 2921 empleando el modelo de infección experimental ascendente una semana después de la última inmunización con una suspensión bacteriana de  $2 \times 10^8$  ufc/animal. Los recuentos de ufc en riñones y vejigas correspondientes a los distintos grupos de ratones se muestran en las Figuras 59 y 60, respectivamente. Al analizar la cantidad de ufc recuperadas de riñones se observó una disminución significativa en el grupo inmunizado con MrpA con relación al grupo control tratado con PBS ( $P=0.01$ ). En el caso de las bacterias recuperadas de los animales inmunizados con flagelina y co-inmunizados con MrpA-flagelina no se observaron disminuciones significativas con respecto al grupo control PBS ( $P=0.2$  y  $0.24$  respectivamente, Figura 59)

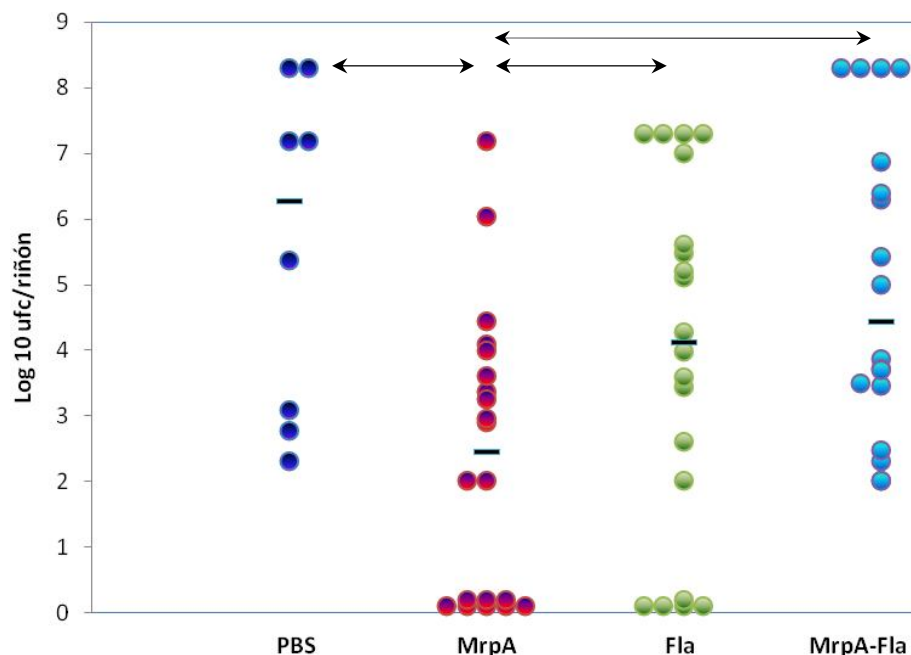


Figura 59: Gráfico de los valores de  $\text{Log}_{10}$  ufc recuperadas de riñones de los ratones tratados con PBS, MrpA, Fla (Flagelina) y MrpA-Fla. Los puntos expresan el  $\text{log}_{10}$  correspondiente a cada uno de los recuentos obtenidos en los riñones de los ratones de los distintos grupos. Las barras corresponden a las medianas de los valores de  $\text{log}_{10}$  ufc de cada uno de los grupos. Las flechas indican los casos en donde se obtuvieron diferencias significativas con el test de Mann-Whitney ( $P \leq 0.05$ ).

Al comparar los valores de ufc recuperadas de riñones de los animales del grupo inmunizado con MrpA comparados con el grupo tratado con flagelina o el co-inmunizado con MrpA-flagelina se observó que ambos grupos exhiben valores significativamente elevados con respecto a los obtenidos en el grupo MrpA ( $P=0.05$  y  $P=0.04$ , respectivamente).

Cuando se analizó la cantidad de ufc recuperadas de vejigas se observó una disminución significativa de los recuentos en el grupos de animales inmunizados con MrpA respecto al grupo control PBS ( $P=0.038$ ). Los otros dos grupos de animales inmunizados con flagelina y co-inmunizados con MrpA y flagelina no mostraron diferencias significativas con respecto al grupo control PBS ( $P=0.84$ ,  $P=0.57$ ). Nuevamente se observó que el grupo de animales inmunizados con flagelina mostró un aumento significativo de la colonización bacteriana a nivel de vejigas comparado con MrpA ( $P=0.02$ ). En el caso de los animales co-inmunizados si bien la diferencia con MrpA no fue significativa ( $P=0.08$ ) los recuentos fueron más elevados en dicho grupo que en los observados en el grupo inmunizado con MrpA (Figura 60).

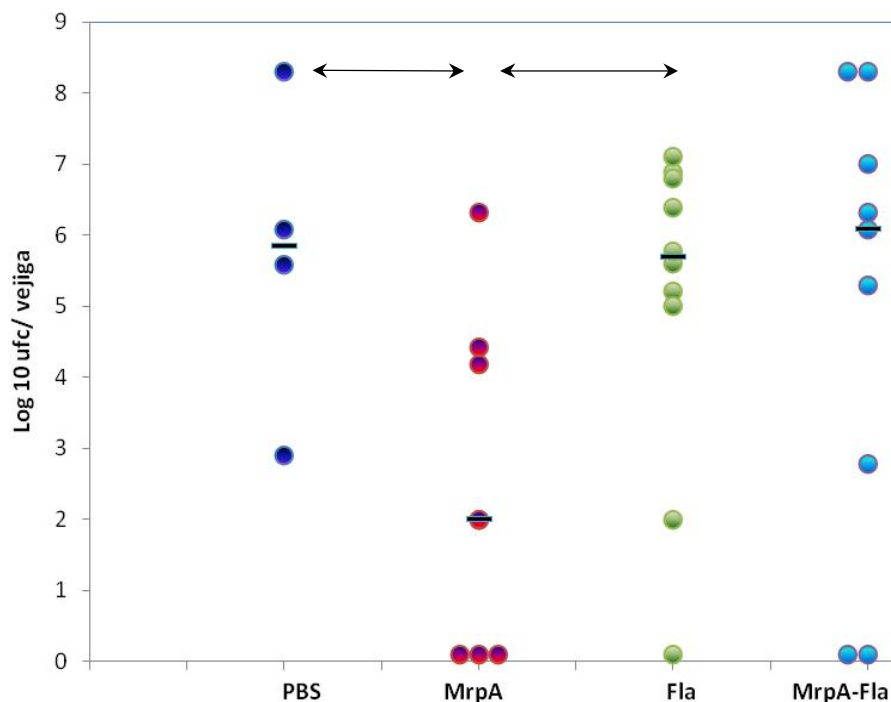


Figura 60: Gráfico de los valores de  $\text{Log}_{10}$  ufc recuperadas de vejiga de los ratones tratados con PBS, MrpA, Fla (Flagelina) y MrpA-Fla. Los puntos expresan el  $\text{log}_{10}$  correspondiente a cada uno de los recuentos obtenidos en las vejigas de los ratones de los distintos grupos. Las barras corresponden a las medianas de los valores de  $\text{log}_{10}$  ufc de cada uno de los grupos. Las flechas indican los casos en donde se obtuvieron diferencias significativas con el test de Mann-Whitney ( $P \leq 0.05$ ).

Con los valores obtenidos de anticuerpos específicos se estimaron las correlaciones con los valores de ufc recuperadas en riñones y vejigas para cada animal. En ninguno de los casos se observó correlación significativa entre la inducción de anticuerpos y la disminución de la infección en riñones y vejigas a nivel individual.

### Inducción de citoquinas en células de esplenocitos re-estimuladas con MrpA y flagelina

La producción de citoquinas se evaluó en los esplenocitos de los animales tratados una vez finalizado el protocolo de inmunización, inmediatamente antes de la infección experimental. Estos animales no fueron incluidos por lo tanto en el ensayo de ITU experimental pues el efecto que se pretende analizar es el de la inmunización y no el de la infección por *P. mirabilis*.

Una vez obtenidos los esplenocitos de tres animales por grupo, se re-estimularon con la proteína recombinante MrpA (5  $\mu\text{g}$ ) y con flagelina (5  $\mu\text{g}$ ), luego de lo cual se evaluó la producción de citoquinas IL-10, IL-4 e IFN- $\gamma$  mediante ELISA. Los esplenocitos provenientes de los animales inmunizados con MrpA se re-estimularon por separado con MrpA o flagelina, lo mismo se realizó en los provenientes de los animales inmunizados con flagelina y con MrpA-flagelina.

Al analizar la producción de IL-10 pudimos observar que el grupo de animales tratados con flagelina y cuyos esplenocitos fueron re-estimulados *in vitro* con flagelina (5  $\mu$ g) tuvieron un aumento significativo de la producción de dicha citoquina con respecto a las células re-estimuladas con MrpA 5 $\mu$ g y a las no estimuladas ( $P=0.0006$ ,  $P=0.0004$ , figura 61).

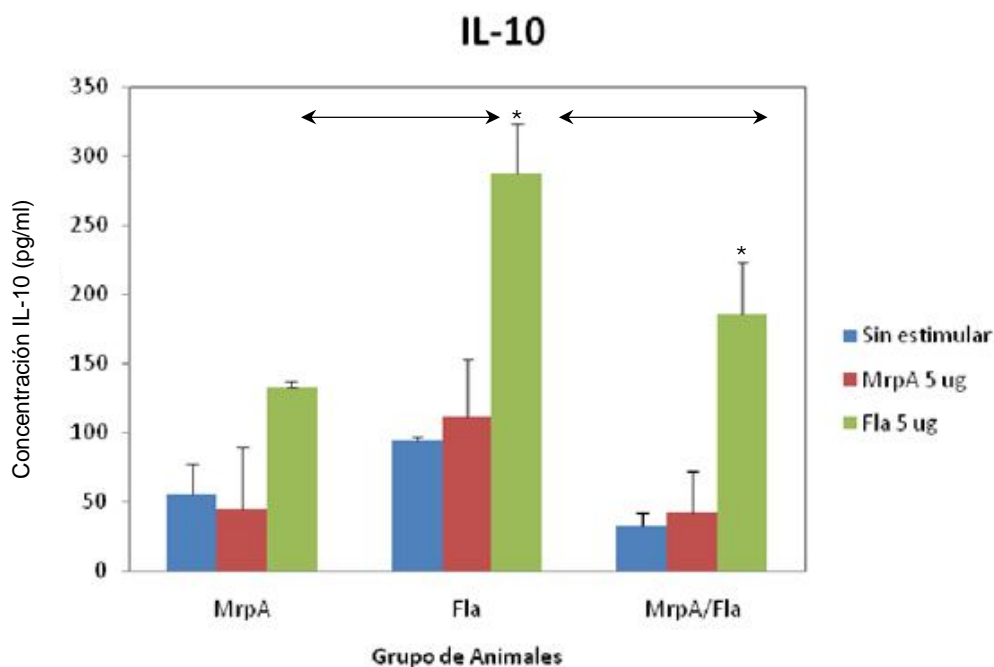


Figura 61: Inducción de la producción de IL-10 en esplenocitos de ratones inmunizados y re-estimulados con 5  $\mu$ g de MrpA, 5  $\mu$ g de flagelina y sin estimular (control negativo) previo al desafío con *P. mirabilis*.

La misma situación se observó en los esplenocitos de los animales co-inmunizados con MrpA-flagelina. En este caso, la re-estimulación con 5  $\mu$ g de flagelina produjo un incremento significativo en la producción de IL-10 con respecto a la producción en los esplenocitos sin estimular y re-estimulados con MrpA 5  $\mu$ g ( $P=0.0007$ ,  $P=0.001$  respectivamente).

En el caso de los animales inmunizados con MrpA se observó que los esplenocitos re-estimulados con 5  $\mu$ g de flagelina tuvieron un aumento en la producción de IL-10 pero no resultó significativo con respecto a la producción de dicha citoquina por los esplenocitos sin estimular y estimulados con MrpA (5 $\mu$ g).

Si se comparan los valores de IL-10 producidos por la re-estimulación con 5  $\mu$ g de flagelina se observa que los animales previamente inmunizados con flagelina sola son los que produjeron una mayor concentración de la citoquina. Las células re-estimuladas con 5  $\mu$ g de MrpA produjeron 3 veces menos de IL-10 que frente a la estimulación con flagelina. Las concentraciones de IL-10 producidas por el estímulo con MrpA fueron similares a las obtenidas

en las células sin re-estimular (en estado basal). Además, los animales inmunizados con flagelina presentaron niveles basales de IL-10 significativamente más elevados que los inmunizados con MrpA y con MrpA-flagelina ( $P=0.01$  y  $P=0.001$ ).

Para el caso de la producción de IFN- $\gamma$  e IL-4 luego de la re-estimulación de los esplenocitos de los animales tratados no se observó inducción de las citoquinas en ninguno de los casos (datos no mostrados).

## **Discusión**

Las ITU son generalmente tratadas con antibióticos y aunque resultan efectivos en los casos de ITU no complicada son menos exitosos en los casos de ITU complicada, cepas resistentes a antibióticos, pacientes cateterizados o con anomalías en el TU (Johnson, 1996). Uno de los efectos adversos de la antibioticoterapia es la emergencia y el rápido incremento de la resistencia a antibióticos. Las causas de esto radican en la presión selectiva de las sustancias antimicrobianas en diversos ambientes lo que genera la emergencia de clones bacterianos resistentes, los cuales luego se diseminan (Wagenlehner & Naber, 2004). Dada esta situación la generación de estrategias preventivas resulta imperiosa.

Diversos autores han sugerido que la recuperación de una ITU no genera inmunidad protectora natural, lo cual ha sido demostrado mediante electroforesis in campo pulsado observándose que en ITU recurrentes la cepa fue la misma que causó la infección original. Las ITU no son como otras infecciones mucosales en donde una sola exposición al agente etiológico resulta en inmunidad protectora de por vida. Es más, la resolución de una ITU no produce inmunidad protectora frente a futuros episodios (Russo *et al.*, 1995).

En particular, *P. mirabilis* expresa una nutrida cantidad de antígenos de superficie conservados los cuales no difieren significativamente de una cepa a otra independientemente de su origen, los cuales podrían potencialmente emplearse como componentes de vacunas (Mobley & Chippendale, 1990; Mobley, 1997). En los últimos años se han evaluado diversas estrategias para prevenir las ITU por *P. mirabilis* con resultados promisorios. La mayoría de estas estrategias están dirigidas contra subunidades bacterianas definidas. Uno de los factores de virulencia más estudiados en *P. mirabilis* es la fimbria MR/P, la cual ha sido también analizada como potencial inmunógeno. En nuestro Departamento hemos evaluado la potencial capacidad protectora de distintas preparaciones fimbriales. Pellegrino y colaboradores (2003) emplearon las proteínas fimbriales recombinantes MrpA, PmfA y UcaA en inmunizaciones subcutáneas seguidas de un desafío hematógeno o transuretral con *P. mirabilis*, observándose que la proteína MrpA protegió a los animales inmunizados subcutáneamente en ambos modelos de infección (Pellegrino *et al.*, 2003). Li y colaboradores observaron que la inmunización intranasal con la

adhesina fimbrial de MR/P (MrpH) o la porción N-terminal de la región de unión al receptor de la adhesina protegió a los ratones inmunizados frente a la ITU experimental (Li *et al.*, 2004). Además, los autores concluyeron que la ruta de inmunización nasal produce una respuesta amplia de anticuerpos en zonas alejadas al sitio de inmunización como el tracto urinario y vaginal (Li *et al.*, 2004).

Las vacunas mucosales pueden activar respuestas de anticuerpos sistémicas y en las mucosas así como respuestas celulares. Tienen la ventaja de ser seguras, de bajo costo y tener menos efectos secundarios que las vacunas sistémicas (Otczyk & Cripps, 2010). En este sentido, hemos evaluado el empleo de rutas de inmunización mucosales (intranasal e intravesical) en la inducción de anticuerpos específicos contra las proteína MrpA, UcaA y PmfA en suero y orina. Los resultados mostraron que los animales inmunizados con MrpA desarrollaron una respuesta de anticuerpos específicas en suero y se observó una disminución significativa del número de bacterias recuperadas de riñones y vejigas luego realizado el desafío experimental (Scavone *et al.*, 2004). Sin embargo, no se observó correlación entre la inducción de anticuerpos y la reducción de la colonización bacteriana. La protección observada a nivel del tracto urinario, si bien fue mayor que en los grupos control, en ningún caso fue total. Los resultados obtenidos luego de la inmunización nasal con MrpA en la presente tesis coinciden con los obtenidos anteriormente ya que se observó una inducción de anticuerpos específicos en suero y orina y una disminución significativa de la colonización del TU aunque no se encontró correlación entre los niveles de anticuerpos y los recuentos bacterianos en riñones y vejigas.

El desarrollo de estrategias que potencian la respuesta inmune resulta interesante y es motivo de estudio en diversos grupos de investigación. En nuestro Departamento hemos evaluado el empleo de la toxina colérica (TC) como adyuvante (Scavone *et al.*, 2009) y la generación de vacunas basadas en cepas atenuadas de *Salmonella* que expresan MrpA-TC recombinantes (Scavone *et al.*, 2011). Los resultados mostraron que la TC incrementó la respuesta inmune humoral y de citoquinas en el TU pero no incrementó el grado de protección contra las ITU (Scavone *et al.*, 2009). Por otro lado, existen varios trabajos que evidencian el papel de la flagelina de distintos microorganismos como adyuvante (Honko & Mizel, 2004; Hasan *et al.*, 2005; Vijay-Kumar *et al.*, 2006). Sin embargo, poco es sabido de la capacidad de la flagelina de *P. mirabilis* como adyuvante de mucosas. En la presente tesis se evaluó el efecto de la co-administración de la flagelina con la proteína MrpA. Sorprendentemente, los resultados mostraron que los animales inmunizados con MrpA y flagelina no indujeron un incremento significativo de anticuerpos específicos en suero ni en orina. Más aún, los niveles de infección en dicho grupo de animales fue significativamente mayor que los inmunizados con MrpA y no se observaron diferencias significativas con relación al grupo control tratado con PBS. En las



condiciones estudiadas, podemos inferir que la flagelina de *P. mirabilis* administrada intranasalmente no tendría un efecto adyuvante de la respuesta inmune. El agregado de la flagelina sería capaz de revertir el efecto inmunoprotector de la proteína MrpA dado que los animales co-inmunizados exhibieron una menor inducción de anticuerpos específicos y menor protección que los inmunizados con MrpA, llegando a mostrar recuento bacterianos similares a los de los animales control tratados con PBS.

Las funciones efectoras de los linfocitos T CD4 está mediada por 3 subclases principales: Th1, Th2 y Th17 (Zhu & Paul, 2008). Estas diferentes poblaciones tienen distintos papeles en la defensa frente a los patógenos y en las inmunopatologías. Cada subgrupo fue definido en base al patrón representativo de citoquinas que secretan siendo respectivamente IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-17. La IL-10 es una molécula inmunoreguladora; su versión celular es producida por macrófagos (Mantovani *et al.*, 2004), células dendríticas, linfocitos B y T reguladores (Tregs) (Mills, 2004). Tanto bacterias, virus, parásitos o productos microbianos son capaces de estimular la producción de IL10 en las células del hospedero, la cual actúa como una citoquina multifuncional en las infecciones en humanos. Es capaz de desarticular las respuestas inmunes innatas y adaptativas, lo que genera condiciones favorables para la persistencia de los microorganismos y el desarrollo de infecciones crónicas. Sin embargo, el control de la respuesta inmune es importante pues previene la reactividad contra antígenos propios y atenúa las respuestas inmunes exageradas, las que podrían generar lesiones deletéreas en los tejidos (Mege *et al.*, 2006). Los resultados obtenidos en la evaluación de la producción de citoquinas en los esplenocitos de los animales inmunizados mostraron que la re-estimulación con flagelina produjo un incremento de IL-10. Además, los esplenocitos de los animales inmunizados con flagelina mostraron valores basales de IL-10 superiores a los de los inmunizados con MrpA o MrpA-Fla. Estos resultados estarían indicando que la flagelina de *P. mirabilis* podría tener un efecto inmunosupresor activando la expresión de IL-10, lo que a su vez se relacionaría con los resultados obtenidos de colonización bacteriana. Los animales inmunizados con flagelina fueron los que presentaron una colonización significativamente mayor respecto a los inmunizados con MrpA y tuvieron los valores más elevados de IL-10. Podríamos establecer que el incremento de la colonización bacteriana en este caso pueda estar relacionada a su vez con el incremento de IL-10 producido por la flagelina. En las ITU en particular se ha observado que se produce una rápida inducción de la expresión génica de IL-10 (Duell *et al.*, 2011). Estos autores plantean que la inducción de respuestas supresoras representaría un intento del hospedero de modular una inflamación excesiva, la cual podría dañar los tejidos y causar inmunopatologías. La función de IL-10 en las ITU es aún desconocida.

Los resultados mostraron además que los esplenocitos de los animales inmunizados y re-estimulados con flagelina no produjeron IFN- $\gamma$  e IL-4. Estos resultados refuerzan las observaciones de que la flagelina tendría un efecto inmunosupresor.

A partir de los resultados obtenidos podríamos establecer que la flagelina de *P. mirabilis* es un potente modulador de la respuesta inmune, no posee efecto adyuvante en el tracto urinario y su inclusión en estrategias preventivas no sería conveniente pues potencia la respuesta mediada por IL-10, lo que en el modelo de ITU experimental por *P. mirabilis* favorece la colonización bacteriana.

## Conclusiones

La hipótesis del presente trabajo plantea que las fimbrias y flagelos de *P. mirabilis* juegan un papel relevante en la colonización y en la inducción de la respuesta inmune en el TU.

Para demostrarlo se emplearon distintas aproximaciones que consistieron inicialmente en la caracterización de la dinámica de las primeras etapas de las ITU en un modelo murino experimental analizando en particular el papel de las fimbrias MR/P y flagelos de *P. mirabilis*. Se analizaron distintos aspectos de la respuesta de células eucariotas ante la interacción con *P. mirabilis* con énfasis en el efecto de las fimbrias MR/P y flagelos. Por último se analizó el potencial papel adyuvante de los flagelos de *P. mirabilis* en co-inmunizaciones con la proteína fimbrial MrpA y su efecto en la protección frente a la ITU experimental.

Los resultados mostraron que *P. mirabilis* coloniza rápidamente el TU e induce una respuesta en el hospedero caracterizada por la inducción de citoquinas pro-inflamatorias, la presencia de neutrófilos y daño en el TU. Las fimbrias MR/P estarían involucradas en los estadios iniciales de la infección y su ausencia hace que la bacteria sea menos infectiva, induzca un menor reclutamiento de células en las vejigas y la expresión relativa de CXCL1 e IL-6 a las 2 hs de infección en las vejigas. Los flagelos también estarían involucrados en los primeros estadios de la infección y su ausencia produce una respuesta de menor magnitud en el hospedero. Estos resultados evidencian la capacidad de *P. mirabilis* de modular la respuesta del hospedero por medio de distintos factores para poder persistir y colonizar el TU.

Tanto las fimbrias MR/P como los flagelos de *P. mirabilis* estarían involucrados en la adhesión e invasión de las células eucariotas. Se demostró que la cepa de *P. mirabilis* 2921 se adhiere de acuerdo al patrón agregativo y que potencialmente estaría involucrado en los mecanismos de invasión. Quedó demostrado por primera vez que *P. mirabilis* induce apoptosis y daño genético y que las fimbrias MR/P y los flagelos estarían involucrados en dichos mecanismos de muerte y daño celular.

Al estudiar el potencial de la flagelina como adyuvante se observó que ésta no ejerce dicho efecto en coimmunizaciones con la proteína MrpA en ratones. La flagelina resultó ser un potente inmunodepresor de la respuesta inmune e inductora de la producción de IL-10 en esplenocitos de animales inmunizados con flagelina.

## Perspectivas

Los resultados obtenidos en la presente Tesis plantean numerosas interrogantes que sería necesario dilucidar. Entre ellas, la evaluación del papel de los neutrófilos en el proceso de las ITU. Para ello se plantea realizar la depleción de neutrófilos en ratones y evaluar las características de la ITU experimental. Además, realizaremos ensayos de opsonización con el fin de establecer si los neutrófilos son capaces de fagocitar a *P. mirabilis* y si la presencia de NET favorece la muerte bacteriana.

En los ensayos de infección experimental observamos la presencia de infiltrados celulares en las vejigas de los animales infectados. Un grupo mayoritario importante de células fue identificado como neutrófilos, linfocitos B y T. Respecto a esto se planteará el estudio de la composición del resto de células CD45<sup>+</sup> no identificada aún. Así mismo se evaluará el tipo de linfocitos T presentes durante la infección (CD4, CD8, Treg).

El estudio de los receptores celulares involucrados en la adhesión mediada por las fimbrias MR/P y/o flagelos también resultará crucial para el desarrollo de estrategias de prevención. El papel de la actina en la movilidad bacteriana intracelular de *P. mirabilis* no es conocido así como los compartimentos intracelulares involucrados. El conocimiento de estos aspectos básicos de la interacción de *P. mirabilis* y las células eucariotas es necesario para el desarrollo de estrategias de prevención del proceso infeccioso.

Otra potencial aplicación que se desprende de los resultados obtenidos y que será necesario abordar con profundidad es la inducción de apoptosis por *P. mirabilis*. Se estudiarán los distintos mecanismos involucrados en la muerte celular programada como la inducción de daño en mitocondrias, activación de caspasas y TNF- $\alpha$  así como la manipulación de NF- $\kappa$ B.

El papel inmunomodulador de la flagelina observado en la presente Tesis nos brindan nuevas aplicaciones para estas proteínas dado que si bien no resultaron protectoras para las ITU podrían tener un papel como inmunomodulador en otro tipo de patologías (enfermedades inflamatorias como colitis ulcerosa, enfermedad de Crohn entre otras).

**REFERENCIAS**

Abraham, J. M., Freitag, C.S., Clements, J.R., Eisenstein, B.I. (1985). An invertible element of DNA controls phase variation of type 1 fimbriae of *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**: 5724-5727.

Agace, W., Hedges, S., Ceska, M. & Svanborg, C. (1993). *J. Clin. Invest.* **92**, 780–785.

Akira, S., Uematsu, S., and O. Takeuchi. (2006). Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* **124**:783–801.

Alamuri, P., & H. L. Mobley. (2008). A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Mol. Microbiol.* **68**:997–1017.

Alamuri, P., Eaton, K.A., Himpsl, S.D., Smith, S.N., Mobley, H.L.T. (2009). Vaccination with *Proteus* toxic agglutinin, a hemolysin-independent cytotoxin in vivo, protects against *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Infect. Immun.* **77**:632-641.

Alamuri, P., Löwer, M., Hiss, J.A., Himpsl, S.D., Schneider, G., Mobley, H.L.T. (2010). Adhesion, invasion, and agglutination mediated by two trimeric autotransporters in the human uropathogen *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* **78**:4882-4894.

Allison, C., Emody, L., Coleman, N., Hughes, C. (1994). The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *J. Infect. Dis.* **169**: 1155-1158.

Allison, C., Lai, H-C., Hughes, C. (1992). Co-ordinate expression of virulence genes during swarming-cell differentiation and population migration of *Proteus mirabilis*. *Mol. Microbiol.* **6**: 1583-1591.

Amer, A., L. Franchi, T.D. Kanneganti, M. Body-Malapel, N. Ozören, G. Brady, S. Meshinchi, R. Jagirdar, A. Gewirtz, S. Akira, and G. Núñez. (2006). Regulation of *Legionella* phagosome maturation and infection through flagellin and host Ipaf. *J. Biol. Chem.* **281**:35217–35223.

Arora, S.K., Ritchings, B.W., Almira, E.C., Lory, S., Ramphal, R., (1998). The *Pseudomonas aeruginosa* flagellar cap protein, FliD, is responsible for mucin adhesion. *Infect. Immun.* **66**: 1000–1007.

Ashida, H., Mimuro, H., Ogawa, M., Kobayashi, T., Sanada, T., Kim, M., Sasakawa, C. (2011). Cell death and infection: a double-edged sword for host and pathogen survival. *J. Cell. Biol.* **195**:931-42.

Backhed, F., Hornef, M. (2003). Toll-like receptor 4-mediated signaling by epithelial surfaces: necessity or threat? *Microbes Infect.* **5**: 951-9.

Baggiolini, M. (2001). Chemokines in pathology and medicine. *J. Intern. Med.* **250**:91-104.

Bahrani, F. K., Massad, G., Lockett, C.V., Johnson, D.E., Russell, R.G., Warren, J.W., Mobley, H.L. (1994). Construction of an MR/P fimbrial mutant of *Proteus mirabilis*: role in virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* **62**: 3363-3371.

Bahrani, F. K., Mobley, H.L. (1993). *Proteus mirabilis* MR/P fimbriae: molecular cloning, expression, and nucleotide sequence of the major fimbrial subunit gene. *J. Bacteriol.* **175**: 457-464.

Bahrani, F. K., Mobley, H.L. (1994). *Proteus mirabilis* MR/P fimbrial operon: genetic organization, nucleotide, sequence, and conditions for expression. *J. Bacteriol.* **176**: 3412-3419.

Baorto, D.M., Gao, Z., Malaviya, R., Dustin, M.L., van der Merwe, A., Lublin, D.M., Abraham, S.N. (1997). Survival of FimH-expressing enterobacteria in macrophages relies on glycolipid traffic. *Nature* **389**:636-639.

Behar, S.M., Divangahi, M., Remold, H.G. (2010). Evasion of innate immunity by *Mycobacterium tuberculosis*: is death an exit strategy? *Nat. Rev. Microbiol.* **8**:668-674.

Berin, M.C., Michaud, A., Egan, L.J., Miyamoto, Y., Kagnoff, M.F., (2002). Role of EHEC O157:H7 virulence factors in the activation of intestinal epithelial cell NF- $\kappa$ B and MAP kinase pathways and the upregulated expression of interleukin 8. *Cell. Microbiol.* **4**, 635-648.

Bertaux, J., Schmid, M., Hutzler, P., Hartmann, A., Garbaye, J., Frey-Klett, P. (2005). Occurrence and distribution of endobacteria in the plant-associated mycelium of the ectomycorrhizal fungus *Laccaria bicolor* S238N. *Environ. Microbiol.* **7**: 1786-1795.

Bettelli, E., Korn, T., Kuchroo, V.K. (2007). Th17: the third member of the effector T cell trilogy. *Curr. Opin. Immunol.* **19**:652-657.

Bierne, H., & Cossart, P. (2012). When bacteria target the nucleus: the emerging family of nucleomodulins. *Cell. Microbiol.* **14**:622-633.

Billips, B.K., Schaeffer, A.J., Klumpp, D.J. (2008). Molecular basis of uropathogenic *Escherichia coli* evasion of the innate immune response in the bladder. *Infect. Immun.* **76**:3891-3900.

- Bower, J.M., Eto, D.S., Mulvey, M.A. (2005). Covert operations of uropathogenic *Escherichia coli* within the urinary tract. *Traffic*. **6**:18-31.
- Bowie, A. G., Haga, I.R. (2005). The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol. Immunol* **42**: 859-867.
- Braun, V., & T. Focareta. (1991). Pore-forming bacterial protein hemolysins (cytolysins). *Crit. Rev. Microbiol.* **18**:115–158.
- Burgdorfer, W., Anacker, R.L., Bird, R.G., and Bertram, D.S. (1968). Intranuclear growth of *Rickettsia rickettsii*. *J. Bacteriol.* **96**: 1415–1418.
- Campellone KG, Giese A, Tipper DJ, Leong JM (2002). A tyrosinephosphorylated 12-amino-acid sequence of enteropathogenic *Escherichia coli* Tir binds the host adaptor protein Nck and is required for Nck localization to actin pedestals. *Mol. Microbiol.* **43**: 1227–1241.
- Casellas, J. M., Visser, M., Coco, B., Mac Douglas, N., Cohen, H., Soutrich, S.J., Arenoso, H., Grupo colaborativo Latinoamericano (2003). In vitro activity at serum and urinary levels of amoxicillin and amoxicillin-sulbactam against 820 *Escherichia coli* strains isolated from community acquired urinary tract infections. *Rev. Chil. Infect.* **20**: 11-18.
- Chen, G.Y., Nuñez, G. (2010). Sterile inflammation: sensing and reacting to damage. *Nat. Rev. Immunol.* **10**:826-37
- Chippendale, G. R., Warren, J.W., Trifillis, A.L., Mobley, H.L.T. (1994). Internalization of *Proteus mirabilis* by human renal epithelial cells. *Infect. Immun.* **62**: 3115-3121.
- Christmas, T. (1994). Lymphocyte sub-populations in the bladder wall in normal bladder, bacterial cystitis and interstitial cystitis. *Br. J. Urol.* **73**: 508-515.
- Clausen, C.R., and Christie, D.L. (1982). Chronic diarrhea in infants caused by adherent enteropathogenic *Escherichia coli*. *J. Pediatr.* **100**: 358–361.
- Coker, C., Poore, C.A., Li, X., Mobley, H.L.T (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect.* **2**: 1497-1505.
- Cossart, P. (1995). Actin-based bacterial motility. *Curr Opin Cell Biol* **7**: 94–101.
- Cossart, P., Sansonetti, P.J. (2004). Bacterial invasion: the paradigms of enteroinvasive pathogens. *Science* **304**: 242–248



Curtis, M.M., Way, S.S. (2009). Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens. *Immunology*. **126**:177-85.

Daims, H., Brühl, A., Amann, R., Schleifer, K.H., Wagner, M. (1999). The domain-specific probe EUB338 is insufficient for the detection of all Bacteria: development and evaluation of a more comprehensive probe set. *Syst Appl Microbiol*. **22**:434-44.

Davis, B.K., H. Wen, and J.P. Ting. (2011). The inflammasome NLRs in immunity, inflammation, and associated diseases. *Annu. Rev. Immunol*. **29**:707–735.

Dons, L., Eriksson, E., Jin, Y., Rottenberg, M.E. (2004). Role of flagellin and the two-component CheA/CheY system of *Listeria monocytogenes* in host cell invasion and virulence. *Infect. Immun.*, **72**, 3237–3244.

Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., Zhu, G. (2012). Flagella and bacterial pathogenicity. *J. Basic Microbiol*. **52**:1-8.

Duell BL, Carey AJ, Tan CK, Cui X, Webb RI, Totsika M, Schembri MA, Derrington P, Irving-Rodgers H, Brooks AJ, Cripps AW, Crowley M, Ulett GC. (2012). Innate transcriptional networks activated in bladder in response to uropathogenic *Escherichia coli* drive diverse biological pathways and rapid synthesis of IL-10 for defense against bacterial urinary tract infection. *J Immunol*. **188**:781-92

Duguid, J. P., Smith, I.W., Dempster, G., Edmunds, P.N. (1955). Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J. Pathol. Bacteriol*. **70**: 335-348.

Eto, D.S., Sundsbak, J.L., Mulvey, M.A. (2006). Actin-gated intracellular growth and resurgence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Cell Microbiol*. **8**:704-17.

Feldman, M., Bryan, R., Rajan, S., Scheffler, L. *et al.*, (1998). Role of flagella in pathogenesis of *Pseudomonas aeruginosa* pulmonary infection. *Infect. Immun*. **66**, 43–51.

Finlay, B.B., Falkow, S. (1997). Common themes in microbial pathogenicity revisited. *Microbiol Mol Biol Rev*. **61**:136-69.

Fokin, S.I., Skovorodkin, I.N., and Sabaneyeva, E.V. (2003). Initial steps of infection of the ciliate *Paramecium* with bacteria *Holospira* sp. *Tsitologiya* **45**: 1227–1233.

Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis. Mon*. **49**: 53-70.

Fraser, G. M., L. Claret, R. Furness, S. Gupta, and C. Hughes. (2002). Swarming-coupled expression of the *Proteus mirabilis* *hpmBA* haemolysin operon. *Microbiology* **148**:2191–2201.

Freundus, B., Wachtler, C., Hedlund, M., Fischer, H., Samuelsson, P., Svensson, M., Svanborg, C. (2001). *Escherichia coli* P fimbriae utilize the Toll-like receptor 4 pathway for cell activation. *Mol. Microbiol.* **40**: 37-51.

Fujishima, M. (2009). Infection and maintenance of *Holospira* species in *Paramecium caudatum*. In *Endosymbionts in Paramecium*. Fujishima, M. (ed.). Berlin/Heidelberg: Springer, pp. 201–225.

Gales, A. C., Sader, H.S., Jones, R.N.; SENTRY Participants Group (Latin America). (2002). Urinary tract infection trends in Latin American hospitals: report from the SENTRY antimicrobial surveillance program (1997-2000). *Diagn. Microbiol. Infect. Dis.* **44**: 289-299.

Gardiner, R. A., Seymour, G.J., Lavin, M.F., Strutton, G.M., Gemmell, E., Hazan, G. (1986). Immunohistochemical analysis of the human bladder. *Br. J. Urol.* **58**: 19-25.

Giron, J.A., Torres, A.G., Freer, E., Kaper, J.B., (2002). The flagella of enteropathogenic *Escherichia coli* mediate adherence to epithelial cells. *Mol. Microbiol.* **44**, 361–379.

Godaly, G., Otto, G., Burdick, M.D., Strieter, R.M., Svanborg, C. (2007). Fimbrial lectins influence the chemokine repertoire in the urinary tract mucosa. *Kidney International* **71**:778-786.

Goertz, H.D. (2010). Microbial infections in free-living protozoa. *Crit Rev Immunol* **30**: 95–106.

Görtz, H.D., and Wiemann, M. (1989). Route of infection of the bacteria *Holospira elegans* and *Holospira obtusa* into the nuclei of *Paramecium caudatum*. *Eur J Protistol* **24**: 101–109.

Hagberg, L., Engberg, Y., Freter, R., Lane, J., Olling, S., Svanborg-Eden, C. (1983). Ascending unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infect. Immun.* **40**:273-283.

Hang, L., Haraoka, M., Agace, W., Burdick, M., Strieter, R., Svanborg, C. (1999). MIP 2 is required for neutrophil passage across the epithelial barrier of the infected urinary tract. *J Immunol.* **162**:3037–44.

Hasan, U. A., Trinchieri, G., Vlach, J. (2005). Toll-like receptor signaling stimulates cell cycle entry and progression in fibroblast. *J. Biol. Chem.* **280**: 20620-20627.

Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R. *et al.*, (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, **410**, 1099–1103.

Hedges, S., Svensson, M. & Svanborg, C. (1992). Interleukin-6 response of epithelial cell lines to bacterial stimulation in vitro. *Infect. Immun.* **60**, 1295–1301.

Hjelm, E. M. (1984). Local cellular immune response in ascending urinary tract infection: occurrence of T-cells, immunoglobulin-producing cells, and Ia-expressing cells in rat urinary tract tissue. *Infect. Immun.* **44**: 627-632.

Hoeniger, J. F. M. (1965). Development of flagella by *Proteus mirabilis*. *J. Gen. Microbiol.* **40**: 29-42.

Honko AN, S. N., Lees CJ, Mizel SB. (2006). Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect. Immun* **74**: 1113-1120.

Honko, A. N., Mizel, S.B. (2004). Mucosal administration of flagellin induces innate immunity in the mouse lung. *Infect. Immun* **72**: 6676-6679.

Honko, A. N., Mizel, S.B. (2005). Effects of flagellin on innate and adaptative immunity. *Immunol. Res.* **33**: 83-102.

Hopkins, W. J., Hall, J. A., Conway, B. P., Uehling, D. T. (1994). Induction of urinary tract infection by intraurethral inoculation with *Escherichia coli*: refining the murine model. *J. Infect. Dis.* **171**:462-465.

Hori, M., Fujii, K., and Fujishima, M. (2008). Micronucleus specific bacterium *Holospora elegans* irreversibly enhances stress gene expression of the host *Paramecium caudatum*. *J Eukaryot Microbiol* **55**: 515–521.

Hultgren, S. J., Normark, S., Abraham, S.N. (1991). Chaperone-assisted assembly and molecular architecture of adhesive pili. *Annu. Rev. Microbiol.* **45**: 383-415.

Iwatani, K., Dohra, H., Lang, B.F., Burger, G., Hori, M., and Fujishima, M. (2005). Translocation of an 89-kDa periplasmic protein is associated with *Holospora* infection. *Biochem Biophys Res Commun* **337**: 1198–1205.

Jansen, A. M., Lockett, C.V, Johnson, D.E., Mobley H.L.T. (2003). Visualization of *Proteus mirabilis* morphotypes in the urinary tract: the elongated swarmer is rarely observed in ascending urinary tract infection. *Infect. Immun.* **71**:3607-3613.

- Jansen, A. M., Lockett, V., Johnson, D.E., Mobley, H.L. (2004). Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. *Infect. Immun* **72**: 7294-7305.
- Jiang, S.S., Liu, M.C., Teng, L.T., Wang, W.B., Huesh, P.R., Liaw, S.J. (2010). *Proteus mirabilis pmrI*, an RppA-regulated gene necessary for polymixin B resistance, Biofilm formation, and urothelial cell invasion. *Antimicrob. Ag. Chemother.* **54**:1564-1571.
- Johnson, J. R. (1996). Treatment and Prevention of urinary tract infections. Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. H. L. T. Mobley, Warren, J. W. Washington DC, ASM Press: 95-118.
- Jones-Carson, J., Balish, E., Uehling, D.T. (1999). Susceptibility of immunodeficient gene-knockout mice to urinary tract infection. *J. Urol.* **161**: 338-341.
- Kenny B, DeVinney R, Stein M, Reinscheid DJ, Frey EA, et al. (1997). Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) transfers its receptor for intimate adherence into mammalian cells. *Cell* **91**: 511-520.
- Kim, M., Ashida, H., Ogawa, M., Yoshikawa, Y., Mimuro, H., Sasakawa, C. (2010). Bacterial interactions with the host epithelium. *Cell Host Microbe.* **8**:20-35
- Klumpp, D. J., M. T. Rycyk, M. C. Chen, P. Thumbikat, S. Sengupta, and A. J. Schaeffer. (2006). Uropathogenic *Escherichia coli* induces extrinsic and intrinsic cascades to initiate urothelial apoptosis. *Infect. Immun.* **74**:5106-5113.
- Kobayashi, S.D., Braughton, K.R., Whitney, A.R. Voyich, J.M., Schwan, T.G., Musser, J.M., DeLeo, F.R. (2003). Bacterial pathogens modulate an apoptosis differentiation program in human neutrophils. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* **100**:10948-10953.
- Kolls, J.K., Linden, A. (2004). Interleukin-17 family members and inflammation. *Immunity* **21**:467-476.
- Konkel, M.E., Klena, J.D., Rivera-Amill, V., Monteville, M.R. et al., (2004). Secretion of virulence proteins from *Campylobacter jejuni* is dependent on a functional flagellar export apparatus. *J. Bacteriol.* **186**, 3296-3303.

- Kopf, M., Ramsay, A., Brombacher, F., Baumann, H., Freer, G., Galanos, C., Gutierrez-Ramos, J. C. & Kohler, G. (1995). Pleiotropic defects of IL-6-deficient mice including early hematopoiesis, T and B cell function, and acute phase responses. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **762**, 308–318.
- Krieger, J. N. (2002). Urinary tract infections: what's new? *J. Urol.* **168**: 2351-2358.
- Kumar, Y., and R.H. Valdivia. (2009). Leading a sheltered life: intracellular pathogens and maintenance of vacuolar compartments. *Cell Host Microbe.* **5**:593–601
- Kunin, C. M. (1987). Detection, prevention and Management of urinary tract infections. Philadelphia, Lea & Febiger.
- Kunin, C. M., Evans, C., Bartholomew, D., Bates, D.G. (2002). The antimicrobial defense mechanism of the female urethra: a reassessment. *J. Urol.* **168**: 413-419.
- Lamkanfi, M., & Dixit, V.M. (2010). Manipulation of host cell death pathways during microbial infections. *Cell Host Microbe.* **8**:44–54.
- Langermann, S., Palaszynski, S., Barnhart, M., Auguste, G., Pinkner, J.S., Burlein, J et al. (1997). Prevention of mucosal *Escherichia coli* infection by FimH-adhesin-based systemic vaccination. *Science* **276**:607-611.
- Latta, R. K., Grondin, A., Jarrell, H.C., Nicholls, G.R. (1999). Differential expression of nonagglutinating fimbriae and MR/P pili in swarming colonies of *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* **181**: 3220-3225.
- Lauw, F.N., Caffrey, D.R., Golenbock, D.T. (2005). Of mice and man: TLR11 (finally) finds profilin. *Trends. Immunol.* **26**:509-11.
- Legnani-Fajardo, C., Zunino, P., Piccini, C., Allen, A., Maskell, D. (1996). Defined mutants of *Proteus mirabilis* lacking flagella cause ascending urinary tract infection in mice. *Microb. Pathog.* **21**: 395-405.
- Lepanto, P., Bryant, D. M., Rosello, J., Datta, A., Mostov, K.E., Kierbel, A. (2011). *Pseudomonas aeruginosa* interacts with epithelial cells rapidly forming aggregates that are internalized by a Lyn-dependent mechanism. *Cell. Microbiol.* **13**:1212-1222.
- Li, X., Erbe, J.L., Lockatell, C.V., Johnson, D.E., Jobling, M.G., Holmes, R.K., Mobley, H.L. (2004). Use of translational fusion of the MrpH fimbrial adhesin-binding domain with the cholera toxin A2 domain, coexpressed with the cholera toxin B subunit, as an intranasal vaccine

to prevent experimental urinary tract infection by *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun* **72**: 7306-7310.

Li, X., Johnson, D.E., Mobley, H.L. (1999). Requirement of MrpH for mannose-resistant *Proteus*-like fimbria-mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun.* **67**: 2822-2833.

Li, X., Lockett, C.V., Johnson, D.E., Lane, M.C., Warren, J.W., Mobley, H.L. (2004). Development of an intranasal vaccine to prevent urinary tract infection by *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun* **72**: 66-75.

Lommel, S., Benesch, S., Rottner, K., Franz, T., Wehland, J., et al. (2001). Actin pedestal formation by enteropathogenic *Escherichia coli* and intracellular motility of *Shigella flexneri* are abolished in N-WASP-defective cells. *EMBO Rep* **2**: 850-857.

Loomes, L. M., Senior, B.W., Kerr, M.A. (1990). A proteolytic enzyme secreted by *Proteus mirabilis* degrades immunoglobulins of the immunoglobulin A1 (IgA1), IgA2, and IgG isotypes. *Infect. Immun* **58**: 1979-1985.

Maki, D. G., Tambyah, P.A. (2001). Engineering out the risk for infection with urinary catheters. *Emerg. Infect. Dis.* **7**: 342-347.

Manos, J., Belas, R. (2004). Transcription of *Proteus mirabilis* *flaAB*. *Microbiol.* **150**:2857-2863.

Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. (2004). The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* **25**: 677-86.

Mege, J-L., Meghari, S., Honstetter, A., Capo, C., Raoult, D. (2006). The two faces of interleukin 10 in human infectious diseases. *Lancet Infect. Dis.* **6**:557-569.

Menzio, F.D., Boucher, P.E., Riveau, G., Gantiez, C., Loch, C. (1994). Surface-associated filamentous hemagglutinin induces autoagglutination of *Bordetella pertussis*. *Infect Immun* **62**: 4261-4269.

Miao, E.A., Alpuche-Aranda, C.M., Dors, M., Clark, A.E. et al., (2006). Cytoplasmic flagellin activates caspase-1 and secretion of interleukin 1beta via Ipaf. *Nat. Immunol.* **7**, 569-575.

Miller, T. E., Findon, G., Cawley, S. (1986). Cellular basis of host defence in pyelonephritis. I. Chronic infection. *Br. J. Exp. Pathol* **67**: 13-23.

Mills, K.H.(2004). Regulatory T cells: friend or foe in immunity to infection? *Nat Rev Immunol* **4**: 841-55.

Mobley, H. L. T. (1997). Vaccines against *Escherichia coli* and *Proteus urinary* infections, p. 931-944. In M. M. Levine, G. C. Woodrow, J. B. Kaper, and G. S. Cobon (ed), New generation vaccines. 2nd ed. Marcel Dekker, Inc., New York.

Mobley, H. L. T. (2000). Virulence of the two primary uropathogens - *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* exhibit distinct mechanisms of pathogenesis when causing urinary tract infections. *ASM News* **66**: 403-410.

Mobley, H. L., Belas, R., Lockatell, V., Chippendale, G., Trifillis, A.L., Johnson, D.E., Warren, J.W. (1996). Construction of a flagellum-negative mutant of *Proteus mirabilis*: effect on internalization by human renal epithelial cells and virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect. Immun* **64**: 5332-5340.

Mobley, H. L., Hausinger, R.P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiol Rev.* **53**: 85-108.

Mobley, H.L. and Chippendale, G.R. (1990). Hemagglutinin, urease, and hemolysin production by *Proteus mirabilis* from clinical sources. *J. Infect. Dis.* **161**: 525-530.

Montie, T. C., Craven, R.C., Holder, I.A. (1982). Flagellar preparations from *Pseudomonas aeruginosa*: isolation and characterization. *Infect. Immun* **35**: 281-288.

Moors, M.A., Li, L., Mizel, S.B. (2001). Activation of interleukin-1 receptor associated kinase by gram-negative flagellin. *Infect. Immun.* **69**, 4424-4429.

Mulvey MA, Schilling JD, Hultgren SJ. (2001). Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infect Immun.* **69**:4572-4579.

Mysorekar IU, Mulvey MA, Hultgren SJ, Gordon JI. (2002). Molecular regulation of urothelial renewal and host defenses during infection with uropathogenic *Escherichia coli*. *J Biol Chem.* **277**:7412-7419.

Naber, K. G. (1999). Experience with the new guidelines on evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infections. *Int. J. Antimicrob. Agents* **11**: 189-196.

Nataro, J.P., Kaper, J.B., Robins-Browne, R., Prado, V., Vial, P., Levine, M.M. (1987) Patterns of adherence of diarrheagenic *Escherichia coli* to HEp-2 cells. *Pediatr Infect Dis J.* **6**: 829-831.



- Nathan, C. (2006). Neutrophils and immunity: challenges and opportunities. *Nat. Rev. Immunol.* **6**:173-182.
- Nicolle, L. (2001). Epidemiology of urinary tract infection. *Infect. Med.* **18**: 153-162.
- Nicolle, L. E. (2002). Resistant pathogens in urinary tract infections. *J. Am. Geriatr. Soc* **50**: S230-S235.
- Nielubowicz, G. R., Mobley, H.L.T (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat. Rev. Urol.* **7**, 430-441.
- O'Donnell, J. A., Gelone, S. P., Abrutyn, E. (2002). Selecting Drug regimens for urinary tract infections: current recommendations. *Infect. Med.* **19**: 14-22.
- Oelschlaeger, T.A., Tall, B.D. (1996). Uptake pathways of clinical isolates of *Proteus mirabilis* into human epithelial cell lines. *Microb Pathog.* **21**:1-16.
- Ogata, H., La Scola, B., Audic, S., Renesto, P., Blanc, G., Robert, C., *et al.* (2006). Genome Sequence of *Rickettsia bellii* illuminates the role of amoebae in gene exchanges between intracellular pathogens. *PLoS Genet* **2**: e76.
- O'Hanley, P. (1996). Prospects for urinary tract infection vaccines. Urinary tract infection: molecular pathogenesis and clinical management. H. L. T. Mobley, Warren, J. W. Washington D.C., ASM Press: 405-425.
- Ossipov, D.V., and Podlipaev, S.A. (1977). Electron microscope examinations of early stages of infection of *Paramecium caudatum* by bacterial symbionts of the macronucleus (jota- bacteria). *Acta Protozool* **16**: 289–308.
- Oswald, E., Nougayrede, J.P., Taieb, F., and Sugai, M. (2005). Bacterial toxins that modulate host cell-cycle progression. *Curr Opin Microbiol* **8**: 83–91.
- Otczyk, D.C., Cripps, A.W. (2010). Mucosal immunization: a realistic alternative. *Hum. Vaccin.* **6**: 978-1006.
- O'Toole, G., Kaplan, H.B., Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annu Rev Microbiol.* **54**:49-79.
- Parthasarathy, G., Yao, Y., Kim, K.S. (2007). Flagella promote *Escherichia coli* K1 association with and invasion of human brain microvascular endothelial cells (HBMEC). *Infect. Immun.* **75**, 2937–2945.

- Patel, J.C., Galan, J.E. (2006). Differential activation and function of Rho GTPases during Salmonella-host cell interactions. *J Cell Biol* **175**: 453–463.
- Pearson, M.M., Sebahia, M., Churcher, C., et al. (2008). Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J. Bacteriol.* **190**:4027-4037.
- Peerbooms, P. G., Verweij, A.M., MacLaren, D.M. (1983). Investigation of the haemolytic activity of *Proteus mirabilis* strains. *Antonie Van Leeuwenhoek.* **49**: 1-11.
- Pellegrino, R., Galvalisi, U., Scavone, P., Sosa, V., Zunino, P. (2003). Evaluation of *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins as antigens against urinary tract infections. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **15**: 103-110.
- Penner, J. L. (1984). *Proteus*. Bergey's manual of systematic bacteriology. N. R. Krieg. Baltimore, Williams and Wilkins: 491-494.
- Ragnarsdóttir, B., Fischer, H., Godaly, G., Grönberg-Hernández, J., Gustafsson, M., Karpman, D., Lundstedt, A. C., Lutay, N., Rämisch, S., Svensson, M.L., Wullt, B., Yadav, M. Svanborg, C. (2008). TLR- and CXCR1-dependent innate immunity: insights into the genetics of urinary tract infections. *Europ. J. Clin. Invest.* **38**:12-20.
- Ramos, H.C., Rumbo, M., Sirard, J.C. (2004). Bacterial flagellins:mediators of pathogenicity and host immune responses in mucosa. *Trends. Microbiol.* **12**:509–517.
- Ren, T., Zamboni, D.S., Roy, C.R., Dietrich, W.F., Vance, R.E. (2006). Flagellin-deficient *Legionella* mutants evade caspase-1 and Naip5-mediated macrophage immunity. *PloS Pathog.*, **2**, e18.
- Roberts, J. (1999). Unconventional immunology and urinary tract infection. *J. Urol.* **161**: 3.
- Robertson, J.M.C., McKenzie, N.H., Duncan, M., Allen-Vercoe, E., Woodward, M.J., Flint, H.J., Grant, G. (2003). Lack of flagella disadvantages *Salmonella enterica* serovar Enteritidis during the early stages of infection in the rat. *J. Med. Microbiol.* **52**:91-99.
- Rocha, S. P.D., Elias, W.P., Cianciarullo, A.M., Menezes, M.A., Nara, J.M., Piazza, R.M.F., Silva, M. R.L., Moreira, C.G., Pelayo, J.S. (2007). Aggregative adherence of uropathogenic *Proteus mirabilis* to cultured epithelial cells. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **51**:319-326.
- Rocha, S.P., Pelayo, J.S., Elias, W.P. (2007). Fimbriae of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **51**:1-7

Rozalski, A., Sidorczyk, Z., Kotelko, K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**: 65-69.

Russo, T. A., Stapleton, A., Wenderoth, S., Hooton, T. M., and Stamm, W. E. (1995). Chromosomal restriction fragments length polymorphism analysis of *Escherichia coli* strains causing recurrent urinary tract infections in young women. *J. Infect. Dis.* **172**: 440-445.

Sabaneyeva, E.V., Derkacheva, M.E., Benken, K.A., Fokin, S.I., Vainio, S., and Skovorodkin, I.N. (2009). Actin-based mechanism of *Holospira obtusa* trafficking in *Paramecium caudatum*. *Protist* **160**: 205–219.

Samuelsson P, Hang L, Wullt B, Irjala H, Svanborg C. (2004). Toll-like receptor 4 expression and cytokine responses in the human urinary tract mucosa. *Infect Immun* **72**:3179–86.

Scaletsky, I.C.A., Silva, M.L.M., Trabulsi, L.R. (1984). Distinctive patterns of adherence of enteropathogenic *Escherichia coli* to HeLa cells. *Infect Immun* **45**: 534–536.

Scavone P, Miyoshi A, Rial A, Chabalgoity A, Langella P, Azevedo V, Zunino P. (2007). Intranasal immunisation with recombinant *Lactococcus lactis* displaying either anchored or secreted forms of *Proteus mirabilis* MrpA fimbrial protein confers specific immune response and induces a significant reduction of kidney bacterial colonisation in mice. *Microbes Infect.* **9**:821-8

Scavone P, Rial A, Umpierrez A, Chabalgoity A, Zunino P. (2009). Effects of the administration of cholera toxin as a mucosal adjuvant on the immune and protective response induced by *Proteus mirabilis* MrpA fimbrial protein in the urinary tract. *Microbiol Immunol.* **53**:233-40.

Scavone P, Sosa V, Pellegrino R, Galvalisi U, Zunino P. (2004). Mucosal vaccination of mice with recombinant *Proteus mirabilis* structural fimbrial proteins. *Microbes Infect.* **6**:853-60.

Scavone P, Umpiérrez A, Maskell DJ, Zunino P. (2011). Nasal immunization with attenuated *Salmonella* Typhimurium expressing an MrpA-TetC fusion protein significantly reduces *Proteus mirabilis* colonization in the mouse urinary tract. *J. Med. Microbiol.* **60**: 899-904.

Scavone, P. (2006). Características inmunogénicas de MrpA, subunidad estructural de la fimbria MR/P de *P. mirabilis*. Tesis de Maestría PEDECIBA-Biología.

Schilling JD, Mulvey MA, Vincent CD, Lorenz RG, Hultgren SJ. (2001). Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *J. Immunol.* **166**:1148–55.

Mag. P. Scavone

Schilling, J. D., Mulvey, M.A., Hultgren, S.J. (2001). Dynamic interactions between host and pathogen during acute urinary tract infections. *Urology* **57**: 56-61.

Schlapp, G., Scavone, P., Zunino, P., Härtel, S. (2011). Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. *J Microbiol Methods*. **87**:234-40.

Senior, B. W. (1978). The special affinity of particular types of *P. mirabilis* for the urinary tract. *J. Med. Microbiol* **12**: 1-8.

Shand, G. H., Anwar, H., Kadurugamuwa, J., Brown, M.R., Silverman, S.H., Melling, J. (1985). In vivo evidence that bacteria in urinary tract infection grow under iron-restricted conditions. *Infect. Immun* **48**: 35-39.

Shibata, K., Yamada, H., Hara, H., Kishihara, K., Yoshikai, Y. (2007). Resident V $\delta$ 1+  $\gamma$  $\delta$ T cells control early infiltration of neutrophils alter *Escherichia coli* infection via IL17 production. *J. Immunol*. **178**:4466-4472.

Sirard, J.C., Bayardo, M., Didierlaurent, A. (2006). Pathogen-specific TLR signaling in mucosa: mutual contribution of microbial TLR agonists and virulence factors. *Eur. J. Immunol*. **36**:260-263.

Sivick, K.E., Mobley, H.L. (2010). Waging war against uropathogenic *Escherichia coli*: winning back the urinary tract. *Infect Immun*.**78**:568-85.

Sobell, J. D., Kayle, D. (2000). Urinary tract infections. Principles and Practice of infectious disease. G. L. Mandell, Bennett, J. E., Dolin, E. New York, Churchill Livingstone: 773-805.

Sosa, V., Schlapp, G., Zunino, P. (2006). *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not present correlation with virulence attributes and can colonise the urinary tract of mice. *Microbiology* **152**: 2149-2157.

Stamm, W. E., Martin, S.M., Benett, J.V. (1997). Epidemiology of nosocomial infections due to gram negative bacilli: aspects relevant to development and use of vaccines. *J. Infect. Dis* **136**: 151-160.

Stickler, D.J., King, J.B., Winters, C., Morris, S.L. (1993). Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. *J Infect*. **27**:133-5.

Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D.G., Costerton, J.W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annu Rev Microbiol* **56**: 187-209.

Svanborg, C., Frendeus, B., Godaly, G., ET AL., (2001). Toll-like receptor signaling and chemokine receptor expression influence the severity of urinary tract infection. *J. Infect. Dis.* **183**:S61-S65.

Svanborg-eden, C. & Svennerholm, A. M. (1978). Secretory immunoglobulin A and G antibodies prevent adhesion of *Escherichia coli* to human urinary tract epithelial cells. *Infect. Immun.* :790–797.

Terashima, H., Kojima, S., Homma, M., (2008). Flagellar motility in bacteria structure and function of flagellar motor. *Cell. Mol. Biol.* **270**: 39–85.

Tice, A. D. (1999). Short-course therapy of acute cystitis: a brief review of therapeutic strategies. *J. Antimicrob. Chemother.* **43**: 85-93.

Tolson, D. L., Barrigar, D.L., McLean, R.J., Altman, E. (1995). Expression of a nonagglutinating fimbria by *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun* **63**: 1127-1129.

Tran Van Nhieu, G., Caron, E., Hall, A., Sansonetti, P.J. (1999). IpaC induces actin polymerization and filopodia formation during *Shigella* entry into epithelial cells. *Embo J* **18**: 3249–3262

Triantafilou, M. & Triantafilou, K., (2002). Lipopolysaccharide recognition: CD14, TLRs and the LPS-activation cluster. *Trends Immunol.* 23:301–304.

Umpiérrez, A. (2011). Efecto de la flagelina de *Proteus mirabilis* en la modulación de la respuesta inmune innata en el tracto urinario. Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas, PEDECIBA-Biología, UdelaR.

Urban. C.F., Lourido, S., Zychlinsky, A. (2006). How do microbes evade neutrophil killing?. *Cell. Microbiol.* **8**:1687-1696.

Vijay-Kumar, M., Wu, H., Jones, R., Grant, G., Babbin, B., King, T.P., Kelly, D., Gewirtz, A.T., Neish, A.S. (2006). Flagellin suppresses epithelial apoptosis and limits disease during enteric infection. *Am. J. Pathol.* **169**: 1686-1700.

Wagenlehner FM, Naber KG. (2004). Antibiotic treatment for urinary tract infections: pharmacokinetic/pharmacodynamic principles. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* **2**: 923-931.

Warren, J. W. (1996). Clinical presentations and epidemiology of urinary tract infections. Urinary Tract infections: molecular pathogenesis and clinical management. H. L. T. Mobley, Warren, J. W. Washington DC, ASM Press: 3-28.

Warren, J. W., Tenney, J.H., Hoopes, J.M., Muncie, H.L., Anthony, W.C. (1982). A prospective microbiologic study of bacteriuria in patients with chronic indwelling urethral catheters. *J. Infect. Dis.* **146**: 719-723.

Welch, R. A. (1987). Identification of two different haemolysin determinants in uropathogenic *Proteus* isolates. *Infect. Immun* **55**: 2183-2190.

Wray, S. K., Hull, S.I., Cook, R.G, Barrish, J., Hull, R.A. (1986). Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. *Infect. Immun* **54**: 43-49.

Wright, S. D., Ramos, R.A., Tobias, P.S., Ulevitch, R.J., Mathison, J.C. (1990). CD14, a receptor for complexes of lipopolysaccharide (LPS) and LPS binding protein. *Science* **249**: 1431-3.

Zhang, D., Zhang, G., Hayden, M.S., Greenblatt, M.B., Bussey, C., Flavell, R.A., Ghosh, S. (2004). A toll-like receptor that prevents infection by uropathogenic bacteria. *Science* **303**: 1522-6.

Zhao, H., Li, X., Johnson, D.E., Blomfield, I., Mobley, H.L. (1997). In vivo phase variation of MR/P fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract. *Mol. Microbiol.* **23**: 1009-1019.

Zhu, J. & Paul, W. E. (2008). CD4 T cells: fates, functions, and faults. *Blood* **112**:1557 – 1569.

Zunino, P., Geymonat, L., Allen, A.G., Legnani-Fajardo, C., Maskell, D.J. (2000). Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **29**: 137-143.

Zunino, P., Geymonat, L., Allen, A.G., Preston, A., Sosa, V., Maskell, D.J. (2001). New aspects of the role of MR/P fimbriae in *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *FEMS Immunol. Med. Microbiol.* **31**: 113-120.

Zunino, P., Piccini, C., Legnani-Fajardo, C. (1994). Flagellate and non-flagellate *Proteus mirabilis* in the development of experimental urinary tract infection. *Microb. Pathog.* **16**: 379-385.

Zunino, P., Sosa, V., Allen, A.G., Preston, A., Schlapp, G., Maskell, D.J. (2003). *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. *Microbiology* **149**: 3231-3237.

Mag. P. Scavone

Zunino, P., Sosa, V., Schlapp, G., Allen, A.G., Preston, A., Maskell, D.J. (2007). Mannose-resistant *Proteus*-like and *P. mirabilis* fimbriae have specific and additive roles in *P. mirabilis* urinary tract infections. *FEMS Immunol Med Microbiol.* **51**:125-33.



## ANEXO I: Análisis y procesamiento de imágenes

### *Cuantificación de células inmunes en orina*

Tinción de orinas y visualización al microscopio óptico

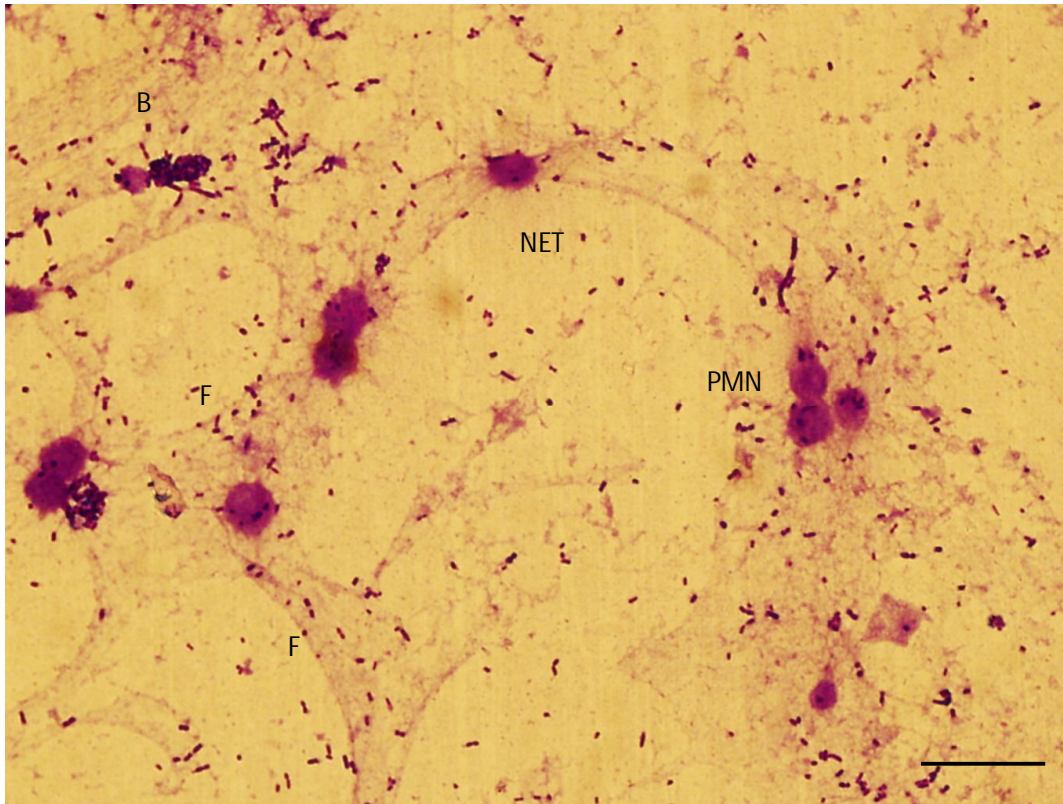


Figura I.A: Muestra la presencia de varios PMN, bacterias (B) y las fibras (F) que potencialmente forman las NETs. La imagen permite visualizar la presencia de agregados bacterianos en contacto con los PMN y la adhesión de bacterias a las fibras. La orina corresponde a un animal con 6 hs de infección con la cepa *P. mirabilis* 2921. La tinción empleada fue con cristal violeta y las imágenes obtenidas empleando un microscopio óptico Olympus BX61, aumento 100X. La barra representa la escala correspondiente a 20  $\mu\text{m}$ .

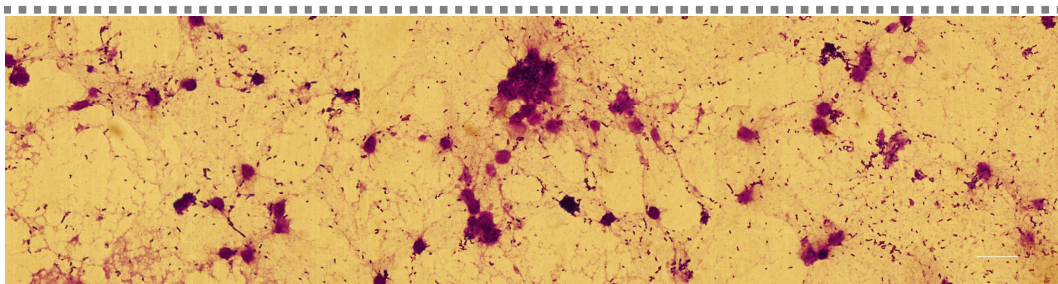


Figura I.B: Imágenes de orinas de 3 ratones con 6 hs de infección con *P. mirabilis* 2921, la tinción y adquisición de las imágenes se realizó como se describió en la figura 1a.

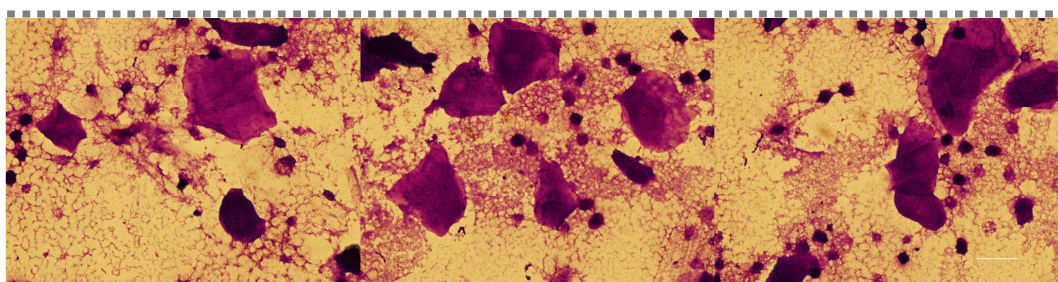


Figura I.C: Imágenes de orinas de 3 ratones con 6 hs de infección con *P. mirabilis* AF. Las células más grandes corresponden células uroepiteliales de descamación. La tinción y adquisición de las imágenes se realizó como se describió en la figura 1a.

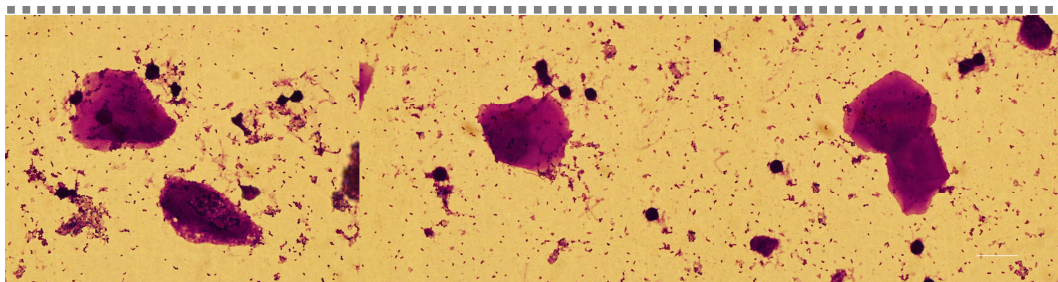


Figura I.D: Imágenes de orinas de 3 ratones con 6 hs de infección con *P. mirabilis* MSD2. Las células más grandes corresponden células uroepiteliales de descamación. La tinción y adquisición de las imágenes se realizó como se describió en la figura 1a.

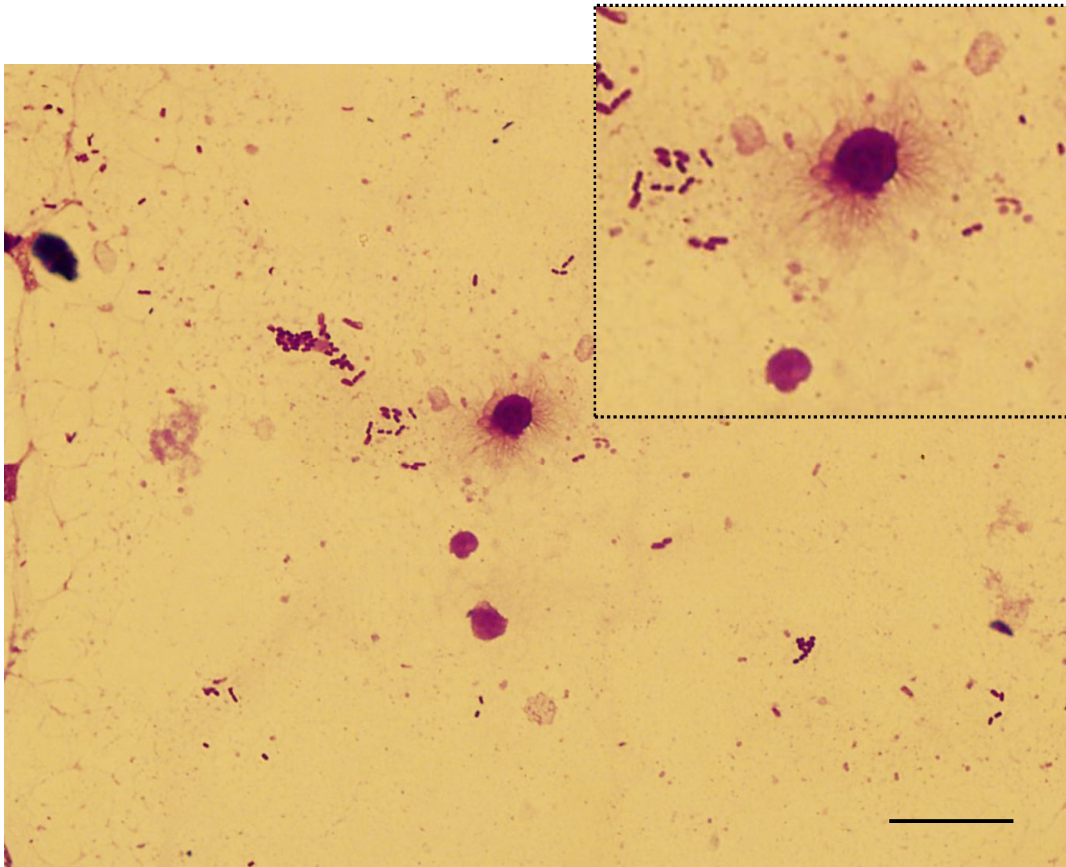


Figura 1.E: En la figura se observa un PMN del cual protruyen fibras de su superficie (recuadro), y se observa además la proximidad de las bacterias. La orina corresponde a un ratón con 24 hs de infección con *P. mirabilis* 2921. La tinción empleada fue con cristal violeta y las imágenes obtenidas empleando un microscopio óptico Olympus BX61, aumento 100X. La barra representa la escala correspondiente a 20  $\mu\text{m}$ .



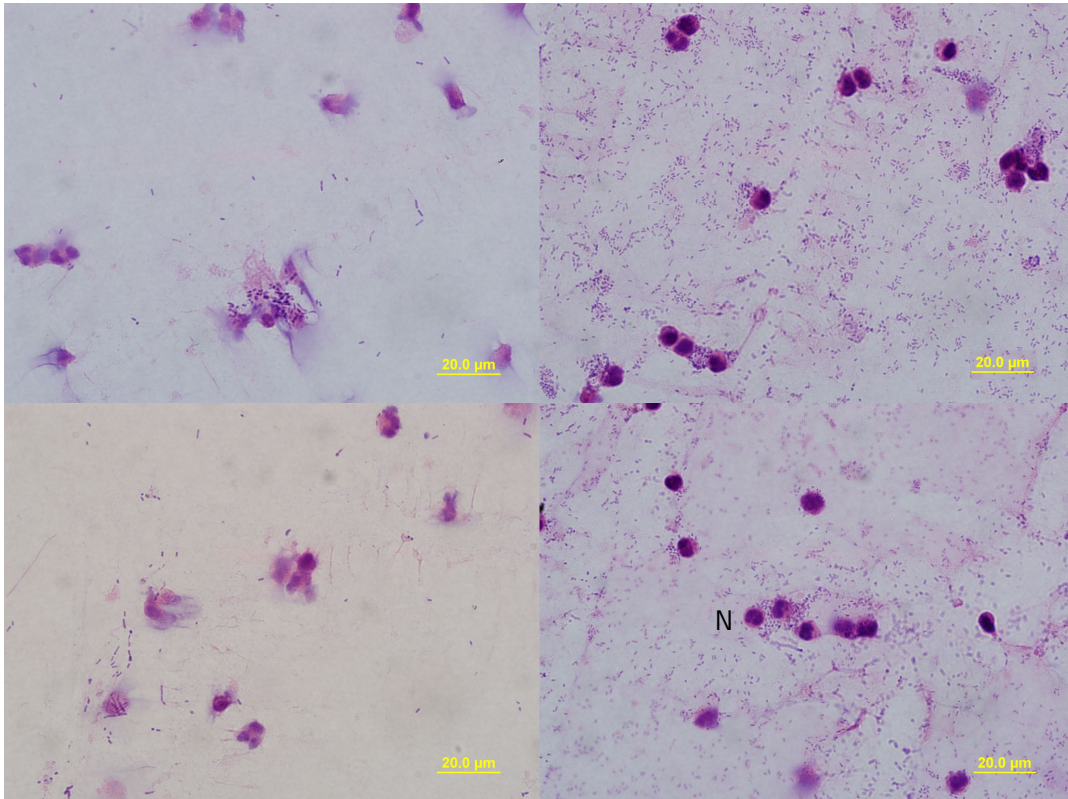
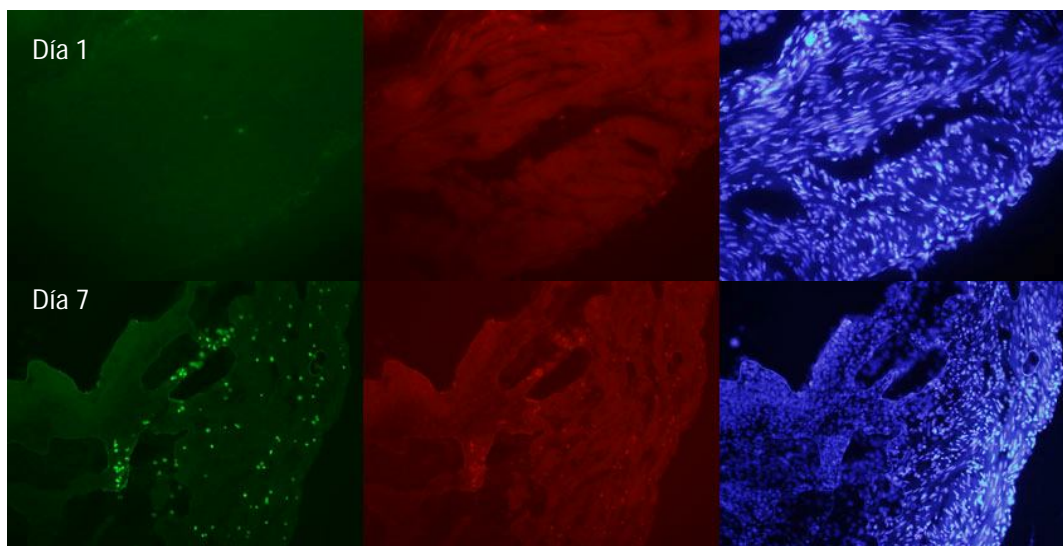


Figura 1.F: Imágenes de orinas fijadas y teñidas con hematoxilina y eosina de 4 animales diferentes luego de 24 hs de infección con *P. mirabilis* 2921. En la figura se observan los típicos neutrófilos (N) multilobulados y la presencia de bacterias, en algunos casos adheridos a la superficie de los neutrófilos y/o PMN los cuales liberaron gránulos y produjeron fibras.

### Localización bacteriana en el tracto urinario

A continuación se muestran imágenes de los distintos cortes de órganos, tinción y visualización al microscopio de epifluorescencia.



Figuras I.G: Panel correspondiente a los 3 canales en los cuales se adquirió cada una de las imágenes de los cortes de vejiga de animales con 1 y 7 días de infección con *P. mirabilis* MSD2. En verde se observa autofluorescencia y la marcación específica para las bacterias (de mayor intensidad), en rojo se observa la actina y en azul el ADN. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 20X.

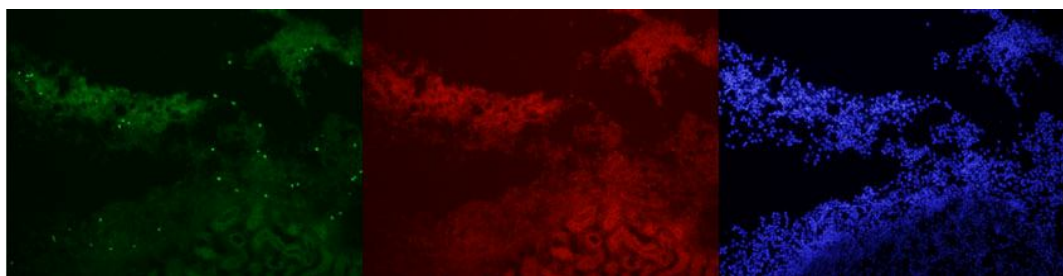
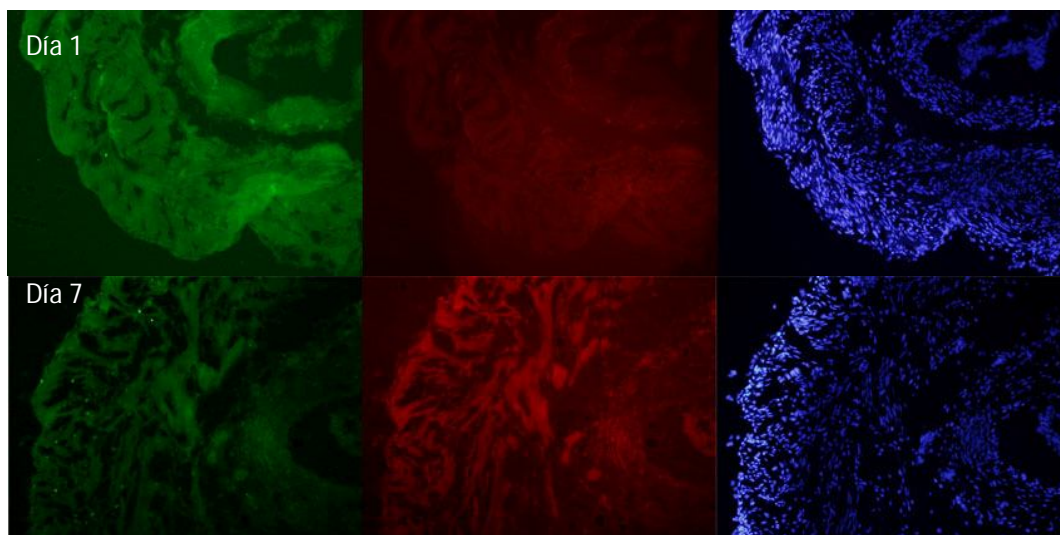
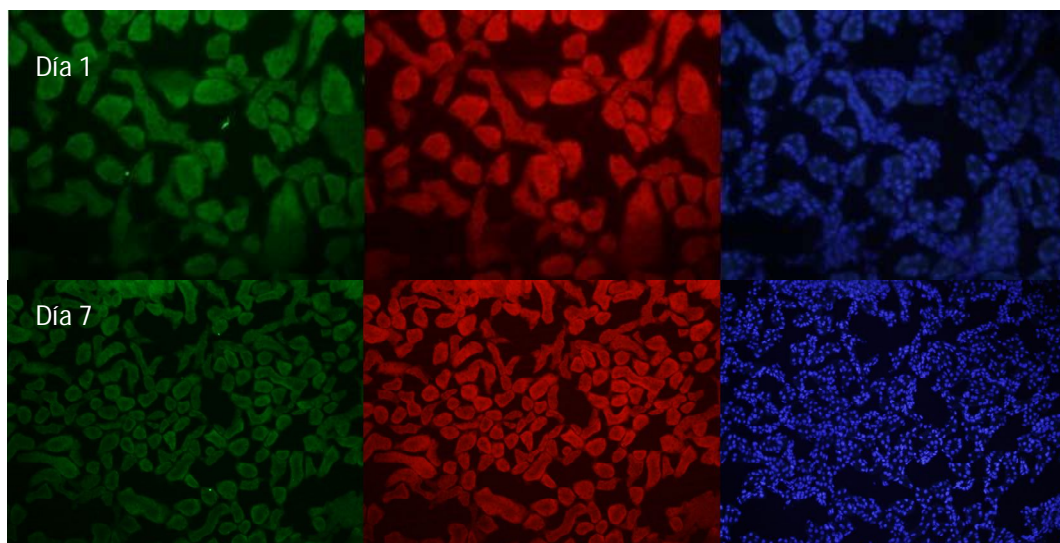


Figura 1.H: Panel correspondiente a cortes de riñón de un animal con 7 días de infección con *P. mirabilis* MSD2. En verde se observa autofluorescencia y la marcación específica para las bacterias (de mayor intensidad), en rojo se observa la actina y en azul el ADN. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 20X.



Figuras I.I: Panel correspondiente a los 3 canales en los cuales se adquirió cada una de las imágenes de los cortes de vejiga de animales con 1 y 7 días de infección con *P. mirabilis* AF. En verde se observa autofluorescencia y la marcación específica para las bacterias (de mayor intensidad), en rojo se observa la actina y en azul el ADN. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 20X.



Figuras I.J: Panel correspondiente a los 3 canales en los cuales se adquirió cada una de las imágenes de los cortes de riñones de animales con 1 y 7 días de infección con *P. mirabilis* AF. En verde se observa autofluorescencia y la marcación específica para las bacterias (de mayor intensidad), en rojo se observa la actina y en azul el ADN. Las imágenes fueron adquiridas con un objetivo 20X.

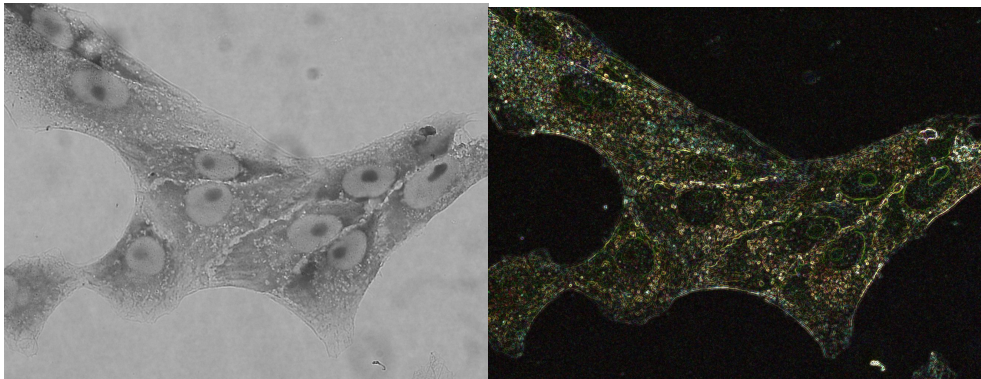


### Adhesión de *P. mirabilis* a células eucariotas

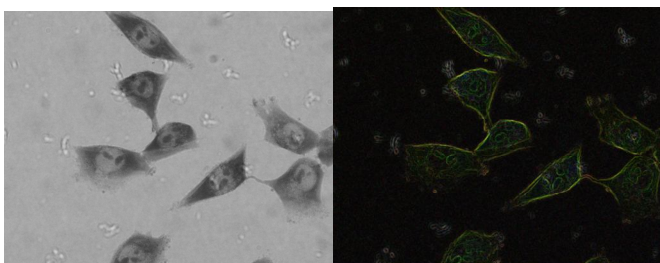
La cuantificación de la adhesión bacteriana a las células eucariotas en cultivo se realizó mediante microscopía óptica. Los cultivos celulares se realizaron sobre cubreobjetos de vidrio, una vez que la monocapa tuvo la densidad celular adecuada se le adicionaron las bacterias y a los distintos tiempos (5, 10 y 15 min) los cubreobjetos fueron lavados para eliminar las bacterias que no estuvieran adheridas y fueron fijados. Luego se realizó una tinción con azul de metileno y se visualizaron al microscopio óptico. De cada tiempo se tomaron 20 campos al azar, los cuales fueron fotografiados para poder posteriormente contar las bacterias adheridas por célula. Con las imágenes obtenidas se realizó un procesamiento con el programa ImageJ, se aplicó el filtro *find edges* (detector de bordes). El filtro usa un detector de bordes de tipo Sobel para resaltar los cambios bruscos en la intensidad de la imagen. De este modo es más sencillo visualizar los bordes de las células eucariotas y localizar las bacterias pues se realzan los contornos.

A continuación se muestran algunas de las imágenes obtenidas sin procesar y luego de aplicado el filtro *find edges*.

Células Vero y T24 control sin infectar



En la imagen de la izquierda se muestra la línea celular Vero y en la imagen de la derecha la misma imagen luego de aplicado el filtro, como se puede apreciar permite determinar claramente los bordes de las células eucariotas y el fondo queda de color negro lo que permite una mejor visualización de las células.



Imágenes de la línea celular T24 a la cual se le realizó el mismo procedimiento que se describió anteriormente.

Mag. P. Scavone



A continuación se muestran algunas de las imágenes obtenidas en el ensayo de adhesión a los distintos tiempos y el procesamiento de las imágenes respectivo.

Línea celular Vero-*P. mirabilis* 2921

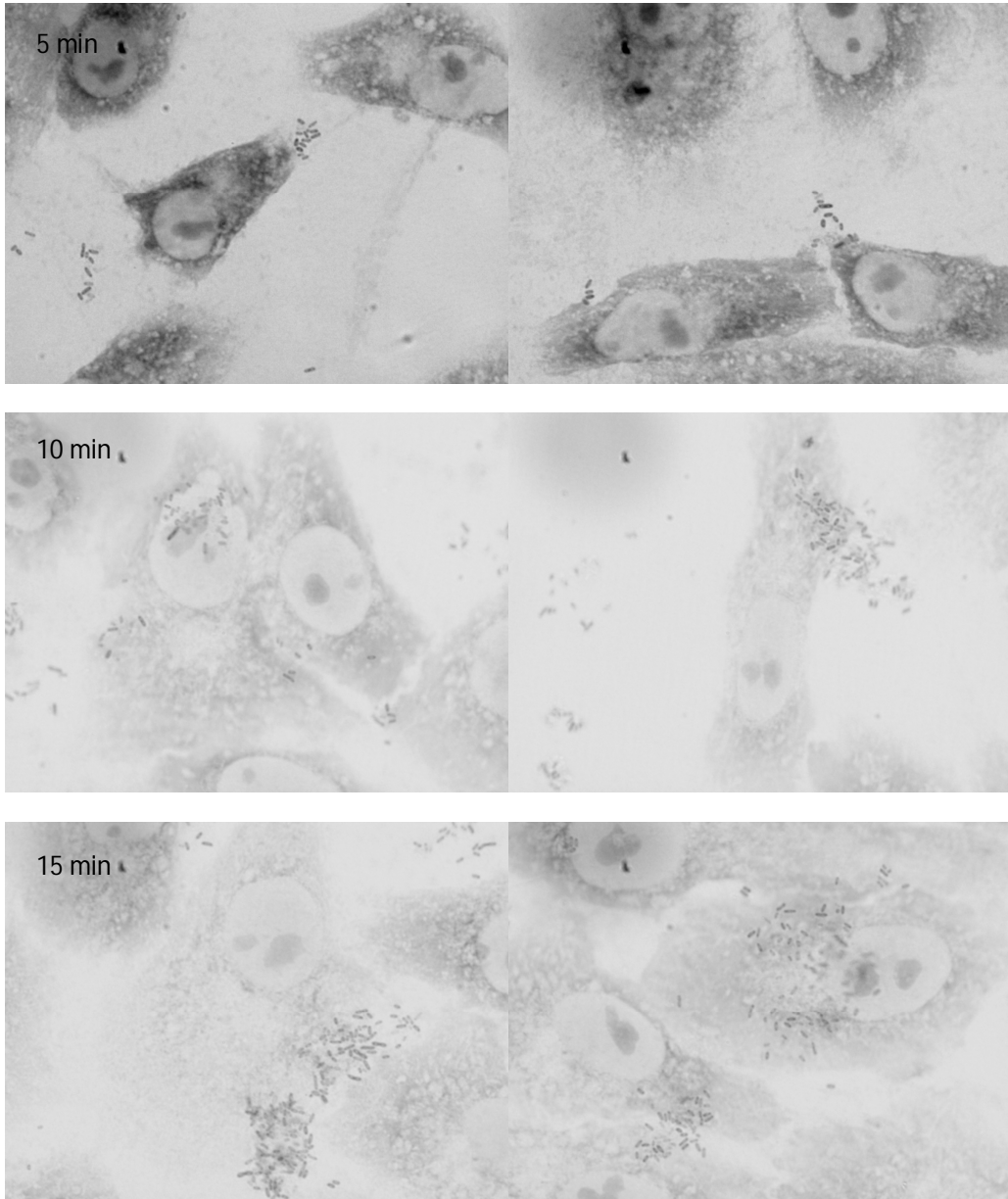


Figura I.K: El panel muestra imágenes representativas del ensayo de adhesión a células Vero de *P. mirabilis* 2921 a los 5, 10 y 15 minutos de adhesión.

Línea celular Vero-*P. mirabilis* 2921, imágenes procesadas

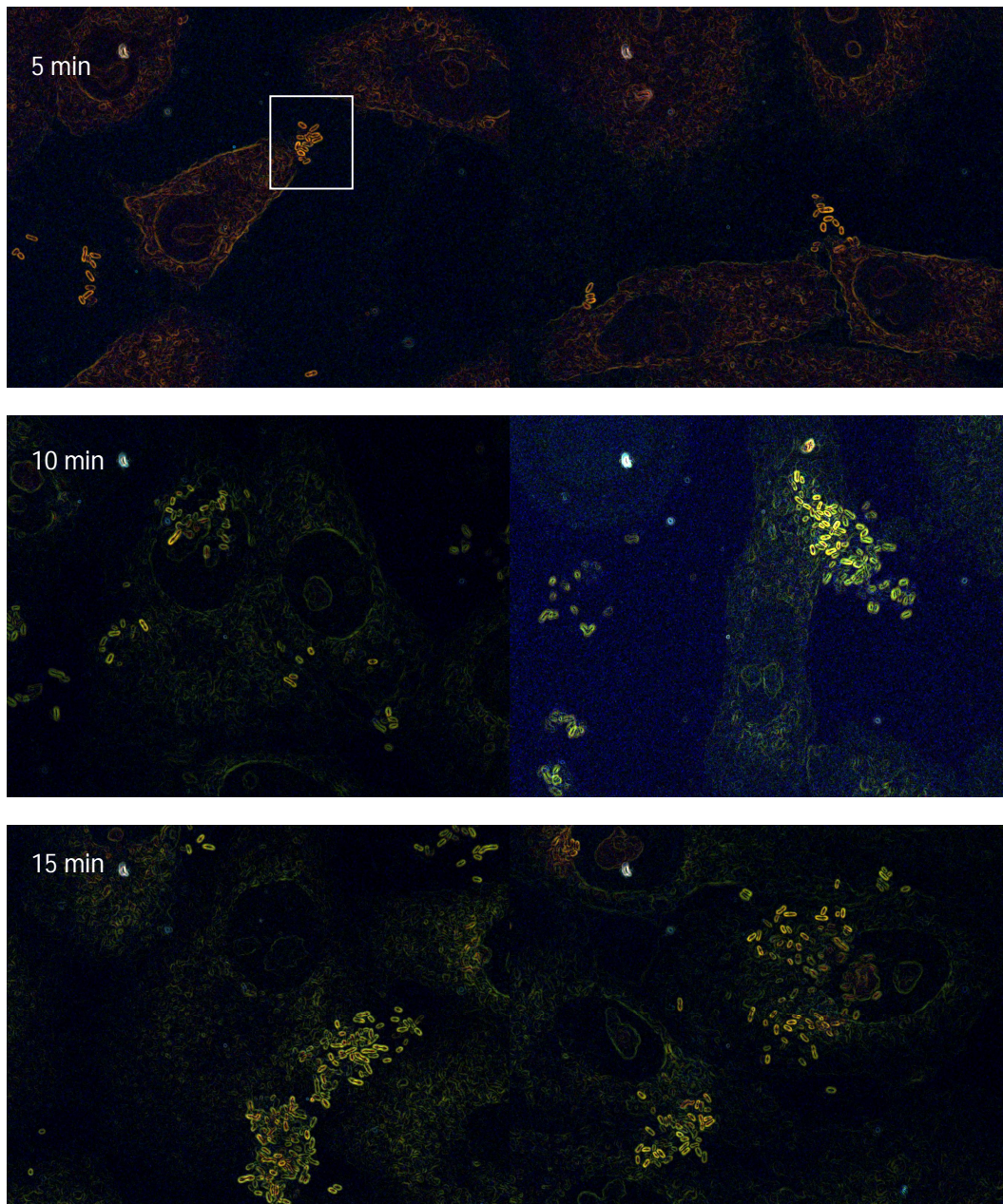


Figura I.L: El panel muestra las imágenes de la figura I.K luego de aplicarle el filtro *find edges* del programa Image J.

Línea celular Vero-*P. mirabilis* MSD2

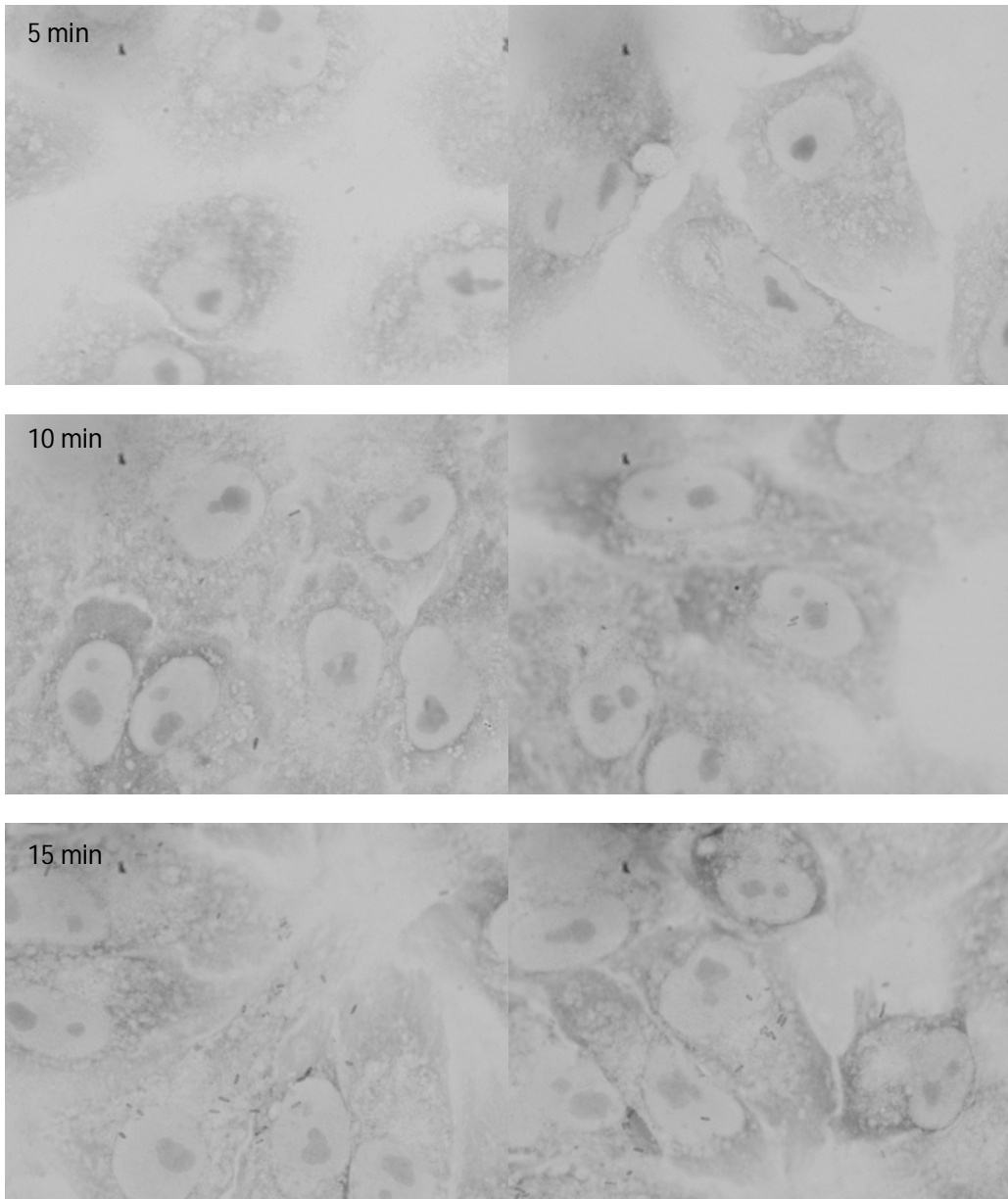


Figura I.M: El panel muestra imágenes representativas del ensayo de adhesión a células Vero de *P. mirabilis* MSD2 a los 5, 10 y 15 minutos de adhesión.



Línea celular Vero-*P. mirabilis* MSD2, imágenes procesadas

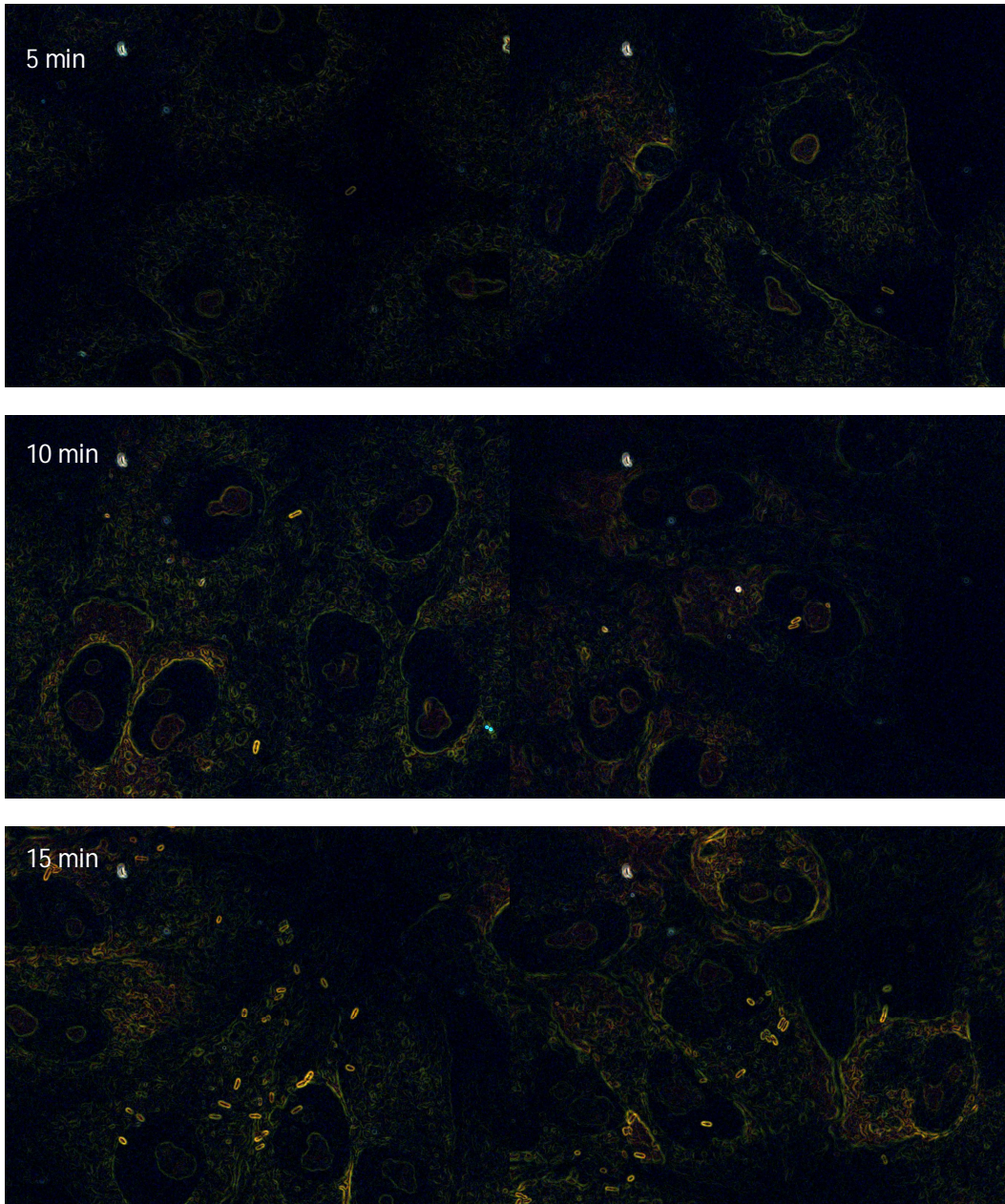


Figura I.N: El panel muestra las imágenes de la figura I.M luego de aplicarle el filtro *find edges* del programa Image J.

Línea celular Vero-*P. mirabilis* AF

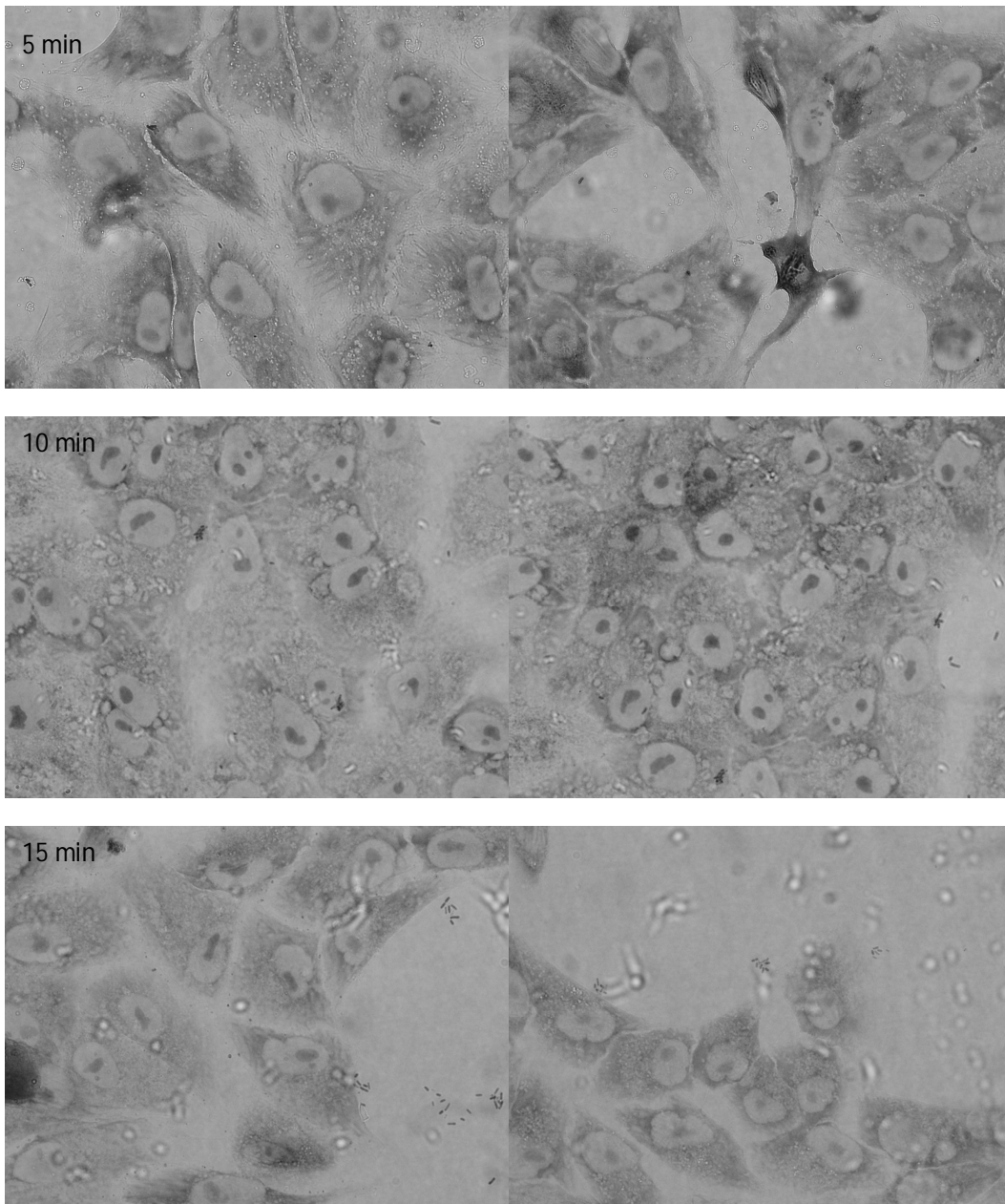


Figura I.O: El panel muestra imágenes representativas del ensayo de adhesión a células Vero de *P. mirabilis* AF a los 5, 10 y 15 minutos de adhesión.



Línea celular Vero-*P. mirabilis* AF, imágenes procesadas

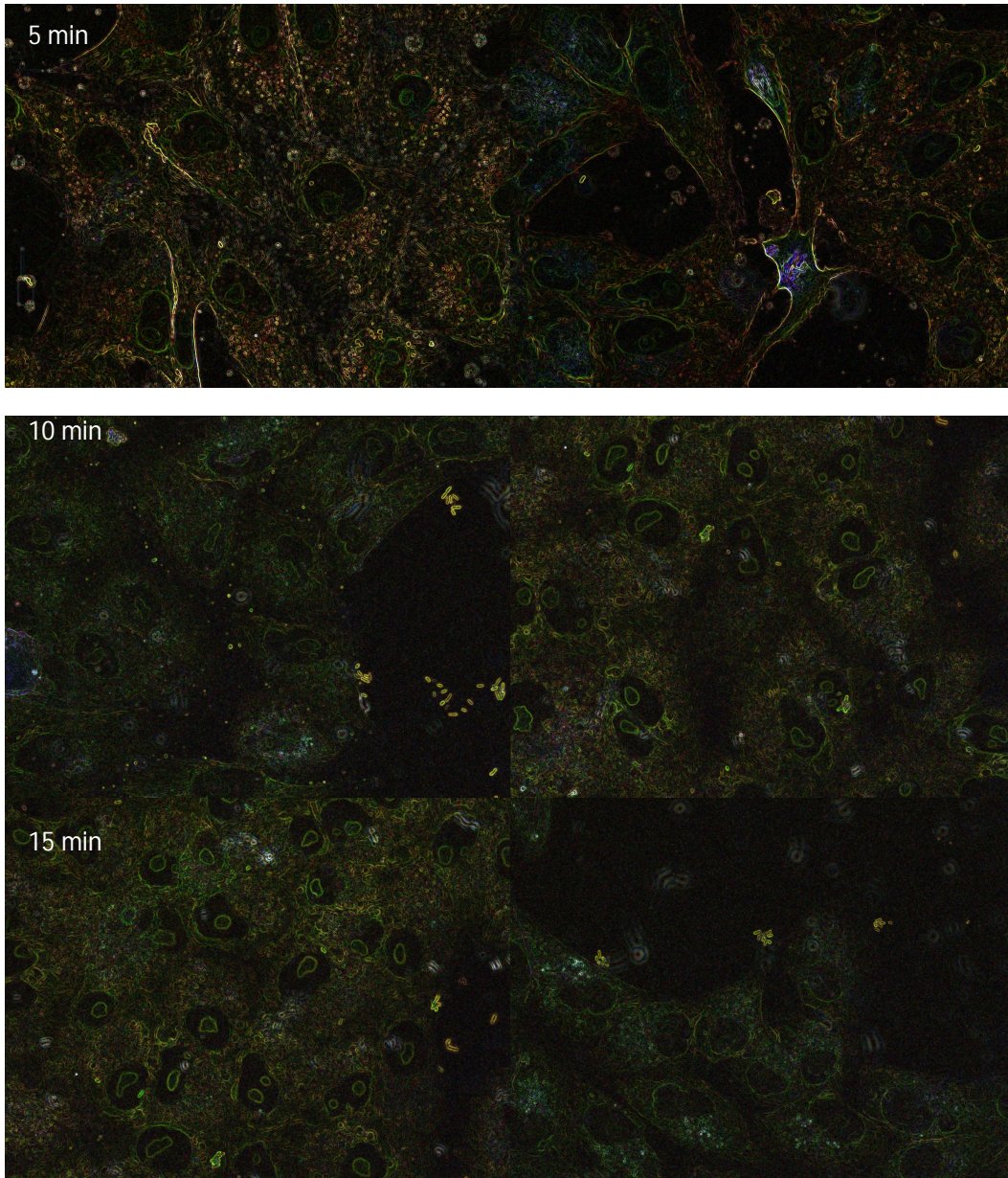


Figura I.P: El panel muestra las imágenes de la figura I.O luego de aplicarle el filtro *find edges* del programa Image J.

Línea celular T24-*P. mirabilis* 2921

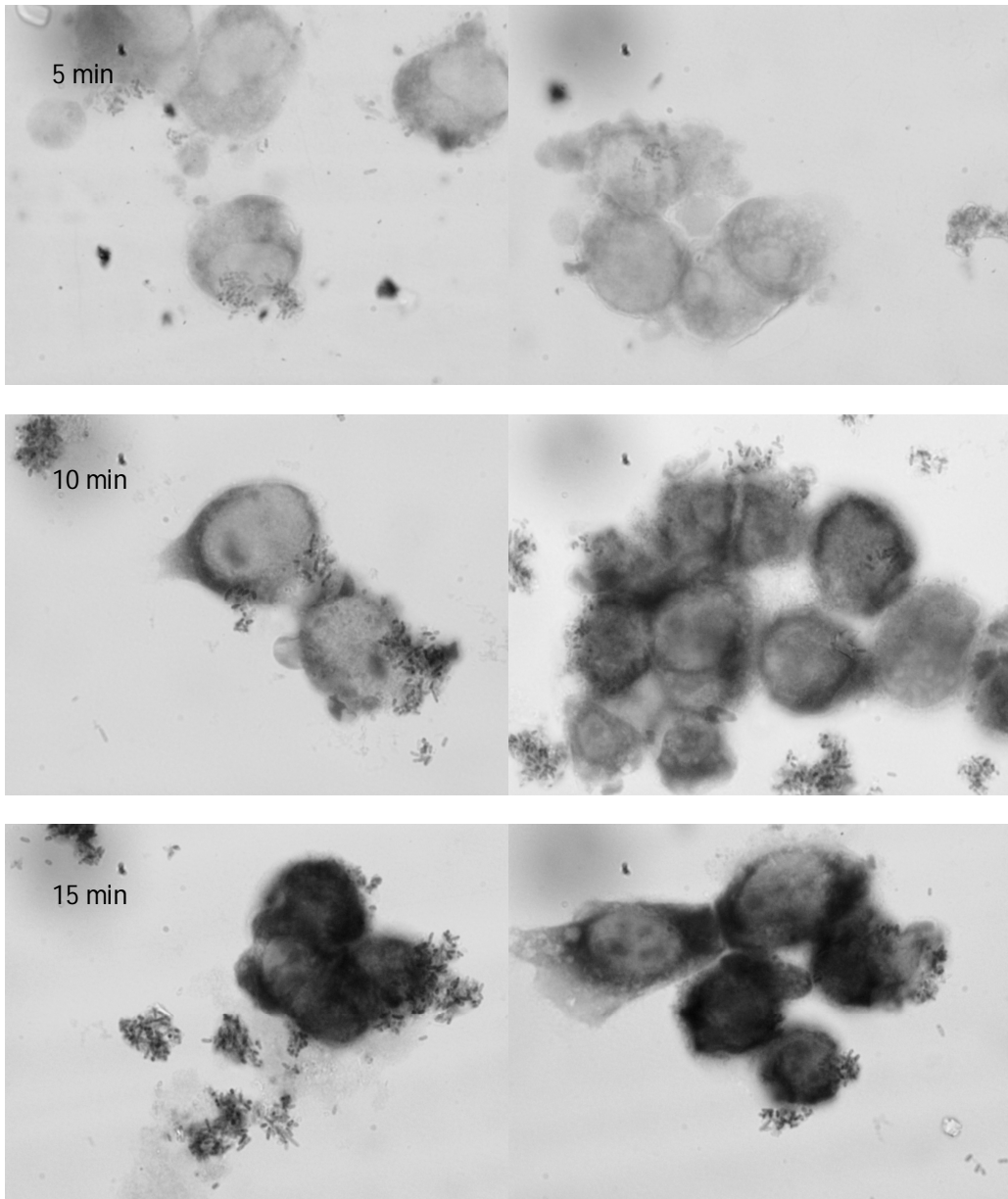


Figura I.Q: El panel muestra imágenes representativas del ensayo de adhesión a células T24 de *P. mirabilis* 2921 a los 5, 10 y 15 minutos de adhesión. Los cubre-objetos conteniendo las células y bacterias fueron teñidas con azul de metileno. Se contabilizaron 20 campos al azar y en ellos se contaron la cantidad de bacterias adheridas a las células, no considerándose las bacterias adheridas al vidrio.

Mag. P. Scavone



Línea celular T24-*P. mirabilis* 2921, imágenes procesadas

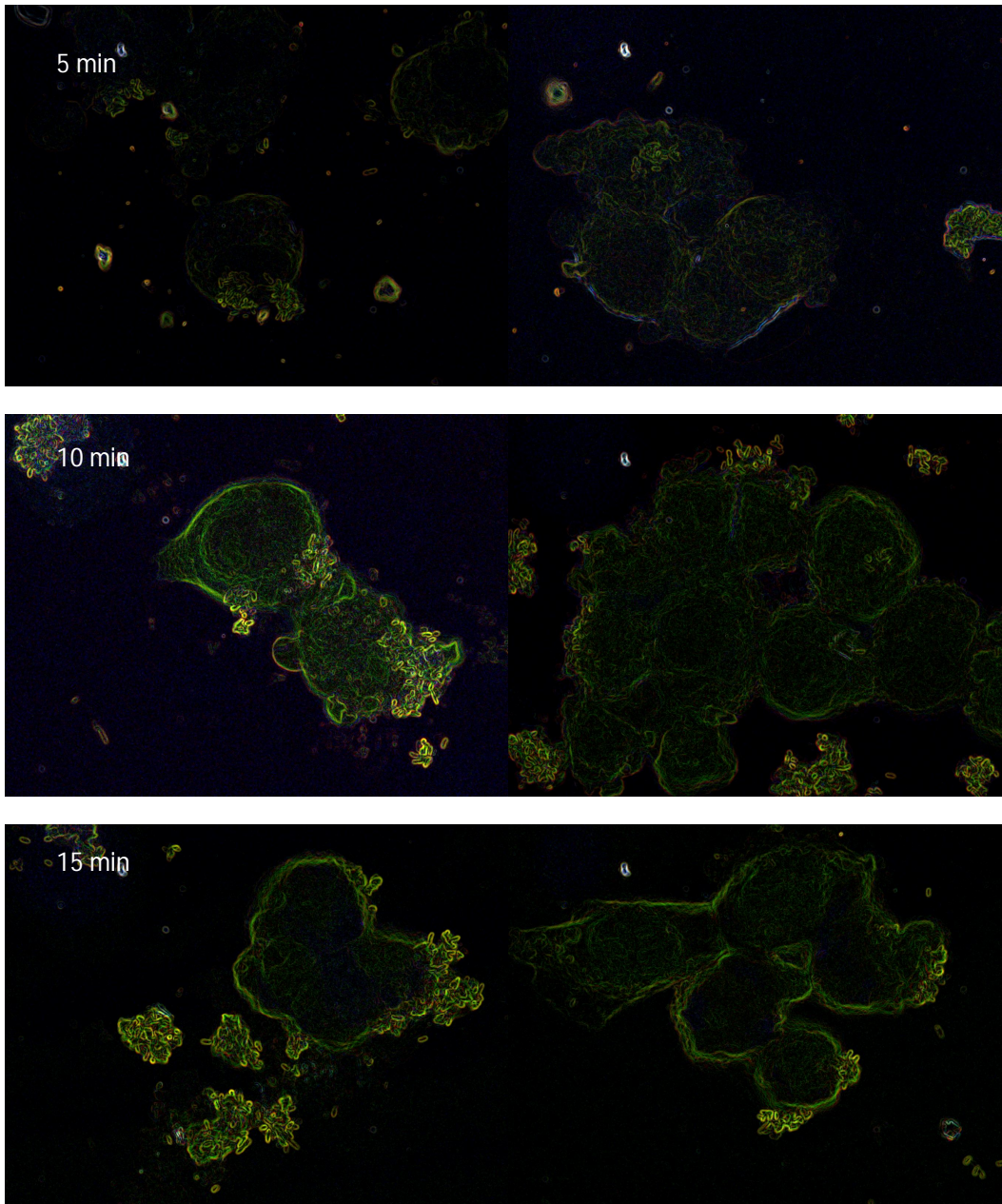


Figura I.R: El panel muestra las imágenes de la figura I.Q luego de aplicarle el filtro *find edges* del programa Image J.

Línea celular T24-*P. mirabilis* MSD2

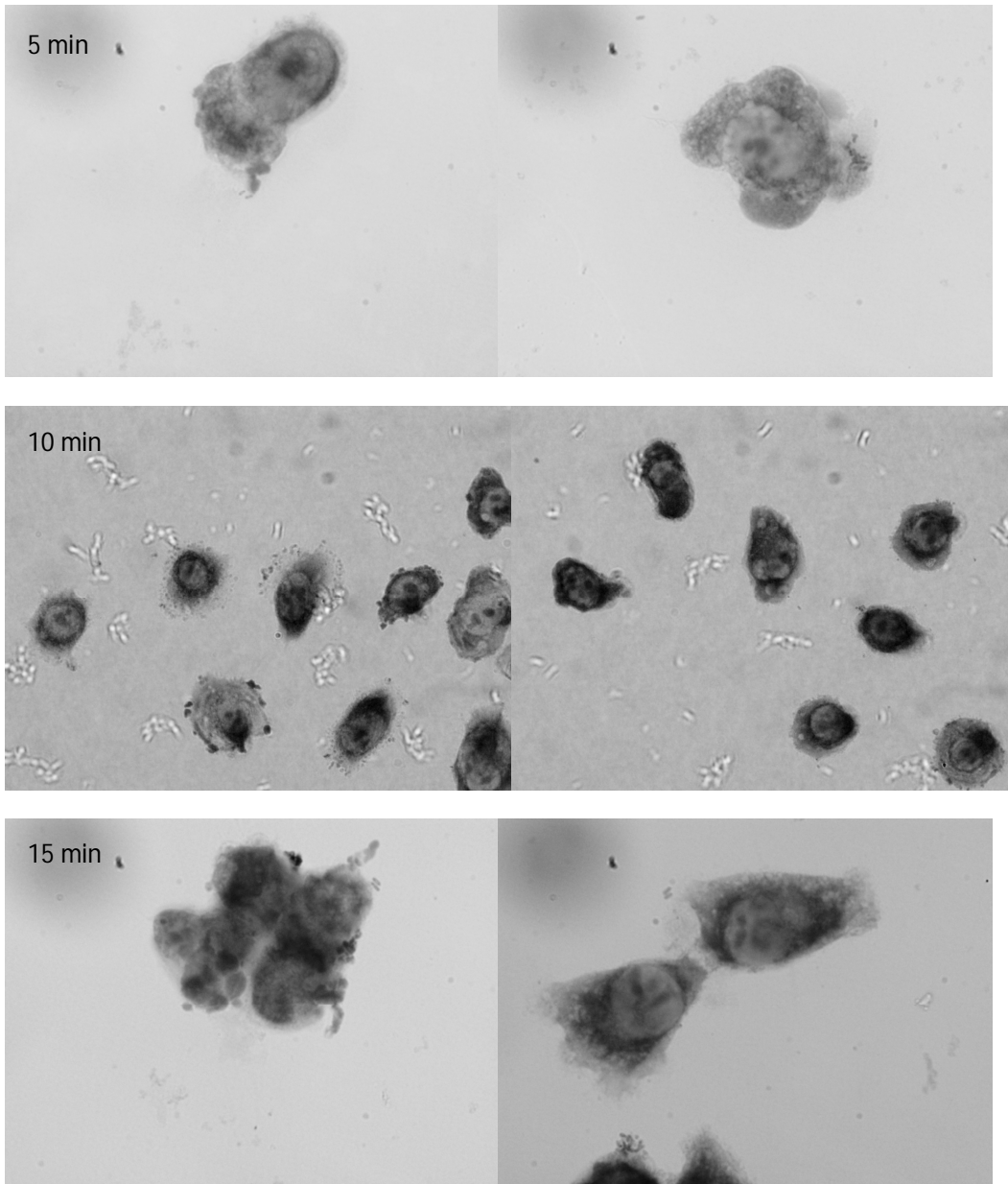


Figura I.S: El panel muestra imágenes representativas del ensayo de adhesión a células T24 de *P. mirabilis* MSD2 a los 5, 10 y 15 minutos de adhesión.



Línea celular T24-*P. mirabilis* MSD2, imágenes procesadas

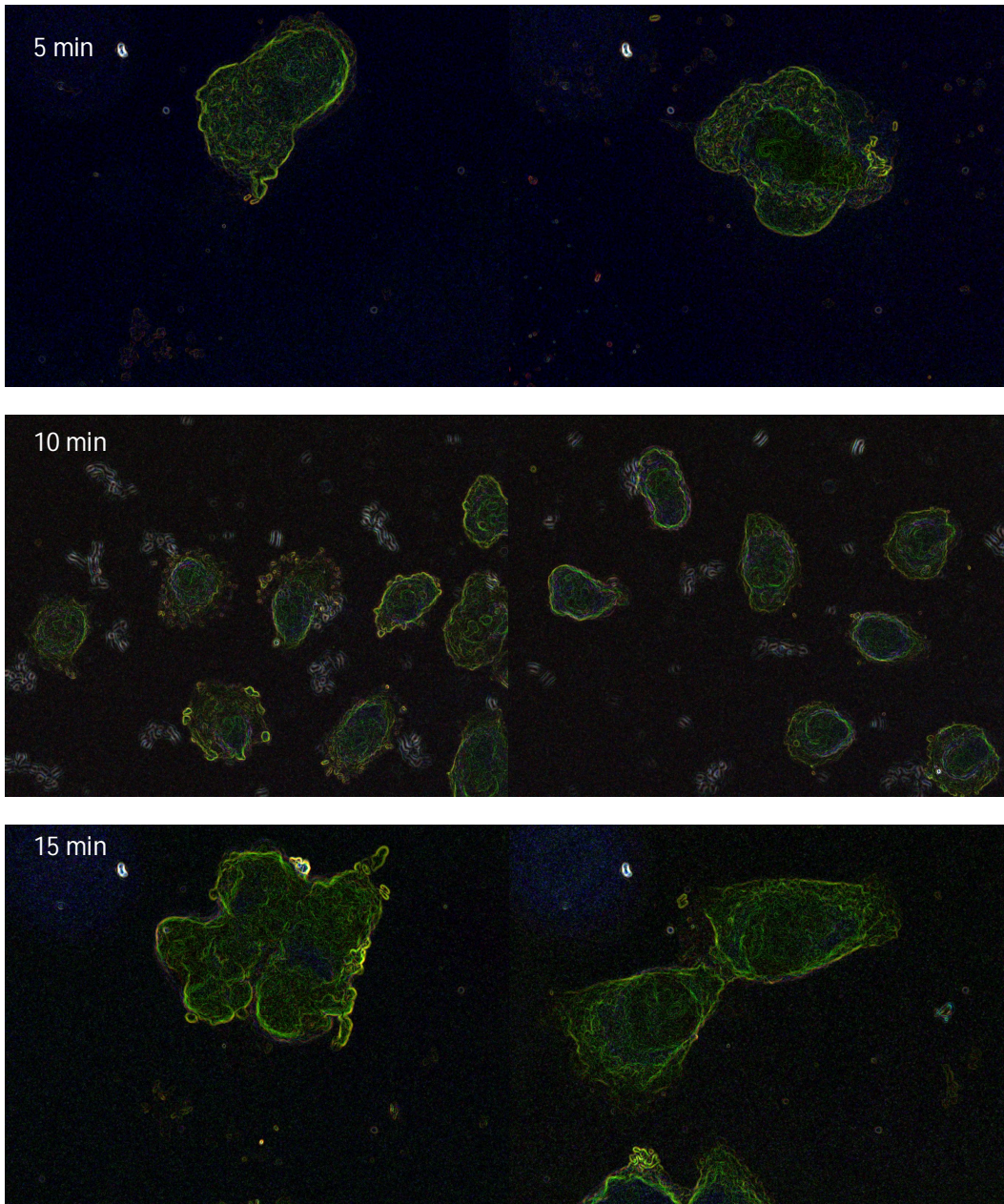


Figura I.R: El panel muestra las imágenes de la figura I.Q luego de aplicarle el filtro *find edges* del programa Image J.

Línea celular T24-*P. mirabilis* AF

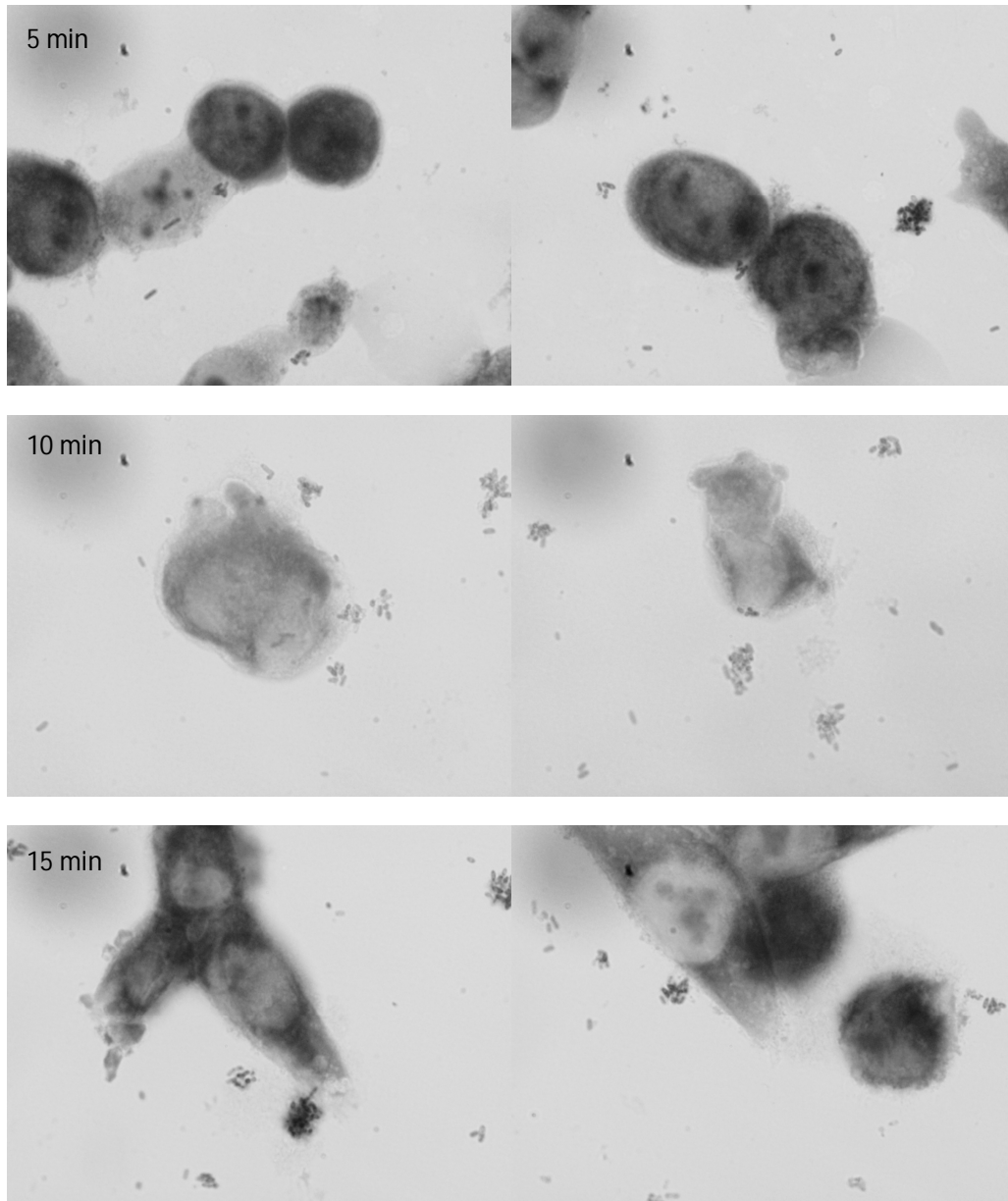


Figura I.S: El panel muestra imágenes representativas del ensayo de adhesión a células T24 de *P. mirabilis* AF a los 5, 10 y 15 minutos de adhesión. Los cubre-objetos conteniendo las células y bacterias fueron teñidas con azul de metileno. Se contabilizaron 20 campos al azar y en ellos se contaron la cantidad de bacterias adheridas a las células, no considerándose las bacterias adheridas al vidrio.



Línea celular T24-*P. mirabilis* AF, imágenes procesadas

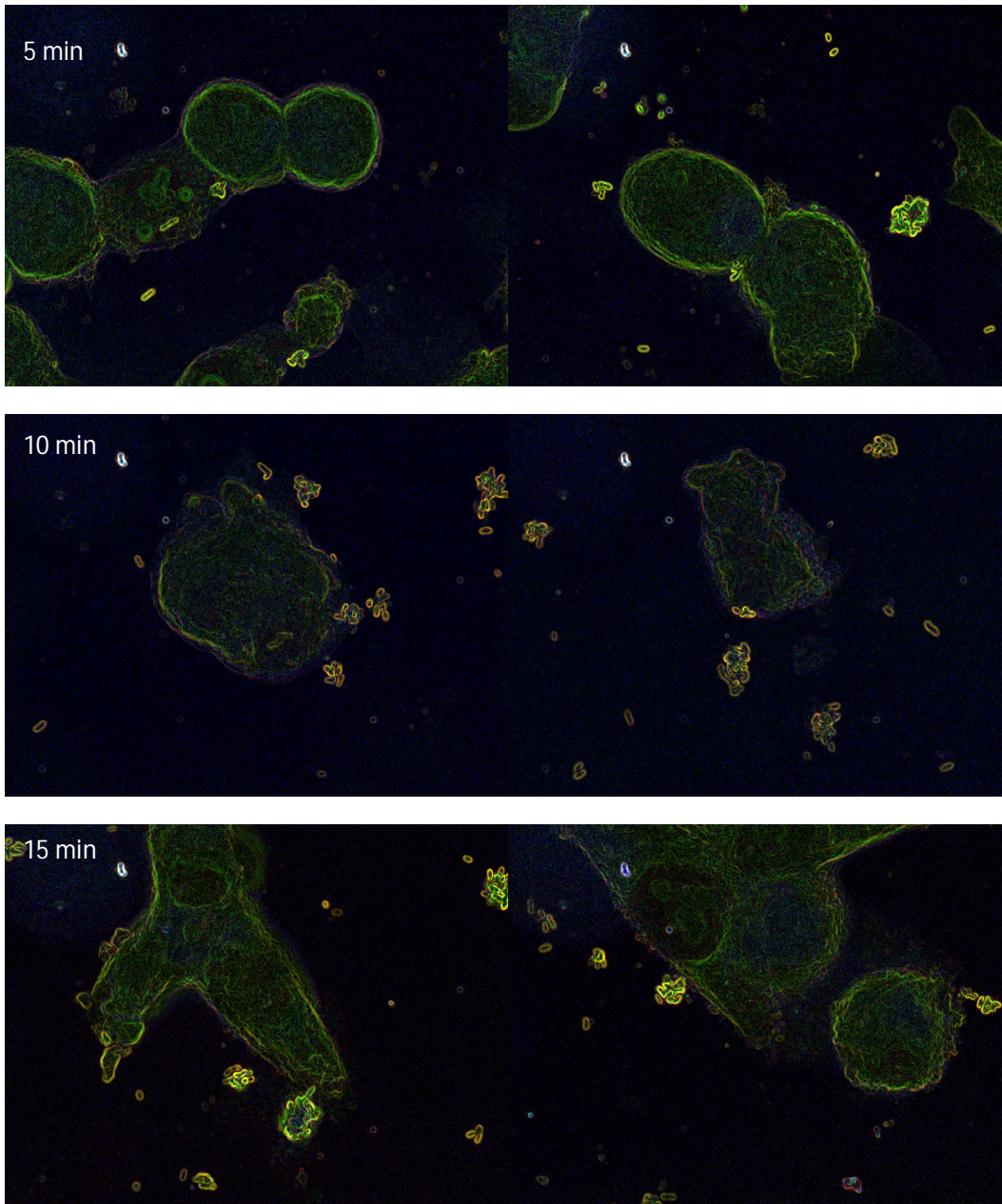


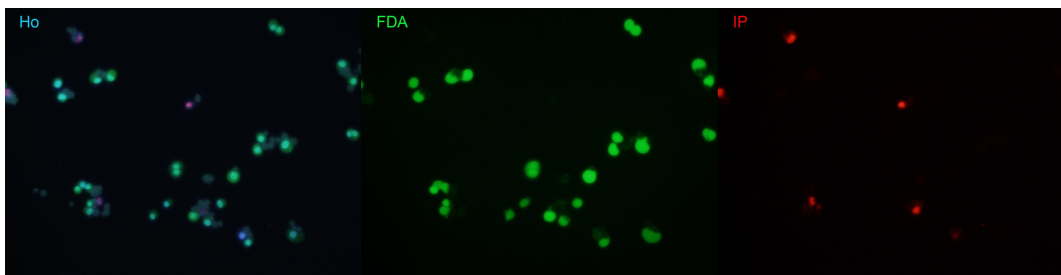
Figura I.R: El panel muestra las imágenes de la figura I.Q luego de aplicarle el filtro *find edges* del programa Image J.

### *Evaluación de la inducción de apoptosis*

La evaluación de la inducción de apoptosis se realizó por triple tinción empleando 3 fluoróforos, diacetato de fluoresceína (FDA), ioduro de propidio (IP) y Hoechst 33342 (Ho). El FDA es el indicador de la integridad de la membrana ya que es transformado a una sustancia fluorescente (verde) por enzimas activas en la célula que tiene su membrana íntegra. El IP es un intercalante del ADN y ARN y sólo atraviesa la membrana cuando hay rupturas en la misma. Por último el Ho es también un intercalante de ADN y permite visualizar la estructura nuclear pudiendo diferenciar distintas morfologías (presencia de micronúcleos, de núcleos múltiples, entre otros).

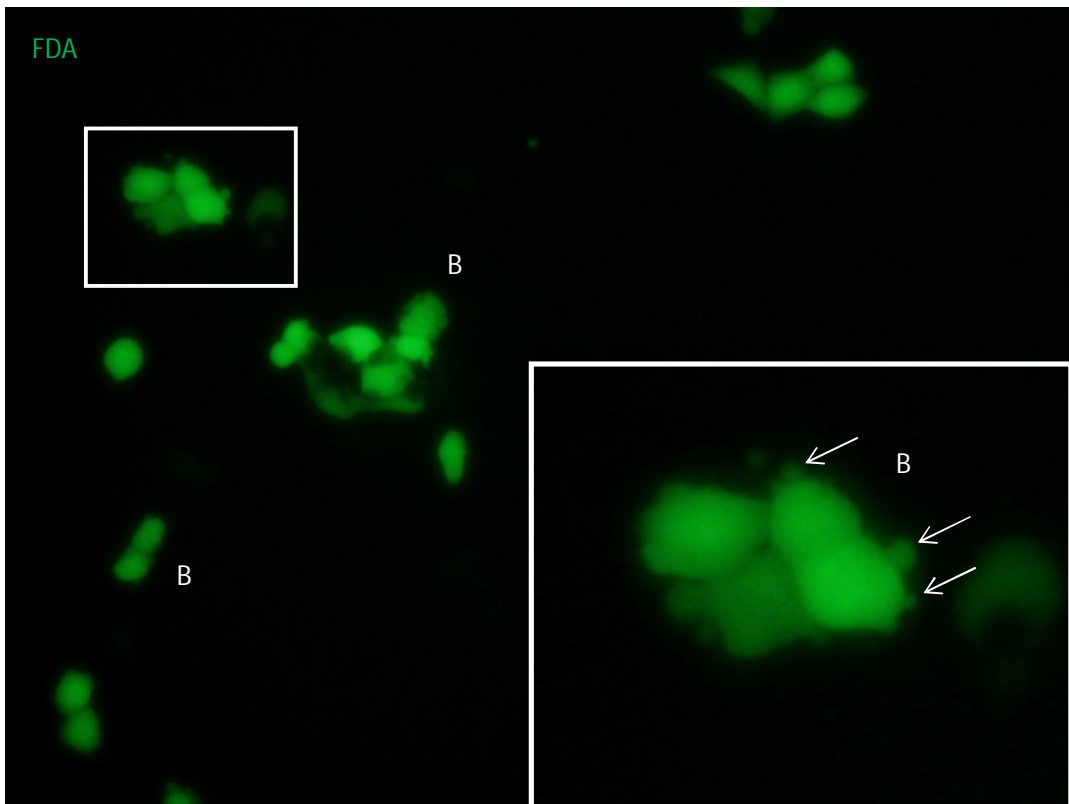
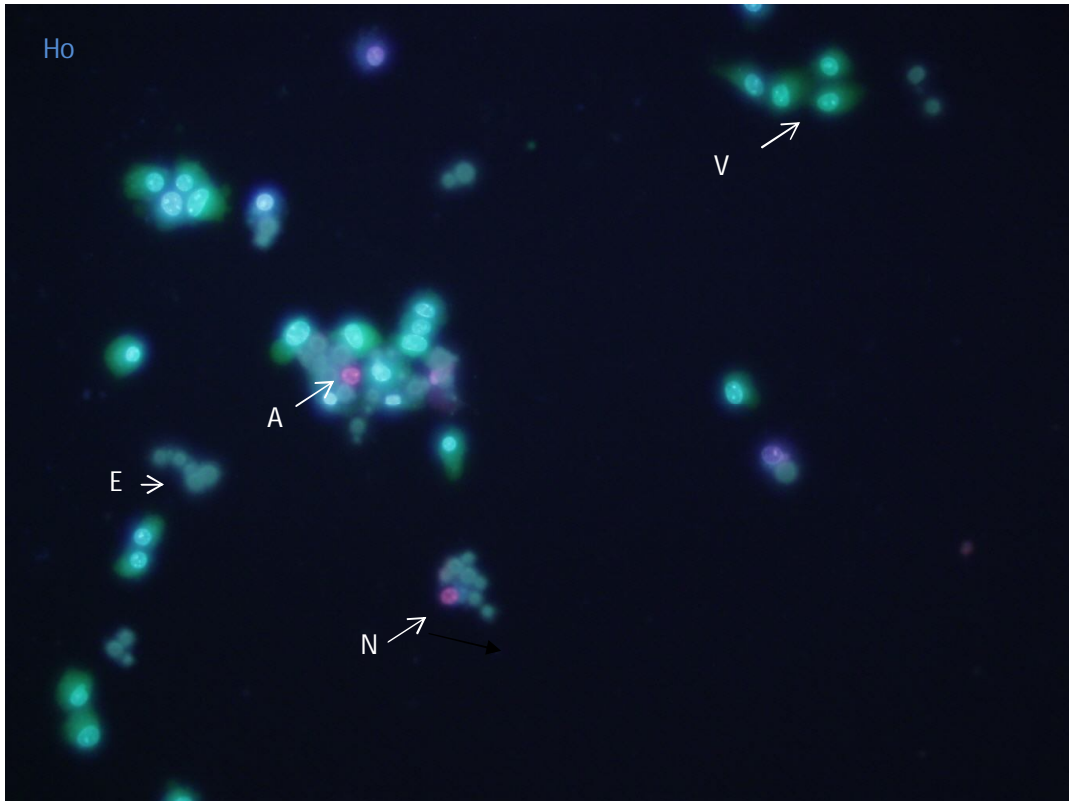
Las células vivas se visualizaron con el citoplasma de color verde y con su núcleo azul de tamaño normal. Las células apoptóticas se observaron con citoplasma de color rojo y núcleo de tamaño igual o menor al normal con cromatina en la periferia condensada, o núcleo de forma anormal con límites difusos y cromatina condensada o gránulos heteropicnóticos. Las células necróticas se observaron con el citoplasma de color rojo y el núcleo de apariencia normal. Además se identificó la presencia de cuerpos apoptóticos conocidos como estallidos y la presencia de blebs en la superficie celular.

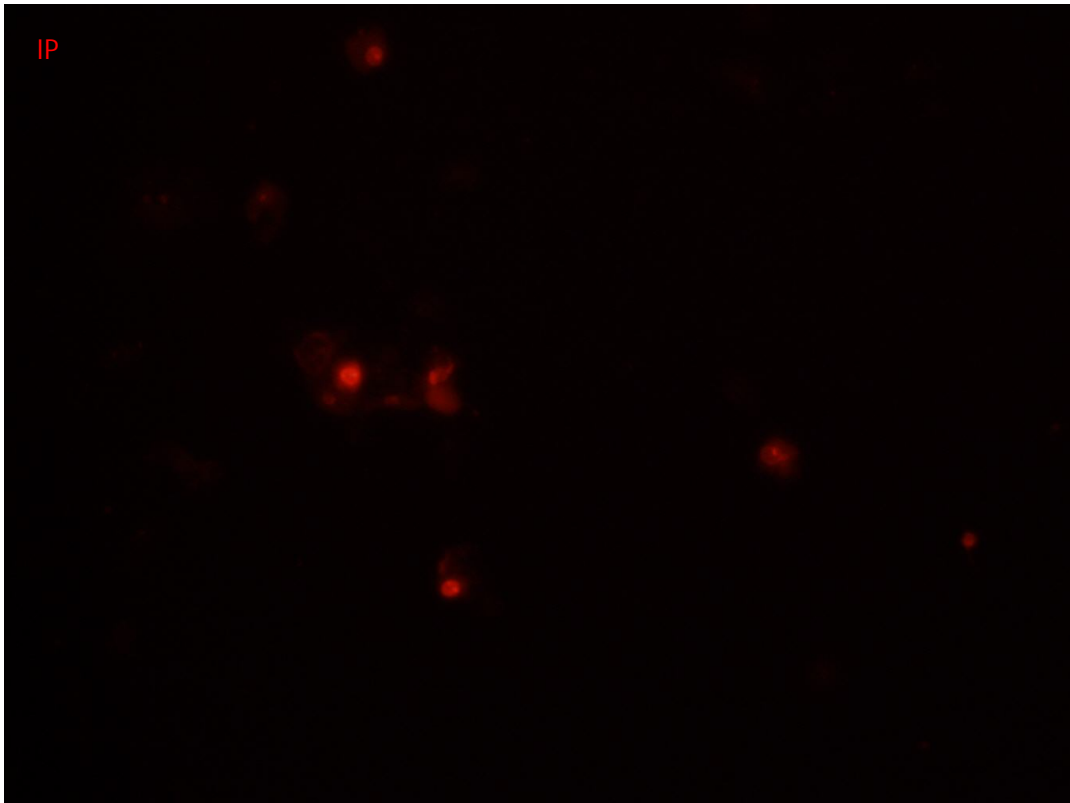
A continuación se muestran las imágenes adquiridas inmediatamente luego de realizar la triple tinción. El mismo campo fue adquirido con 3 filtros diferentes, azul para la captura de la emisión del fluoróforo Ho (en particular el filtro que posee el microscopio de epifluorescencia deja pasar toda la emisión mayor a 420 nm por lo que se observa también la emisión del canal verde y del rojo), filtro verde para la captura de la emisión del FDA y rojo para la del IP.



En las siguientes imágenes se muestran identificados los distintos fenómenos evaluados: V: células vivas, A: células apoptóticas, N: células necróticas, E: estallidos y B: células con blebs. Los tres canales adquiridos con los 3 filtros se muestran por separado.







## ANEXO II: Citometría de flujo

Para evaluar el reclutamiento de células inmunes en el tracto urinario se realizó la infección experimental en 4 grupos de animales. Cada uno de ellos se infectó con las cepas *P. mirabilis* 2921, MSD2 o AF y un grupo sin infectar como control. El reclutamiento se evaluó en primera instancia a las 2 y 24 hs post-infección tanto en riñones como en vejigas.

Los marcadores celulares empleados para las células provenientes de vejigas y riñones fueron CD45-FitC, Ly6G-PE, CD11c -APC.

Los resultados de la primera citometría de flujo realizadas en vejigas de los animales con 2 y 24 horas de infección mostraron que el mayor reclutamiento de células se dio a las 24 hs, siendo mayoritarios los neutrófilos (Ly6G+), los linfocitos (definidos por su ubicación en el gráfico) y células CD11c+.

A continuación se muestran los histogramas obtenidos en las citometrías para un animal de cada grupo a las 2 y 24 hs en vejigas y riñones. Previa a la realización de la citometría se contó la cantidad de células viables por órgano y con este dato se calculó las cantidades de células en cada una de las regiones estudiadas en las citometrías.

### Citometría en células provenientes de vejigas

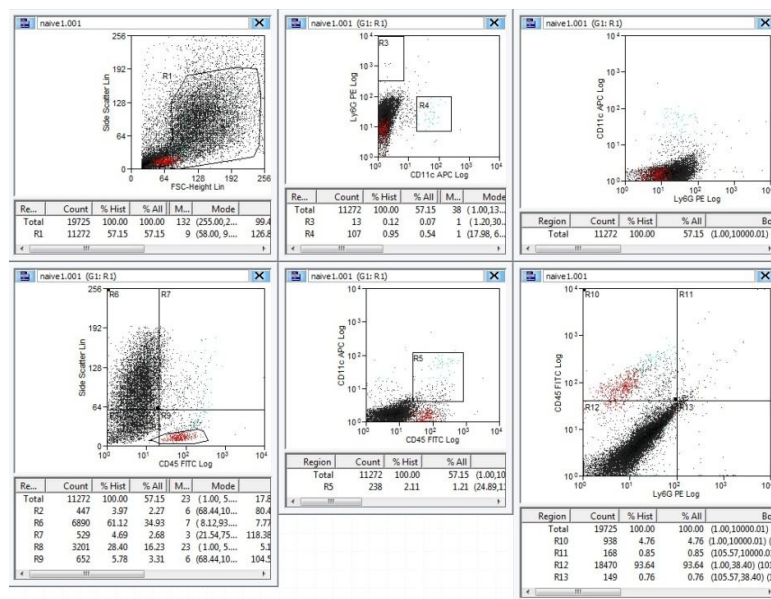


Figura II.a: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de las vejigas de un animal naive control. La región R1 correspondió a las células con el tamaño y granularidad de los leucocitos, la región R2 en el gráfico side scatter vs CD45+ correspondió a la región en donde se encuentran los linfocitos, la región R3 mostró las células Ly6G+ (neutrófilos) y la región R4 las células CD11c+.

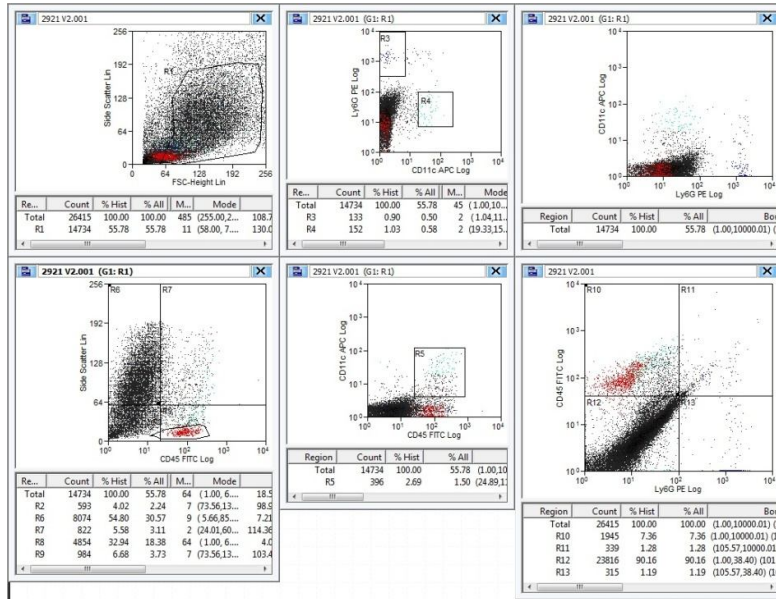


Figura II.b: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de las vejigas de un animal con 2 hs de infección por *P. mirabilis* 2921. Las regiones fueron las mismas que se indicaron en el figura IIa.

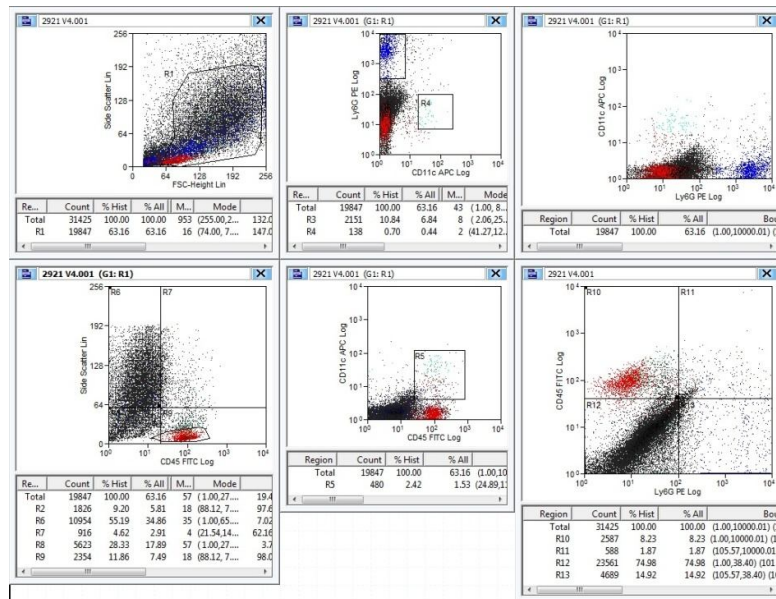


Figura II.c: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de las vejigas de un animal con 24 hs de infección por *P. mirabilis* 2921. Las regiones fueron las mismas que se indicaron en el figura IIa.

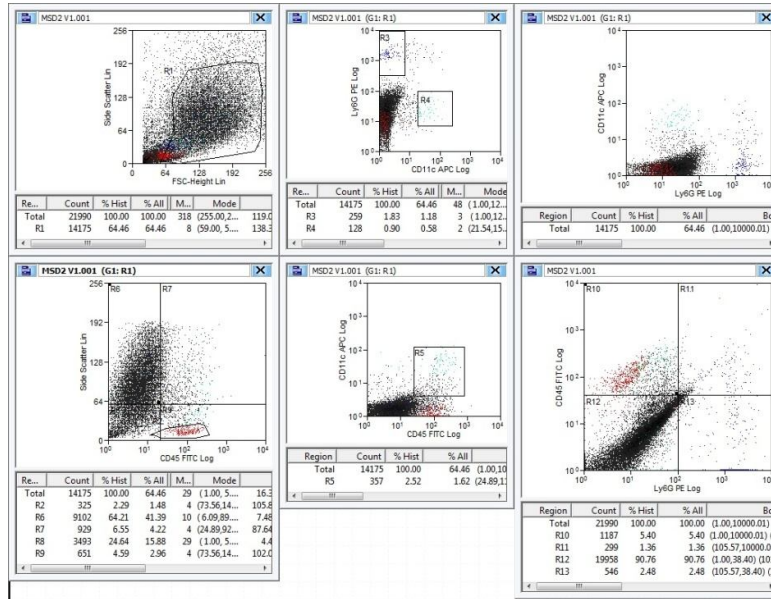


Figura II.d: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de las vejigas de un animal con 2 hs de infección por *P. mirabilis* MSD2. Las regiones fueron las mismas que se indicaron en el figura II.a.

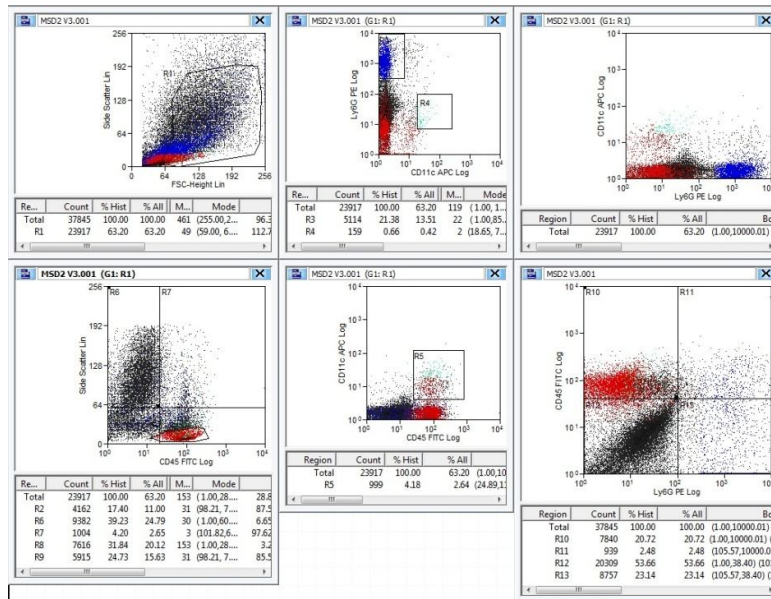


Figura II.e: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de las vejigas de un animal con 24 hs de infección por *P. mirabilis* MSD2. Las regiones fueron las mismas que se indicaron en el figura II.a.



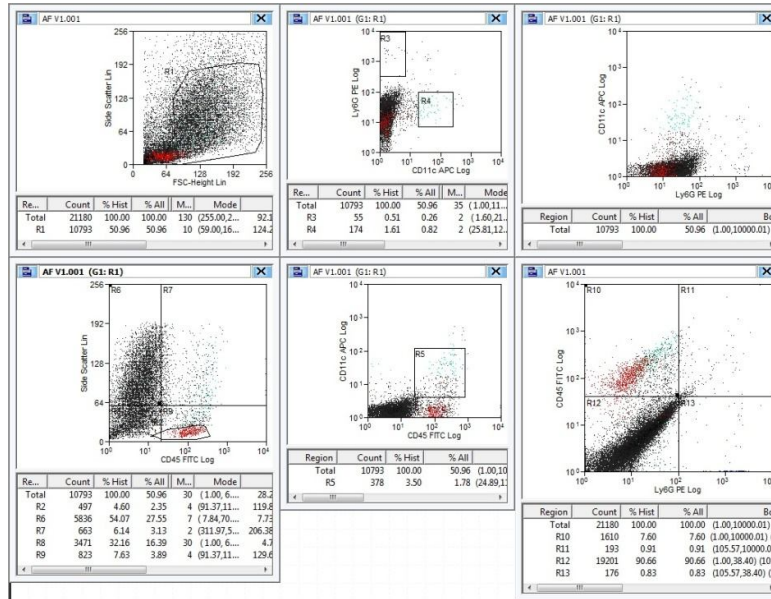


Figura II.f: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de las vejigas de un animal con 2 hs de infección por *P. mirabilis* AF. Las regiones fueron las mismas que se indicaron en el figura II.a.

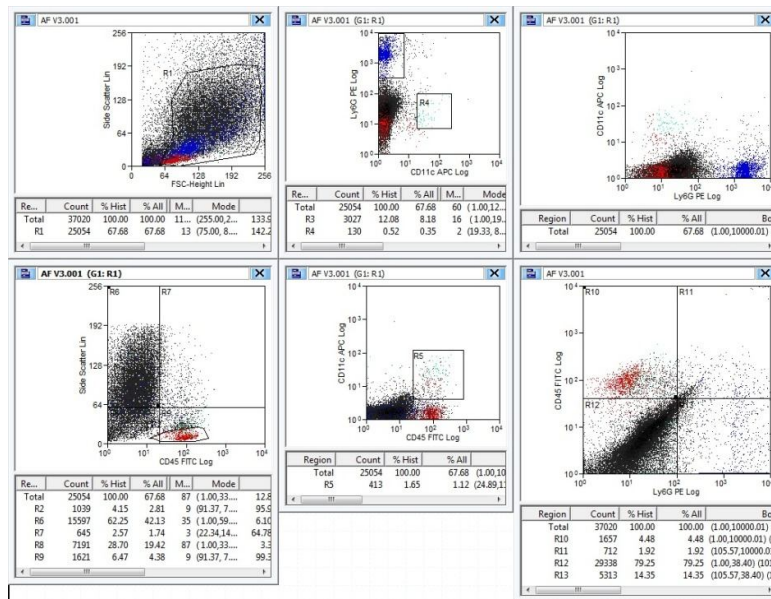


Figura II.g: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de las vejigas de un animal con 24 hs de infección por *P. mirabilis* AF. Las regiones fueron las mismas que se indicaron en el figura II.a.



### Citometría de células provenientes de riñón

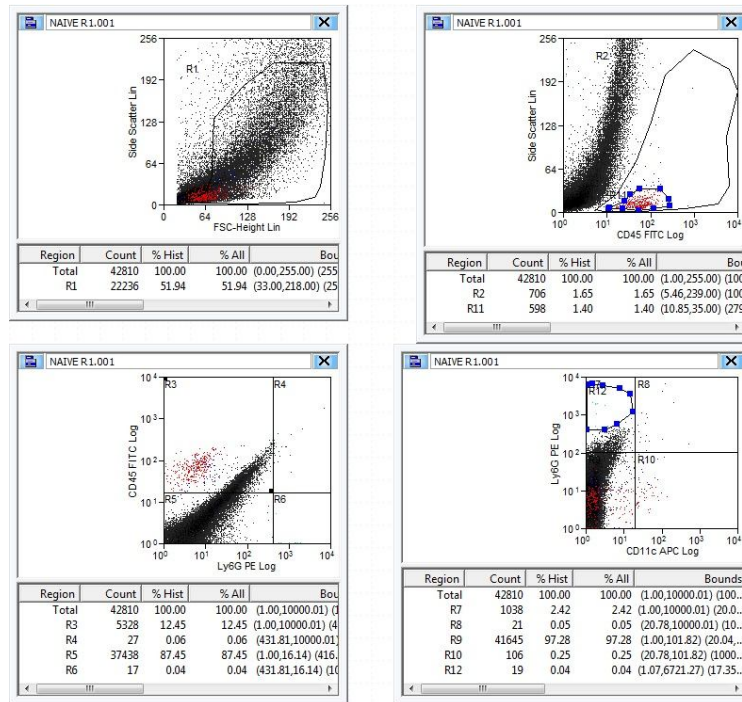


Figura II.h: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de los riñones de un animal naive control. La región R1 correspondió a las células con el tamaño y granularidad de los leucocitos, la región R11 en el gráfico side scatter vs CD45+ correspondió a la región en donde se encuentran los linfocitos, la región R12 mostró las células Ly6G+ (neutrófilos) y la región R10 las células CD11c+.

Cabe destacar que la manipulación de las células provenientes de los riñones fue muy difícil porque rápidamente se formaban agregados lo que genera inconvenientes al momento de pasar las células por el citómetro.

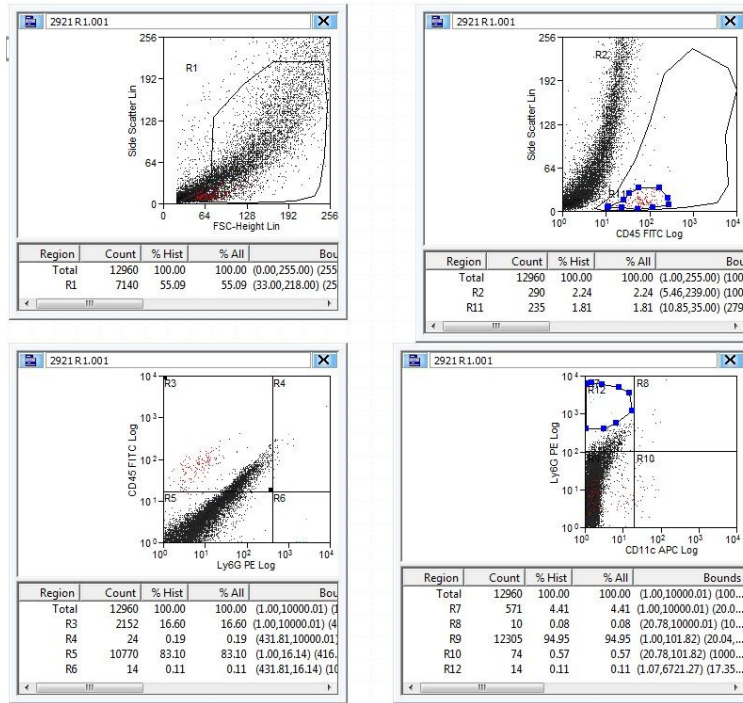


Figura II.i: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de los riñones de un animal con 2 hs de infección con *P. mirabilis* 2921. Las regiones que se analizaron fueron las mismas que están indicadas en la figura II h.

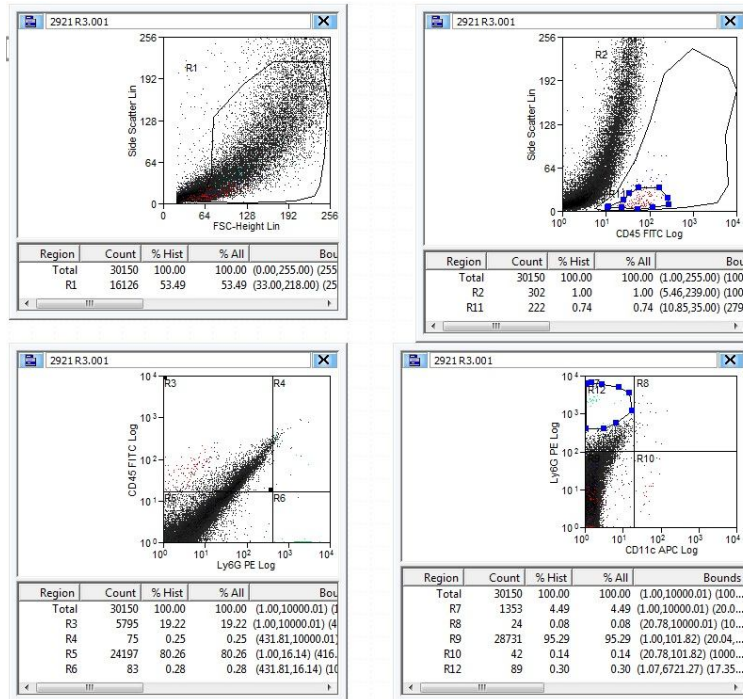


Figura II.j: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de los riñones de un animal con 24 hs de infección con *P. mirabilis* 2921. Las regiones que se analizaron fueron las mismas que están indicadas en la figura II h.

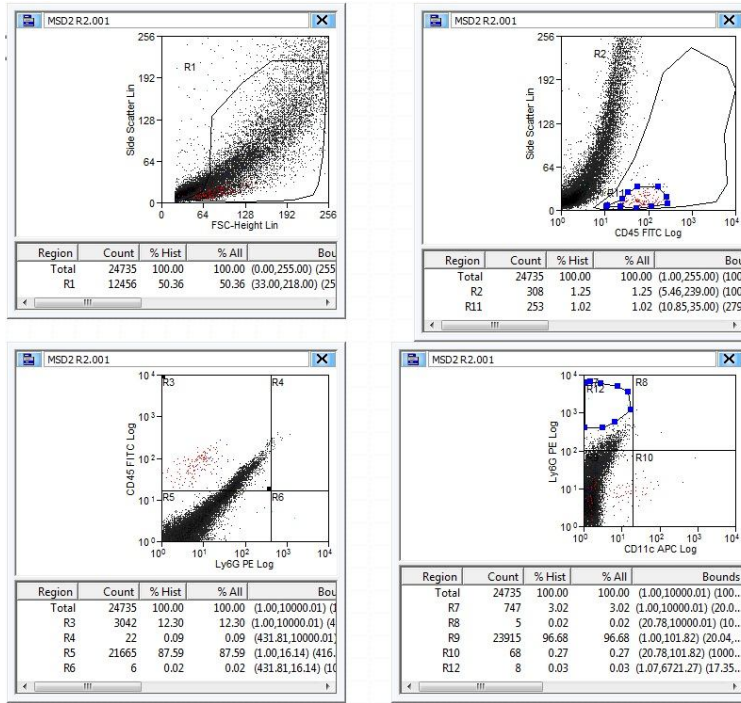


Figura II.k: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de los riñones de un animal con 2 hs de infección con *P. mirabilis* MSD2. Las regiones que se analizaron fueron las mismas que están indicadas en la figura II h.

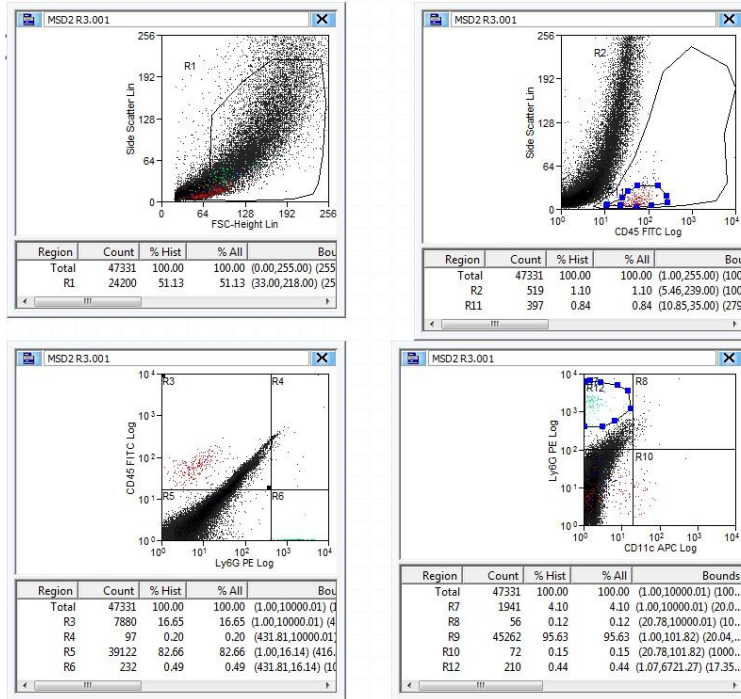


Figura II.L: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de los riñones de un animal con 24 hs de infección con *P. mirabilis* MSD2. Las regiones que se analizaron fueron las mismas que están indicadas en la figura II h.

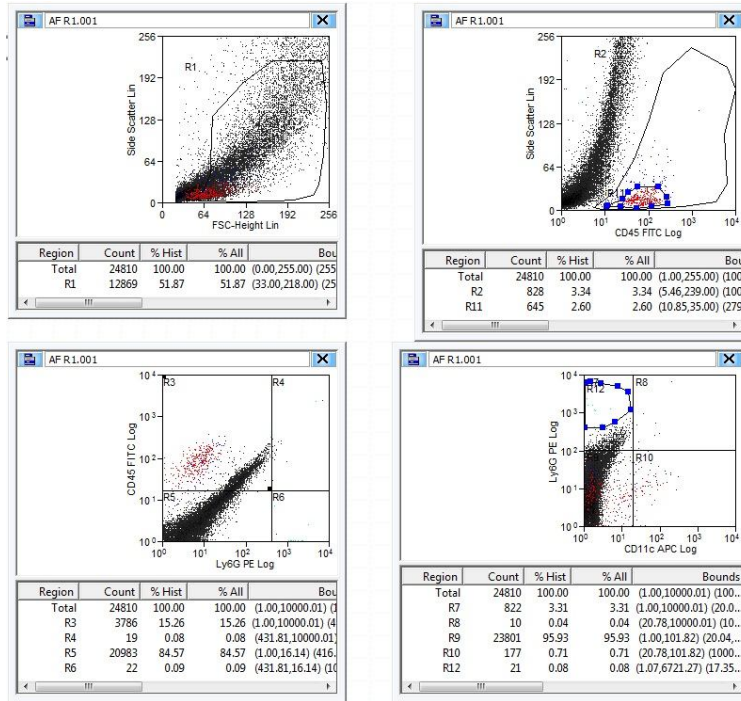


Figura II.L: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de los riñones de un animal con 2 hs de infección con *P. mirabilis* AF. Las regiones que se analizaron fueron las mismas que están indicadas en la figura II h.

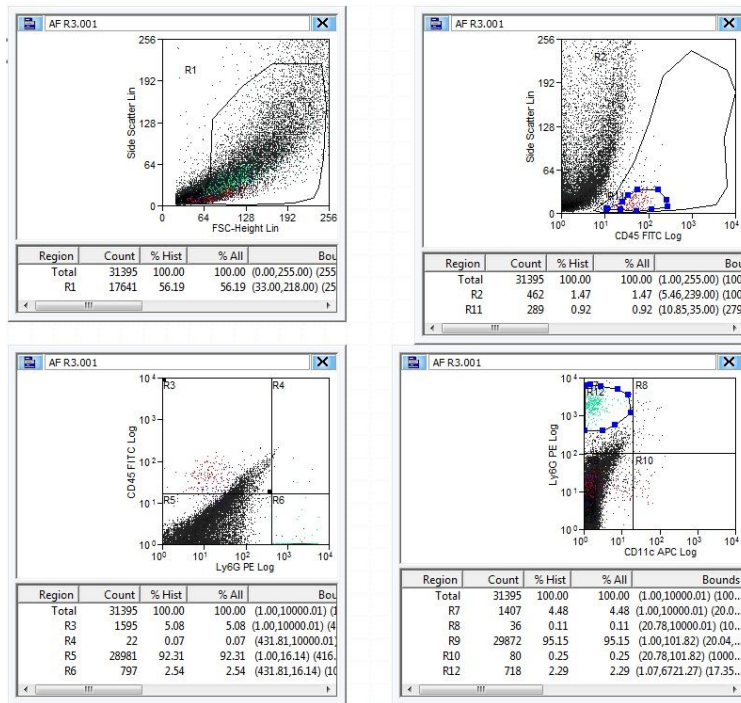


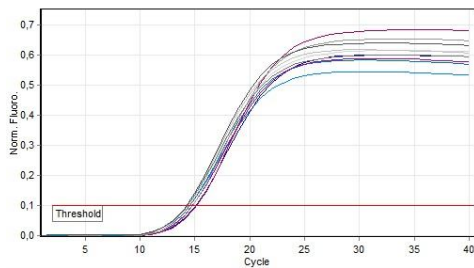
Figura II.M: Gráficos correspondientes a las adquisiciones realizadas en el citómetro de flujo de las células provenientes de los riñones de un animal con 24 hs de infección con *P. mirabilis* AF. Las regiones que se analizaron fueron las mismas que están indicadas en la figura II h.

A partir de los porcentajes obtenidos en las citometrías y con el conteo de células viables por órgano se calcularon las cantidades de células en cada población celular. Para cada tipo celular se calcularon los promedios de número de células para cada grupo de animales infectados y se muestran en las Figuras 20 y 21 (pág. 65-66).

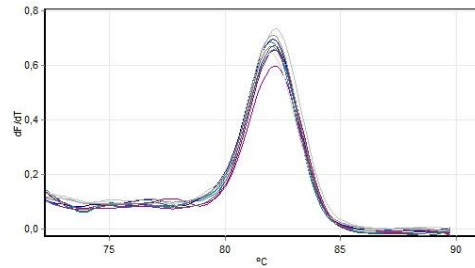
## ANEXO III: Real Time PCR

A continuación se muestran las curvas de amplificación y de disociación de los genes de la  $\beta$ -actina, IL-6, CXCL10, CCL20, IFN- $\gamma$ , CXCL1, IL-17A e IL17F murinos obtenidas con la técnica de amplificación por PCR en tiempo real con el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science).

### *$\beta$ -actina*

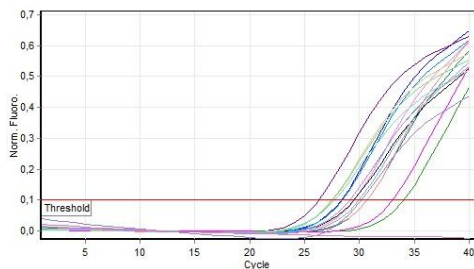


Curva de amplificación

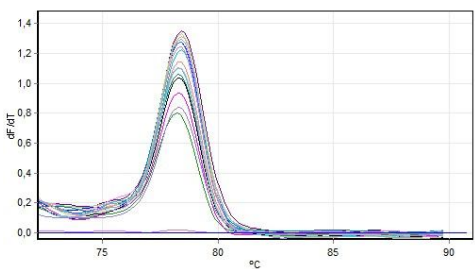


Curva de disociación

### *CCL20*

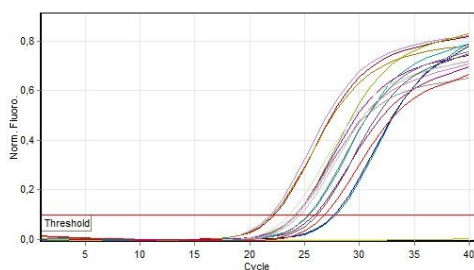


Curva de amplificación

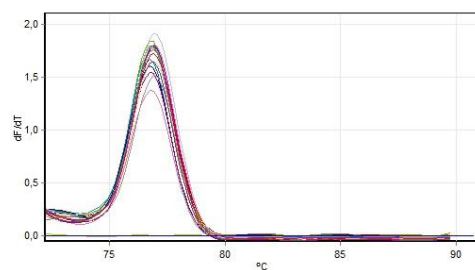


Curva de disociación

### *CXCL1*



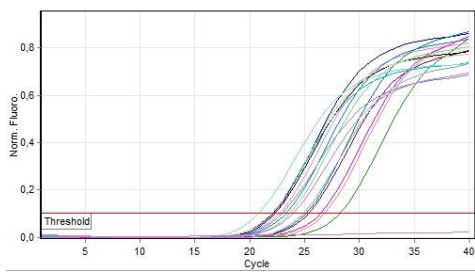
Curva de amplificación



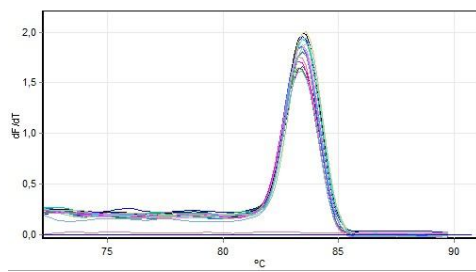
Curva de disociación



**CXCL10**

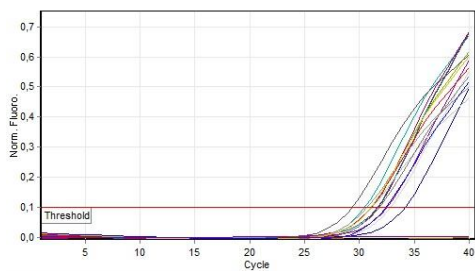


Curva de amplificación

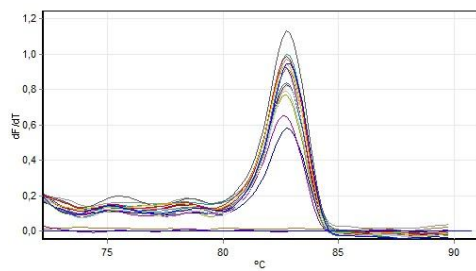


Curva de disociación

**IFN- $\gamma$**

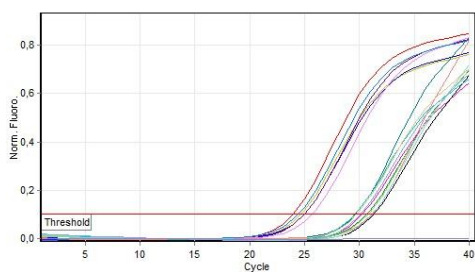


Curva de amplificación

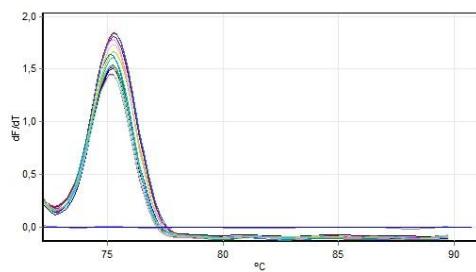


Curva de disociación

**IL-6**

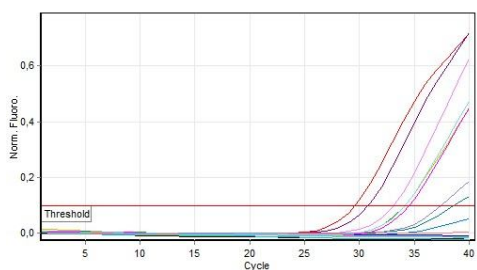


Curva de amplificación

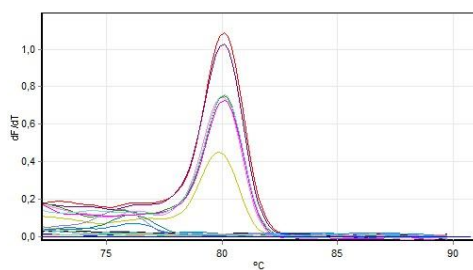


Curva de disociación

### IL-17A

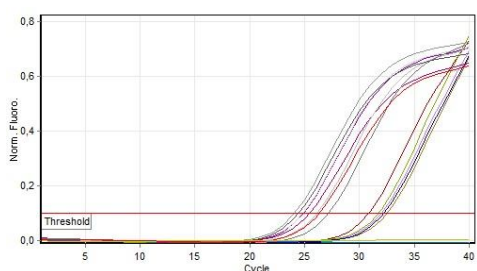


Curva de amplificación

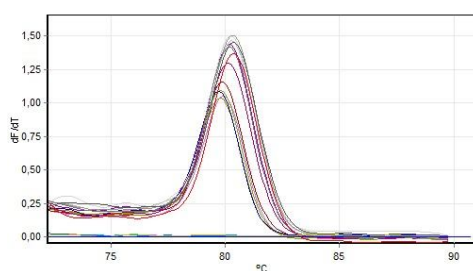


Curva de disociación

### IL-17F



Curva de amplificación



Curva de disociación