

Universidad de la República  
Facultad de Ciencias  
PEDECIBA-Biología  
Sub-área Microbiología  
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

**EFFECTOS DE LA FLAGELINA DE**  
***PROTEUS MIRABILIS* EN LA**  
**MODULACIÓN DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA**  
**EN EL TRACTO URINARIO**

LIC. ANA UMPIÉRREZ



ORIENTADOR DE TESIS: DR. PABLO ZUNINO

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE



Universidad de la República  
Facultad de Ciencias  
PEDECIBA-Biología  
Sub-área Microbiología  
Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas

**EFFECTOS DE LA FLAGELINA DE**  
***Proteus mirabilis* EN LA MODULACIÓN**  
**DE LA RESPUESTA INMUNE INNATA**  
**EN EL TRACTO URINARIO**

Lic. Ana Umpiérrez

Orientador de Tesis: Dr. Pablo Zunino

Tribunal:

Dr. Alejandro Chabalgoity

Dra. Ana Hernández

Dra. Claudia Piccini

DEPARTAMENTO DE MICROBIOLOGÍA  
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS  
CLEMENTE ESTABLE



Tabla de Contenidos

<b>AGRADECIMIENTOS.....</b>	<b>4</b>
<b>ABREVIATURAS.....</b>	<b>5</b>
<b>RESUMEN.....</b>	<b>6</b>
<b>ANTECEDENTES.....</b>	<b>7</b>
Infecciones del tracto urinario.....	7
Estructura del tracto urinario, vías de infección y sintomatología.....	7
ITU complicada y no complicada.....	8
Etiología de las ITU.....	9
Tratamiento y prevención de las ITU.....	10
<i>Proteus mirabilis</i> y las ITU.....	12
Sistema inmune innato.....	13
PRRs, sus funciones y sus ligandos.....	14
Tracto urinario, barrera contra patógenos y respuesta inmune.....	16
Flagelos bacterianos.....	17
<b>HIPÓTESIS.....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVO GENERAL.....</b>	<b>21</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....</b>	<b>21</b>
<b>MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento.....	22
2. Ensayo de Dienes.....	23
3. Purificación de flagelina.....	23

4. Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (SDS-PAGE)	25
5. Animales	26
6. Infección experimental del tracto urinario e instilación intravesical de flagelina	27
7. Co-Infección <i>P. mirabilis</i> 2921 - <i>P. mirabilis</i> AF	28
8. Evaluación de la activación de la respuesta inmune <i>in vitro</i>	28
8.1 Estimulación de células CacoCCL20-Luc con flagelinas de <i>P. mirabilis</i>	28
8.2 Expresión de genes vinculados a la inmunidad innata	30
9. Evaluación de la respuesta inflamatoria en el tracto urinario	32
9.1 Modificación histológica en vejigas murinas	32
9.2 Recuento de células inmunes en orina	33
9.3 Respuesta celular en vejiga	34
9.4 Extracción de ARN de vejigas murinas, retrotranscripción y PCR en tiempo real	35
10. Evolución de la ITU luego de la instilación intravesical de flagelina	38
11. Análisis estadísticos	39
<b>RESULTADOS</b>	<b>40</b>
1. Papel de los flagelos bacterianos de <i>P. mirabilis</i> en una ITU ascendente experimental (co-infección)	40
2. Ensayo de Dienes	41
3. Purificación de flagelina de <i>P. mirabilis</i>	42
4. Activación de la respuesta inmune innata <i>in vitro</i>	44
4.1 Respuesta inmune innata en el sistema reportero CacoCCL20-Luc	44
4.2 Respuesta inmune innata en células T24	47
5. Instilación intravesical de flagelina en ratones	51
5.1 Recuentos de células inmunes en orina	51
5.2 Evaluación de modificaciones histológicas en vejigas de ratones tratados con flagelina en forma intravesical (transuretral)	54
5.3 Reclutamiento celular en vejiga luego de la instilación de flagelina	56

5.4 Expresión de citoquinas y quimioquinas en vejigas.....	58
5.5 Evolución de una ITU luego de la instilación de flagelina de <i>P.</i> <i>mirabilis</i> en el tracto urinario.....	60
<b>DISCUSIÓN.....</b>	<b>62</b>
<i>Los flagelos de P. mirabilis en una ITU ascendente experimental</i> .....	63
<i>Respuesta de la respuesta inmune innata in vitro</i> .....	64
<i>Respuesta inflamatoria y modificaciones histológicas en vejiga</i> .....	68
<i>Presencia de células inmunes en vejiga</i> .....	69
<i>Expresión de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias en vejiga</i> .....	69
<i>Efecto de la instilación de flagelina en el desarrollo de una ITU</i> .....	70
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>72</b>
<b>PERSPECTIVAS.....</b>	<b>73</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>74</b>
<b>ANEXO I.....</b>	<b>83</b>
<b>ANEXO II.....</b>	<b>84</b>

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Pablo Zunino, por darme la posibilidad de realizar mi maestría bajo su orientación y apoyarme en todo momento.

A la Mag. Paola Scavone, por enseñarme tanto durante todos estos años, desde mi llegada al laboratorio hasta el día de hoy. Por colaborar conmigo en los experimentos de este trabajo y principalmente por repetir reiteradamente que sí se puede. Gracias Paola!

A la Colonia de Microbiología!!! A todos y cada uno de sus integrantes que me ayudaron y apoyaron incondicionalmente con mucha buena onda, positivismo, cantos y mucha paciencia. En particular con aquellos amigos con los que compartí excelentes momentos: Vanessa Sosa, Karina Antúnez, Martín Fraga, Karen Perelmuter, Bruno D' Alessandro, Geraldine Schlapp, Belén Branchiccela y Virginia Baráibar.

A la *New Generation*: Matilde Anido, Germán Pérez y María José Valencia. Compañeros infalibles de mesada!!

Al Dr. Martín Rumbo del Laboratorio de Investigaciones en el Sistema Inmune, por aceptar ser mi tutor de pasantía y recibirme tan amablemente en su laboratorio en La Plata.

A David Romanin, por colaborar conmigo en todo momento durante mi estadía en La Plata.

A la Dra. Analía Rial del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, por su gran colaboración y dedicación para conmigo y mis ensayos de citometría.

Al Dr. Juan Martín Marqués del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, por colaborar conmigo en los ensayos de PCR en tiempo real.

A la Mag. Analía Richeri del Laboratorio de Biología Celular del IIBCE, por colaborar conmigo en la generación de los cortes histológicos.

A AMSUD-Pasteur, por financiarme la Beca de Intercambio Regional para Jóvenes Investigadores, que me permitió asistir al Laboratorio de Investigaciones en el Sistema Inmune en La Plata, Argentina.

A todos mis amigos de la vida. En particular a Inés, quien me brindó apoyo y me transmitió energía en todo momento.

Se lo dedico a mi familia, mis padres y mi hermano.

**ABREVIATURAS**

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	Ácido desoxirribonucleico complementario
AN	Medio agar nutriente
APC	Célula presentadora de antígeno
ARN	Ácido ribonucleico
ARNm	Ácido ribonucleico mensajero
ATF	Fimbria " <i>Ambient temperature fimbriae</i> "
BHI	Medio infusión cerebro corazón
CCL-	Quimioquina motivo C-C
CD	Célula dendrítica
CXCL-	Quimioquina motivo C-X-C
DAMP	Patrón molecular asociado a daño
DMEM	Medio " <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i> "
dNTP	Desoxinucleotido trifosfato
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ácido etilendiaminotetraacético
IFN	Interferón
Ig	Inmunoglobulina
IL	Interleuquina
ITU	Infección del tracto urinario
LB	Luria Bertani
LPS	Lipopolisacárido
MALDI-TOF	Espectrometría de masas
MAMP	Patrón molecular asociado a microorganismo
MCP-1	Quimioquina " <i>Monocyte chemotactic protein-1</i> "
MIP-1 $\alpha$	Quimioquina " <i>Macrophage inflammatory protein-1</i> "
M-MLV	Transcriptasa reversa " <i>Macrophage inflammatory protein-1</i> "
MR/P	Fimbria " <i>Mannose Resistan Proteus-like</i> "
NLR	Receptor tipo NOD
PAMP	Patrón molecular asociado a patógeno
PBS	Solución tampón fosfato salina
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PM	Peso molecular
PMF	Fimbria de <i>Proteus mirabilis</i>
PRR	Receptores de Reconocimiento de Patógenos
RPMI	Medio Roswell Park Memorial Institute
SDS-PAGE	Gel desnaturizante de acrilamida
SFB	Suero fetal bovino
TLR	Receptor tipo Toll
TNF	Factor de necrosis tumoral
TU	Tracto urinario
UPEC	<i>Escherichia coli</i> uropatogénico
UFC	Unidad formadora de colonias

## RESUMEN

Los flagelos comprenden uno de los factores de virulencia más importantes de los patógenos bacterianos. Dichas estructuras permiten a los microorganismos desplazarse en ambientes acuosos y también sobre superficies sólidas. La flagelina, componente estructural de los flagelos, es reconocida como MAMP por los receptores del sistema inmune innato del hospedador. La interacción de dicho ligando con estos receptores inmunes desencadena la activación de la cascada intracelular NF- $\kappa$ B, con la concomitante producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias y la generación de respuestas inmunes innatas contra el patógeno.

En la última década, la modulación de la respuesta inmune innata frente a infecciones microbianas utilizando agonistas de TLRs ha despertado un gran interés por parte de los investigadores. La utilización de MAMPs para generar respuestas inmunes innatas que potencien la respuesta hacia el patógeno por sí mismo promete ser un camino interesante para mejorar el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas.

*P. mirabilis* es un patógeno oportunista Gram negativo, que causa infecciones del tracto urinario generalmente complicadas y tiene la capacidad de sobreexpresar flagelos en su superficie, cuando alterna su estructura celular a la forma *swarmer*.

En el presente trabajo se utilizaron distintas aproximaciones *in vivo* e *in vitro* para estudiar la capacidad de la flagelina de *P. mirabilis* de inducir la activación de la respuesta inmune innata en el TU.

Los resultados obtenidos demostraron que la flagelina de *P. mirabilis* tiene la capacidad de inducir la producción de quimioquinas pro-inflamatorias. Asimismo, la presencia de dicha proteína en la vejiga murina indujo el reclutamiento de células inmunes, produciendo inflamación en el tejido. Por otra parte, el ensayo de instilación de flagelina y posterior desafío ascendente con *P. mirabilis* puso en evidencia que la respuesta inflamatoria producida por la presencia de altas concentraciones de dicha proteína en el TU favorece la colonización bacteriana, sugiriendo que la respuesta inflamatoria genera un ambiente propicio para la infección. Además, se evidenció que la flagelina de las distintas cepas de *P. mirabilis* no tienen la misma capacidad de inducir la activación de la respuesta inmune innata.



## **ANTECEDENTES**

### Infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se encuentran entre las enfermedades infecciosas más comunes que afectan a personas de diversas edades, siendo muy frecuentes en pacientes hospitalizados así como también en pacientes de carácter ambulatorio (Foxman, 2003). Entre los grupos de riesgo de padecer una ITU se encuentran neonatos, adultos mayores y mujeres jóvenes sexualmente activas, las cuales exhiben un alto grado de incidencia y recurrencia (Sobbel, 2000). Diversos estudios epidemiológicos reportan que casi el 50 % de las mujeres presentan al menos un episodio de ITU durante su vida y que sólo en Estados Unidos unos 11 millones de mujeres son afectadas con una ITU anualmente (Foxman, 2003). Las ITU constituyen la mayor causa de morbilidad y gastos en cuidados de la salud en todos los grupos de edades. Se estima que más de 150 millones de personas en todo el mundo son diagnosticadas con ITU anualmente (Gonzalez and Schaeffer, 1999). Por lo tanto, las ITU hacen que se destine una enorme cantidad de dinero a su tratamiento. En particular, en el año 2006 se realizaron más de 11 millones de consultas médicas y casi medio millón de hospitalizaciones debido a este padecimiento en Estados Unidos, alcanzando un costo anual de 3,5 billones de dólares sólo en ese país (Nielubowicz and Mobley, 2010).

### Estructura del tracto urinario, vías de infección y sintomatología

Estructuralmente el tracto urinario (TU) se separa en TU bajo, constituido por la uretra y la vejiga y el TU alto, integrado por los uréteres y los riñones. La vía más común de acceso bacteriano al

organismo es a través de la uretra, la que se denomina vía ascendente (Li and Mobley, 2002). Los microorganismos tienen acceso a la uretra y a la vejiga y desde allí pueden ascender por los uréteres hasta los riñones. En otros casos la infección puede producirse de forma descendente, a través de la sangre y se denomina vía hematógena. Este tipo de infección es menos frecuente que la ascendente y generalmente ocurre en pacientes inmunocomprometidos, que presentan un TU obstruido o una infección sistémica persistente (Hooton, 2000).

Cuando la ITU compromete el TU bajo, se produce cistitis. Entre los síntomas que caracterizan a este tipo de infección se encuentran disuria, urgencia por orinar y dolor suprapúbico (Warren, 1996). Por otro lado, cuando la infección alcanza el TU superior se produce pielonefritis. En estos casos las manifestaciones clínicas son más serias e incluyen desde dolor lateral bajo o abdominal y disuria hasta fiebre alta, sudor, cefaleas, náuseas y vómitos (Rubin *et al.*, 1992). Cabe agregar que la ausencia de síntomas no implica ausencia de colonización bacteriana ya que también existen ITU asintomáticas. Una ITU asintomática ocurre cuando se aísla un mismo microorganismo en dos urocultivos consecutivos, careciendo la persona de síntomas clínicos (Andriole, 1992), mientras que en una ITU sintomática se observan síntomas clínicos que varían dependiendo del sitio de infección. Tales síntomas son atribuidos a la presencia bacteriana en el TU (Nicolle, 2001).

### ITU complicada y no complicada

Teniendo en cuenta la anatomía y funcionalidad del tracto urinario las ITU también se han clasificado en complicadas y no complicadas. Las no complicadas se refieren a ITU que ocurren en

personas que poseen un TU estructuralmente normal y funcional. Mayormente se asocian a infecciones bacterianas no nosocomiales y en general susceptibles a antimicrobianos (Gonzalez and Schaeffer, 1999). En el caso de las complicadas, los pacientes pueden presentar un TU anormal, ya sea desde el punto de vista funcional y/o estructural que le impide tener un flujo y evacuación normal de orina. De la misma manera, la presencia de catéteres y la condición inmunocomprometida del paciente pueden ser factores que afecten el flujo de orina o que dificulten la erradicación de el o los patógenos urinarios. Una ITU complicada frecuentemente involucra microorganismos resistentes a agentes antimicrobianos (Gonzalez and Schaeffer, 1999).

### Etiología de las ITU

Los microorganismos capaces de colonizar el TU y generar ITU pueden variar según las circunstancias del paciente y la predisposición a otras enfermedades. En particular, la etiología de las ITU se puede modificar por factores del hospedero que complican esta enfermedad tales como edad, sexo, presencia de diabetes, lesiones de médula espinal y cateterización, entre otros. Por esta razón, la prevalencia de uropatógenos difiere entre ITU complicadas y no complicadas (Ronald, 2003).

Las ITU no complicadas generalmente se asocian a la presencia de un único microorganismo que coloniza el TU. En particular, la etiología de las ITU no complicadas se ha mantenido casi constante en las últimas 2 décadas, aunque con un aumento importante en la resistencia a los antimicrobianos utilizados para su tratamiento. El principal agente microbiano causante de estas ITU corresponde a *Escherichia coli* uropatogénico (UPEC) (del inglés *uropathogenic*

*Escherichia coli*), el cual es responsable de entre el 80 y 85% de las cistitis no nosocomiales (Hooton and Samadpour, 2005; Ronald, 2003). Por otra parte, la etiología de las ITU complicadas es más diversa y como se mencionó previamente se relaciona directamente con las características del hospedero. Dichas infecciones son típicamente causadas por *P. mirabilis*, *P. stuartii*, *M. morgani*, *K. pneumoniae*, *E. coli* y *P. aeruginosa*, entre otras especies (Hooton *et al.*, 2010; Nicolle, 2005).

### Tratamiento y prevención de las ITU

Tradicionalmente, el tratamiento de las ITU se ha basado en la terapia antimicrobiana, la cual durante muchos años ha sido efectiva. Sin embargo, la emergencia de resistencia bacteriana a agentes antimicrobianos ha generado un importante problema de salud. La elección del antibiótico correcto constituye una tarea difícil para el médico tratante ya que los patrones de susceptibilidad antimicrobiana cambian continuamente (Mathai *et al.*, 2001). *E. coli*, el principal agente etiológico causante de ITU, junto con otras Enterobacterias, es en la actualidad menos susceptible a los antimicrobianos usualmente utilizados contra las ITU (Gales *et al.*, 2002). Un ejemplo de ello es la mezcla Trimetropin-Sulfamethoxazole (TMP-SMZ), una combinación de antimicrobianos que han perdido eficacia debido a una disminución de la permeabilidad de la membrana bacteriana y a la producción de enzimas que evitan la acción de estos fármacos (Gonzalez and Schaeffer, 1999). Por lo tanto, cada vez se hace más necesario el surgimiento de formas alternativas de tratamiento y prevención. En la actualidad se han propuesto varias estrategias terapéuticas alternativas al uso de antibióticos para el tratamiento de ITU, las cuales se

encuentran en etapa de experimentación. Entre ellas encontramos el tratamiento profiláctico con estrógenos en mujeres postmenopáusicas y la inclusión de jugo de arándanos en la dieta (Sivick and Mobley, 2010). Asimismo, el tratamiento de ratones con forskolina, una droga que incrementa los niveles de AMPcíclico intracelular, genera la expulsión de UPEC desde el interior de las células del hospedador hacia el espacio extracelular, dejándolas susceptibles a la respuesta inmune innata y a los antibióticos (Bishop *et al.*, 2007). De la misma manera, en ensayos donde se exponen vejigas a sulfato de protamina, una proteína altamente catiónica, se logra remover a UPEC de las paredes del órgano así como las intracelulares por medio de la exfoliación de las células del epitelio vesical (Mysorekar and Hultgren, 2006). Desafortunadamente, se ha demostrado que esta estrategia causa un alto grado de disconformidad por parte de los voluntarios (Sivick and Mobley, 2010). Asimismo, existen dos vacunas comerciales (Solcourvac® y Uro-Vaxon®) contra ITU, producidas a partir de extractos bacterianos complejos, las cuales son utilizadas sólo en Europa. No obstante, se ha visto que dichas vacunas, producen efectos secundarios en los pacientes que las utilizan y presentan una protección limitada (Mobley, 1997).

Otra posible estrategia para la prevención de ITU consiste en la inmunización. Actualmente, la mayoría de los estudios que involucran esta estrategia están dirigidos a la identificación y caracterización de factores de virulencia requeridos para la colonización o diseminación bacteriana en el TU. Entre dichos factores encontramos la fimbria P, la hemolisina HlyA, la fimbria tipo 1 y proteínas relacionadas a la captación de hierro como el sideróforo de membrana externa IroN de UPEC (Sivick and Mobley, 2010). Aunque la vacunación con estos factores de virulencia ha mostrado generar un incremento en el nivel de

anticuerpos específicos y una disminución en la colonización bacteriana en el hospedador, dicha disminución en la colonización nunca tiene una efectividad del 100%. Existe también la complejidad de que muchos de estos factores también se pueden encontrar en microorganismos no patógenos. Además, hasta el momento ninguna vacuna desarrollada tiene una efectividad del 100% para evitar una ITU.

Para ello, el conocimiento del patógeno y los factores de virulencia que juegan un papel importante en el proceso de infección son puntos claves en el desarrollo de nuevas estrategias profilácticas y terapéuticas.

### *Proteus mirabilis* y las ITU

*P. mirabilis* es una bacteria Gram negativa móvil, uropatógeno oportunista. Pertenece al Filo Proteobacteria, Clase Gammaproteobacteria, Orden Enterobacteriales y a la familia de las Enterobacterias. Comparte el género *Proteus* con las especies: *P. vulgaris*, *P. penneri* y *P. myxofaciens* (Penner, 1984). 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 multinucleada (célula *swarmer*) que sobreexpresa flagelos en su superficie (Hoeniger, 1965).

*P. mirabilis* es un agente causante de ITU ascendente en humanos. Generalmente se asocia a ITU en pacientes con anormalidades funcionales y/o estructurales del TU o que deben ser cateterizados por largos períodos de tiempo, por lo que comprende uno de los agentes causantes de ITU complicadas en humanos (Ronald, 2003; Rosser *et al.*, 1999). En particular, los pacientes sometidos a cateterización son más susceptibles a infecciones causadas por *P.*

*mirabilis*. La producción de amoníaco, debido a la actividad ureasa de dicho patógeno conllevan a la precipitación de cristales de estruvita y carbonato de hidroxapatita en la orina, lo cual muchas veces causa la obstrucción de los catéteres (Coker *et al.*, 2000). Más de 5 millones de pacientes son cateterizados cada año, cada uno con un alto riesgo de padecer una ITU-C (ITU asociada a catéteres) (Nielubowicz and Mobley, 2010). *P. mirabilis* ocupa el cuarto lugar entre los agentes etiológicos causantes de ITU hospitalarias en América Latina, después de *E. coli*, *Klebsiella* spp., *P. aeruginosa* (Gales *et al.*, 2002) y el tercer lugar en América del Norte (Mathai *et al.*, 2001).

Durante el proceso de entrada al huésped la bacteria toma contacto con los diferentes órganos y tejidos que conforman el TU, a los cuales debe adherirse y colonizar. La adhesión bacteriana a la superficie epitelial es considerada uno de los mecanismos de patogenicidad más importantes (Reid and Sobel, 1987). Para ello *P. mirabilis* expresa diversos factores de virulencia que le permiten establecer la infección. Entre sus factores de virulencia potenciales se encuentran los flagelos (Latta *et al.*, 1999), producción de ureasa, hemolisinas, proteasas que clivan inmunoglobulinas (Ig) A e IgG (Loomes *et al.*, 1990) y diversos tipos de fimbrias (Rozalski *et al.*, 1997). Estos factores mediarían la adherencia al epitelio, la invasión del tejido y evasión de la respuesta inmune del hospedador (Coker *et al.*, 2000).

### Sistema inmune innato

Los efectos causados por las infecciones microbianas han llevado a la generación de una variedad de mecanismos de respuesta en el hospedador, tanto innatos como adaptativos. Una de las distinciones

entre ambos tipos de respuestas radica en los tipos de receptores utilizados para reconocer a los microorganismos (Medzhitov, 2007).

El reconocimiento en la inmunidad innata se basa en la detección de estructuras que son únicas de los microorganismos. Los agonistas de los receptores inmunes PRRs (del inglés *pattern recognition receptors*) son denominados generalmente como PAMPs (*pathogen associated molecular patterns*) o más recientemente como MAMPs (*microbe associated molecular patterns*) (Akira *et al.*, 2006). Dichos MAMPs son fácilmente reconocidos por los receptores de la respuesta inmune innata por tres razones principales. Primero, son conservados entre los microorganismos de una determinada clase, segundo, son productos de vías que son únicas a los microorganismos, y tercero, tienen roles esenciales en la fisiología microbiana, lo cual hace que sea muy difícil que el microorganismo evada al sistema inmune innato modificando dichas moléculas (Medzhitov, 2007). Asimismo, los PRRs reconocen señales de estrés endógeno llamadas DAMPs (*damage associated molecular patterns*) (Jeong and Lee, 2011).

### PRRs, sus funciones y sus ligandos

Existen varias clases de PRRs funcionalmente diferentes como los receptores de la familia de los NLRs (entre los que encontramos los receptores NOD, NALP, IPAF y NAIP) y la de los receptores tipo Toll (TLRs). Los TLRs forman una familia importante de receptores inmunes innatos (Medzhitov and Janeway, 1997). Son receptores transmembrana que reconocen ácidos nucleicos virales y varios productos bacterianos, incluyendo LPS, flagelina y ácidos lipoteicoicos (Akira *et al.*, 2006).

La unión de los TLRs a sus ligandos lleva a la generación de respuestas inflamatorias y antimicrobianas. En términos de respuesta



inflamatoria, el reconocimiento de los MAMPs por parte de los TLRs induce la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias, incluyendo factor de necrosis tumoral (TNF)- $\alpha$ , interleuquina-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) e IL-6, las cuales coordinan las respuestas inflamatorias locales y sistémicas (Medzhitov, 2007). Una propiedad de los agonistas de los TLRs es la habilidad de promover la maduración de las células dendríticas (CDs) y la producción de citoquinas, paso crítico para establecer el nexo entre la inmunidad innata y la adaptativa requerida para enfrentar a los patógenos (Honko and Mizel, 2005).

El receptor TLR5 se expresa en una variedad de células y participa en la respuesta inmune innata y adaptativa mediante el reconocimiento de la subunidad estructural de los flagelos, la flagelina. Las superficies epiteliales del hospedador representan los sitios de entrada para los microorganismos patógenos y la expresión de este receptor permite la rápida detección de los organismos flagelados (Honko and Mizel, 2005). La flagelina, como otros agonistas de TLRs, tiene la capacidad de estimular la maduración y producción de citoquinas en CD humanas (Means *et al.*, 2003). El reconocimiento de la flagelina de bacterias Gram negativas por parte del receptor TLR5 inicia una cascada de señalización mediada por moléculas adaptadoras y factores que culmina con la transcripción de genes pro-inflamatorios y co-estimuladores (Honko and Mizel, 2005). También se ha visto que esta subunidad tiene la capacidad de activar la expresión de genes antiapoptóticos (Vijay-Kumar *et al.*, 2006).

Asimismo se ha planteado la posibilidad de que la flagelina pueda funcionar como adyuvante de mucosas en ensayos de co-inmunización con antígenos de *Y. pestis* en un modelo murino (Honko *et al.*, 2006).

Tracto urinario, barrera contra patógenos y respuesta inmune

El TU está constituido por la uretra, vejiga, uréteres y riñones y representa una formidable barrera mecánica contra infecciones microbianas. En particular la vejiga es una barrera impermeable que continuamente sufre expansión y contracción (Apodaca, 2004). Está cubierta internamente por un epitelio de transición, constituido externamente por células altamente diferenciadas, multinucleadas, que limitan la superficie luminal. Debajo de este epitelio está la lámina propia donde se encuentran fibroblastos, vasos sanguíneos y células inmunes.

El epitelio del TU tiene la capacidad de generar respuestas inmunes innatas y adaptativas altamente organizadas y efectivas para contrarrestar los ataques bacterianos (Song and Abraham, 2008). En particular, para que se monte una respuesta inmune innata en el TU es crítica la presencia y actividad de receptores inmunes (Song and Abraham, 2008). Dichos receptores también son necesarios para el control de la respuesta inmune adaptativa que se produce posteriormente (Bowie and Haga, 2005). Entre estos receptores, los TLR comúnmente encontrados en el TU incluyen TLR2 (reconoce ARN doble hebra), TLR4 (reconoce LPS), TLR5 (reconoce flagelina), TLR9 (CpG no-metilados de ADN bacteriano y virus) y TLR11 cuya función en humanos es aún discutida (Song and Abraham, 2008). Estudios *in vivo* han mostrado que la expresión de TLR5 y TLR11 contribuyen a la defensa inmune en el TU y son esenciales para la efectiva respuesta inmune murina contra una infección experimental con UPEC (Andersen-Nissen *et al.*, 2005). De todas formas, actualmente el ligando específico de TLR11 en UPEC sigue siendo desconocido (Lauw *et al.*, 2005). Asimismo, se conoce que la respuesta inmune frente a una infección por UPEC depende de la activación del receptor TLR4 (Billips *et al.*, 2007). El

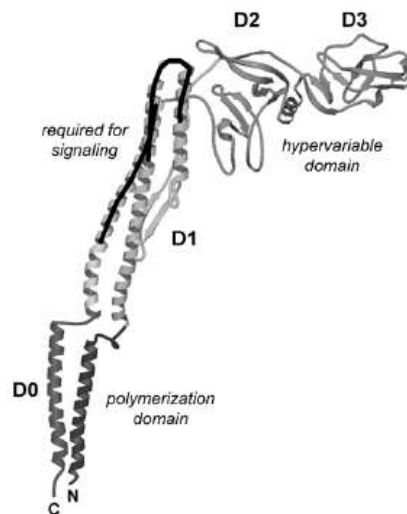
reconocimiento de ligandos, como el LPS de UPEC por el TLR4, resulta en la activación del factor transcripcional NF- $\kappa$ B y la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias como por ejemplo CXCL-6 y CXCL-8 entre otras. Esta respuesta temprana inducida en el TU resulta en la acumulación de quimioquinas inflamatorias en la mucosa de la vejiga y en la orina, así como induce también el reclutamiento y activación de células efectoras, entre ellas neutrófilos, con el fin de resolver la ITU (Akira *et al.*, 2006; Billips *et al.*, 2007).

### Flagelos bacterianos

Los flagelos de bacterias Gram negativas están implicados en la patogenicidad bacteriana sirviendo como medio de propulsión, adhesión e invasión del epitelio del hospedador (Murthy *et al.*, 2004). Son estructuras helicoidales, filamentosas y tubulares, constituidas por 3 componentes generales: el filamento, el cuerpo basal y el gancho. El cuerpo basal se encuentra embebido en la membrana y pared bacteriana y corresponde al motor del flagelo. El filamento del flagelo se ancla al cuerpo basal a través del gancho y está compuesto por subunidades repetidas de una proteína denominada flagelina (Miao *et al.*, 2007). La forma y longitud del flagelo están en parte determinadas por la estructura y número de subunidades de flagelina así como por la dirección de rotación del filamento (Madigan *et al.*, 1997).

Una de las subunidades estructurales de los flagelos que ha sido más extensamente estudiada es la flagelina de *Salmonella typhimurium* en la cual se ha visto que su estructura en 3D presenta una disposición tipo “gamma” ( $\Gamma$ ) (Fig. 1) formada por 4 dominios: D0, D1, D2 y D3 (Miao *et al.*, 2007). Los dominios D0 y D1 son altamente conservados a lo largo de las secuencias de diferentes flagelinas bacterianas,

conforman la base de  $\Gamma$  y corresponden a los extremos amino-terminal y carboxilo-terminal (Ct) de la secuencia aminoacídica total (Beatson *et al.*, 2006). Por otro lado, los dominios D2 y D3 consisten mayormente en hojas plegadas  $\beta$ , las cuales forman el brazo horizontal de la molécula que sobresale hacia afuera del eje central del filamento y son generalmente menos conservados en su secuencia aminoacídica (Beatson *et al.*, 2006). En particular, estudios mutacionales con dicha flagelina han permitido establecer los residuos aminoacídicos conservados en el dominio D1 que son reconocidos por TLR5 (Eaves-Pyles *et al.*, 2001). Además, se ha visto que cambios en un único aminoácido en la región de reconocimiento de TLR5 de la flagelina previenen el correcto ensamblaje y motilidad del flagelo, demostrando nuevamente que el receptor TLR5 reconoce una estructura terciaria altamente conservada evolutivamente (Andersen-Nissen *et al.*, 2005; Smith *et al.*, 2003).



**Figura 1.** Estructura de la flagelina. Tomada de Honko y Mizel (2005).

Estudios llevados a cabo con la flagelina de *S. typhimurium* han demostrado que el reconocimiento de su región conservada por el receptor TLR5 del huésped, induce la activación de la cascada de señalización intracelular NF- $\kappa$ B que lleva a la inducción de la expresión de genes pro-inflamatorios en el huésped (Simon and Samuel, 2007). No obstante, algunas bacterias flageladas presentan cambios en el dominio D1 que previenen el reconocimiento por parte del receptor TLR5 (Andersen-Nissen *et al.*, 2005) así como modificaciones compensatorias que restauran la correcta polimerización del filamento y motilidad del flagelo (Andersen-Nissen *et al.*, 2005).

En la última década, la modulación de la respuesta inmune innata frente a infecciones microbianas utilizando agonistas de TLRs ha despertado un gran interés por parte de los investigadores. La utilización de MAMPs para generar respuestas inmunes innatas que potencien la respuesta hacia el patógeno por sí mismo promete ser un camino interesante para mejorar el tratamiento de diversas enfermedades infecciosas (Mizel and Bates, 2010). La flagelina, tiene la capacidad de inducir fuertes respuestas inmunes innatas cuando es reconocida por los receptores innatos, activando la cascada intracelular NF- $\kappa$ B, con la concomitante producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (Honko and Mizel, 2004). Diversos estudios han utilizado la flagelina para modular la respuesta inmune en mucosas, induciendo mecanismos innatos protectores que contribuyen al desarrollo de subsecuentes respuestas adaptativas (Honko and Mizel, 2005). Por otra parte, la utilización de flagelina como adyuvante es actualmente un concepto muy estudiado en el contexto de un amplio rango de vacunas recombinantes (Mizel and Bates, 2010). En algunos casos dichas vacunas se aplican por separado mientras que en otros como proteínas de fusión entre la flagelina y el antígeno heterólogo.

Algunas de las propiedades que la hacen interesante para dicho uso son la inducción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias (Honko and Mizel, 2004), así como también la generación de respuestas celulares basadas en neutrófilos, células dendríticas y la migración de linfocitos T y B a los nódulos linfáticos (Bates *et al.*, 2008). Además, la flagelina presenta otras ventajas que la hacen interesante para su utilización como adyuvante, entre las que se destaca su efectividad en bajas concentraciones (Weimer *et al.*, 2009). El efecto adyuvante de la flagelina recombinante de *S. typhimurium* en combinación con, por ejemplo, *Y. pestis* y *S. pneumoniae*, se ha evaluado en varios ensayos con animales, obteniéndose resultados muy prometedores (Honko *et al.*, 2006; Muñoz *et al.*, 2010).

## **HIPÓTESIS**

La flagelina de *P. mirabilis* tiene un papel en la modulación de la respuesta inmune innata en el tracto urinario y una función en la protección del huésped frente a infecciones del tracto urinario.

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la influencia de la flagelina de *P. mirabilis* en la modulación de la respuesta inmune innata en el tracto urinario por medio de distintas aproximaciones experimentales.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- 1- Evaluar el papel de los flagelos bacterianos de *P. mirabilis* en el desarrollo de una ITU ascendente en ratones.
- 2- Obtener flagelina nativa de diferentes cepas uropatogénicas de *P. mirabilis* de la colección del Departamento de Microbiología.
- 3- Determinar la capacidad de las diferentes flagelinas purificadas de activar una respuesta inmune innata *in vitro*.
- 4- Evaluar el tipo de respuesta inmune innata inducida por la flagelina de *P. mirabilis* en cultivo de células de vejiga humana T24 mediante PCR en tiempo real.
- 5- Establecer si la instilación de la flagelina en el TU murino promueve una respuesta inmune innata en vejiga.
- 6- Estudiar el efecto de la instilación de flagelina de *P. mirabilis* en el TU sobre el desarrollo de una ITU ascendente experimental en ratones.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **1. Cepas bacterianas y condiciones de crecimiento**

En este trabajo se emplearon 8 cepas salvajes de *P. mirabilis*, pertenecientes a la colección del Departamento de Microbiología del IIBCE (Tabla 1). Dichas cepas son de origen clínico, recuperadas de pacientes que presentaban ITU. Todas ellas se cultivaron en forma rutinaria en medio Luria Bertani (LB) (triptona 1,0 %, extracto de levadura 0,5 %, NaCl 0,5 %, pH: 6,8) a 37°C durante 24 hs.

Para la purificación de flagelina, las cepas se sembraron en el medio Infusión Cerebro Corazón (BHI del inglés *Brain Heart Infusion*) (infusión cerebro de ternero 0,77%, infusión corazón de buey 0,98%, peptona 1,0%, dextrosa 0,2%, NaCl 0,5%, fosfato disódico 0,25%, pH: 7,4). Cuando se requirió el uso de medio sólido, se agregó 1,5% de agar base.

**Tabla 1.** Cepas de *P. mirabilis* uropatogénicas utilizadas en este trabajo.

<i>Cepa</i>	<i>Origen</i>	<i>Referencia</i>
<i>P. mirabilis</i> 6515	ITU clínica	(Piccini <i>et al.</i> , 1998)
<i>P. mirabilis</i> 19287	ITU clínica	Colección del Dpto. de Microbiología
<i>P. mirabilis</i> 47	ITU clínica	Colección del Dpto. de Microbiología
<i>P. mirabilis</i> 268	ITU clínica	Colección del Dpto. de Microbiología
<i>P. mirabilis</i> 2921	ITU clínica	(Zunino <i>et al.</i> , 2000)
<i>P. mirabilis</i> 289	ITU clínica	Colección del Dpto. de Microbiología
<i>P. mirabilis</i> 783	ITU clínica	(Zunino <i>et al.</i> , 1994)
<i>P. mirabilis</i> 2932	ITU clínica	(Zunino <i>et al.</i> , 1994)
<i>P. mirabilis</i> AF	ITU clínica	(Scavone, 2009- Tesis de Doctorado PEDECIBA, en marcha)



En el ensayo de co-infección se utilizó la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 (Zunino *et al.*, 2000) y la cepa aflagelada AF (Pr2921 *flA*<sup>-</sup> *flaB*<sup>-</sup>, Kan<sup>R</sup>) (Scavone, 2009- Tesis de Doctorado PEDECIBA, en marcha), mutante isogénica de la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921.

Para el recuento diferencial de *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF se tuvo en cuenta que como resultado del proceso de mutagénesis la mutante AF es resistente al antibiótico Kanamicina (Bjorling *et al.*, 2001). Por esta razón, cuando fue necesario, se adicionó dicho antibiótico al medio de cultivo, a una concentración final de 34 µg/ml.

## 2. Ensayo de Dienes

Antes de utilizar las cepas de *P. mirabilis* que se detallan en Tabla 1, se realizó el Test de Dienes de inhibición mutua. Dicho test se basa en la característica que presenta *P. mirabilis* de inhibir el *swarming* cuando 2 o más aislamientos de diferente origen se siembran en una misma placa (Pfaller *et al.*, 2000; Skirrow, 1969).

A partir de un cultivo de cada aislamiento en BHI se sembraron en simultáneo 2 µl de 3 de los aislamientos en una placa de medio BHI suplementado con agar 1,5% y se incubaron las placas a 37°C durante 24 hs. Transcurrido el tiempo de incubación establecido se analizó el crecimiento de cada cepa.

## 3. Purificación de flagelina

La purificación de flagelina (proteína estructural del flagelo) se realizó de acuerdo al protocolo descrito por Allison y colaboradores (1985) con modificaciones. Para purificar la flagelina de *P. mirabilis*, cada una de las distintas cepas (Tabla 1) se sembraron en 60 placas

de Petri con medio BHI suplementado con 1,5% de agar y se incubaron a 37°C durante 24 horas. A continuación las células se recuperaron con ansa estéril, se resuspendieron en PBS (0,01 M, pH: 7,0) y se centrifugaron a 5000 x *g* durante 15 minutos a 4°C. El *pellet* bacteriano obtenido se resuspendió en PBS estéril en una relación 100 ml cada 6 gramos 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 minutos y a 4°C. El sobrenadante conteniendo los flagelos se centrifugó una vez más a 40.000 x *g* durante 1 hora y 4°C. Finalmente se descartó el sobrenadante y el sedimento rico en flagelos se resuspendió en PBS estéril. Cada suspensión final de flagelina se separó en alícuotas las cuales se congelaron a -20°C hasta su utilización. Dichas flagelinas purificadas se detallan en la Tabla 2. La cuantificación de flagelina en cada muestra se realizó mediante el método colorimétrico de Bradford (Bradford, 1976).

**Tabla 2.** Nomenclatura de flagelinas de *P. mirabilis* purificadas.

<i>Cepa</i>	<i>Nomenclatura de la flagelina</i>
<i>P. mirabilis</i> 6515	Pr6515 "A"
<i>P. mirabilis</i> 19287	Pr19287 "B"
<i>P. mirabilis</i> 47	Pr47 "C"
<i>P. mirabilis</i> 268	Pr268 "D"
<i>P. mirabilis</i> 2921	Pr2921 "E"
<i>P. mirabilis</i> 289	Pr289 "F"
<i>P. mirabilis</i> 783	Pr783 "G"
<i>P. mirabilis</i> 2932	Pr2932 "H"

Para identificar el producto obtenido a partir del protocolo de purificación de flagelina, se analizó una de las muestras por mapeo peptídico (MALDI-TOF). Para ello se corrió una alícuota de flagelina “E” en un SDS-PAGE al 10% y luego de la corrida electroforética se escindió la banda del gel. Dicha banda fue remitida al Laboratorio de Bioquímica y Proteómica Analítica del Instituto Pasteur de Montevideo para su análisis.

Con el fin de evaluar una posible contaminación de las preparaciones con LPS bacteriano, se agregó Polimixina B a la flagelina en una relación 1:100, la cual se estudió previamente en distintos ensayos *in vivo* de instilación de flagelina en ratones y recuento de células inmunes en orina y evaluación de modificaciones histológicas en vejigas de animales instilados. De acuerdo a diferentes autores, dicha cantidad de antibiótico es suficiente para neutralizar el LPS que pudiera estar presente en la preparación (Bjorling *et al.*, 2001; McDermott *et al.*, 2000). Al no detectarse diferencias en los efectos de la preparación con o sin Polimixina B, se decidió emplear la flagelina en los distintos procedimientos.

#### 4. Geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE)

Para visualizar las proteínas purificadas se corrió un gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes. Dicha técnica se realizó de acuerdo al protocolo de Sambrook (1989). El gel separador se preparó a una concentración de acrilamida final del 10% y el concentrador del 5%. En ambos casos la relación acrilamida/bisacrilamida fue 29:1. 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 la llegada del frente de corrida al gel separador y luego se continuó a 140 V.

Antes de la corrida electroforética las proteínas se suspendieron en *buffer* de muestra para electroforesis en geles de acrilamida (Tris-HCl 125 mM, pH: 6,75, glicerol 20%, SDS 4%,  $\beta$ -mercaptoetanol 10% y azul de bromofenol 0,01%) al doble de su concentración inicial (2x) y se sometieron a 100°C durante 5 minutos.

Para visualizar las bandas proteicas los geles se tiñeron con azul brillante de Coomassie (0,25 gramos de azul brillante de Coomassie en 90 ml de etanol absoluto al 50% en agua destilada y 10 ml de ácido acético glacial) y se decoloraron con solución decolorante (etanol 25%, ácido acético 8,0%). Para la estimación del peso molecular (Ragnarsdottir et al., 2008) de las flagelinas se empleó el marcador de PM estándar de amplio rango de Bio-Rad.

## 5. Animales

En los ensayos *in vivo* se utilizaron ratones hembra CD-1 de 8 semanas de edad. El número de animales utilizados en cada experimento se redujo al mínimo necesario para poder realizar los análisis estadísticos correspondientes. Todos los animales se mantuvieron bajo condiciones controladas en las instalaciones del bioterio del IIBCE con alimento y agua *ad libitum*.

Los protocolos de manipulación animal utilizados en este trabajo fueron aprobados previamente por la Comisión de Bioética del IIBCE.

## 6. Infección experimental del tracto urinario e instilación intravesical de flagelina

En los ensayos de ITU ascendente experimental, los ratones se infectaron con 50  $\mu$ l de una suspensión bacteriana de  $2,0 \times 10^{10}$  unidades formadoras de colonias (UFC) por mililitro de *P. mirabilis* (Zunino *et al.*, 2000). Transcurridos siete días luego del desafío los animales se sacrificaron por dislocación cervical y se extrajeron de forma aséptica los riñones y las vejigas. Dichos órganos se colocaron en bolsas estériles conteniendo 10 ml de PBS, se homogeneizaron durante 120 segundos utilizando Stomacher 80 Lab Blender (Seward, London, UK) y luego se realizaron diluciones seriadas en PBS. Para los recuentos bacterianos se utilizó medio agar nutritivo (AN) (extracto de carne 0,3%, peptona 0,5%, pH: 6,8) sin NaCl, para evitar la formación de *swarming*. Se consideró animal infectado aquel que en cualquiera de los órganos presentara un recuento mayor a  $1,0 \times 10^2$  UFC/ml.

Para realizar los ensayos de ITU ascendente experimental y los de instilación de flagelina se utilizaron catéteres de polietileno de 0,61 mm de diámetro externo, los cuales se introdujeron en las uretras de los ratones. A través de dicho catéter se administró lentamente cada suspensión en las vejigas (Gonzalez and Schaeffer, 1999). Ambos procedimientos se realizaron con los animales anestesiados con xilazina (10 mg/Kg) y ketamina (50 mg/Kg). Previo a comenzar ambos experimentos, se vaciaron las vejigas de los ratones mediante suaves masajes abdominales.

## 7. Co-Infección *P. mirabilis* 2921 - *P. mirabilis* AF

Para llevar a cabo la co-infección, un grupo de 9 ratones hembra CD-1 fue desafiado transuretralmente con 50  $\mu$ l de una suspensión bacteriana de *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF en una proporción 1:1 en PBS, a una concentración final de  $2,0 \times 10^{10}$  UFC/ml cada una (Ver protocolo de desafío y extracción de órganos en sección 6 de Materiales y Métodos).

La infectividad de cada cepa se evaluó en base al número de colonias recuperadas en medio AN (UFC recuperadas de las cepas salvaje y mutante) y el número de colonias recuperadas en medio AN suplementado con Kanamicina (UFC recuperadas de la cepa mutante aflagelada).

## 8. Evaluación de la activación de la respuesta inmune *in vitro*

### 8.1 Estimulación de células CacoCCL20-Luc con flagelinas de *P. mirabilis*

Para evaluar la capacidad de las distintas flagelinas de *P. mirabilis* de inducir una respuesta inmune en células en cultivo se utilizó el sistema reportero de las células eucariotas CacoCCL20-Luc (Nempont *et al.*, 2008). Dichas células provienen de la línea celular Caco-2 de adenocarcinoma de colon humano, transfectadas con un plásmido que posee el gen de la luciferasa bajo el control del promotor *ccl20* humano (Rumbo *et al.*, 2004). El reconocimiento de la flagelina por estas células en cultivos induce la actividad luciferasa, la cual puede ser cuantificada en ensayos de bioluminiscencia. La actividad del reportero luciferasa, se asocia a la activación de la cascada intracelular NF- $\kappa$ B y a la inducción de la expresión del gen que codifica a la quimioquina pro-inflamatoria CCL20. La activación de dicha cascada es

considerada como una marca de la activación de la repuesta inmune innata (Nempont *et al.*, 2008).

Para realizar los ensayos, las células CacoCCL20-Luc se cultivaron en placas estériles de 48 pocillos, en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C hasta llegar a confluencia y cada uno de los pocillos se estimuló con una suspensión de flagelina. El medio utilizado para cultivar las células y para realizar las diluciones de flagelina fue DMEM CacoCCL20-Luc (DMEM base Gibco, suero fetal bovino (SFB) 10% final, Hepes 10 mM, 1x de aminoácidos no esenciales, 100 U/ml de Penicilina y 100 U/ml de Estreptomicina).

Previo a la estimulación todas las suspensiones de flagelina se calentaron a 80°C durante 5 minutos para romper posibles enlaces peptídicos y así obtener una suspensión con monómeros de flagelina. Como control de condición basal se dejaron 2 pocillos sin estimular y como control de estimulación se utilizó flagelina recombinante FliC1 de *S. typhimurium* a una concentración final de 1 µg/ml, cuya capacidad activadora está ampliamente caracterizada en el sistema reportero CacoCCL20-Luc (Nempont *et al.*, 2008; Romanin *et al.*, 2010; Rumbo *et al.*, 2004). En todos los casos se realizaron duplicados biológicos de cada estimulación.

Se evaluaron diferentes concentraciones de flagelina de *P. mirabilis*: 10 µg/ml, 2,0 µg/ml, 400 ng/ml y 80 ng/ml. Para realizar la estimulación, se preparó cada muestra en un volumen final de 500 µl de medio DMEM CacoCCL20-Luc. Una vez transcurrido el tiempo de estimulación se lisaron las células de cada pocillo con solución de lisis (Lysis Reagent, PROMEGA) y se mezcló con el sustrato de la luciferasa (PROMEGA) en una relación 5:1 respectivamente. La actividad luciferasa se midió utilizando un Luminómetro (Labsystems Luminoskan TL Plus, Thermo Scientific, USA).

## 8.2 Expresión de genes vinculados a la inmunidad innata

La expresión de genes innatos *in vitro* se evaluó en cultivo de células eucariotas T24. Dicha línea deriva de un carcinoma de epitelio de transición de vejiga humana y ha sido ampliamente empleada en ensayos de adhesión de *P. mirabilis* (Tolson *et al.*, 1997; Zunino *et al.*, 2003). Las células se cultivaron en placas de 96 pocillos estériles en estufa de CO<sub>2</sub> al 5% y 37°C hasta su confluencia y luego se estimularon con flagelina. El medio de cultivo para las células T24 estuvo compuesto por medio DMEM 4,5 g/l Gibco (*High* Glucosa, L-glutamina 2 mM, piruvato de sodio 1 mM, bicarbonato de sodio) suplementado con suero fetal bovino 10% final (PAA), Estreptomicina 100 U/ml y Penicilina 100 U/ml.

Como se describió previamente, las suspensiones de flagelina se calentaron antes de su utilización. En este ensayo se evaluaron 2 variables: tiempo de estimulación y concentración de proteína. Los tiempos de estimulación estudiados fueron 2 y 8 hs mientras que las concentraciones de flagelina utilizadas fueron 1 µg/ml, 10 µg/ml y 50 µg/ml. Como control negativo 4 pocillos no fueron estimulados con proteína y como control positivo las células se estimularon con flagelina FliC1 de *S. typhimurium* (Nempont *et al.*, 2008).

Transcurrido el tiempo de estimulación las células se homogeneizaron con *buffer* de lisis RA1 (GE, Healthcare, Germany) y el ARN total se extrajo utilizando el *kit* comercial NucleoSpin RNA II (Macherey-Nagel, Germany), el cual permite también la eliminación del ADN que pudiera permanecer en la muestra.

Para la retrotranscripción se utilizaron *random primers* y la enzima transcriptasa reversa M-MLV (Invitrogen, California, USA). El protocolo consistió en una incubación de 10 minutos a 25°C y 1 hora a 37°C. La mezcla de reacción estuvo compuesta por 2 µl de ARN, 1 nM de



*random primers*, 0,5 mM de deoxinucleótidos (dNTPs), 200 U de la enzima M-MLV, 4 µl del *buffer* de la enzima (5x), 20U de *RNAseOUT*, y 7,5 mM de DTT, en un volumen final de 20 µl. El ADNc se congeló a -20°C hasta su utilización.

A partir del ADNc obtenido se realizó la PCR en tiempo real utilizando el termociclador MyiQ Single Color Real-time PCR Detection System (BioRad, USA) y SYBR® Green Master Mix (Invitrogen). Para realizar las amplificaciones se utilizaron placas de 96 pocillos y cada mezcla de reacción consistió en 1 nM de cada *primer* específico, 0,5 mM de dNTPs, 12 µl de *master mix* y 10 µl de ADNc, en un volumen final de 24 µl. El protocolo de ciclado consistió en 30 minutos a 65°C, 1 minuto a 95°C (x2), 10 minutos a 95°C, [15 segundos a 95°C, 1 minuto a 60°C] (x40), 10 segundos a 50°C (x91) y un período final de manutención a 4°C. Los *primers* para el gen reportero de la β-actina humana así como para las quimioquinas pro-inflamatorias CCL20, CXCL2 y MCP-1 humanas fueron previamente diseñados y utilizados por Rumbo y colaboradores (2004) y se detallan en la Tabla 3.

Los resultados se expresaron como el aumento relativo de los niveles de ARNm en cada tratamiento respecto a los pocillos control mediante la fórmula  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  (Livak and Schmittgen, 2001).

**Tabla 3.** Secuencias nucleotídicas de *primers* humanos utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real.

<i>Primers</i>	<i>Secuencia</i>
qhu $\beta$ -actina <i>Forward</i>	5'- CCT GGC ACC CAG CAC AAT -3'
qhu $\beta$ -actina <i>Reverse</i>	5'- GCC GAT CCA CAC GGA GTA CT -3'
qhuCCL20 <i>Forward</i>	5'- CCA AGA GTT TGC TCC TGG CT -3'
qhuCCL20 <i>Reverse</i>	5'- TGC TTG CTG CTT CTG ATT CG -3'
qhuMCP-1 <i>Forward</i>	5'- CGC CTC CAG CAT GAA AGT CT -3'
qhuMCP-1 <i>Reverse</i>	5'- ATG AAG GTG GCT GCT ATG AGC -3'
huCXCL2 <i>Forward</i>	5'- AAG GTG AAG TCC CCC GGA C -3'
huCXCL2 <i>Reverse</i>	5'- GCC CAT TCT TGA GTG TGG CT -3'

Todos los ensayos de PCR en tiempo real a partir de cultivos de células T24 así como los ensayos con cultivos de células CacoCCL20-Luc (Numerales 8.1 y 8.2 de Materiales y Métodos) se realizaron en el marco de una pasantía de investigación en el Laboratorio de Investigaciones del Sistema Inmune (LISIN) de la Universidad Nacional de La Plata, Argentina.

## 9. Evaluación de la respuesta inflamatoria en el tracto urinario

### 9.1 Modificación histológica en vejigas murinas

Con el fin de evaluar el efecto de la administración de flagelina en el tracto urinario de ratones se instilaron dos grupos de animales. El primer grupo se instiló con 50  $\mu$ l de PBS (n=7) y el segundo con 50  $\mu$ l de una suspensión de flagelina “E” (n=10), purificada de la cepa *P. mirabilis* 2921, a una concentración final de 100  $\mu$ g/ml (5  $\mu$ g/ratón). Transcurridas 24 horas post-instilación se sacrificaron los animales para

extraer sus vejigas y crioprotegerlas en *Tissue Tek*. Las vejigas así tratadas se almacenaron a  $-20^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

A continuación, se realizaron cortes histológicos seriados de cada vejiga crioprotegida de  $12\ \mu\text{m}$  de espesor, con criostato Leica CM 1510. Dichos cortes se tiñeron con Hematoxilina y Eosina y se observaron con microscopio invertido OLYMPUS DP71, utilizando los aumentos 4x, 10x, 20x y 40x. Las imágenes se procesaron con el programa Cell^F (OLYMPUS).

Para evaluar la respuesta inflamatoria generada por la instilación de flagelina se diseñó un *Score* de daño histológico basado en el trabajo de Alamuri y colaboradores (Alamuri *et al.*, 2009). El valor 0 corresponde a ausencia modificaciones en el tejido; 1 a la presencia de infiltrados de células inflamatorias ocasionales en submucosa; 2 a infiltrados celulares diseminados en submucosa y muy poco en capa muscular y epitelio; 3 a inflamación perivascular expandida, distribución transmural y células inflamatorias en el epitelio.

## 9.2 Recuento de células inmunes en orina

Este ensayo consistió en instilar una suspensión de flagelina “E” de *P. mirabilis* 2921 en forma intravesical (transuretral) a distintos grupos de ratones hembra CD-1 para analizar la presencia de células inmunes en la orina murina (n=10 en cada grupo). Se evaluaron tres concentraciones de flagelina diferentes:  $5\ \mu\text{g}/\text{ratón}$ ,  $10\ \mu\text{g}/\text{ratón}$  y  $25\ \mu\text{g}/\text{ratón}$ . Como control se agregó un grupo de ratones instilados sólo con PBS. La orina se colectó en micro tubos de 1,5 ml a tiempo 0 previo a la instilación y a las 6 y 24 hs post-instilación. Luego de cada colecta se realizaron recuentos de células inmunes en Cámara de Neubauer para establecer el número de células inmunes por unidad de

volumen de orina. Para la identificación de las células inmunes se tuvo en cuenta el pequeño tamaño, 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. Estas últimas presentan mayor tamaño, forma irregular y capacidad por refringir la luz.

### 9.3 Respuesta celular en vejiga

Para evaluar el reclutamiento de células inmunes en el tejido vesical, se utilizaron 4 grupos de 4 animales cada uno. Dos grupos se sacrificaron a las 2 hs post-instilación, 1 tratado con solución salina y el otro con 5  $\mu$ g de flagelina de *P. mirabilis*. De la misma manera, los otros 2 grupos se sacrificaron a las 24 hs post-instilación. Todas las vejigas se colocaron en tubos conteniendo 500  $\mu$ l 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 termostático a 37°C, 15 mg de Colagenasa Gibco (17100-017), ADNasa I [10 mg/ml] y se incubó durante 30 minutos a 37°C en estufa de CO<sub>2</sub> al 5%. Para disgregar completamente los fragmentos de órganos se utilizó una pipeta Pasteur y luego se filtró cada muestra utilizando filtros BD de 70  $\mu$ m de diámetro de poro lavando con PBS-5 mM EDTA. La mezcla obtenida se colectó en tubos estériles y se centrifugó a 250 x *g* durante 4 minutos. Cada *pellet* 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%) hasta alcanzar una concentración final de 2,0 x 10<sup>7</sup> células/ml. Las suspensiones celulares se marcaron con anticuerpos específicos diluidos 1/50 durante 30 minutos a 4°C en oscuridad.

Se utilizaron 6 anticuerpos marcados diferentes: B220 acoplado a FITC, Ly6G acoplado a PE, CD19 acoplado a PerCP-Cy5.5, CD3 acoplado a PE-Cy7, CD11c acoplado a APC y CD11b acoplado a APC-Cy7 (BD Biosciences, San Diego, USA). Una vez transcurrido ese tiempo, las células se lavaron 3 veces con PBS sin BSA y se centrifugaron durante 3 minutos a 300 x *g*. Posteriormente se agregaron 50 µl de formol 4% en PBS hipertónico diluido al medio en 50 µl de PBS, se homogeneizó con *vortex* y se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente. Finalmente se realizaron 3 lavados con medio FACS EDTA y cada muestra se procesó por medio de citómetro de flujo FACS Canto II. Dicho citómetro cuenta con un láser de argón (488 nm) cuyos filtros son: LP735 + BD780/60 (750-810), LP670, BP 585/42, BP530/30 y un láser de diodo rojo (635 nm) 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, Biosciences, San Diego, USA). Primeramente las células se clasificaron de acuerdo a su tamaño y granulosidad y se calculó la cantidad de cada tipo de células marcadas respecto al número total de células inmunes presentes en las vejigas de cada animal.

Este ensayo se realizó en colaboración con la investigadora Dra. Analía Rial del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, Fac. de Medicina, UDELAR.

#### 9.4 Extracción de ARN de vejigas murinas, retrotranscripción y PCR en tiempo real

En este experimento se instilaron 2 grupos de 4 ratones con 5 µg de flagelina “E” de *P. mirabilis* cada uno. Transcurridas 2 y 24 hs luego del procedimiento se sacrificaron los animales y se extrajeron sus vejigas. Cada vejiga extraída se homogeneizó con 500 µl TRIzol (Invitrogen, California USA). Los tejidos se disgregaron de forma mecánica con *Ultra*

*Turrax* (IKA-Werke, Staufen-Germany) y se mantuvieron congelados a  $-80^{\circ}\text{C}$  hasta su utilización.

Para la extracción de ARN de cada tejido se siguió el siguiente protocolo. Primeramente se agregaron 200  $\mu\text{l}$  de cloroformo a cada muestra y se centrifugó a  $10.000 \times g$  durante 15 minutos a  $4^{\circ}\text{C}$ . El ARN presente en el sobrenadante se precipitó con isopropanol en una relación 1:1 y el *pellet* obtenido se lavó con 1 ml de etanol 75%. A continuación las muestras se centrifugaron a  $7500 \times g$  durante 5 minutos y  $4^{\circ}\text{C}$  y se descartó el sobrenadante. Para eliminar el exceso de sobrenadante se colocaron las muestras a  $55^{\circ}\text{C}$  durante 10 minutos. Finalmente el ARN se resuspendió en 40  $\mu\text{l}$  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  $\mu\text{g}$  de ARN total. Previo a la retrotranscripción se realizó un tratamiento con ADNasa I (0,35U, Invitrogen, California USA) de forma de eliminar posibles contaminaciones por ADN en las muestras. Para ello el ARN se diluyó al 1/5 en  $\text{H}_2\text{O}$  y se agregó la siguiente mezcla: 1,0  $\mu\text{l}$  de buffer de ADNasa I, 0,4  $\mu\text{l}$  de ADNasa I y 3,0  $\mu\text{l}$  de  $\text{H}_2\text{O}$ . El ARN junto con la mezcla se dejó reposar durante 15 minutos a TA. Posteriormente se agregó 1,0  $\mu\text{l}$  de EDTA 25 mM a cada tubo y se calentó durante 10 minutos a  $65^{\circ}\text{C}$ .

Para la retrotranscripción se utilizaron *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, 400U *RNaseOUT* (Invitrogen), 200U 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 protocolo de ciclado: 10 minutos a 25°C y 50 minutos a 37°C con un paso final de 15 minutos a 70°C. El ADNc fue diluido al 1/5 en agua y conservado a -20°C.

El ADNc obtenido previamente se empleó como molde en las reacciones de PCR en tiempo real. Para ello se utilizó el *kit* comercial de PCR QuantiTect® SYBR® Green de 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 final 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 Márquez del Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene y se detallan en la Tabla 4. El protocolo de amplificación empleado para todos los genes evaluados fue el siguiente: 15 minutos a 95°C seguido por 40 ciclos a 95°C por 15 segundos y 60°C por 1 minuto. La lectura de fluorescencia se realizó en este último paso.

Para evaluar la especificidad de la reacción se analizaron las curvas de disociación de cada producto amplificado. Dicha curva de disociación se consiguió subiendo la temperatura de a 1°C cada vez, partiendo de 60°C hasta alcanzar 95°C y midiendo 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 and Schmittgen, 2001).

Todos los ensayos detallados en esta sección se realizaron en el Departamento de Desarrollo Biotecnológico del Instituto de Higiene, Fac. de Medicina, UDELAR, en colaboración con el Dr. Juan Martín Marqués.

**Tabla 4.** Secuencias nucleotídicas de *primers* murinos utilizados en las reacciones de PCR en tiempo real.

<i>Primers</i>	<i>Secuencias</i>
mβ-actina <i>Forward</i>	5'- GCT TCT TTG CAG CTC CTT CGT -3'
mβ-actina <i>Reverse</i>	5'- CGT CAT CCA TGG CGA ACTG -3'
mCCL20 <i>Forward</i>	5'- TTT TGG GAT GGA ATT GGA CAC -3'
mCCL20 <i>Reverse</i>	5'- TGC AGG TGA AGC CTT CAA CC -3'
mCXCL1 <i>Forward</i>	5'- CTT GGT TCA GAA AAT TGT CCA AAA -3'
mCXCL1 <i>Reverse</i>	5'- ACG GTG CCA TCA GAG CAG TCT -3'
mIL-6 <i>Forward</i>	5'- GTT CTC TGG GAA ATC GTG GAA A -3'
mIL-6 <i>Reverse</i>	5'- AAG TGC ATC ATC GTT GTT CAT ACA -3'
mCXCL10 <i>Forward</i>	5'- GCC GTC ATT TTC TGC CTC AT -3'
mCXCL10 <i>Reverse</i>	5'- GCT TCC CTA TGG CCC TCA TT -3'
mIFNγ <i>Forward</i>	5'- TCA GCA ACA GCA AGG CGA AA -3'
mIFNγ <i>Reverse</i>	5'- CCG CTT CCT GAG GCT GGA T -3'

#### 10. Evolución de la ITU luego de la instilación intravesical de flagelina

Para estudiar el efecto de la administración de flagelina en el desarrollo de una ITU ascendente experimental en ratones se instilaron de forma intravesical (transuretral) 3 grupos de animales con 5, 10 y 25 µg de flagelina “E” de *P. mirabilis*/ ratón, cada uno con 9, 4 y 6 animales respectivamente. Además, se agregó un grupo instilado únicamente con PBS (7 animales). Transcurridas 24 hs luego de la instilación los animales se desafiaron con una suspensión de  $2,0 \times 10^{10}$  UFC/ml de *P. mirabilis* 2921 (Zunino *et al.*, 2000) y 7 días después se evaluó la colonización bacteriana en riñones y vejigas.



## 11. Análisis estadísticos

Para evaluar el efecto de la instilación de flagelina en el TU sobre el desarrollo de una ITU experimental en ratones se analizaron los recuentos de UFC/órgano obtenidos con el test no paramétrico de Mann-Whitney.

Para los análisis de expresión relativa de genes inmunes por PCR en tiempo real y para el ensayo de activación de cultivos CacoCCL20-Luc se utilizó el test no paramétrico Mann-Whitney y el test de Student respectivamente.

Cuando se analizaron los recuentos de células inmunes en orina entre los diferentes grupos tratados se utilizó el test estadístico de Kluskal Wallis.

En el ensayo de citometría de flujo se utilizó el test estadístico de Duncan í.

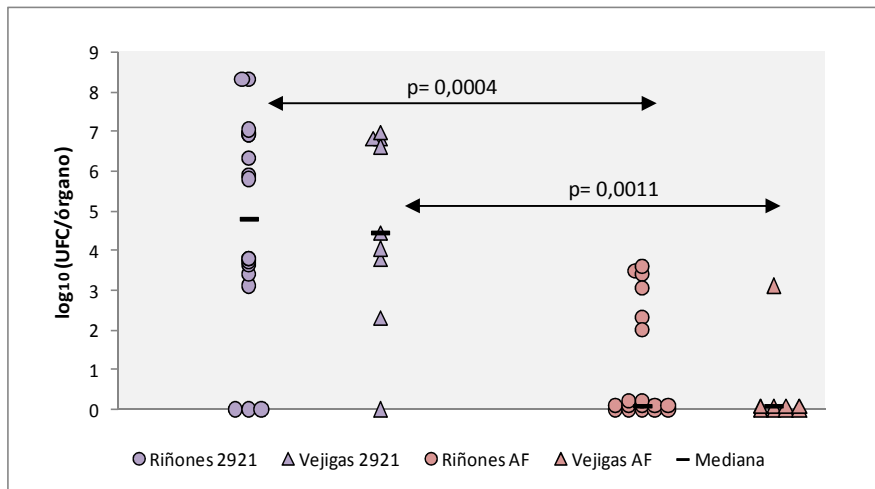
Todos los análisis estadísticos se realizaron con el programa STATISTICA 7.0.

## RESULTADOS

### 1. Papel de los flagelos bacterianos de *P. mirabilis* en una ITU ascendente experimental (co-infección)

Con el fin de evaluar el efecto de los flagelos de *P. mirabilis* en el establecimiento de un ITU ascendente experimental en ratones se realizó un ensayo de co-infección empleando la cepa salvaje *P. mirabilis* 2921 y su mutante isogénica aflagelada *P. mirabilis* AF. Nueve ratones hembra CD-1 se co-infectaron con una suspensión de 50  $\mu$ l de  $2,2 \times 10^{10}$  UFC/ml de *P. mirabilis* 2921 y  $2,6 \times 10^{10}$  UFC/ml de *P. mirabilis* AF. Transcurridos 7 días luego de la infección, se evaluó la colonización bacteriana.

Los resultados obtenidos en este ensayo mostraron que los valores de UFC de la cepa salvaje recuperados en riñones fueron significativamente mayores a los valores de UFC correspondientes a la cepa aflagelada ( $p= 0,0004$ ). En particular, *P. mirabilis* AF no se recuperó en riñones ni vejigas de 4 animales co-infectados. El mismo comportamiento se observó en la colonización bacteriana en vejigas, donde los valores de UFC correspondientes a AF fueron significativamente menores a los de *P. mirabilis* 2921 ( $p= 0,0011$ ) (Figura 2).

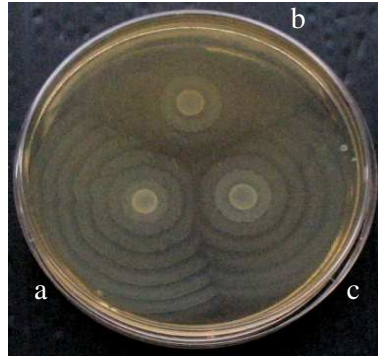


**Figura 2.** Recuentos de UFC ( $\log_{10}$ ) en riñones y vejigas de 9 ratones hembra CD-1 co-infectados con *P. mirabilis* 2921 y *P. mirabilis* AF. Cada punto corresponde a la cantidad de UFC recuperadas en cada órgano. Los círculos representan los riñones y los triángulos las vejigas. Las barras corresponden a las medianas de cada grupo. Las diferencias significativas entre riñones y entre vejigas de cada cepa (flechas) se analizaron con el test estadístico no-paramétrico de Mann Whitney.

## 2. Ensayo de Dienes

Con el propósito de corroborar que los aislamientos de *P. mirabilis* que utilizamos correspondían efectivamente a diferentes cepas, se realizó el ensayo de Dienes.

En la Figura 3 se muestran tres cepas de *P. mirabilis* (Pr6515, Pr268 y Pr2921) cultivadas en una misma placa de Petri. Se puede observar claramente que en los lugares donde tomaron contacto los frentes de *swarming* entre cada una de las cepas se inhibió el crecimiento bacteriano. Todas las combinaciones de cepas fueron sembradas y en todos los casos se obtuvo el mismo comportamiento de inhibición mutua del *swarming*. Por consiguiente, el ensayo de Dienes permitió ratificar que los 8 aislamientos seleccionados para este trabajo corresponden a cepas uropatogénicas de *P. mirabilis* diferentes.

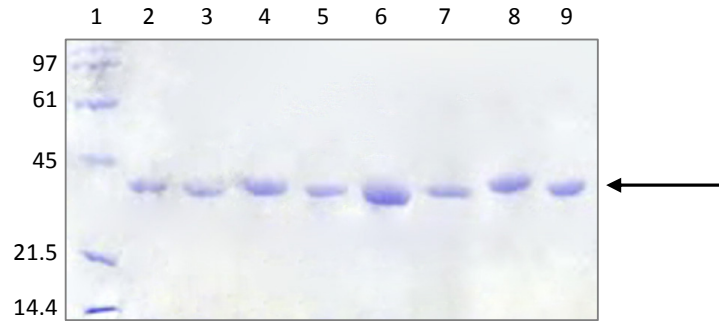


**Figura 3.** Fotografía de placa de Petri (BHI adicionado con agar 1,5%) sembrada en simultáneo con 2  $\mu$ l de cultivos frescos de *P. mirabilis* 6515 (a), *P. mirabilis* 268 (b) y *P. mirabilis* 2921 (c). Incubación a 37°C durante 24 hs.

### 3. Purificación de flagelina de *P. mirabilis*

Una vez realizado el procedimiento de purificación de flagelina, las muestras se corrieron en un gel de poliacrilamida al 10%, en condiciones desnaturizantes (SDS-PAGE) para corroborar la pureza de las mismas.

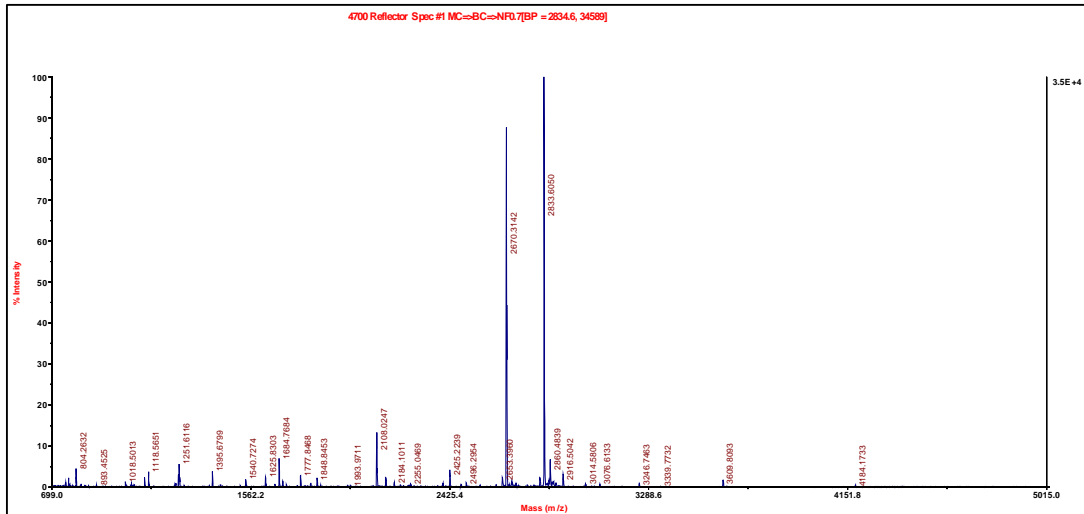
Todas las suspensiones de flagelinas obtenidas mostraron estar correctamente purificadas ya que se observó una única banda en el SDS-PAGE (Figura 4). Asimismo, todas las proteínas presentaron un peso molecular cercano a los 41 kDa, aunque con pequeñas diferencias en los pesos moleculares relativos (Figura 4).



**Figura 4.** SDS-PAGE 10%. Flagelinas de *P. mirabilis* purificadas por tratamiento mecánico y centrifugación diferencial. Carril 1: Marcador de Peso Molecular de amplio espectro de Bio-Rad (kDa). Carriles 2-9: Pr2921 “E”, Pr783 “G”, Pr189287 “B”, Pr6515 “A”, Pr2932 “H”, Pr268 “D”, Pr47 “C”, Pr289 “F”, respectivamente. La flecha indica la proteína purificada.

Una vez que se obtuvieron todas las muestras de flagelina, se seleccionó la flagelina de la cepa *P. mirabilis* 2921 para un subsiguiente análisis por mapeo peptídico.

A partir de los resultados de MALDI-TOF confirmamos que el producto mayoritario obtenido de la purificación mecánica de flagelina correspondía efectivamente a dicha proteína. En particular, se corroboró que su secuencia presenta un 84% de similitud con la secuencia la proteína “*flagellin 1*”, perteneciente a la cepa secuenciada *P. mirabilis* HI4320 (Pearson *et al.*, 2008). De esta forma se corroboró nuevamente la eficiencia del protocolo de purificación de flagelina utilizado y la calidad del producto generado (Figura 5). Asimismo este ensayo permitió estimar un peso molecular teórico de 38,8 kDa correspondiente a la flagelina de la cepa uropatogénica *P. mirabilis* 2921, el cual fue similar al estimado a partir del SDS-PAGE.



**Figura 5.** Espectro de masa obtenido en modo reflector positivo donde se identifica la flagelina “E” de la cepa uropatógena *P. mirabilis* 2921.

#### 4. Activación de la respuesta inmune innata *in vitro*

##### 4.1 Respuesta inmune innata en el sistema reportero CacoCCL20-Luc

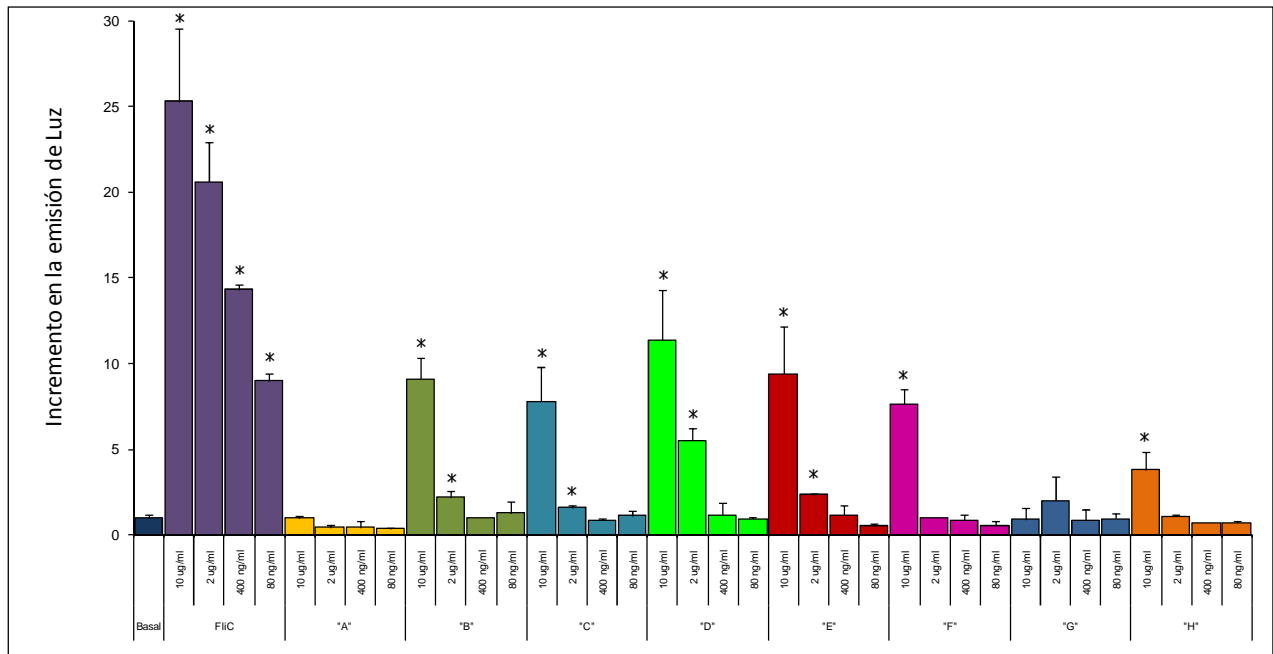
En este ensayo se evaluó la capacidad de las distintas flagelinas de *P. mirabilis* de inducir una respuesta inmune utilizando el sistema reportero de las células eucariotas CacoCCL20-Luc.

Los resultados obtenidos muestran que 6 flagelinas de *P. mirabilis* tuvieron la capacidad de estimular el sistema reportero y por tanto indujeron la activación del sistema inmune innato, mientras que dos prácticamente no respondieron (Figura 6). Dicha activación del sistema fue menor que la observada para el caso donde se utilizó la flagelina recombinante FliC1 de *S. typhimurium* (Figura 6). Mientras que FliC1 indujo un incremento en la emisión de luz 28 veces mayor que las células no estimuladas, en los casos de las flagelinas de *P. mirabilis* el

mayor incremento observado fue de 9 veces respecto a las células no estimuladas, cuando se estimuló con 10 µg/ml de proteína (Figura 6). Estos resultados confirmaron que las distintas flagelinas de *P. mirabilis* no tienen la misma capacidad de inducir una respuesta inmune innata en cultivo.

Cuando se analizaron estadísticamente los resultados con el test de Student se demostró que cuando se utilizó FliC1, el aumento en la emisión de luz fue significativo para todas las concentraciones de proteína utilizada respecto a las células basales. Por otro lado, la emisión de luz inducida por la estimulación con las flagelinas de *P. mirabilis* fue significativo con respecto a las células sin estimular cuando se utilizó una concentración final de proteína de 10 µg/ml y 2 µg/ml. A menores concentraciones, no se observaron diferencias significativas con respecto a las células no estimuladas (Figura 6).

En todos los casos, las flagelinas de *P. mirabilis* y FliC1 de *S. typhimurium* mostraron una respuesta dosis dependiente. A mayores concentraciones de flagelina, la emisión de luz fue mayor, y a medida que se disminuyó la concentración de estimulación, la emisión de luz fue menor (Figura 6).



**Figura 6.** Incremento en la emisión de luz en cultivos de células CacoCCL20-Luc estimuladas durante 6 hs con FliC1 de *S. typhimurium* y 8 flagelinas de *P. mirabilis*. Se utilizaron 4 concentraciones diferentes de proteína: 10 µg/ml, 2 µg/ml, 400 ng/ml y 80 ng/ml. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas (test de Student,  $p < 0,05$ ) con respecto a las células no estimuladas (Basal).

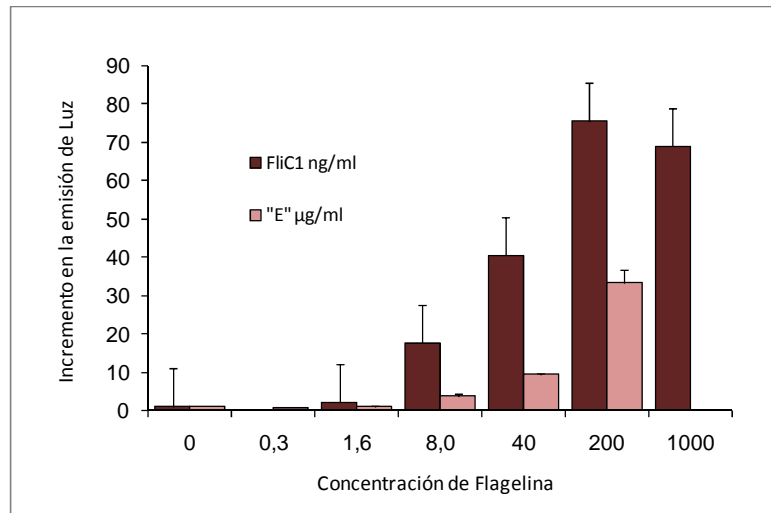
A continuación se realizó una curva dosis – respuesta entre FliC1 de *S. typhimurium* y flagelina “E” de *P. mirabilis*. Se utilizaron 5 concentraciones diferentes de cada suspensión de proteína. La estimulación con la flagelina de *P. mirabilis* realizó con 0,3, 1,6, 8,0, 40 y 200 µg/ml de proteína, mientras que con FliC1 se estimuló con 1,6, 8,0, 40, 200 y 1000 ng/ml de proteína.

Ambas curvas mostraron un comportamiento similar, dependiente de la concentración del estímulo proteico, siendo FliC1 de *S. typhimurium* mas estimuladora que la flagelina de *P. mirabilis* (Figura 7).

Teniendo en cuenta los resultados obtenidos en el ensayo con las flagelinas en el sistema reportero CacoCCL20-Luc, donde se observó que la flagelina “E” *P. mirabilis* activó el sistema reportero, se decide



utilizar dicha proteína en todos los subsiguientes ensayos de la tesis. Además, para dicha elección se tuvo en cuenta que la cepa de origen de esta proteína (*P. mirabilis* 2921) se encuentra ampliamente caracterizada en nuestro laboratorio y que contamos con una cepa mutante isogénica de ella, la cual no expresa flagelos.



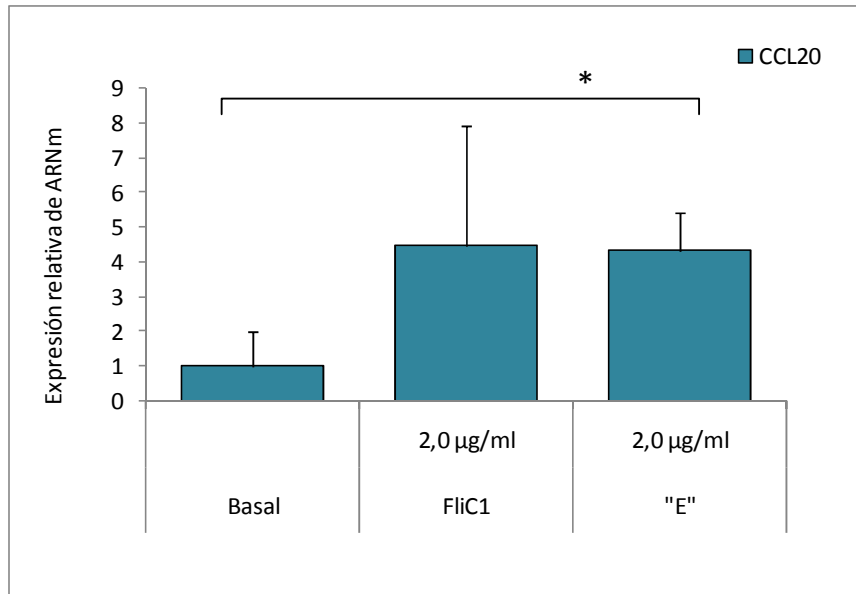
**Figura 7.** Curva dosis – respuesta de células CacoCCL20-Luc estimuladas durante 6 hs con diferentes concentraciones de FliC1 de *S. typhimurium* y flagelina “E” de *P. mirabilis*.

#### 4.2 Respuesta inmune innata en células T24

Con el propósito de evaluar la inducción de la expresión de genes involucrados en la inmunidad innata, se realizaron ensayos de estimulación en cultivos de células uroepiteliales T24 con flagelina “E” de *P. mirabilis* y posterior análisis de la expresión de ARNm por PCR en tiempo real. Los cultivos en monocapa se estimularon durante 2 hs con 2 µg/ml de flagelina de *P. mirabilis* y FliC1 de *S. typhimurium* y se evaluó la expresión de la quimioquina CCL20.

El análisis de los resultados mostró un aumento significativo en la expresión relativa de CCL20 cuando se estimularon las células con

flagelina "E" de *P. mirabilis*, respecto a las células no estimuladas ( $p=0,021$ ). Este aumento en los niveles de expresión de CCL20, fue similar en el caso de las células estimuladas con FliC1 como con células estimuladas con "E" (Figura 8).



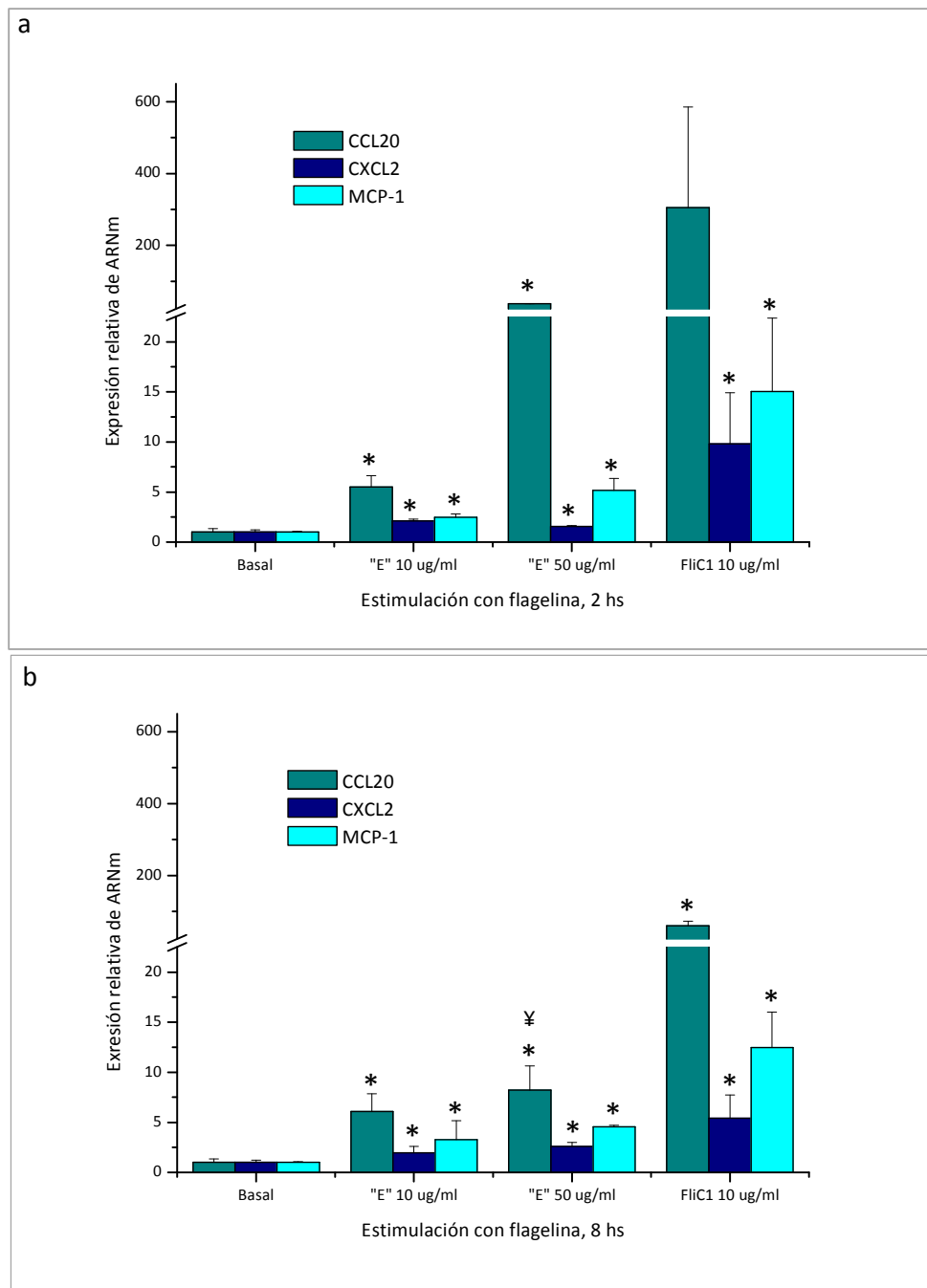
**Figura 8.** Expresión relativa de ARNm de CCL20 en cultivo de células T24 estimuladas durante 2 hs con 2 µg/ml de flagelina de *P. mirabilis* y FliC1 de *S. typhimurium*. El gen de la  $\beta$ -actina humana se utilizó como normalizador. El asterisco (\*) indica diferencia significativa respecto a las células no estimuladas (test de Student,  $p < 0,05$ ).

A continuación se estudió la expresión de quimioquinas en tiempos más prolongados para evaluar el transcurso de la respuesta inmune inducida por la flagelina. Para ello se estimularon cultivos de células T24 durante 2 y 8 hs. En este ensayo se evaluaron las quimioquinas involucradas en la respuesta inmune innata CCL20, CXCL2 y MCP-1. Las curvas de amplificación y de disociación para cada muestra analizada se muestran en el ANEXO I.

Cuando se analizó estadísticamente la expresión relativa de ARNm con el test de Student, se observó un aumento significativo de todas las quimioquinas respecto a las células basales, tanto a las 2 como a

las 8 hs post-estimulación ( $p < 0,05$ ) (Figura 9a y 9b), excepto para el caso de FliC1 a 10  $\mu\text{g/ml}$  (Figura 9a). En este caso se observaron diferencias entre los niveles de expresión relativa de ARNm de las quimioquinas, entre las células estimuladas con FliC1 y “E”, siendo la primera más estimuladora que la flagelina de *P. mirabilis* (Figuras 9a y 9b). Este resultado es similar al observado en el ensayo con las células CacoCCL20-Luc, donde se aprecia que FliC1 es más activador que la flagelina de *P. mirabilis*.

Asimismo los niveles de expresión relativa de ARNm de todas las quimioquinas disminuyeron a las 8 hs post-estimulación, respecto a los niveles observados a las 2 hs, tanto para el caso de estimulación con FliC1 como de “E” (Figura 9b). En particular el nivel de expresión de ARNm de CCL20 disminuyó significativamente respecto al nivel de expresión a las 2 hs, cuando se estimuló con flagelina “E” de *P. mirabilis* (¥) (Figura 9b).



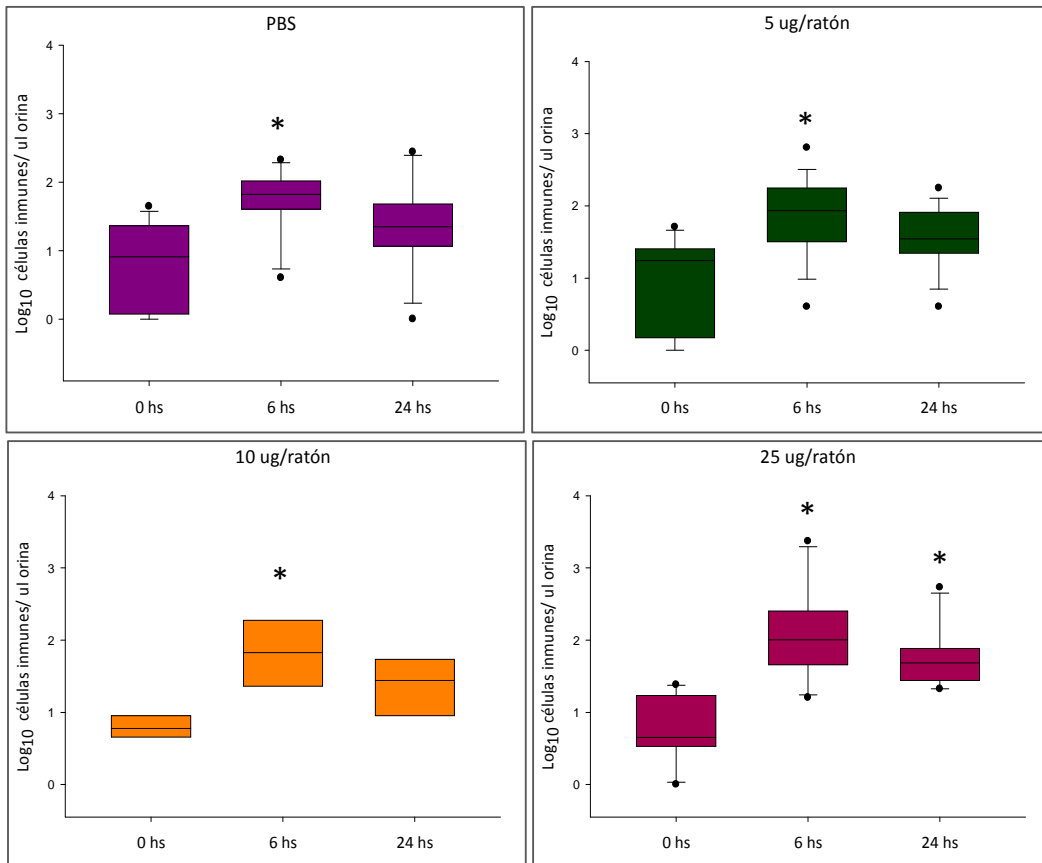
**Figura 9.** Expresión relativa de ARNm de las quimioquinas: CCL20, CXCL2 y MCP-1 en cultivo de células T24 estimuladas con flagelina de *P. mirabilis* y FliC1 de *S. typhimurium*. El gen de la  $\beta$ -actina humana se utilizó como normalizador. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas respecto a las células no estimuladas (test de Student,  $p < 0,05$ ) y (¥) indica diferencia significativa en la expresión relativa de ARNm de CCL20 entre 2 y 8 hs de estimulación con 50  $\mu\text{g}/\text{ml}$  de flagelina "E" de *P. mirabilis* (test de Student,  $p < 0,05$ ).

Con el fin de evaluar una posible contaminación de las preparaciones con LPS bacteriano, se agregó Polimixina B a la suspensión de flagelina en una relación 1:100. Estas preparaciones se evaluaron en los ensayos *in vivo* de instilación de flagelina en ratones y en los recuentos de células inmunes en orina y evaluación de modificaciones histológicas en vejigas de animales instilados. De acuerdo a diferentes autores, dicha cantidad de antibiótico es suficiente para neutralizar el LPS que pudiera estar presente en la preparación (Bjorling et al., 2001; McDermott et al., 2000). Al no detectarse diferencias en los efectos de la preparación con ó sin Polimixina B, se decidió emplear la flagelina sin suplementar en los distintos procedimientos.

## 5. Instilación intravesical de flagelina en ratones

### 5.1 Recuentos de células inmunes en orina

En este ensayo se evaluó el efecto de la instilación de flagelina de *P. mirabilis* en vejigas murinas. Primeramente se instilaron transuretralmente 3 grupos de ratones (n=10 en cada grupo), con 5, 10 y 25 µg/ratón de flagelina “E” de *P. mirabilis* respectivamente y se realizaron recuentos de células inmunes en Cámara de Neubauer, teniendo en cuenta las características descritas en el numeral 9.2 de Materiales y Métodos).

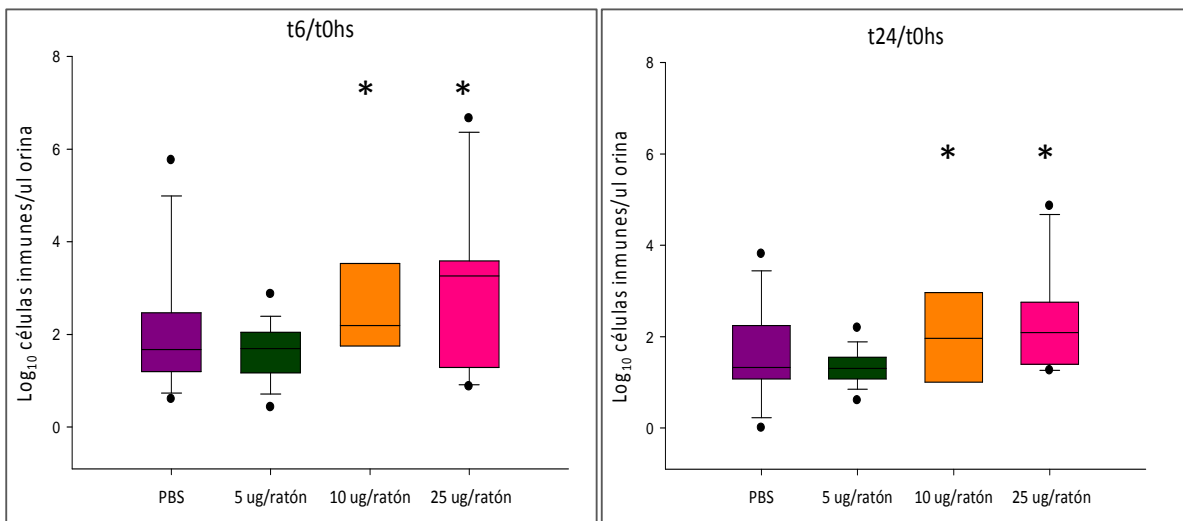


**Figura 10.** BoxPlot del Log<sub>10</sub> de células inmunes/μl de orina obtenidos a partir de recuentos en Cámara de Neubauer previo a la instilación (t0) y a las 6 y 24 hs post-instilación con flagelina de *P. mirabilis*. Los círculos (●) corresponden a los valores atípicos y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas respecto al número de células inmunes a t0, en cada tratamiento (test no paramétrico de Kluskal Wallis,  $p < 0,05$ ).

Los recuentos mostraron un aumento en el número de células inmunes a las 6 y 24 hs post-instilación, en todos los animales tratados respecto a tiempo cero (Figura 10). Cuando dichos valores se analizaron estadísticamente con el test no paramétrico de Kruskal Wallis se observó que el aumento de células inmunes en orina fue significativo a las 6 hs post-instilación en todos los grupos de animales ( $p \ll 0,05$ ) respecto a tiempo cero, mientras que a las 24 hs se observó un

aumento sólo en los ratones instilados con 25  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  de “E” ( $p=0,0066$ ) (Figura 10).

Si bien se observó un aumento de células inmunes en orina de los animales instilados con las tres concentraciones de flagelina, también se observó un aumento en el grupo control PBS respecto a t0. Por esta razón, se analizó la relación de células inmunes t6/t0 hs y t24/t0 hs. En esta instancia, el aumento de células inmunes fue significativo a las 6 hs post-instilación en los grupos tratados con 10 y 25  $\mu\text{g}/\text{ratón}$  de “E” con respecto al grupo control PBS. Cabe agregar que esta diferencia significativa se mantuvo hasta las 24 hs post-instilación (p-valores obtenidos con el test estadístico no paramétrico de Kluskal Wallis: 0,015 y 0,000074 respectivamente). Dicho aumento no sería entonces debido a la técnica de instilación, sino que correspondería al efecto de la flagelina administrada (Figura 11).



**Figura 11.** BoxPlot del  $\text{Log}_{10}$  de células inmunes/ $\mu\text{l}$  de orina, obtenidos a partir de recuentos en Cámara de Neubauer. Se grafica la relación t6/t0 hs y t24/t0 hs post-instilación. Los círculos (•) corresponden a los valores atípicos y los asteriscos (\*) indican diferencias significativas respecto al número de células inmunes en el grupo instilado con PBS (test no paramétrico de Kluskal Wallis,  $p < 0,05$ ).

## 5.2 Evaluación de modificaciones histológicas en vejigas de ratones tratados con flagelina en forma intravesical (transuretral)

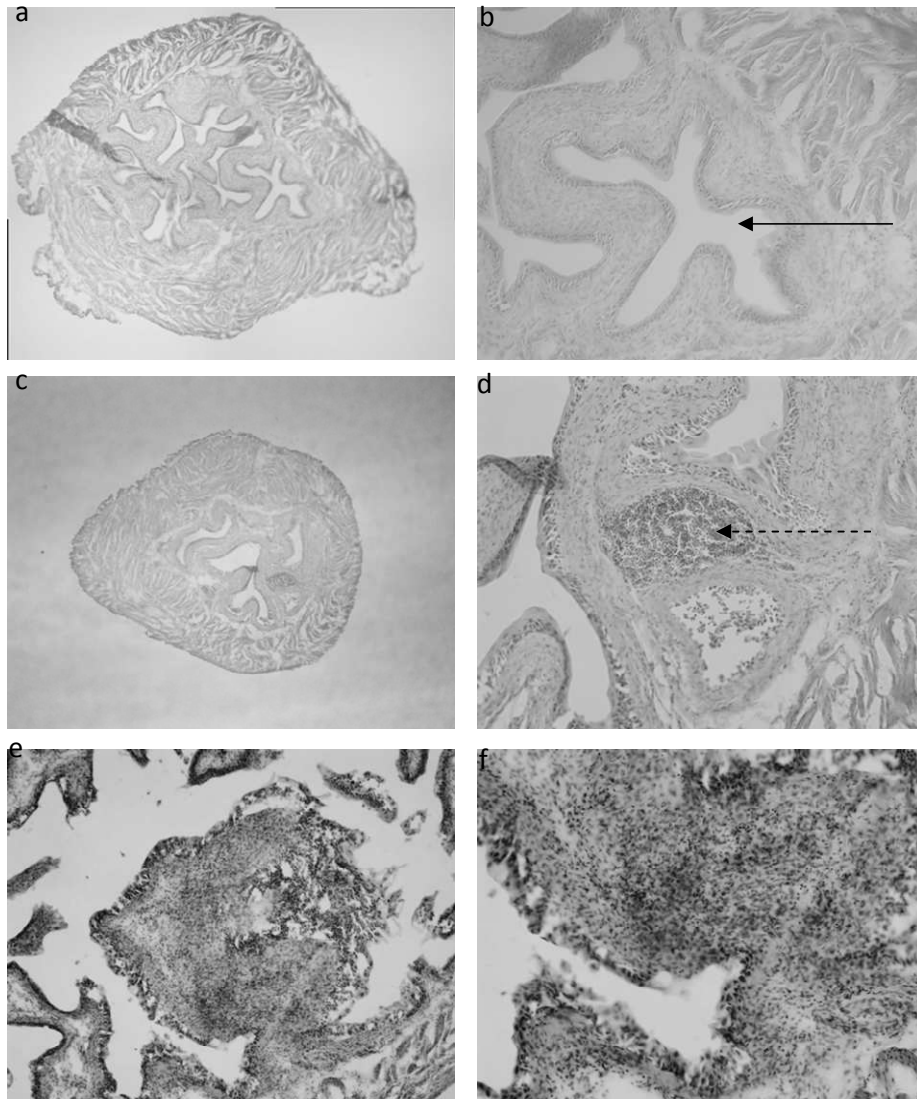
Paralelamente al ensayo de recuento de células inmunes en orina se utilizaron las vejigas de los ratones tratados en el ensayo anterior (Sección 5.1) para determinar el efecto de la instilación de flagelina de *P. mirabilis* mediante la observación de modificaciones histológicas en dicho tejido.

Cuando se analizó cada uno de los cortes histológicos, se observó la presencia de células inmunes en todos los órganos. Dichas células inmunes se encontraron a nivel de submucosa, diseminadas en todo el tejido y en ocasiones formando pequeños y medianos focos inflamatorios. En particular, las vejigas instiladas con PBS presentaron modestos infiltrados de células inmunes en submucosa. Además, en 3 vejigas se observó la presencia de pequeños focos inflamatorios. Dichos focos se distinguieron como agregados de células inflamatorias bien definidos y delimitados. En todos los casos de las vejigas tratadas con PBS, las modificaciones fueron más leves respecto a las observadas en los animales instilados con flagelina (Figuras 12a y 12b). Por otro lado, las vejigas instiladas con “E” mostraron modificaciones más intensas, con presencia de focos de mayor tamaño e infiltrados en submucosa y capa muscular (Figura 12c y 12d). Dichos infiltrados, en algunos casos fueron generalizados y con alto grado de inflamación (Figura 12d y 12e).

A partir de lo observado en los preparados, se generó un *score* de modificación histológica en vejiga de acuerdo a los criterios expuestos en el numeral 9.1 de Materiales y Métodos (Figura 13). El *score* obtenido muestra que ninguna de las vejigas careció de modificaciones. Asimismo, se observó que las vejigas instiladas con flagelina “E” presentaron mayor severidad en las modificaciones



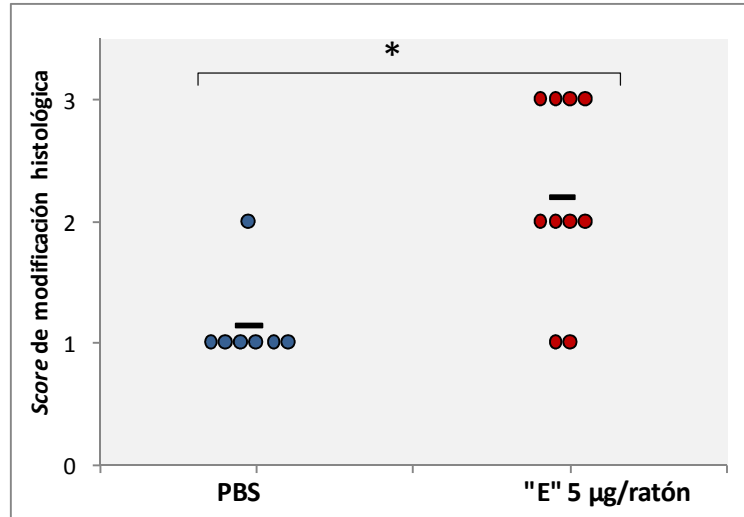
histológicas y por consecuencia obtuvieron un *score* superior respecto a las instiladas con PBS (Figura 13).



**Figura 12.** Cortes histológicos transversales de vejigas murinas instiladas con PBS y flagelina “E” durante 24 hs, teñidos con Hematoxilina-Eosina. Imágenes tomadas con microscopio invertido utilizando el programa Cell<sup>^</sup>F. 12a y 12b vejiga instilada con PBS. 12c-12f vejigas instiladas con “E” (5  $\mu$ g/ ratón). Aumentos con el microscopio invertido: 12a y 12c aumento: 4x, 12b, 12d y 12e aumento: 10x y 12f: aumento 20x. La flecha continua indica la luz de la vejiga y la flecha punteada un foco inflamatorio, con reclutamiento de células inmunes en submucosa.

El análisis estadístico con el test no paramétrico de Mann Whitney muestra que ocurrió un aumento significativo de modificaciones histológicas asociado a inflamación en las vejigas del grupo instilado

durante 24 hs con flagelina respecto al grupo control tratado con PBS, obteniéndose un  $p= 0,0086$  (Figura 13).



**Figura 13.** Score de modificaciones histológicas en vejigas murinas. Los círculos azules corresponden al *score* de vejigas instiladas con PBS y los rojos al *score* de vejigas instiladas con flagelina "E" 100 µg/ml (5 µg/ratón). Las barras indican las medias en cada grupo. El valor 0: corresponde a ausencia de modificaciones en el tejido, 1: presencia de infiltrados de células inflamatorias en submucosa, 2: infiltrados celulares diseminados en submucosa y muy poco en capa muscular y epitelio, 3: inflamación perivascular expandida, distribución transmural y células inflamatorias en el epitelio. El asterisco (\*) indica diferencias significativas entre los grupos ( $p= 0,0086$ ) con el test no paramétrico de Mann Whitney.

### 5.3 Reclutamiento celular en vejiga luego de la instilación de flagelina

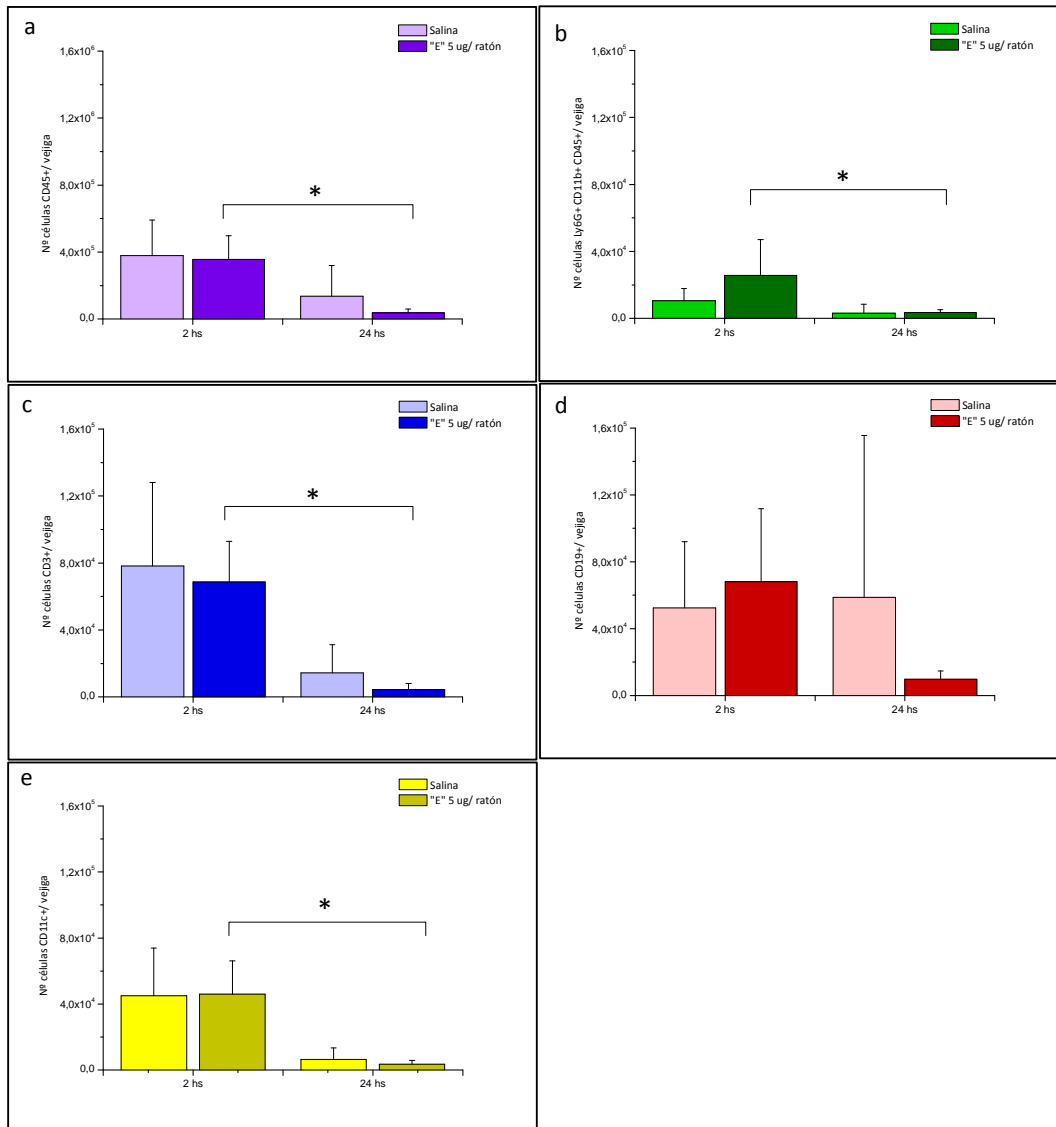
En este ensayo se evaluó el reclutamiento de células inmunes en vejiga mediante citometría de flujo a las 2 y 24 hs post-instilación de flagelina de *P. mirabilis*.

Se observó un aumento del pan leucocitario, caracterizado por células CD45+, a las 2 hs post-instilación tanto para el caso del grupo tratado con solución salina como el grupo tratado con flagelina (n=4 en cada grupo de animales). Estos valores, disminuyeron significativamente a las 24 hs post-instilación (Figura 14a). El reclutamiento de leucocitos

y linfocitos debido a la instilación de flagelina no fue muy contundente, y fue similar al observado en el grupo instilado con solución salina.

Por otro lado, se observó un aumento de neutrófilos, caracterizados por los marcadores Ly6G+/CD11b+/CD45+ a las 2 hs, en el grupo instilado con flagelina “E” (Figura 14b). Transcurridas 24 hs, el número neutrófilos disminuyó significativamente en ambos grupos, respecto al grupo flagelina 2 hs (Figura 14b).

Las poblaciones de linfocitos T y linfocitos B, así como la población de células CD11c+ mostraron el mismo patrón que el pan leucocitario, caracterizado por un reclutamiento de células a las 2 hs post-instilación y una posterior disminución de células a las 24 hs. En todos los casos, la cantidad de células presentes en el grupo instilado con flagelina y el grupo instilado con solución salina a las 2 hs post-tratamiento fueron similares, excepto en el caso de los neutrófilos, como se expuso en el párrafo anterior.

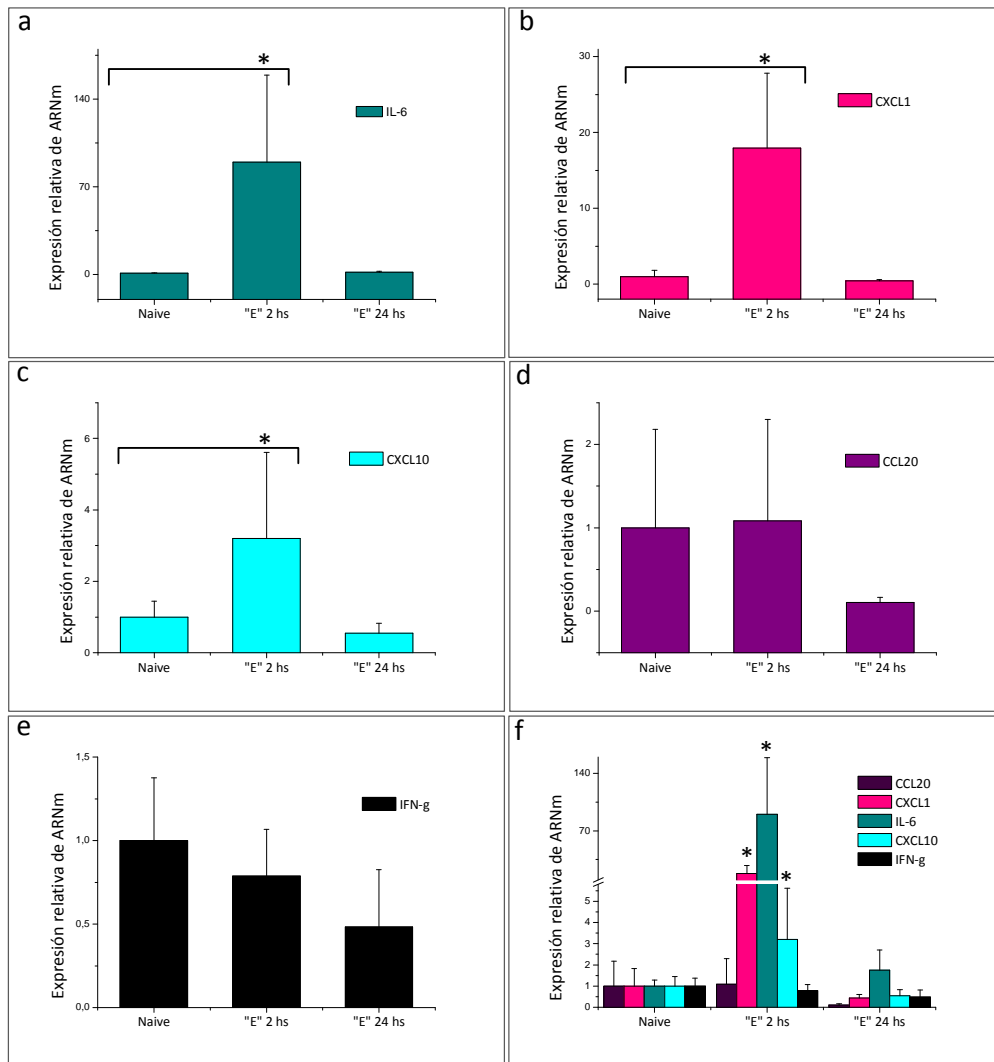


**Figura 14.** Número de células inmunes en vejiga obtenidas por la técnica de Citometría de Flujo a las 2 y 24 hs post-instilación. Un grupo de animales se instiló con 5 µg/ratón de flagelina “E” de *P. mirabilis* mientras que el grupo control se instiló con solución salina. n= 4 animales en cada grupo. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas realizadas con el test de Duncan ( $p < 0,05$ ).

#### 5.4 Expresión de citoquinas y quimioquinas en vejigas

La expresión de genes correspondientes a citoquinas y quimioquinas de la respuesta inmune innata en vejiga se evaluaron mediante la técnica de PCR en tiempo real. Se utilizaron tres grupos de animales (n= 4 en cada grupo), dos de los cuales se instilaron

transuretralmente con flagelina "E" de *P. mirabilis* durante 2 y 24 hs. El tercer grupo no se trató y permaneció como control. El procesamiento de cada muestra se realizó de acuerdo al protocolo descrito en Materiales y Métodos (Sección 7.4). Las curvas de amplificación y las de disociación de las muestras analizadas en este ensayo se muestran en el ANEXO II.



**Figura 15.** Expresión relativa de ARNm de quimioquinas en vejigas murinas a las 2 y 24 hs post-institución de flagelina, respecto a las vejigas no tratadas (*naive*). El gen de la  $\beta$ -actina se utilizó como normalizador. Los asteriscos (\*) indican diferencias significativas respecto a las vejigas de animales no tratados (*naive*) con el test no paramétrico de Mann Whitney ( $p < 0,05$ ).

Cuando se analizaron los resultados obtenidos por PCR en tiempo real, correspondientes a la expresión relativa de ARNm de IL-6, IFN- $\gamma$  y de las quimioquinas CXCL1, CXCL10 y CCL20 se observó que algunos de los genes estudiados aumentaron su expresión a las 2 hs post-institación, mientras que otros no se modificaron o incluso mostraron una tendencia a la disminución en sus niveles de expresión, respecto a los niveles de expresión en los animales no tratados (Figura 15f). En particular, los niveles de ARNm de CXCL1, CXCL10 e IL-6 aumentaron significativamente a las 2 hs post-institación respecto a las vejigas no tratadas (*naive*) y luego a las 24 hs disminuyeron (Figura 15a, 15b y 15c). Los valores de p obtenidos con el test no paramétrico de Mann Whitney fueron de 0,049 para cada gen (CXCL1, CXCL10 e IL-6). Por el contrario, el nivel de expresión relativa de ARNm de IFN- $\gamma$  en el grupo de vejigas tratadas con “E” mostró una tendencia a la disminución a las 2 y 24 hs post-institación con respecto al grupo de vejigas no tratadas (Figura 15e). Finalmente, en el caso de CCL20 no se observó un patrón de aumento claro a las 2 hs post-institación y a las 24 hs de institación el nivel de ARNm tendió a disminuir respecto a las vejigas no tratadas (Figura 15d).

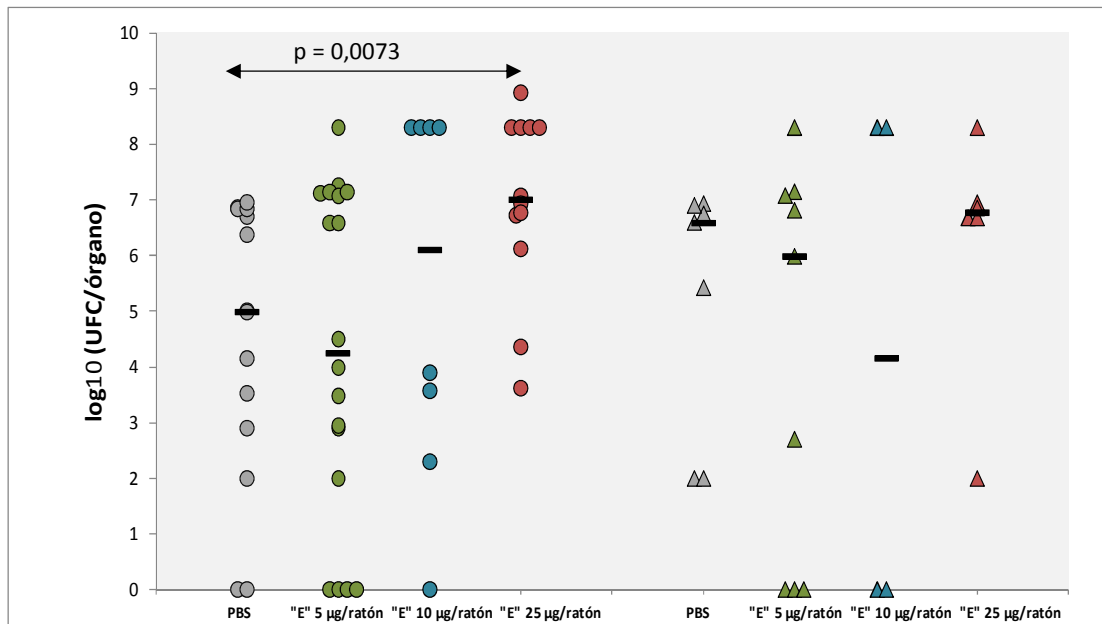
### 5.5 Evolución de una ITU luego de la institación de flagelina de *P.*

#### *mirabilis* en el tracto urinario

En este ensayo se analizó si la respuesta inflamatoria en vejiga inducida por la institación de flagelina de *P. mirabilis* podría tener un efecto en la evolución de una ITU ascendente experimental en ratones.

Los resultados mostraron que el número de UFC en riñones de los animales institados con 10 (n= 4) y con 25  $\mu$ g de flagelina (n=6)

aumentó con respecto al grupo control PBS (n= 7). Dicho aumento se analizó con el test estadístico no paramétrico de Mann Whitney obteniéndose un p-valor significativo sólo en el grupo instilado con 25  $\mu\text{g}$  de flagelina por ratón respecto al grupo control PBS ( $p= 0,0073$ ). Para el caso de la infección transuretral con 5  $\mu\text{g}$  de flagelina "E" de *P. mirabilis* (n= 9), no se observó una disminución en la colonización bacteriana. Finalmente, todos los grupos mostraron un recuento elevado en vejigas, no obteniéndose diferencias significativas entre ellos ni respecto al grupo control PBS (Figura 16).



**Figura 16.** Recuentos de UFC ( $\log_{10}$ ) en riñones y vejigas de ratones hembra CD-1 que fueron tratados con 5, 10 y 25  $\mu\text{g}$  de flagelina de *P. mirabilis* y transcurridas 24 hs. desafiados con la cepa *P. mirabilis* 2921. Cada punto corresponde a la cantidad de UFC recuperadas en cada órgano. Los círculos representan los riñones y los triángulos las vejigas. Las barras corresponden a las medianas de cada grupo. La flecha indica diferencia significativa entre el grupo PBS y el grupo tratado con 25  $\mu\text{g}$  de flagelina,  $p= 0,0073$  (test estadístico no-paramétrico de Mann Whitney).

## **DISCUSIÓN**

Los flagelos comprenden uno de los factores de virulencia más importantes de los patógenos bacterianos. Dichas estructuras permiten a los microorganismos desplazarse en ambientes acuosos y también sobre superficies sólidas (Jarrell and McBride, 2008). Dado que comprenden un componente esencial para la supervivencia microbiana, son estructuras muy conservadas evolutivamente. En particular, el dominio D1 de la flagelina, es reconocido como MAMP por el receptor de membrana tipo Toll TLR5 y por los receptores intracelulares Ipaf y Naip5 (Miao *et al.*, 2007). La interacción de dicho ligando con estos receptores inmunes del hospedador desencadena la activación de cascadas intracelulares que conllevan a la generación de respuestas inmunes innatas contra el patógeno. En particular estas respuestas incluyen la inducción de la expresión de citoquinas pro-inflamatorias, quimioquinas y otras moléculas antimicrobianas (Akira *et al.*, 2006).

El TU representa una importante barrera mecánica contra las infecciones bacterianas. Es considerado un ambiente estéril, el cual los diferentes hospederos deben mantener libre de microorganismos ya que su presencia puede ocasionar serias consecuencias clínicas. Por esta razón, los patógenos urinarios deben enfrentarse a un epitelio relativamente impermeable y además superar el flujo de orina y la presencia de mucina para poder alcanzar los distintos tejidos y multiplicarse (Song and Abraham, 2008). Debido a ello, la expresión de flagelos juega un rol importante que permite a las bacterias acceder a las diferentes regiones del TU. Asimismo, en el TU se desarrollan respuestas inmunes innatas y adaptativas altamente organizadas y efectivas para contrarrestar y superar la presencia de uropatógenos por parte del hospedador (Song and Abraham, 2008).



### Los flagelos de *P. mirabilis* en una ITU ascendente experimental

*P. mirabilis* tiene la capacidad de sobreexpresar flagelos en su superficie, cuando alterna su estructura celular a la forma *swarmer*. Varios autores proponen que el fenómeno de cambio de isotipo al morfotipo *swarming* representa el mecanismo que le permitiría a *P. mirabilis* tener acceso al hospedador, lo que sugiere que dicha forma celular se podría encontrar en las primeras etapas de una ITU (Coker *et al.*, 2000). Sin embargo, existe controversia en cuanto a su papel en el desarrollo de una ITU. Uno de los primeros estudios realizados con varias flagelinas de *P. mirabilis* demostraron que a pesar que dichas preparaciones son altamente inmunogénicas, la generación de anticuerpos específicos contra ellas no protegía en posteriores desafíos homólogos y heterólogos con *P. mirabilis* (Legnani-Fajardo *et al.*, 1991). En cuanto a la importancia de la expresión de flagelos, ensayos llevados a cabo con una cepa mutante de *P. mirabilis* móvil, incapaz de alternar a la forma *swarmer*, mostraron que dicha cepa no logró infectar riñones en un modelo de ITU ascendente experimental en ratones, aunque sí logró colonizar vejigas. En este caso los autores mostraron la importancia de la forma celular *swarmer* y por consecuencia de la expresión y presencia de flagelos de *P. mirabilis* en el desarrollo de una ITU experimental (Allison *et al.*, 1994). Sin embargo, otros estudios han mostrado que cepas aflageladas salvajes de *P. mirabilis* son capaces de desarrollar una ITU ascendente en ratones, con un grado de infectividad similar a las cepas flageladas (Zunino *et al.*, 1994).

En el primer ensayo del presente trabajo se evaluó el papel de los flagelos bacterianos de *P. mirabilis* en el desarrollo de una ITU mediante un ensayo de co-infección. Dicha aproximación ha sido previamente utilizada en nuestro laboratorio para estudiar la

competitividad de mutantes isogénicas de *P. mirabilis* que no expresan las fimbrias MR/P y PMF con respecto a la cepa salvaje (Zunino *et al.*, 2001; Zunino *et al.*, 2003).

Los recuentos de UFC obtenidos en el presente ensayo mostraron una reducción significativa en la colonización bacteriana de AF respecto a la cepa salvaje lo que sugiere que la capacidad de competencia de la mutante aflagelada está afectada con respecto a la cepa salvaje. Estos resultados son diferentes a aquellos comunicados por Legnani y colaboradores quienes observaron que la infectividad de una cepa mutante aflagelada fue similar a la de la cepa salvaje (Legnani-Fajardo *et al.*, 1996). Por otro lado, Mobley y colaboradores proponen que la expresión de flagelos contribuiría con la colonización del TU en un ensayo de infección experimental al emplear una cepa salvaje de *P. mirabilis* y su mutante isogénica aflagelada (Mobley *et al.*, 1996). No obstante, ambos ensayos se realizaron inoculando cada cepa en grupos independientes, mientras que en nuestro ensayo de co-infección se evaluó el papel de los flagelos cuando ambas cepas están presentes al mismo tiempo y en cantidades iguales en el TU.

El ensayo de co-infección realizado en este trabajo sugiere que la presencia de los flagelos de *P. mirabilis* en el desarrollo de una ITU ascendente experimental es importante y por consiguiente se fortaleció el interés en comprender cómo es su interacción con el sistema inmune innato del hospedador.

#### Respuesta de la respuesta inmune innata *in vitro*

La aproximación experimental para estudiar la activación de la respuesta inmune innata se realizó mediante ensayos *in vitro* con cultivos de células CacoCCL20-Luc. La estimulación de dichas células en

cultivo nos permitió establecer que la flagelina de *P. mirabilis* tiene la capacidad de activar la respuesta inmune innata en este sistema reportero. Resultados similares han sido obtenidos por otros autores utilizando flagelina de *Salmonella* en el sistema CacoCCL20-Luc (Nempont *et al.*, 2008; Romanin *et al.*, 2010) y en el sistema HEK293-Luc el cual expresa el reportero luciferasa asociado a NF- $\kappa$ B (Simon and Samuel, 2007) así como flagelina de *L. monocytogenes* en cultivos de células CHO-Luc (Hayashi *et al.*, 2001). En particular, la respuesta del sistema a la flagelina FliC1 de *Salmonella* fue mayor que la observada con las flagelinas de *P. mirabilis*. Esta apreciación se corresponde con lo reportado por McDermott y colaboradores, quienes han observado diferencias intrínsecas de activación de la respuesta inmune entre flagelinas de diferentes especies (McDermott *et al.*, 2000). Entre dichas flagelinas se encuentran las de *S. enteritidis*, *S. typhimurium*, *E. coli*, *Y. enterocolitica* y *P. aeruginosa*, siendo la flagelina de *S. typhimurium* la más inductora y la de *P. aeruginosa* la menos inductora (McDermott *et al.*, 2000). Cabe destacar que en dichos estudios, la mayoría de las flagelinas se expresan de forma recombinante en *E. coli*. Se ha propuesto, que la expresión heteróloga de dichas proteínas podría afectar las vías de activación de la cascada NF- $\kappa$ B y la inducción de la expresión de genes pro-inflamatorios debido a modificaciones post-transcripcionales diferentes entre la cepa de origen y la cepa de expresión (Honko and Mizel, 2005; Simon and Samuel, 2007). Sin embargo, en el presente trabajo se utilizó flagelina purificada directamente a partir de cultivos de *P. mirabilis* por lo que se evaluó la activación de la respuesta inmune de la proteína nativa.

Asimismo, la flagelina de las distintas cepas uropatogénicas de *P. mirabilis* tendrían diferentes capacidades de activar la respuesta inmune ya que se obtuvieron respuestas diferentes entre ellas en el sistema

CacoCCL20-Luc. Una hipótesis para explicar esto sería que dichas diferencias les permitirían evadir la respuesta inmune del hospedador, como lo discuten Simon y colaboradores cuando utilizan flagelina de *S. typhimurium* (Simon and Samuel, 2007). *P. mirabilis* presenta dos genes en *tándem* *flaA* y *flaB* que codifican a flagelina (Manos *et al.*, 1994), recientemente renombrados como *fliC1* y *fliC2* (número de acceso en PUBMED: P42272 y P42273 respectivamente). Ambos genes presentan una similitud en sus secuencias la cual es cercana al 80% mientras que en los extremos 5' y 3' es del 100%. El gen *fliC1* es el que usualmente se expresa, mientras que el gen *fliC2* no se transcribe y se lo conoce como alelo silencioso. Estudios de mutagénesis han demostrado que naturalmente y bajo ciertas circunstancias se pueden generar genes híbridos *fliC1-2*. Dichos rearrreglos son reversibles y generan flagelinas con distintas secuencias aminoacídicas que difieren en su antigenicidad respecto a aquellas cepas que expresan sólo *fliC1* (Manos *et al.*, 2004; Manos and Belas, 2004). Como consecuencia, estos rearrreglos también llevarían a la concomitante generación de flagelinas que no tienen la misma capacidad de inducir una respuesta inmune innata. Estas observaciones podrían estar relacionadas con lo obtenido en el primer ensayo en cultivos de células CacoCCL20-Luc donde las diferencias en la respuesta podrían deberse a rearrreglos entre los genes *fliC1* y *fliC2*. De esta manera, esta propiedad les podría permitir a las distintas cepas de *P. mirabilis* no ser reconocidas por los receptores inmunes, lo que les proporcionaría una ventaja al momento de colonizar el TU.

Como se expuso previamente, la flagelina de diversos microorganismos, como por ejemplo de *S. typhimurium*, induce respuestas inmunes innatas, con producción de TNF- $\alpha$ , IL-6, IL-10, IL-12p70, MIP-1 $\alpha$  e IFN- $\gamma$  (Eaves-Pyles *et al.*, 2001) y reclutamiento principalmente de neutrófilos, cuando se administra local o

sistémicamente en ratones (Honko and Mizel, 2004; Muñoz *et al.*, 2010). En el presente trabajo demostramos que la flagelina de *P. mirabilis* tiene la capacidad de inducir la producción de ARNm de CCL20, CXCL-2 y MCP-1 en cultivos de células T24. Asimismo, los niveles de expresión relativa de ARNm de dichas quimiocinas fueron más altos cuando se estimularon las células con FliC1 que cuando se utilizó “E”, para todas las quimiocinas evaluadas. Sin embargo, a bajas concentraciones de proteína (2µg/ml) los niveles de expresión relativa de ARNm de CCL20 fueron similares entre la flagelina de *P. mirabilis* y la de *S. typhimurium*. Esto último podría estar relacionado con una respuesta basal de las células.

Los neutrófilos se encuentran entre las principales células del sistema inmune reclutadas al sitio de infección en una ITU. En particular, se los considera los más rápidos y abundantes que llegan a los sitios de infección en casos de ITU (Nielubowicz and Mobley, 2010). Su reclutamiento es iniciado cuando los uropatógenos presentes en el TU, inducen a las células del epitelio urinario a secretar quimiocinas y citoquinas y a expresar receptores de quimiocinas (Haraoka *et al.*, 1999). Por otra parte, las quimiocinas pro-inflamatorias CXCL-2 y CCL20 son consideradas muy importantes para la infiltración de neutrófilos y se ha observado que la flagelina de *S. typhimurium* induce su expresión cuando se administra por la vía nasal en ratones (Muñoz *et al.*, 2010). En el presente trabajo se pudo demostrar que la flagelina de *P. mirabilis* induce un aumento en la expresión de ARNm de varias quimiocinas que están involucradas en el reclutamiento de neutrófilos. Por lo tanto, dicha flagelina estaría involucrada en la activación de la respuesta inflamatoria, a través de la inducción de la expresión de genes pro-inflamatorios en vejiga.

### Respuesta inflamatoria y modificaciones histológicas en vejiga

Algunas de las principales modificaciones que se han observado en vejigas murinas infectadas con UPEC son engrosamiento del epitelio, acompañado por robustos infiltrados de células inflamatorias así como también edema en la lámina propia (Johnson *et al.*, 1998). Asimismo, vejigas murinas infectadas con *P. mirabilis* presentan patrones similares de respuesta inflamatoria, los cuales son persistentes en el tiempo y dependiendo de su severidad pueden ocasionar la muerte del animal (comunicación personal con la Magister Paola Scavone).

A partir de los ensayos de instilación transuretral de flagelina de *P. mirabilis* del presente trabajo se demostró que esta proteína induce una respuesta inflamatoria en el tejido vesical. Dicha respuesta se pudo apreciar en las modificaciones histológicas de los cortes de las vejigas tratadas con flagelina y en los recuentos de células inmunes en orina elevados transcurridas 6 hs post-instilación. Asimismo, se estableció que la instilación de flagelina produjo un aumento transitorio de células inmunes, ya que a las 24 hs post-instilación los valores fueron más bajos. Resultados similares fueron observados por Saban y colaboradores, en ensayos de instilación transuretral de LPS de *E. coli* en vejigas murinas (Saban *et al.*, 2002). En ese caso, la migración de células inmunes y la formación de edema ocurrieron más rápido, con un pico de liberación de células a las 2 hs post-instilación. Cabe destacar que la severidad de las modificaciones histológicas y la formación de edema observada en nuestro ensayo fueron más modestas que las observadas en trabajos donde el epitelio vesical se enfrentó a *P. mirabilis* en una ITU ascendente experimental en ratones (Alamuri *et al.*, 2009) así como en el ensayo donde se instiló LPS de *E. coli* (Saban *et al.*, 2002).

### Presencia de células inmunes en vejiga

De la misma manera, el análisis de las distintas poblaciones de células inmunes por citometría de flujo demostró que la instilación de flagelina indujo un reclutamiento transitorio de células blancas en el tejido vesical el cual no fue tan contundente como el que se ha observado a partir de la instilación directa con *P. mirabilis* (comunicación personal con la Mag. Paola Scavone). Es importante resaltar que del procesamiento de las vejigas se obtuvieron pocas células, lo cual fue una limitante al momento de marcar y analizar las muestras con el citómetro. En futuros ensayos se afinará la técnica de extracción de células de este tejido. Un resultado llamativo fue que la cantidad de células blancas en los grupos de animales tratados con flagelina y con solución salina a las 2 hs post-instilación fueron similares, con la única excepción de la población de neutrófilos, la cual fue mayor en el grupo tratado con flagelina. Esto nos permitió especular que el procedimiento de introducción del catéter en la uretra murina ocasiona la inducción de una respuesta inflamatoria. Esta misma apreciación fue observada en los cortes histológicos y en los recuentos de células inmunes en orina, donde los grupos control presentaban también alteraciones. No obstante, en esos ensayos se pudo diferenciar claramente que el efecto inducido por la presencia de flagelina superaba al producido por el proceso mecánico de introducción del catéter.

### Expresión de quimioquinas y citoquinas pro-inflamatorias en vejiga

Como se señaló anteriormente uno de los aspectos fundamentales en la defensa temprana hacia una ITU se debe a la inducción de la expresión de quimioquinas pro-inflamatorias como por ejemplo la

quimioquina IL-8 (Haraoka *et al.*, 1999; Ragnarsdottir *et al.*, 2008). En particular, se ha observado que se induce una paleta muy variada de citoquinas y quimioquinas en vejigas infectadas con UPEC (Ingersoll *et al.*, 2008).

En el presente trabajo, se demostró que la instilación transuretral de flagelina de *P. mirabilis* indujo un aumento transitorio de los niveles de expresión relativa de ARNm de las quimioquinas pro-inflamatorias IL-6, CXCL-1 y CXCL-10. Estos resultados son concordantes con los obtenidos por otros autores, quienes han demostrado que la administración *in vivo* de flagelina regula positivamente la expresión de quimioquinas (Honko and Mizel, 2004; Muñoz *et al.*, 2010; Sha *et al.*, 2004; Siervo *et al.*, 2001). Dichas quimioquinas y citoquina pro-inflamatorias son consideradas cruciales para la activación y movilización de respuestas inmunes innatas en vejigas (Sivick and Mobley, 2010). De todas maneras se debe tener en cuenta que el proceso de instilación propiamente dicho induce el reclutamiento de células inmunes, como se observó en el ensayo previo de citometría. Por esta razón, no se puede descartar que lo observado en el presente ensayo sea una respuesta a la introducción del catéter en la vejiga murina. Por esta razón, sería conveniente repetir el procedimiento y análisis de la expresión relativa de ARNm de citoquinas añadiendo un grupo de animales control, instilado con solución salina.

#### Efecto de la instilación de flagelina en el desarrollo de una ITU

La generación de respuestas inmunes innatas y adaptativas son esenciales para contrarrestar los ataques bacterianos producidos durante una ITU (Song and Abraham, 2008).



Como se demostró previamente, la flagelina de *P. mirabilis* tiene la capacidad de activar la respuesta inmune innata *in vitro* e *in vivo*, induciendo la expresión de quimioquinas pro-inflamatorias y generando inflamación en el epitelio vesical. Teniendo en cuenta estas propiedades de la flagelina de *P. mirabilis*, se especuló que su instilación transuretral podría tener un efecto favorable para neutralizar en alguna medida el desarrollo de una ITU ascendente experimental. Otros investigadores han demostrado que la administración nasal de flagelina de *S. typhimurium* induce la activación de la respuesta inmune innata local y que dicha respuesta disminuye la ocurrencia de neumonía en un modelo de infección por *S. pneumoniae* en ratones (Muñoz *et al.*, 2010). Sin embargo, los resultados obtenidos en el presente trabajo revelaron lo contrario, ya que la respuesta inmune generada por la instilación de flagelina de *P. mirabilis* en la vejiga murina no contribuyó a disminuir la colonización bacteriana en el TU. Más aun, la colonización bacteriana se vio exacerbada cuando se utilizaron altas concentraciones de flagelina. Esto sugiere que la inflamación y el reclutamiento de células inmunes producida por la instilación de flagelina de *P. mirabilis* en el TU no son favorables para la resolución de una ITU. Al respecto, Smith y colaboradores han propuesto que en ITU causadas por UPEC sería muy importante mantener la funcionalidad de la barrera del epitelio urinario del hospedador para limitar la inflamación y preservar la homeostasis del tejido (Smith *et al.*, 2010). Por todo lo expuesto, la estimulación de una respuesta en la vejiga no es beneficiosa para la neutralización del proceso infeccioso en el hospedador.

## **CONCLUSIONES**

En el presente trabajo se utilizaron distintas aproximaciones *in vivo* e *in vitro* para estudiar la capacidad de la flagelina de *P. mirabilis* de inducir la activación de la respuesta inmune innata en el TU.

Como se mencionó previamente, la producción de citoquinas y quimioquinas pro-inflamatorias es un punto clave en el desarrollo de fuertes respuestas inmunes para contrarrestar los ataques microbianos en el TU. A partir de los ensayos en cultivos de células como en los ensayos de PCR en tiempo real pudimos demostrar que la flagelina de *P. mirabilis* tiene la capacidad de inducir la producción de quimioquinas pro-inflamatorias. Asimismo, el ensayo de instilación intravesical (transuretral) de flagelina nos permitió demostrar que la presencia de dicha proteína en la vejiga induce el reclutamiento de células inmunes, produciendo inflamación en el tejido.

Por otra parte, el ensayo de instilación de flagelina y posterior desafío ascendente con *P. mirabilis* puso en evidencia que la respuesta inflamatoria producida por la presencia de dicha proteína en el TU no es favorable para prevenir el desarrollo de una ITU ascendente experimental. Más aun, concentraciones elevadas de dicha proteína favorecen la colonización bacteriana, sugiriendo que la respuesta inflamatoria genera un ambiente propicio para la infección.

Los resultados del presente trabajo también evidenciaron que la flagelina de las distintas cepas de *P. mirabilis* no tiene la misma capacidad de inducir la activación de la respuesta inmune innata, como se observó en el sistema reportero CacoCCL20-Luc. En todos los casos, el efecto fue significativamente menor que el constatado al usar flagelina de *S. typhimurium*.

## PERSPECTIVAS

Los resultados obtenidos en este trabajo presentan que la flagelina de distintas cepas uropatógenicas de *P. mirabilis* presentan diferente capacidad de inducir una respuesta inmune innata, como se observó en el ensayo de estimulación del sistema reportero CacoCCL20-Luc. Por esta razón una perspectiva interesante consistiría en realizar análisis genómicos y proteómicos de todas las flagelinas de *P. mirabilis* utilizadas (activadoras y no activadoras) y a partir de estos análisis, efectuar comparaciones genómicas y a nivel de expresión entre cada una de ellas. Asimismo, otra perspectiva sería evaluar la capacidad de cada una de las flagelinas de inducir una respuesta inmune innata *in vitro* utilizando cultivos de células T24 e *in vivo*, a partir de los modelos de instilación transuretral de flagelina desarrollados en la Tesis.

Finalmente, sería muy interesante evaluar la capacidad infectiva de las cepas uropatógenicas cuyas flagelinas no son activadoras y comparar estos resultados con respecto a la capacidad infectiva de las cepas que expresan flagelinas activadoras, mediante ensayos de co-infección.

**BIBLIOGRAFÍA**

- Akira, S., Uematsu, S., Takeuchi, O., 2006, Pathogen recognition and innate immunity. *Cell* 124, 783-801.
- Alamuri, P., Eaton, K.A., Himpsl, S.D., Smith, S.N., Mobley, H.L., 2009, Vaccination with proteus toxic agglutinin, a hemolysin-independent cytotoxin in vivo, protects against *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Infect Immun* 77, 632-641.
- 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, N., O'Donnell, M.J., Fewson, C.A., 1985, Membrane-bound lactate dehydrogenases and mandelate dehydrogenases of *Acinetobacter calcoaceticus*. Purification and properties. *Biochem J* 231, 407-416.
- Andersen-Nissen, E., Smith, K.D., Strobe, K.L., Barrett, S.L., Cookson, B.T., Logan, S.M., Aderem, A., 2005, Evasion of Toll-like receptor 5 by flagellated bacteria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 9247-9252.
- Andriole, V.T., 1992, Urinary tract infections in the 90s: pathogenesis and management. *Infection* 20 Suppl 4, S251-256.
- Apodaca, G., 2004, The uroepithelium: not just a passive barrier. *Traffic* 5, 117-128.
- Bates, J.T., Honko, A.N., Graff, A.H., Kock, N.D., Mizel, S.B., 2008, Mucosal adjuvant activity of flagellin in aged mice. *Mech Ageing Dev* 129, 271-281.
- Beatson, S.A., Minamino, T., Pallen, M.J., 2006, Variation in bacterial flagellins: from sequence to structure. *Trends Microbiol* 14, 151-155.
- Billips, B.K., Forrestal, S.G., Rycyk, M.T., Johnson, J.R., Klumpp, D.J., Schaeffer, A.J., 2007, Modulation of host innate immune response in the bladder by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 75, 5353-5360.
- Bishop, B.L., Duncan, M.J., Song, J., Li, G., Zaas, D., Abraham, S.N., 2007, Cyclic AMP-regulated exocytosis of *Escherichia coli* from infected bladder epithelial cells. *Nat Med* 13, 625-630.

- Bjorling, D.E., Jacobsen, H.E., Blum, J.R., Shih, A., Beckman, M., Wang, Z.Y., Uehling, D.T., 2001, Intravesical *Escherichia coli* lipopolysaccharide stimulates an increase in bladder nerve growth factor. *BJU Int* 87, 697-702.
- Bowie, A.G., Haga, I.R., 2005, The role of Toll-like receptors in the host response to viruses. *Mol Immunol* 42, 859-867.
- Bradford, M.M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 72, 248-254.
- Coker, C., Poore, C.A., Li, X., Mobley, H.L., 2000, Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect* 2, 1497-1505.
- Eaves-Pyles, T.D., Wong, H.R., Odoms, K., Pyles, R.B., 2001, Salmonella flagellin-dependent proinflammatory responses are localized to the conserved amino and carboxyl regions of the protein. *J Immunol* 167, 7009-7016.
- Foxman, B., 2003, Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis Mon* 49, 53-70.
- Gales, A.C., Sader, H.S., Jones, R.N., 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.
- Gonzalez, C.M., Schaeffer, A.J., 1999, Treatment of urinary tract infection: what's old, what's new, and what works. *World J Urol* 17, 372-382.
- Haraoka, M., Hang, L., Frendeus, B., Godaly, G., Burdick, M., Strieter, R., Svanborg, C., 1999, Neutrophil recruitment and resistance to urinary tract infection. *J Infect Dis* 180, 1220-1229.
- Hayashi, F., Smith, K.D., Ozinsky, A., Hawn, T.R., Yi, E.C., Goodlett, D.R., Eng, J.K., Akira, S., Underhill, D.M., Aderem, A., 2001, The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature* 410, 1099-1103.
- Hoener, J.F., 1965, Influence of pH on *Proteus* Flagella. *J Bacteriol* 90, 275-277.
- 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 adaptive immunity. *Immunol Res* 33, 83-101.
- Honko, A.N., Sriranganathan, N., Lees, C.J., Mizel, S.B., 2006, Flagellin is an effective adjuvant for immunization against lethal respiratory challenge with *Yersinia pestis*. *Infect Immun* 74, 1113-1120.
- Hooton, T.M., 2000, Pathogenesis of urinary tract infections: an update. *J Antimicrob Chemother* 46 Suppl 1, 1-7; discussion 63-65.
- Hooton, T.M., Bradley, S.F., Cardenas, D.D., Colgan, R., Geerlings, S.E., Rice, J.C., Saint, S., Schaeffer, A.J., Tambayh, P.A., Tenke, P., Nicolle, L.E., 2010, Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clin Infect Dis* 50, 625-663.
- Hooton, T.M., Samadpour, M., 2005, Is acute uncomplicated urinary tract infection a foodborne illness, and are animals the source? *Clin Infect Dis* 40, 258-259.
- Ingersoll, M.A., Kline, K.A., Nielsen, H.V., Hultgren, S.J., 2008, G-CSF induction early in uropathogenic *Escherichia coli* infection of the urinary tract modulates host immunity. *Cell Microbiol* 10, 2568-2578.
- Jarrell, K.F., McBride, M.J., 2008, The surprisingly diverse ways that prokaryotes move. *Nat Rev Microbiol* 6, 466-476.
- Jeong, E., Lee, J.Y., 2011, Intrinsic and extrinsic regulation of innate immune receptors. *Yonsei Med J* 52, 379-392.
- Johnson, D.E., Lockatell, C.V., Russell, R.G., Hebel, J.R., Island, M.D., Stapleton, A., Stamm, W.E., Warren, J.W., 1998, Comparison of *Escherichia coli* strains recovered from human cystitis and pyelonephritis infections in transurethrally challenged mice. *Infect Immun* 66, 3059-3065.
- Latta, R.K., Grondin, A., Jarrell, H.C., Nicholls, G.R., Berube, L.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, 509-511.

- Legnani-Fajardo, C., Zunino, P., Algorta, G., Laborde, H.F., 1991, Antigenic and immunogenic activity of flagella and fimbriae preparations from uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Can J Microbiol* 37, 325-328.
- 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.
- Li, X., Mobley, H.L., 2002, Vaccines for *Proteus mirabilis* in urinary tract infection. *Int J Antimicrob Agents* 19, 461-465.
- Livak, K.J., Schmittgen, T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C(T)}$  Method. *Methods* 25, 402-408.
- 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.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J., 1997, *Biology of Microorganisms*, Eight Edition Edition. Prentice Hall International, New Jersey, 56 p.
- Manos, J., Artimovich, E., Belas, R., 2004, Enhanced motility of a *Proteus mirabilis* strain expressing hybrid FlaAB flagella. *Microbiology* 150, 1291-1299.
- Manos, J., Belas, R., 2004, Transcription of *Proteus mirabilis* flaAB. *Microbiology* 150, 2857-2863.
- Manos, M.M., Waldman, J., Zhang, T.Y., Greer, C.E., Eichinger, G., Schiffman, M.H., Wheeler, C.M., 1994, Epidemiology and partial nucleotide sequence of four novel genital human papillomaviruses. *J Infect Dis* 170, 1096-1099.
- Mathai, D., Jones, R.N., Pfaller, M.A., 2001, Epidemiology and frequency of resistance among pathogens causing urinary tract infections in 1,510 hospitalized patients: a report from the SENTRY Antimicrobial Surveillance Program (North America). *Diagn Microbiol Infect Dis* 40, 129-136.
- McDermott, P.F., Ciacci-Woolwine, F., Snipes, J.A., Mizel, S.B., 2000, High-affinity interaction between gram-negative flagellin and a cell surface

- polypeptide results in human monocyte activation. *Infect Immun* 68, 5525-5529.
- Means, T.K., Hayashi, F., Smith, K.D., Aderem, A., Luster, A.D., 2003, The Toll-like receptor 5 stimulus bacterial flagellin induces maturation and chemokine production in human dendritic cells. *J Immunol* 170, 5165-5175.
- Medzhitov, R., 2007, Recognition of microorganisms and activation of the immune response. *Nature* 449, 819-826.
- Medzhitov, R., Janeway, C.A., Jr., 1997, Innate immunity: impact on the adaptive immune response. *Curr Opin Immunol* 9, 4-9.
- Miao, E.A., Andersen-Nissen, E., Warren, S.E., Aderem, A., 2007, TLR5 and Ipaf: dual sensors of bacterial flagellin in the innate immune system. *Semin Immunopathol* 29, 275-288.
- Mizel, S.B., Bates, J.T., 2010, Flagellin as an adjuvant: cellular mechanisms and potential. *J Immunol* 185, 5677-5682.
- 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.T., 1997, Vaccines against *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* urinary infections., In: Inc., M.D. (Ed.) *New generation Vaccines*. M. M. Levine, G. C. Woodrow, J. C. Kaper, G. S. Cobon, New York, pp. 931-944.
- Muñoz, N., Van Maele, L., Marques, J.M., Rial, A., Sirard, J.C., Chabalgoity, J.A., 2010, Mucosal administration of flagellin protects mice from *Streptococcus pneumoniae* lung infection. *Infect Immun* 78, 4226-4233.
- Murthy, K.G., Deb, A., Goonesekera, S., Szabo, C., Salzman, A.L., 2004, Identification of conserved domains in *Salmonella muenchen* flagellin that are essential for its ability to activate TLR5 and to induce an inflammatory response in vitro. *J Biol Chem* 279, 5667-5675.
- Mysorekar, I.U., Hultgren, S.J., 2006, Mechanisms of uropathogenic *Escherichia coli* persistence and eradication from the urinary tract. *Proc Natl Acad Sci U S A* 103, 14170-14175.



- Nempont, C., Cayet, D., Rumbo, M., Bompard, C., Villeret, V., Sirard, J.C., 2008, Deletion of flagellin's hypervariable region abrogates antibody-mediated neutralization and systemic activation of TLR5-dependent immunity. *J Immunol* 181, 2036-2043.
- Nicolle, L.E., 2001, A practical guide to antimicrobial management of complicated urinary tract infection. *Drugs Aging* 18, 243-254.
- Nicolle, L.E., 2005, Catheter-related urinary tract infection. *Drugs Aging* 22, 627-639.
- Nielubowicz, G.R., Mobley, H.L., 2010, Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nat Rev Urol* 7, 430-441.
- Pearson, M.M., Sebahia, M., Churcher, C., Quail, M.A., Seshasayee, A.S., Luscombe, N.M., Abdellah, Z., Arrosmith, C., Atkin, B., Chillingworth, T., Hauser, H., Jagels, K., Moule, S., Mungall, K., Norbertczak, H., Rabbino-witsch, E., Walker, D., Whithead, S., Thomson, N.R., Rather, P.N., Parkhill, J., Mobley, H.L., 2008, Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *J Bacteriol* 190, 4027-4037.
- Penner, J.L., 1984, *Proteus* sp., In: Krieg, N.R. (Ed.) *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* Williams and Wilkins, Baltimore, pp. 491-494.
- Pfaller, M.A., Mujeeb, I., Hollis, R.J., Jones, R.N., Doern, G.V., 2000, Evaluation of the discriminatory powers of the Dienes test and ribotyping as typing methods for *Proteus mirabilis*. *J Clin Microbiol* 38, 1077-1080.
- Piccini, C.D., Barbe, F.M., Legnani-Fajardo, C.L., 1998, Identification of iron-regulated outer membrane proteins in uropathogenic *Proteus mirabilis* and its relationship with heme uptake. *FEMS Microbiol Lett* 166, 243-248.
- Ragnarsdottir, B., Fischer, H., Godaly, G., Gronberg-Hernandez, J., Gustafsson, M., Karpman, D., Lundstedt, A.C., Lutay, N., Ramisch, 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. *Eur J Clin Invest* 38 Suppl 2, 12-20.

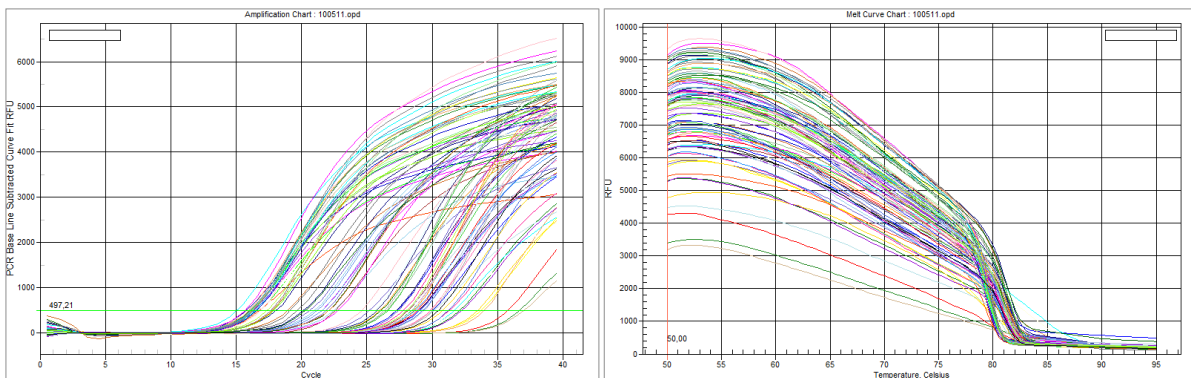
- Reid, G., Sobel, J.D., 1987, Bacterial adherence in the pathogenesis of urinary tract infection: a review. *Rev Infect Dis* 9, 470-487.
- Romanin, D., Serradell, M., Gonzalez Maciel, D., Lausada, N., Garrote, G.L., Rumbo, M., 2010, Down-regulation of intestinal epithelial innate response by probiotic yeasts isolated from kefir. *Int J Food Microbiol* 140, 102-108.
- Ronald, A., 2003, The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Dis Mon* 49, 71-82.
- Rosser, C.J., Bare, R.L., Meredith, J.W., 1999, Urinary tract infections in the critically ill patient with a urinary catheter. *Am J Surg* 177, 287-290.
- Rozalski, A., Sidorczyk, Z., Kotelko, K., 1997, Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiol Mol Biol Rev* 61, 65-89.
- Rubin, R.H., Shapiro, E.D., Andriole, V.T., Davis, R.J., Stamm, W.E., 1992, Evaluation of new anti-infective drugs for the treatment of urinary tract infection. Infectious Diseases Society of America and the Food and Drug Administration. *Clin Infect Dis* 15 Suppl 1, S216-227.
- Rumbo, M., Anderle, P., Didierlaurent, A., Sierro, F., Debard, N., Sirard, J.C., Finke, D., Kraehenbuhl, J.P., 2004, How the gut links innate and adaptive immunity. *Ann N Y Acad Sci* 1029, 16-21.
- Saban, M.R., Saban, R., Hammond, T.G., Haak-Frendscho, M., Steinberg, H., Tengowski, M.W., Bjorling, D.E., 2002, LPS-sensory peptide communication in experimental cystitis. *Am J Physiol Renal Physiol* 282, F202-210.
- Sambrook, J.F., E.F.; Maniatis, T., 1989, *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Press, Cold Spring, New York.
- Scavone, P., 2009- Tesis de Doctorado PEDECIBA, en marcha. Papel de la fimbrias MR/P y flagelos de *Proteus mirabilis* en la colonización del tracto urinario. Tesis de Doctorado. Universidad de la República, Montevideo.
- Sha, Q., Truong-Tran, A.Q., Plitt, J.R., Beck, L.A., Schleimer, R.P., 2004, Activation of airway epithelial cells by toll-like receptor agonists. *Am J Respir Cell Mol Biol* 31, 358-364.

- Sierro, F., Dubois, B., Coste, A., Kaiserlian, D., Kraehenbuhl, J.P., Sirard, J.C., 2001, Flagellin stimulation of intestinal epithelial cells triggers CCL20-mediated migration of dendritic cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 13722-13727.
- Simon, R., Samuel, C.E., 2007, Activation of NF-kappaB-dependent gene expression by Salmonella flagellins FliC and FliB. *Biochem Biophys Res Commun* 355, 280-285.
- Sivick, K.E., Mobley, H.L., 2010, Waging war against uropathogenic Escherichia coli: winning back the urinary tract. *Infect Immun* 78, 568-585.
- Skirrow, M.B., 1969, The dienes (mutual inhibition) test in the investigation of proteus infections. *J Med Microbiol* 2, 471-477.
- Smith, K.D., Andersen-Nissen, E., Hayashi, F., Strobe, K., Bergman, M.A., Barrett, S.L., Cookson, B.T., Aderem, A., 2003, Toll-like receptor 5 recognizes a conserved site on flagellin required for protofilament formation and bacterial motility. *Nat Immunol* 4, 1247-1253.
- Smith, T.J., Yamamoto, K., Kurata, M., Yukimori, A., Suzuki, S., Umeda, S., Sugawara, E., Kojima, Y., Sawabe, M., Nakagawa, Y., Suzuki, K., Crawley, J.T., Kitagawa, M., 2010, Differential expression of Toll-like receptors in follicular lymphoma, diffuse large B-cell lymphoma and peripheral T-cell lymphoma. *Exp Mol Pathol* 89, 284-290.
- Sobbel, J.D.K., D., 2000, Urinary tract infections, In: Mandell, G.L.B., J.E.; Dolin, E. (Ed.) *Mandell, Douglas and Bennett's Principles and Practice of infectious Diseases*. Churchill Livingstone, Philadelphia, pp. 773-805.
- Song, J., Abraham, S.N., 2008, Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. *Eur J Clin Invest* 38 Suppl 2, 21-28.
- Tolson, D.L., Harrison, B.A., Latta, R.K., Lee, K.K., Altman, E., 1997, The expression of nonagglutinating fimbriae and its role in Proteus mirabilis adherence to epithelial cells. *Can J Microbiol* 43, 709-717.
- Vijay-Kumar, M., Wu, H., Jones, R., Grant, G., Babbitt, 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.

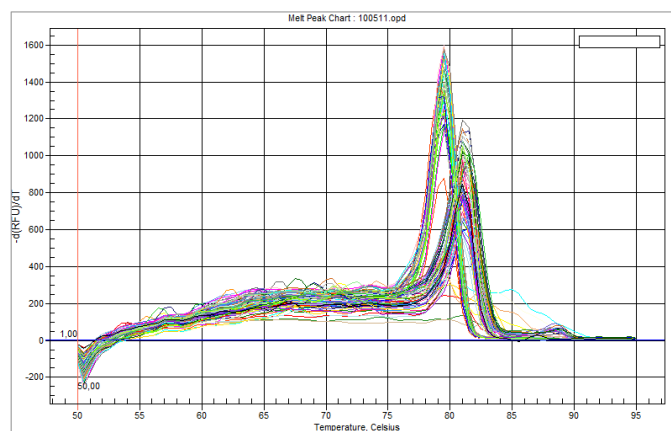
- 
- Warren, J.W., 1996, Urethral catheters, condom catheters, and nosocomial urinary tract infections. *Infect Control Hosp Epidemiol* 17, 212-214.
- Weimer, E.T., Ervin, S.E., Wozniak, D.J., Mizel, S.B., 2009, Immunization of young African green monkeys with OprF epitope 8-OprI-type A- and B-flagellin fusion proteins promotes the production of protective antibodies against nonmucoid *Pseudomonas aeruginosa*. *Vaccine* 27, 6762-6769.
- 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.

**ANEXO I**

Curvas de amplificación y curvas de disociación de genes involucrados en la inmunidad innata en cultivos de células humanas T24 obtenidas con el método de PCR en tiempo real con el termociclador MyiQ Single Color Real-time PCR Detection System (BioRad, USA).



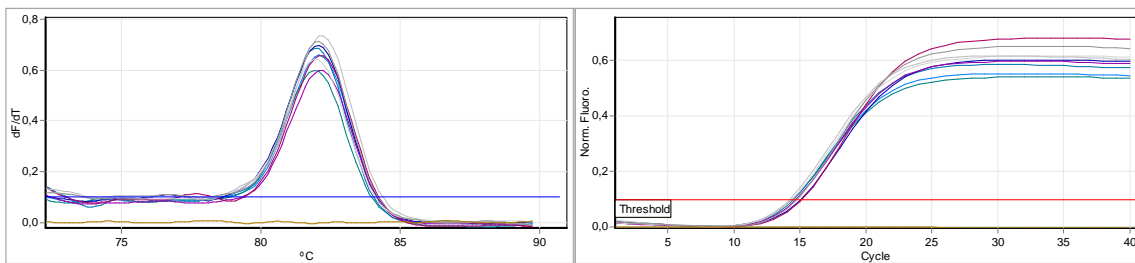
Curvas de amplificación



Curvas de disociación

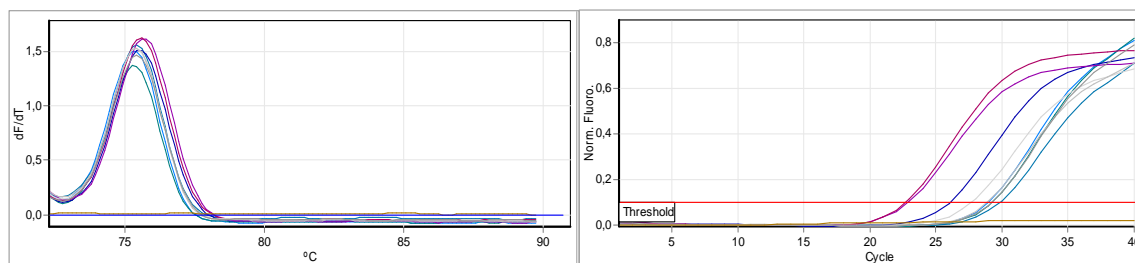
**ANEXO II**

Curvas de amplificación y curvas de disociación de los genes de la  $\beta$ -Actina, IL-6, CXCL10, CXCL1, IFN- $\gamma$  y CCL20 murinos obtenidas con la técnica de amplificados PCR en tiempo real con el equipo Rotor-Gene 6000 (Corbett Life Science).

 **$\beta$ -actina**

Curva de disociación

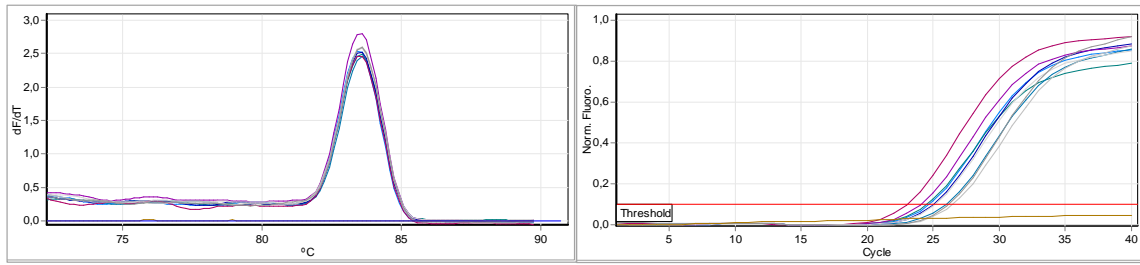
Curva de amplificación

**IL-6**

Curva de disociación

Curva de amplificación

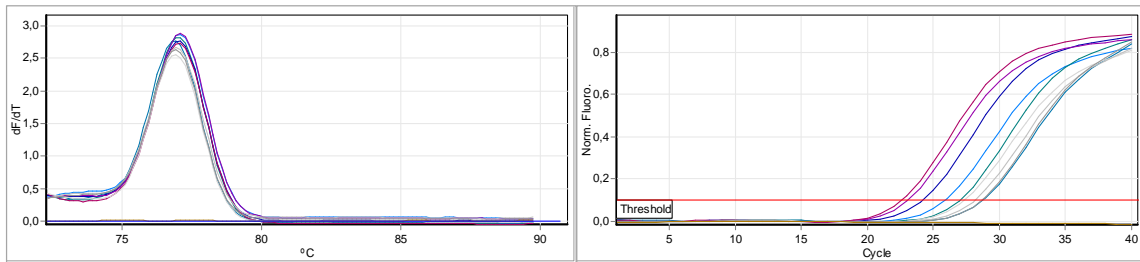
CXCL10



Curva de disociación

Curva de amplificación

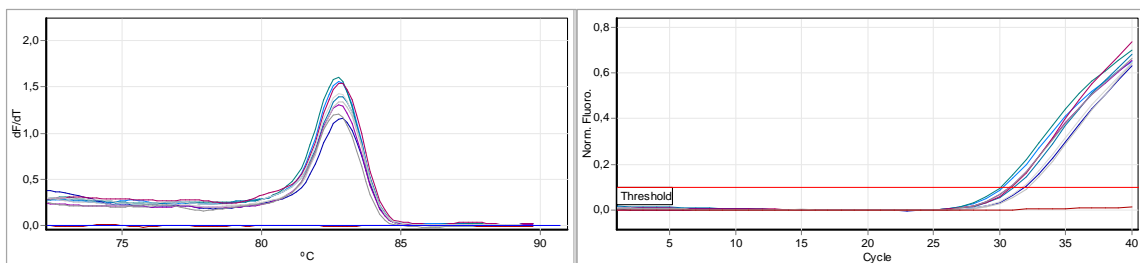
CXCL1



Curva de disociación

Curva de amplificación

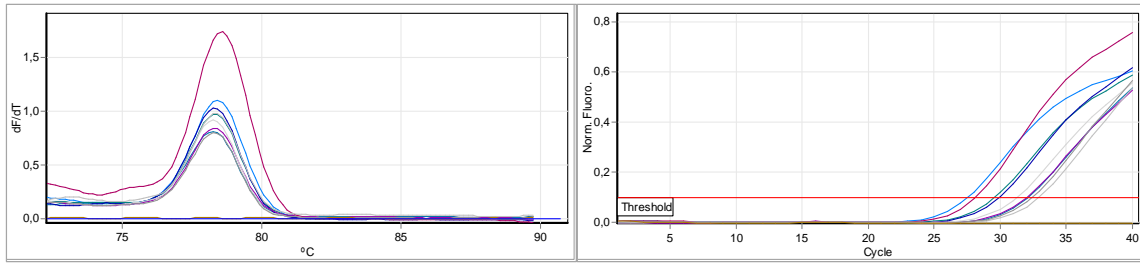
IFN-g



Curva de disociación

Curva de amplificación

CCL20



Curva de disociación

Curva de amplificación