



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA METROPOLITANA

UNIDAD XOCHIMILCO

DIVISIÓN DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Y DE LA SALUD
DEPARTAMENTO DE SISTEMAS BIOLÓGICOS

MAESTRÍA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

LÍNEA DE INVESTIGACIÓN:

ESTRATEGIAS BIOLÓGICAS EN EL ÁREA FARMACÉUTICA
(EBAF)

**EVALUACIÓN DE CITOCINAS PROINFLAMATORIAS EN EL
MODELO MURINO DE INFECCIÓN POR BACTERIAS
UROPATÓGENAS**

IDÓNEA COMUNICACIÓN DE RESULTADOS PARA OBTENER EL
GRADO DE MAESTRA EN CIENCIAS FARMACÉUTICAS

PRESENTA

Melendez Avalos Araceli

Matrícula: 2162800144

Comité Tutorial:

Co-Tutora: Dra. María Elisa Drago Serrano

Co-Tutor: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Asesora: M. en C. Alejandro Palma Ramos

Junio, 2019

VISTO BUENO (Vo. Bo.) DEL COMITÉ TUTORAL

Co-Tutora: Dra. María Elisa Drago Serrano _____

Co-Tutor: Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez _____

Asesora: M. en C. Alejandro Palma Ramos _____

Alumna: Q.F.B. Araceli Melendez Avalos _____

Matrícula: 2162800144

JURADO DEL EXAMEN DE GRADO

Presidente: Dra. Marycarmen Godínez Victoria _____

Vocal: Dra. Raquel González Vázquez _____

Secretario: Dra. María Elisa Drago Serrano _____

RESUMEN

Este estudio, evalúa por primera vez en un modelo murino, la expresión génica de citocinas proinflamatorias a nivel de tracto urinario por la infección causada por las cepas *Escherichia coli* (*E. coli*) enteroagregativa EAEC 042, *Proteus mirabilis* RTX339, y *Proteus mirabilis* ATCC29906. Se utilizaron 4 grupos de 4 ratones BALB/c hembras, los cuales fueron infectados por vía intrauretral con un inoculo de 5×10^7 Unidades Formadoras de Colonia UFC/mL de cada una de las cepas antes mencionadas. A un grupo control sin infectar se le administró 50 μ L de amortiguador fosfato salino (PBS) pH7.4.

Se obtuvieron muestras de orina, vejiga y riñones a los 2, 4, 7 y 10 días post-infección (p.i.) para el conteo de UFC. Las muestras de la vejiga y el riñón se utilizaron para determinar la expresión génica de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-8, IL-6) mediante PCR en tiempo real (qPCR); la determinación tisular de estas citocinas se realizó mediante inmunohistoquímica solamente a los 7 días de p.i. Los datos se expresaron en unidades relativas al gen de actina utilizado como control. Las diferencias entre los datos de los diferentes grupos fueron analizadas con ANOVA de una sola vía, seguida de una prueba de Tukey. Se consideró que había diferencias significativas cuando la p fue menor a 0.05 ($p < 0.05$).

Los resultados fueron los siguientes: *P. mirabilis* RTX339 y *E. coli* 042 causaron una mayor infección en vejiga y riñón al día 7 de infección ($p = 0.0001$). En vejiga, la infección con *P. mirabilis* RTX339 indujo la mayor expresión génica de TNF- α , IL-8 e IL-6. En riñón, la infección con *E. coli* 042 indujo la mayor expresión génica de IL-8 e IL-6. En vejiga y riñón, la infección con *P. mirabilis* ATCC29906 indujo la mayor expresión génica de IL-1 β . En los ratones infectados con *P. mirabilis* RTX339 se observó mayor presencia de IL-8 en riñón y vejiga, y de IL-6 en riñón, en comparación con los ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906 y *E. coli* 042, y con el grupo control. En conclusión, la expresión génica de citocinas proinflamatorias varió de acuerdo con la cepa uropatógena, a los órganos infectados y a los días post-infección.

ABSTRACT

This study is the first evaluation of gene expression of proinflammatory cytokines at the level of the urinary tract in a murine model of Urinary Tract Infection (UTI) caused by strains enteroaggregative *Escherichia coli* (042), *Proteus. mirabilis* RTX339 and *Proteus. mirabilis* ATCC29906. Four groups of 4 female BALB/c mice were used; three of them were infected intraurethrally with an inoculum of 5×10^7 Colony Forming Units CFU/mL of each strain: the control group was uninfected, which received only of Buffer fosfato salino PBS at pH7.4.

Urine, bladder and kidneys samples were obtained at 2, 4, 7 and 10 days post-infection (p.i) in orden to count CFU. Samples of bladder and kidney were used to determine the gene expression of proinflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-8, and IL-6) by real-time PCR (qPCR). The tissue expression of these cytokines was determined by immunohistochemistry (only at 7 days of p.i). The data were expressed as relative units compared with the β - *Actin* control gene. The data from the different groups were compared by one-way ANOVA, followed of a Tukey test. Significant differences were assumed with values of $p < 0.05$.

At the 7 day of infection *P. mirabilis* RTX339 and *E. coli* 042 caused a greater infection in bladder and kidney compared to *P. mirabilis* ATCC29906- In bladder: the infection with *P. mirabilis* RTX339 induced the highest gene expression of TNF- α , IL-8 and IL-6. In kidney the infection with *E. coli* 042 caused the highest gene expression of IL-8 and IL-6. In bladder and kidney the infection with *P. mirabilis* ATCC29906 caused the highest gene expression of IL-1 β . The animals infected with *P. mirabilis* RTX339 was observed greater presence of IL-8 in kidney and bladder, and of IL-6 in kidney compared to *P. mirabilis* ATCC29906 and *E. coli* 042 and the control group. Thus, the gene expression of proinflammatory cytokines in kidney and bladder was different according to the uropathogenic strain, infected organs and to the different days post-infection.

AGRADECIMIENTOS INSTITUCIONALES

Quiero agradecer al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico (beca No.600558) para la realización de este proyecto, así como al Bioterio de la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UPEAL)

Agradezco el apoyo de los siguientes investigadores de los laboratorios que trabajan en los laboratorios ubicados en la UAM-X:

Microbiología Molecular: Dra. María Elisa Drago Serrano y Dra. Teresita del Rosario Sainz Espuñes

Inmunología: M. en C. Alejandro Palma Ramos y Dr. Jorge Ismael Castañeda Sánchez

Histopatología: Dr. Osvaldo López Díaz

Biología Experimental: M. en C. Cristina Fresán, Dra. Ana Laura Esquivel Campos, Dra. Julia Pérez Ramos y M. en C. Felipe Mendoza Pérez

Biotecnología: Dr. Lino Mayorga Reyes, Dr. Alejandro Azaola Espinosa, Dra. Raquel González Vázquez

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mis padres: por haberme dado la vida, por educarme con los mejores valores y principios que me han permitido salir adelante. Ustedes son mi mayor ejemplo por seguir, pues me han enseñado que todo lo que uno se propone se puede lograr con esfuerzo y dedicación. Los amo mucho.

A mis Hermanos: ustedes son mi segundo ejemplo por seguir Raúl, por enseñarme que tenemos que vencer los miedos y adquirir conocimientos día con día y no ser conformistas. Ericka, por demostrarme que los objetivos y metas se pueden cumplir sin importar el tiempo que pueda transcurrir. A los dos los admiro y quiero mucho.

Vío: gracias por traernos al mundo a un nuevo integrante de familia, mi Mauricio un angelito hermoso que cada que me sentía vencida me daba fuerzas para seguir.

Mis amigas y amigos: Horte, Karina Blanquita y Lupita, por todo el apoyo brindado tanto profesionalmente como emocionalmente. Maxi, gracias por echarme porras todo el tiempo. Daniel, mil gracias por darme siempre consejos y estar conmigo en las buenas y en las malas.

A la doctora Teresita Sainz por brindarme la confianza de trabajar sus cepas.

Al Doctor Alejandro Azaola y Lino Mayorga por darme ánimos para continuar con la maestría.

A las nuevas personas que dios cruzo en mi camino: Dr. Heriberto, Dr. Héctor, Dr. Miguel, Dr. Orlando, Dra. Gaby, por compartirme su conocimiento. Daniel, Rene, Rosy, Mary, Aldo, Eduardo, Mario Rivera, Abel, Erik Luna, Salathiel Salinas, Señor Eduardo Melo, Manuel, Señora Blanquita, Señor Juan, Señora Isabel, muchas gracias por toda la ayuda brindada.

También quiero agradecer profundamente a la Dra. María Elisa Drago Serrano; por ser mi sostén, por brindarme su tiempo y conocimiento. A la Dra. Raquel por el tiempo dedicado y por compartir conmigo sus enseñanzas. A las dos mi más grande respeto y admiración.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	13
2. ANTECEDENTES DIRECTOS	15
3. MARCO TEÓRICO	17
3.1. Infecciones del tracto urinario (ITUs)	17
3.2. Clasificación de las ITUs	17
3.3. Bacterias que causan ITUs	19
3.4. ITUs y respuesta inmune	22
3.4.1. Respuesta inmune de la vejiga ante las ITUs	23
3.4.2. Respuesta inmune del riñón ante las ITUs	24
3.5. Señalización de citocinas proinflamatorias en las ITUs	25
3.5.1. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF-α)	27
3.5.2. Interleucina 1β (IL-1β)	28
3.5.3. Interleucina 8 (IL-8)	28
3.5.4. Interleucina 6 (IL-6)	29
3.6. Diagnóstico y Tratamiento farmacológico para ITUs	30
3.6.1. Probióticos	31
3.6.2. Estrógenos	31
3.6.3. Arándanos	31
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	32
5. HIPÓTESIS	33
6. OBJETIVOS	34
6.1. General	34
6.2. Particulares	34
7. MATERIAL Y MÉTODOS	35
7.1. Pruebas bioquímicas	35
7.2. Animales de experimentación	35
7.3. Preparación de dosis infectiva	35
7.4. Infección urinaria en ratones BALB/c	36
7.5. Obtención de muestras (orina, vejiga y riñones)	37
7.6. Conteo de unidades formadoras de colonias (UFC)	37
7.7. Extracción de ARN total	37
7.8. Retrotranscripción de ARNm a ADNc	38

7.9.	Expresión génica de citocinas proinflamatorias por qPCR	38
7.10.	Obtención de cortes histológicos	40
7.10.1.	Procedimiento para inmunohistoquímica	40
7.10.2.	Procedimiento para tención con hematoxilina-eosina	42
7.11.	Análisis estadístico	43
8.	RESULTADOS	44
8.1.	Pruebas bioquímicas	44
8.2.	Unidades Formadoras de Colonias	44
8.3.	Extracción de ARNm y síntesis de ADNc	46
8.4.	Niveles de expresión de citocinas proinflamatorias	46
8.4.1.	TNF- α	47
8.4.2.	IL-1 β	48
8.4.3.	IL-8	50
8.4.4.	IL-6	52
8.5.	Determinación tisular de citocinas proinflamatorias	54
8.5.1.	TNF- α	55
8.5.2.	IL-1 β	55
8.5.3.	IL-8	56
8.5.4.	IL-6	57
8.6.	Tinción con hematoxilina-eosina	58
9.	DISCUSIÓN	60
10.	CONCLUSIÓN	63
11.	PERSPECTIVAS	64
12.	REFERENCIAS	65
	ANEXOS	71
	Anexo 1. Carta de aceptación del bioterio	71
	Anexo2. Cartas de participación de eventos científicos	72
	Anexo 3. Artículo	73

Índice de Tablas

Tabla 1. Clasificación ORENUC basada en la presentación clínica de infección del tracto urinario (ITU) y factores de riesgo (FR)	18
Tabla 2. Clasificación de ITU por sintomatología y localización de la infección	19
Tabla 3. Factores de virulencia de <i>E. coli</i> (EAEC) y <i>P. mirabilis</i>	20
Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos de citocinas proinflamatorias	39
Tabla 5. Condiciones de reacción de PCR en tiempo real	39
Tabla 6. Solventes utilizados en histoquimete	40
Tabla 7. Técnica para desparafinar	40
Tabla 8. Procedimiento de tinción con hematoxilina-eosina	42
Tabla 9. Resultados de pruebas bioquímicas	44
Tabla 10. Presencia de citocinas proinflamatorias en tejidos de vejiga y riñón por inmunohistoquímica.	54

Índice de Figuras

Figura 1. Patogénesis de las infecciones del tracto urinario	21
Figura 2. Respuesta inmune de la vejiga.	24
Figura 3. Activación de TLR y señalización de citocinas proinflamatorias	26
Figura 4. Unidades Formadoras de Colonias (UFC)	45
Figura 5. Expresión relativa de TNF- α ARNm	47
Figura 6. Expresión relativa de IL-1 β ARNm	49
Figura 7. Expresión relativa de IL-8 ARNm	51
Figura 8. Expresión relativa de IL-6 ARNm	53
Figura 9. Corte histológico con preparación inmunohistoquímica para reacción positiva de TNF- α	55
Figura 10. Corte histológico con preparación inmunohistoquímica para reacción positiva de IL-1 β	56
Figura 11. Corte histológico con preparación inmunohistoquímica para reacción positiva de IL-8	57
Figura 12. Corte histológico con preparación inmunohistoquímica para reacción positiva de IL-6	58
Figura 13. Corte histológico con tinción de hematoxilina-eosina	59

1. INTRODUCCIÓN

Las infecciones del tracto urinario (ITUs) abarcan cualquier infección que involucre el tracto urinario (uretra, vejiga, ureteros, riñones) (**Chee y Maciej, 2016**). Las ITUs se clasifican en complicadas y no complicadas (**Ronald, 2003**), y también, dependiendo del sitio de infección, en uretritis (uretra), cistitis (vejiga), pielonefritis (riñón) y prostatitis (próstata) (**Vitaly Smelov y cols., 2016**). Las ITUs afectan a toda la población, pero principalmente a mujeres (**Ahmed y Ghadeer., 2013**). La incidencia de infecciones urinarias ha aumentado más del 50%; debido a que son infecciones de tipo recurrente, son una de las principales causas de consultas médicas en adultos en México (**Reyes-López y Blandón-Vijil, 2016**). Además, las bacterias que causan las ITUs adquieren alta resistencia antimicrobiana, lo que limita los tratamientos para los pacientes (**Abbo y Hooton, 2016**).

Las ITUs son causadas principalmente por las especies *Escherichia* (*E. coli*) uropatógena (UPEC) y *Proteus* (*P. mirabilis*), ambas especies resistentes a antibióticos (**Sheerin, 2011**). Sin embargo, algunos estudios han demostrado que el prototipo *E. coli* enteroagregativa (EAEC), causante de diarreas, también es capaz de causar ITUs (**Boll y cols., 2013; Herzog y cols., 2014**), debido, a que estas bacterias expresan genes que codifican factores de virulencia, como: fimbrias, flagelos y toxinas, los cuales les ayudan a colonizar e infectar de manera ascendente (**Huang y cols., 2006; Baldo y cols., 2014**). Los factores de virulencia son reconocidos por receptores tipo toll (TLR) presentes en las membranas de macrófagos; este reconocimiento produce una cascada de señalización que desencadena la producción de citocinas proinflamatorias como TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 (**Song y Abraham, 2008**).

Varios estudios en ratones han demostrado que las ITUs causadas por *P. mirabilis* elevan los niveles de citocinas proinflamatorias en orina, vejiga y riñones (**Armbruster y cols., 2017; Fusco y cols., 2017**). Sin embargo, los niveles de estas citocinas en pacientes con ITUs producidas por *E.coli* EAEC solamente han sido evaluados en líneas celulares de colón (**Steiner y cols., 1998; Harrington y cols., 2005; Boll y cols., 2013; Rocha-Ramírez y cols., 2016**). Debido a su relevancia,

en este trabajo se estudiaron los niveles de citocinas proinflamatorias a nivel del tracto urinario en un modelo murino de infección por bacterias uropatógenas como *E. coli* 042, *P. mirabilis* ATCC29906 y *P. mirabilis* RTX339 (cepa aislada de un paciente con ITU complicada, ya identificada y caracterizada) (**Gutiérrez y cols., 2012**).

2. ANTECEDENTES DIRECTOS

Los agentes etiológicos más comunes responsables de causar infecciones no complicadas del tracto urinario son *E. coli* UPEC y *P. mirabilis*; esta última afecta sobre todo a personas con catéteres o con alguna malformación en el tracto urinario (Sheerin, 2011; Jacobsen y Shirtliff, 20011). Existen estudios que han demostrado la participación del prototipo, *E. coli* EAEC, normalmente causante de diarreas, en infecciones urinarias. En el 2013, Boll y colaboradores, determinaron las propiedades uropatógenas de la cepa EAEC O78: H10 causante de un brote de ITU's en Copenhague, Dinamarca. Los investigadores infectaron células de vejiga (5637) y colon (T84) de ratones hembra OF-1 con las cepas uropatógenas de *E. coli* CETC736 y J96, y con cepas de EAEC enteroagregativa O78: H10 y 042. Ellos demostrando, a través de la expresión de fimbrias de adherencia agregada, las principales adhesinas de EAEC, que la cepa O78: H10 tenía una mayor capacidad de adherencia a las células epiteliales de la vejiga que las cepas uropatógenas (Boll y cols., 2013). En el 2014, Herzog y colaboradores destacaron el potencial de cepas de EAEC (EAEC-30-I y EAEC-30-II) para causar infecciones extraintestinales como las ITUs; estas cepas fueron aisladas de muestras de heces y orina en una mujer de 55 años inmunocomprometida que había recibido un trasplante de riñón. Los investigadores determinaron que ambas cepas expresaban genes para fimbrias y sugirieron que los factores de virulencia específicos de EAEC aumentan la uropatogenicidad (Herzog y cols., 2014).

Las infecciones con cepas de EAEC desencadenan una respuesta inflamatoria; se ha comprobado en células de colon (T84 y HT29-C1) infectadas con *E.coli* EAEC 042 aumenta la expresión génica de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Harrington y cols., 2005). Armbruster y colaboradores, reportaron un aumento de las mismas citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-8) en orina de ratones CBA/J infectados con cepas de *P. mirabilis* y *Providencia stuartii* ambas bacterias uropatógenas (Armbruster y cols., 2017). En el 2012, Gutiérrez y colaboradores aislaron e identificaron una cepa de *P. mirabilis* (RTX339) en un paciente de un hospital psiquiátrico que padecía de ITU complicada (Gutierrez y

cols., 2012). No obstante, faltan estudios que demuestren la relación de *P. mirabilis* RTX339 y de otras cepas de *P. mirabilis* y *E. coli* con la expresión de citocinas proinflamatorias a nivel del tracto urinario.

3. MARCO TEÓRICO

3.1. Infecciones del tracto urinario (ITUs)

Las Infecciones del Tracto Urinario (ITUs) es un término colectivo que describe cualquier infección que involucre cualquier parte del tracto urinario, a saber, los riñones, los uréteros, la vejiga y la uretra. El tracto urinario se puede dividir en el tracto superior (riñones y uréteros) y el tracto inferior (vejiga y uretra) (**Chee y Maciej, 2016**). Las ITUs representan un serio problema de salud pública en México, con una morbilidad significativa y una tasa de mortalidad asociada importante, que sin embargo podría disminuir significativamente con un manejo estandarizado adecuado, pues la mayoría de los decesos son producidos por complicaciones. En México, el Sistema Nacional de Vigilancia Epidemiológica reportó que en 2010 las ITUs ocuparon el tercer sitio dentro de las principales causas de morbilidad. En 2010, se reportaron 1, 204,032 casos en adultos de 25 a 44 años de edad, con una tasa de incidencia de 3000 por cada 100,000 habitantes. En mayores de 60 años, la tasa de incidencia fue de 6000 por cada 100,000 habitantes, con predominio en el sexo masculino (**Calderón y cols., 2013**).

Las ITUs ocurren con mayor frecuencia en mujeres que en hombres, en una proporción de 8:1. Aproximadamente 50-60% de las mujeres reportan al menos una ITU en su vida, y el 80% presenta ITUs recurrentes. Una de cada tres mujeres de 24 años de edad habrá tenido al menos una ITU sintomática que necesite tratamiento con antibióticos (**Ahmed y Ghadeer, 2013**).

3.2. Clasificación de las ITUs

De acuerdo con las directrices de la Asociación Europea de Urología (EAU por sus siglas en inglés), la bacteriuria se refiere a la cantidad de las bacterias de multiplicarse en grandes cantidades en la orina. Cantidades por encima de 10^4 UFC por mL son consideradas una ITU (**Vitaly y cols., 2016**). Las ITUs fueron clasificadas inicialmente como complicadas (infecciones asociadas con afecciones, como anomalías estructurales o funcionales del tracto genitourinario, o con la

presencia de enfermedades subyacentes) y no complicadas (tracto urinario normal) (Ronald, 2003). En adultos las ITUs no complicadas se clasifican en las categorías O, R y, parcialmente, E, mientras que las ITU complicadas se clasifican principalmente en las categorías N, U y C (Tabla 1) (Chee y Maciej, 2016). La Sección Europea de Infección en Urología (ESIU), de la EAU, en colaboración con la Consulta Internacional sobre Enfermedades Urológicas (ICUD) y otras asociaciones, clasificaron a las ITUs de acuerdo con su sintomatología y el lugar de infección (Tabla 2) (Vitaly y cols., 2016).

Tabla 1. Clasificación ORENUC basada en la presentación clínica de infección del tracto urinario (ITU) y factores de riesgo (FR) (Tomado de Chee y Maciej, 2016).

Tipo	Categoría y factor de riesgo (FR)	Ejemplos de factores de riesgo
O	No se conoce el factor de riesgo	Mujeres premenopáusicas sanas
R	ITU recurrente con FR pero sin riesgo de resultado grave	-Comportamiento sexual y dispositivos anticonceptivos -Posmenopausia y deficiencia hormonal -Tipo secretor de ciertos grupos sanguíneos -Diabetes mellitus controlada
E	RF extra-urogenital con riesgo de un resultado más grave	-Prematuridad de recién nacido -Embarazo -Género masculino -Diabetes mellitus mal controlada -Inmunosupresión relevante (no bien definida)
N	Nefropatía con riesgo de resultado más grave	-Resistencia renal relevante (no bien definida) Nefropatía poliquística -Nefritis intersticial (e. g., debido a analgésicos)
U	RF urológica con riesgo de resultado más grave, que puede resolverse durante la terapia	-Obstrucción uretral (piedras, estenosis) -Catéter transitorio de corto plazo en el tracto urinario -Bacteriuria asintomática

			-Vejiga neurogénica controlada
			-Cirugía urológica
C	Catéter	urinario	-Tracto urinario a largo plazo
	permanente	y no	-Tratamiento de catéter
	resoluble.		-Obstrucción urinaria no
	RF urológica con riesgo		resoluble
	de un resultado más		-Vejiga neurógena mal
	grave		controlada

Tabla 2. Clasificación de ITUs por sintomatología y localización de la infección (Vitaly y cols., 2016).

Uretritis. Infección en la uretra
Cistitis. Infección en vejiga
Pielonefritis. Infección en riñón
Prostatitis. Infección en próstata

3.3. Bacterias que causan ITUs

La bacteria más común causante de ITUs en comunidades y hospitales es UPEC con 77-90% de los casos, mientras que *P. mirabilis*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Klebsiella pneumoniae* y *Pseudomonas aeruginosa* causan menos del 10% de los casos (Sheerin, 2011). UPEC es la especie que más ITUs causa, tanto complicadas como no complicadas (Ronald, 2003). *Proteus mirabilis* fue descrita por primera vez por Hauser en 1885 (O'Hara y cols., 2000); "Proteus" significa "variabilidad de la forma, que tiene el don de la transformación sin fin. *P. mirabilis* ha sido asociada con más frecuencia con ITUs complicadas, sobre todo en pacientes con catéteres permanentes o anomalías estructurales del tracto urinario (Schaffer y Pearson, 2015). Estudios recientes han demostrado que el prototipo de EAEC; también puede causar ITUs (Boll y cols., 2013; Herzog y cols., 2014). La cepa *E. coli* EAEC 042, fue aislada por primera vez en heces de niños que padecían de infecciones intestinales; ha sido ampliamente estudiada por su capacidad de adherirse a las células intestinales y causar inflamación (Okeke y Nataro, 2001). Todas las especies y prototipos antes mencionados son bacterias Gram (-); pertenecientes a la familia de las *Enterobacteriaceae* (O'Hara y cols., 2000;

Ronald, 2003). Estas bacterias expresan genes que codifican diversos factores de virulencia (Tabla 3); los cuales contribuyen a causar las ITUs (Kaper y cols., 2004; Huang y cols., 2006; Baldo y cols., 2014; Schaffer y Pearson, 2015).

Tabla 3. Factores de virulencia de *E. coli* y *P. mirabilis*

<i>E. coli</i>	<i>P. mirabilis</i>	Función	Referencia
Fimbrias: -AAF/I (<i>aggA</i>) -AAF/II (<i>aafA</i>) -AAF/III (<i>agg3</i>)	Fimbrias: -MR/P (<i>mrpA</i>) manosa resistente -ATF (<i>atf</i>) temperatura ambiente -MPF (<i>pmfA</i>)	Adherencia	Kaper y cols., 2004 Huang y cols., 2006 Baldo y cols., 2014 Schaffer y Pearson, 2015
-EAST1 (<i>astA</i>). Enterotoxina estable al calor tipo 1 -Pet (<i>pet</i>)-Proteína autotransportadora, enterotoxina y citotoxina	-Hemolisina (<i>hpmA</i> y <i>hpmB</i>) -Toxina aglutinina Pta (<i>pta</i>)	Citotoxicidad	Kaper y cols., 2004 Huang y cols., 2006 Baldo y cols., 2014 Schaffer y Pearson, 2015
Proteínas secretadas -Pic (<i>pic</i>) proteína serin-proteasa autotransportadora	Ureasa (<i>ureR</i>)	Proteólisis	Kaper y cols., 2004 Huang y cols., 2006 Baldo y cols., 2014 Schaffer y Pearson, 2015
Flagelo	Flagelo	Movilidad	Kaper y cols., 2004 Huang y cols., 2006 Baldo y cols., 2014 Schaffer y Pearson, 2015

La adhesión de las bacterias es un evento clave en la patogénesis de las ITU. La **Figura 1** muestra cómo las bacterias, junto con sus factores de virulencia, comienza la infección.

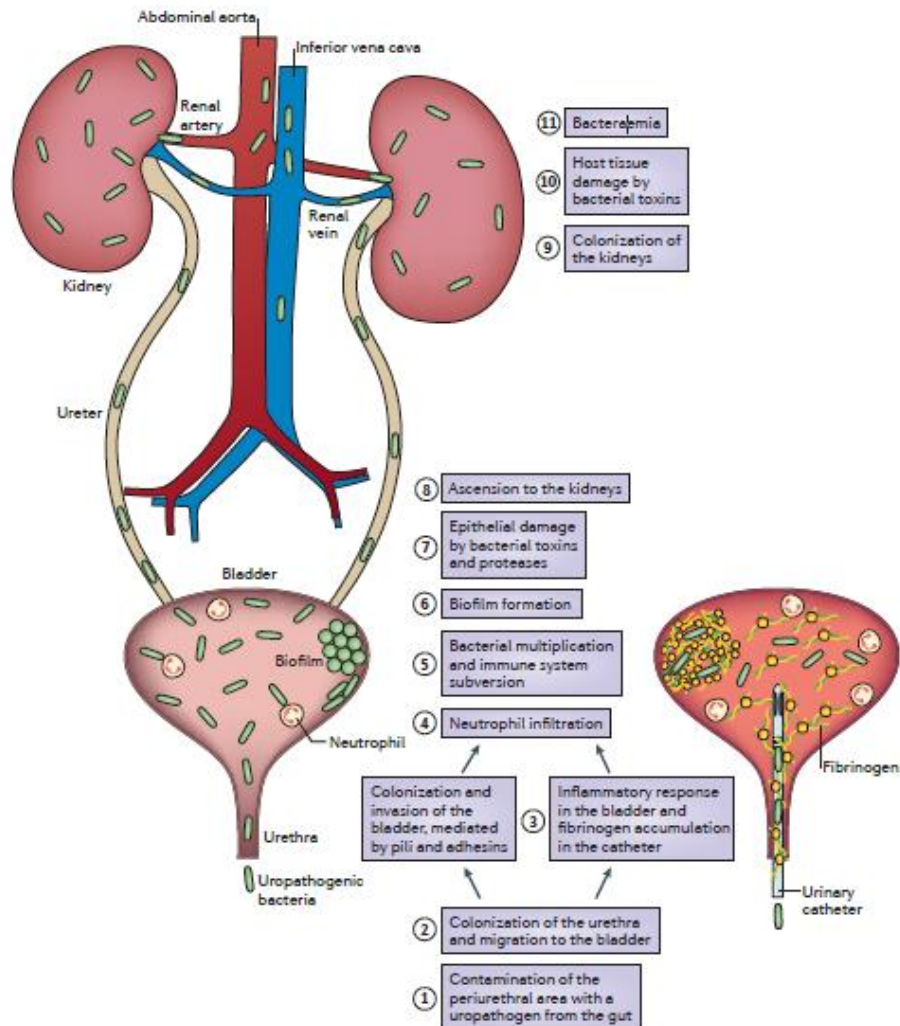


Figura 1. Patogénesis de las infecciones del tracto urinario (Tomado de Flores-Mireles y cols., 2015).

Las ITUs no complicadas comienzan cuando los uropatógenos que residen en el intestino contaminan el área periuretral y colonizan la uretra. La posterior migración a la vejiga y la expresión de pili y adhesinas da como resultado la colonización e invasión de las células. Las respuestas inflamatorias del huésped, incluida la infiltración de neutrófilos, comienzan a eliminar las bacterias. Algunas bacterias

evaden el sistema inmune, mediante la invasión de la célula huésped a través de cambios morfológicos que resultan en resistencia a los neutrófilos; estas bacterias se multiplican y forman biopelículas, además de que producen toxinas y proteasas que inducen el daño a la célula huésped, liberando nutrientes esenciales que promueven la supervivencia bacteriana y la ascensión a los riñones. La colonización renal da como resultado la producción de toxinas bacterianas y daño tisular en el riñón. Las bacterias que causan las ITUs complicadas siguen los mismos pasos iniciales que los descritos para las infecciones no complicadas, incluida la contaminación del área periuretral. Sin embargo, para que el patógeno pueda causar infección, la vejiga debe estar comprometida. La causa más común de una vejiga comprometida es el cateterismo. Debido a la respuesta inmune robusta inducida por el cateterismo, el fibrinógeno se acumula en el catéter, proporcionando un ambiente ideal para la fijación de uropatógenos que expresan proteínas de unión al fibrinógeno. Las bacterias se multiplican y forman biopelículas, lo cual promueve el daño epitelial y les permite infectar los riñones, causando daño tisular. Sin tratamiento los patógenos urinarios que causan las ITUs complicadas pueden progresar a bacteriemia cruzando la barrera de células epiteliales tubulares (**Flores-Mireles y cols., 2015**).

3.4. ITUs y respuesta inmune

La respuesta inmune innata altamente conservada proporciona defensa de primera línea contra microbios y conduce a la subsiguiente activación del sistema inmune adaptativo. La respuesta inmune innata no se basa en el reconocimiento de antígenos específicos y por lo tanto, es menos específica que el sistema inmune adaptativo. La inmunidad innata involucra una variedad de componentes que son activados o inducidos rápidamente, incluyendo barreras como las de las superficies epiteliales y las uniones estrechas intracelulares, sensores de microorganismos comensales y patógenos, células que liberan mediadores inflamatorios y citocinas, células fagocíticas, proteínas séricas relacionadas con la inflamación, y moléculas antimicrobianas. La respuesta inmune adaptativa, se desarrolla en un período de días y confiere inmunidad duradera (**Song y Abraham, 2008**). La mayor parte del

tracto urinario, que comprende los riñones, los uréteres, la vejiga y uretra, es considerado como estéril, con la excepción de la uretra (**Ingersoll y Albert, 2013**). Si las bacterias uropatógenas evaden el uroepitelio pueden establecer una infección severa y sintomática, caracterizada por una respuesta rápida innata del huésped, con secreción de citoquinas, reclutamiento de células inmunes al sitio de infección y eliminación exitosa de bacterias o bien enfermedad progresiva con destrucción tisular aguda (**Weichhart y cols., 2008**). Varios estudios han usado la tinción con hematoxilina-eosina para observar el daño tisular en cortes de vejiga y riñón (**Bahrani y cols., 1994; Schilling y cols., 2001; Roelofs y cols., 2006; Umpiérrez y cols., 2013**).

3.4.1. Respuesta inmune de la vejiga ante las ITUs

La vejiga normalmente se mantiene libre de infecciones debido en parte a la respuesta inmune no específica. La micción es un mecanismo de defensa; sin embargo, ciertas bacterias evaden ser expulsadas por la micción, mediante fortalecimiento de su adherencia a la superficie de la vejiga. Las fimbrias de las bacterias uropatógenas y enteroagregativas se unen a las células epiteliales de la vejiga (BEC) (**Boll y cols, 2013**). La respuesta inmunitaria innata de la vejiga se produce ante la infección con estas bacterias. Comienza con la encapsulación de las bacterias dentro de vesículas (RAB27b⁺). Los receptores tipo Toll- like 4 (TLR4) reconocen las bacterias intracelulares y elevan los niveles de adenosín monofosfato cíclico (AMPc). Esto conduce a la exocitosis de las vesículas y la expulsión de las bacterias. Existen bacterias que escapan a la primera expulsión rompiendo la vesícula (RAB27b⁺), estas bacterias son dirigidas a los lisosomas, los cuales pierden así su capacidad de degradación. Estos lisosomas funcionan mal por un canal de potencial receptor transitorio de mucolipina 3 (TRPML3), lo que desencadena la exocitosis de los lisosomas y la expulsión bacteriana. Una amplia gama de factores solubles también son secretados por BEC al detectarse la presencia de patógenos por TLR4 y posterior señalización, estos factores incluyen péptidos antimicrobianos (catelicidinas y β -defensinas), proteínas antimicrobianas (pentraxina 3) y quimiocinas. Otros mecanismos de defensa ante la infección son la

producción de caspasa 3 y la apoptosis dependiente de caspasa 8 de BEC infectadas que se vierten en el lumen de la vejiga para reducir la carga bacteriana. Al mismo tiempo ocurren respuestas celulares inmunes coordinadas en la vejiga; células inmunes como los mastocitos o las, células natural Killers (NK), pueden detectar la presencia de infecciones y secretan diversas citocinas para reclutar otras células inmunes innatas del torrente sanguíneo, especialmente neutrófilos para despejar las infecciones (**Figura 2**) (**Soman y Yuxuan, 2015**).

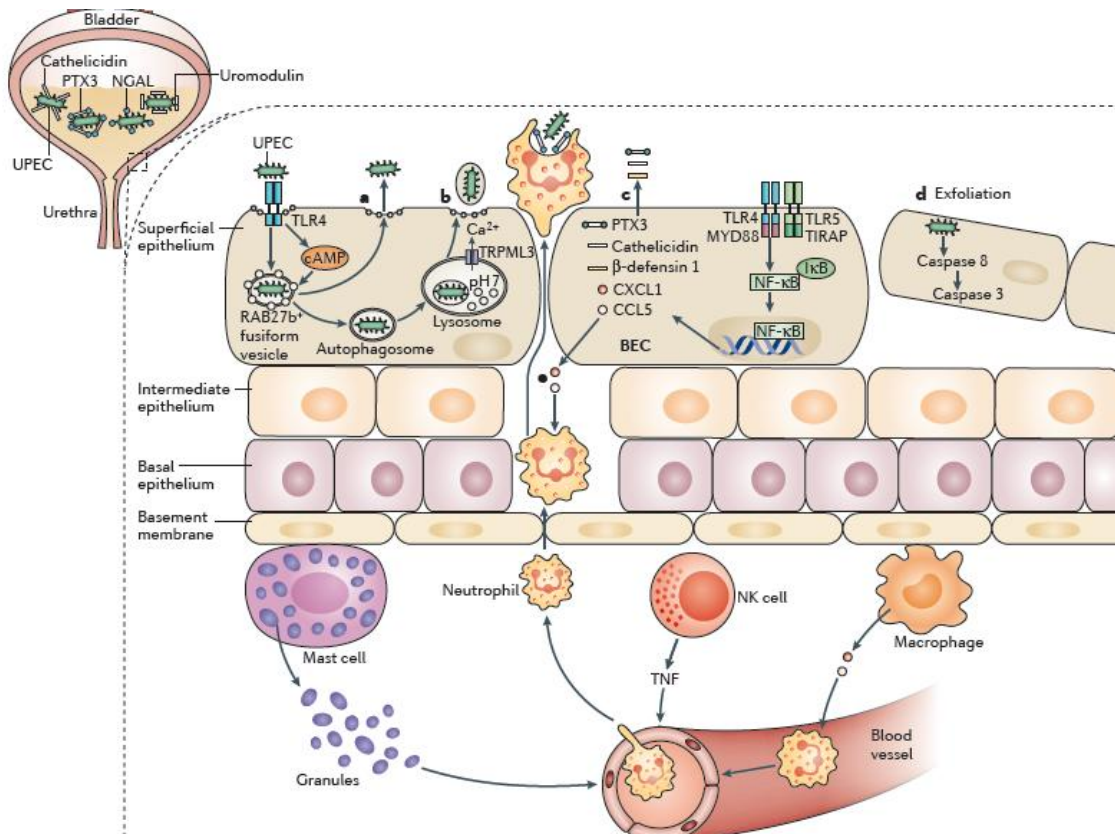


Figura 2. Respuesta inmune de la vejiga (Tomado de Soman y Yuxuan, 2015).

3.4.2. Respuesta inmune del riñón ante las ITUs

En los riñones, los productos de desecho tóxicos del metabolismo son retirados de la sangre por nefronas. Cada nefrona contiene un glomérulo que funciona como filtro electivo que retiene moléculas por encima de 50 kDa en la sangre. Compuestos de menor masa molecular pasan a través del filtro glomerular, entran en el sistema

tubular y son excretadas en la orina a menos de que sean reabsorbidos por el epitelio tubular (**Kurts y cols., 2013**). Los riñones tienen como función regular el equilibrio electrolítico, la osmolaridad extracelular y la presión arterial (**Imig y Ryan, 2013**). Las células inmunes de los riñones incluyen células dendríticas (DC) y macrófagos, así como algunos linfocitos (**Kaissling y Le Hir, 1994; Imig y Ryan, 2013**). Ante la pielonefritis bacteriana (infección renal), los riñones producen quimiocinas que reclutan neutrófilos durante la infección. Los neutrófilos también pueden ser reclutados por células epiteliales tubulares para la eliminación de bacterias. Las complicaciones a largo plazo de las ITUs incluyen cicatrices renales, hipertensión y enfermedad crónica del riñón (**Kurts y cols., 2013**).

3.5. Señalización de citocinas proinflamatorias en las ITUs

Como fue mencionado anteriormente, existen bacterias que evaden las primeras barreras físicas del urotelio y cuando esto sucede son reconocidas por receptores TLR que movilizan la respuesta inmune de las células epiteliales de la vejiga y el riñón (**Backhed y cols., 2001**). Los TLR son proteínas transmembranales responsables del reconocimiento de patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP por sus siglas en inglés): moléculas muy conservadas expresadas por patógenos (**Fleshner y cols., 2017**). Los TLR que se encuentran en el tracto urinario incluyen TLR2 (reconoce el ácido lipoteicoico bacterial o lipoproteína), TLR3 (reconoce el ARN bicatenario), TLR4 (reconoce lipopolisacáridos), TLR5 (reconoce flagelina), TLR9 (reconoce el ADN no metilado de bacterias y virus), y TLR11 (reconoce los parásitos) (**Akira y Takeda, 2004**). La **Figura 3**, muestra la activación de TLR por la unión con las PAMP de las bacterias uropatógenas, lo que a su vez activa varias vías de señalización complejas, incluyendo la respuesta primaria de diferenciación mieloide 88 (MyD88), varios receptores de interleucina asociada a quinasa (IRAK), rutas de proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPK) y quinasas c-Jun N-terminal (JNK) (**Lim y Staudt, 2013; Kawasaki y Kawai, 2014**). La activación de estas vías inducen una respuesta inmune robusta a través de la expresión de citocinas proinflamatorias que sirven como señal para el reclutamiento

de otras células del sistema inmune innato y para la respuesta inflamatoria (Spencer y cols., 2014).

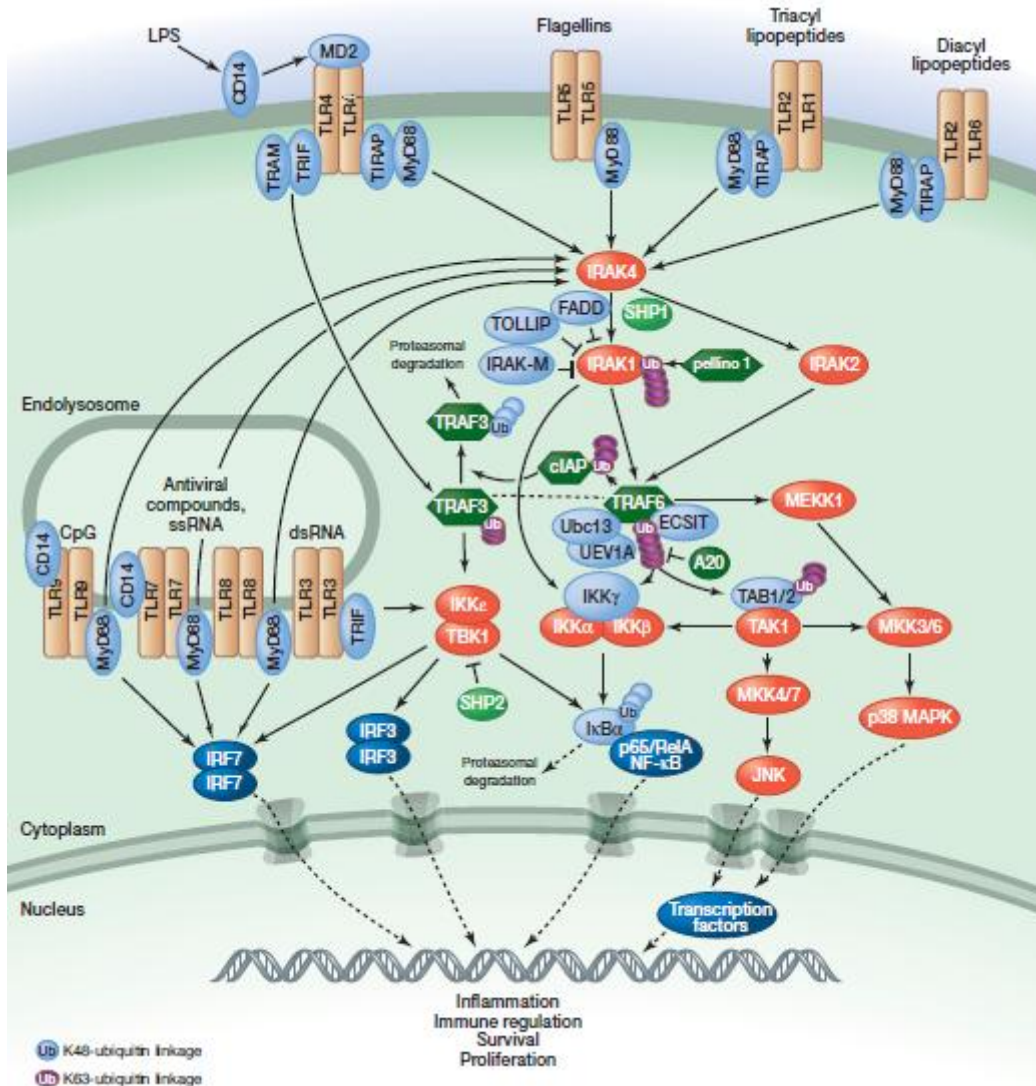


Figura 3. Activación de TLR y señalización de citocinas proinflamatorias (Tomado de Lim y Staudt, 2013)

Las citocinas son proteínas que actúan sobre la célula que las produce o sobre otras células. Las citocinas se producen en respuesta a la presencia de microorganismos y otros antígenos (Dinarello, 2007). Las citocinas incluyen interleucinas IL (excepto la quimiocina IL-8), interferones (IFN- α , - β y - γ), el factor estimulante de colonias (CSF) (granulocito CSF (G-CSF), macrófagos CSF (M-CSF) y, granulocito-macrófagos CSF (GM-CSF), y el factor de necrosis tumoral (TNF) (Kelso, 1998).

Algunos estudios han demostrado que cuando existe una ITU, aumentan los niveles de expresión génica de citocinas proinflamatorias como: TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 (**Agace y cols., 1993; Armbruster y cols., 2017**), estos niveles pueden ser medidos mediante qPCR (**Peinnequin y cols., 2004**).

3.5.1. Factor de Necrosis Tumoral alfa (TNF- α)

TNF es un miembro prototípico de una gran superfamilia conocida como la superfamilia TNF/TNFR, que ahora comprende más de 40 miembros (**Carswell y cols., 1975**) El gen *TNF- α* está presente como un gen de copia única en el cromosoma 17 en ratones. El ARN mensajero (ARNm) del *TNF- α* se expresa en un amplio rango de células, incluyendo monocitos y macrófagos. La expresión del gen TNF- α está regulada, en el nivel transcripcional, por varios factores, incluyendo el factor nuclear kappa b (NF κ B) y el factor nuclear de células T activadas (NF-AT) (**Spriggs y cols., 2002**). El TNF α se expresa como una proteína de 27 kDa (233 aminoácidos) que luego se escinde proteolíticamente a una molécula de 17 kDa (157 aminoácidos). El TNF α actúa a través de dos receptores transmembrana: el receptor de TNF 1 (TNFR1), también conocido como p55 o p60, y el receptor de TNF 2 (TNFR2), también conocido como p75 o p80. La activación de TNFR1 es responsable de un gran número de respuestas inflamatorias (**Parameswaran y Patial S, 2010**).

El TNF α es un poderoso agente proinflamatorio que regula muchas funciones de los macrófagos. Es liberado rápidamente después de un trauma, infección o exposición a lipopolisacáridos (LPS) derivado de bacterias y se ha demostrado que es uno de los mediadores tempranos más abundantes en el tejido inflamado. Una de sus funciones más importantes es la producción de un citocinas proinflamatorias, pero el TNF α también aumenta la liberación de mediadores de transducción de señales lipídicas (como las prostaglandinas) y la activación plaquetaria. Debido a la multitud de funciones que realiza TNF α ha sido propuesto como un actor central en la inflamación, la activación celular y el reclutamiento de neutrófilos (**Parameswaran y Patial S, 2010**).

3.5.2. Interleucina 1 β (IL-1 β)

La IL-1 es un mediador clave de la inmunidad e inflamación innata. La familia de IL-1 incluye 7 ligandos con actividad agonista (IL-1 α y β , IL-18, IL-33, IL-36 α , β , γ). Estos ligandos se unen a los receptores IL-1R e IL-1R2 (**Boraschi y cols., 2013**). La IL-1 α está activa y funciona como una "alarma", iniciando rápidamente una cascada de citocinas y quimiocinas inflamatorias, lo que explica la inflamación estéril. Los precursores de IL-1 α son liberados a partir de células necróticas y de monocitos activados (**Garlanda y cols., 2013**). Por el contrario, IL-1 β es producida, en respuesta a TLR, por células hematopoyéticas, incluyendo monocitos sanguíneos, macrófagos tisulares, células dendríticas de la piel y de la microglia cerebral. La IL-1 β no está normalmente activa, pero cuando es escindida por la caspasa-1 se libera la citocina activa en el espacio extracelular (**Dinarello, 2011**). IL-1 es el pirógeno endógeno clásico, que tiene diferentes funciones: 1) regular la inmunidad e inflamación innata; 2) regular la respuesta de fase aguda, desencadenada por IL-6 en el hígado, amplificando la resistencia innata mediada por el brazo humoral de la inmunidad innata (e.g., Proteína C reactiva (CRP), lectina de unión a manosa, componentes del complemento) y regular el daño tisular (por ejemplo, α 1-antitripsina); 3) inducir la expresión de moléculas de adhesión en células endoteliales y quimiocinas, lo que da como resultado una expansión del reclutamiento de leucocitos y de la resistencia innata a la infección; 4) prolongar notablemente la vida útil y estimular la función efectora de neutrófilos y macrófagos (**Garlanda y cols., 2013**). La familia IL-1 también incluye miembros que tienen un papel inhibitorio, lo que les permite suprimir la señalización y por lo tanto limitar la respuesta inflamatoria (**Turner y cols., 2014**).

3.5.3. Interleucina 8 (IL-8)

La IL-8 fue identificada en 1987 como una quimiocina activadora de neutrófilos. La acumulación de neutrófilos en un tejido es el sello distintivo de la inflamación, una reacción de defensa a infecciones y otras lesiones, con la participación de sangre, vasos sanguíneos y elementos tisulares. Los neutrófilos son reclutados de la sangre

mediante estímulos quimiotácticos que guían su migración a través de la pared de los vasos sanguíneos en busca del sitio afectado (**Baggiolini y Clark-Lewis, 1992**). La IL-8 deriva de macrófagos y se une a dos tipos distintos de receptores, IL-8-R1 e IL-8 R2, para activar los neutrófilos (**Koch y cols., 1992; Hammond y cols., 1995**). Estas cascadas se inician principalmente a través de la activación de las proteínas G intracelulares. Después, las subunidades de proteína G estimulan enzimas (adenilato ciclasa o fosfolipasa C) que pueden activar la señalización MAPK y alterar la expresión génica para promover la supervivencia y proliferación celular, así como la inflamación. Además, la señalización de IL-8 a través de MAPK y fosfatidilinositol-3 quinasa (PI3K) induce la expresión de moléculas de adhesión, como la integrina, Mac-1, que se requieren para la quimiotaxis. Por lo tanto, IL-8 media el reclutamiento y la activación de neutrófilos a través de mecanismos complejos de señalización (**Turner y cols., 2014**).

3.5.4. Interlucina 6 (IL-6)

La familia de IL-6 son citocinas pleiotrópicas que incluyen, además de los miembros de IL-6, a IL-11. EL ARNm del gen IL-6 se expresa en diferentes células, incluidos los fagocitos mononucleares, células T, células B, fibroblastos, células del endotelio, queratinocitos, hepatocitos y células de la médula ósea (**Jücker y cols., 1991**). La IL-6 se une al receptor IL-6R; al unirse al ligando, se asocia con la proteína receptora de señal gp130. La gp130 se dimeriza, lo que lleva a la activación de la señalización JAK-STAT. Esta vía de señalización conduce a la fosforilación del transductor de señal y a la activación de la transcripción 3 (STAT3), miembro de la familia más amplia de factores de transcripción STAT y asociado con la señalización de citocinas; el resultado es la translocación nuclear de STAT3 y la expresión génica de *IL-6* (**Scheller y cols., 2011**). IL-6 está involucrado en la hematopoyesis y es clave para en la diferenciación de células B en células plasmáticas productoras de anticuerpos, la activación de células T y la secreción de proteínas de fase aguda por el hígado, lo cual hace en cooperación con IL-1 (**Kishimoto, 2010; Turner y cols, 2014**).

3.6. Diagnóstico y Tratamiento farmacológico para ITUs

La sospecha de ITU en niños debe confirmarse mediante la realización de un examen general de orina (EGO) y urocultivo. El examen de orina con tira reactiva puede revelar la presencia de esterasa leucocitaria y nitritos. En el análisis microscópico, un conteo de cinco o más leucocitos por campo, aunado a bacteriuria, sugiere ITU (**Calderón-Jaimes y cols., 2013**). El urocultivo se considera positivo si hay $>10^4$ de UFC/mL (**Vitaly Smelov y cols., 2016**). En adultos, el urocultivo se recomienda en casos de sospecha de pielonefritis, síntomas persistentes o recurrentes dentro de las primeras 2 a 4 semanas de haber concluido el tratamiento, así como en caso de síntomas atípicos. En personas con ITU's complicadas se recomienda un ultrasonido del tracto urinario para saber si existe alguna anomalía anatómica (**Grabe y cols., 2008**).

El tratamiento antimicrobiano es fundamental en el manejo de las IU para evitar el riesgo de episodios de reinfección y para prevenir la afectación del tracto urinario. Normalmente se recetan cefalosporinas (ceftibuten), nitrofurantoína, trimetoprima/sulfametoxazol y, quinolonas (ácido nalidíxico) (**Calderón-Jaimes y cols., 2013**). Para dar este tipo de tratamiento se debe tomar en cuenta: la edad del paciente, si las mujeres están embarazadas o lactando, y la resistencia antimicrobiana (**Grabe y cols., 2008**).

La resistencia a los antibióticos ha estado empeorando en años recientes debido al creciente número de cepas bacterianas resistentes a múltiples fármacos y al uso indiscriminado de antibióticos de amplio espectro (**Bartoletti y cols., 2016**). Las cepas *E. coli* y *P. mirabilis* manifiestan resistencia a varios agentes antimicrobianos como betalactamasas, cefalosporinas de espectro extendido, fluoroquinolonas y aminoglucósidos (**Adamus-Bialek y cols., 2013**), lo que limita la elección de tratamiento para los pacientes. Debido a esto, es necesario considerar diversos factores al hacer la elección de antibióticos, como su actividad in vitro frente a los patógenos urinarios más frecuentes, sus concentraciones urinarias sus efectos en la flora vaginal y gastrointestinal, los posibles eventos adversos y el costo de la terapia (**Abbo y Hooton, 2014; Reyes-López y Blandón-Vijil, 2016**).

Como ya se mencionó anteriormente, las bacterias que provocan las ITUs presentan resistencia a diferentes antimicrobianos, por lo que tiene sentido dar más importancia a medidas preventivas como el uso de probióticos y hormonas para proteger el tracto urinario del crecimiento microbiano.

3.6.1. Probióticos

Los probióticos son microorganismos que en cantidades adecuadas son benéficos para la salud. Diversas cepas de *Lactobacillus* han sido utilizadas como probióticos principalmente *Lactobacillus rhamnosus*, *L. casei*, *L. planetario*, *L. bulgaricus* y *L. salivarius*; *Bifidobacterium* y *Enterococcus faecium* (**Kechagia y cols., 2013**). Los probióticos desempeñan un papel importante en la prevención de la colonización de en la vagina por bacterias patógenas; se han administrado supositorios vaginales que contienen *Lactobacillus crispatus* GAI 98322 a pacientes con ITUs recurrentes y se ha observado una reducción significativa en el número de infecciones recurrentes, sin ninguna complicación adversa (**Uehara y cols, 2006**).

3.6.2. Estrógenos

Después de la menopausia, los niveles de estrógeno y el número de lactobacilos disminuyen, lo cual desempeña un papel importante en el desarrollo de bacteriuria, y hace a las mujeres posmenopáusicas susceptibles a las infecciones urinarias (**Ahmed y Ghadeer, 2013**). Por lo que se ha administrado estradiol por vía intravaginal a mujeres con ITUs y estas infecciones han disminuido. Se cree que los estrógenos estimulan la proliferación de *Lactobacillus* en el epitelio vaginal, el pH, evita que la vagina sea colonizada por patógenos urinarios (**Raz y Stamm, 1993**).

3.6.3. Arándanos

Para la prevención de ITUs se ha utilizado jugo de arándano y tabletas, en los que se encuentra un compuesto llamado proantocianidinas que reduce la colonización bacteriana (**Jepson y col., 2012**). Por ejemplo, se ha demostrado que el jugo de arándano reduce la colonización vaginal por cepas de *E. coli* que son uropatógenas pero no enteroagregativas (**Zafiri y cols, 1989**)

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En México las infecciones urinarias son un problema de salud debido a las recurrencias que estas presentan. Entre un 77-90% y un 10 % de las infecciones son provocadas por bacterias resistentes a antibióticos, principalmente por *E. coli* uropatógena y *P. mirabilis* respectivamente. Recientemente se ha demostrado que *E. coli* enteroagregativa bacteria causante de diarrea, también puede causar infecciones en vías urinarias: el daño inflamatorio y la inducción de expresión de citocinas proinflamatorias que provoca esta bacteria sólo se ha realizado a nivel intestinal.

Por lo que el presente trabajo se enfoca en la capacidad de ciertas cepas *E. coli* EAEC (0420) y *P. mirabilis* (RTX 339 Y ATCC 29906) para inducir la expresión de citocinas proninflamatorias en el tracto urinario (vejiga y riñón) en un modelo murino.

5. HIPÓTESIS

Las bacterias uropatógenas inducen la expresión diferenciada de citocinas proinflamatorias en un modelo murino de infección

6. OBJETIVOS

6.1. General

Evaluar la expresión de citocinas proinflamatorias en el modelo murino de infección por bacterias uropatógenas.

6.2. Particulares

1. Establecer infección urinaria en modelo murino causada por *P. mirabilis* ATCC29906, *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339.
2. Comparar la infección urinaria causada por las tres cepas antes mencionadas mediante el conteo de unidades formadoras de colonia (UFC)
3. Determinar la expresión génica de citocinas proinflamatorias en vejiga y riñón durante infección urinaria por *P. mirabilis* ATCC29906, *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339.
4. Determinar la presencia tisular de citocinas proinflamatorias en vejiga y riñón infectados con de las bacterias antes mencionadas.

7. MATERIAL Y MÉTODOS

7.1. Pruebas bioquímicas

Con el fin de caracterizar bioquímicamente a las cepas *P. mirabilis* ATCC29906 (de referencia), *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339 (aislada de paciente con ITU complicada), se sembraron aislados de estas cepas con un asa bacteriológica en agar Mac Conkey (Cat. No. 212123, BD Bioxon MD, USA), agar Eosina y azul de metileno EMB (Cat 210600, BD Bioxon); *E. coli* 042 se sembró también en Rapid *E. coli* 2 agar (Cat 3564024, Bio-Rad, Marnes-France). Todas las cepas fueron incubadas a una temperatura de 37°C durante 24 horas. Una vez que crecieron cada una de las cepas, se les realizaron pruebas bioquímicas tales como: citrato, Kligler, ureasa, medio de sulfuro indol para movilidad (SIM), rojo de metilo y Voges-Proskauer.

7.2. Animales de experimentación

Los 60 ratones BALB/c hembra de seis semanas de edad se alimentaron con (Laboratory Rodent Diet 5001 LabDiet, Saint Louis, MO, EE. UU.) y agua *ad libitum*. Los ratones se mantuvieron en un ciclo de luz/oscuridad de 12:12 h (las luces se encendían a las 7 a.m.) y temperatura de 20 °C en una habitación silenciosa para animales de la "Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio, (UPEAL) de la Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco". El Protocolo (No. 177) fue aprobado por el Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL) bajo las regulaciones federales mexicanas para experimentación y cuidado animal (NOM-062-ZOO-1999, Ministerio de Agricultura, Ciudad de México, México).

7.3. Preparación de dosis infectiva

Aislados de *P. mirabilis* ATCC29906, *P. mirabilis* RTX339 y *E.coli* 042 se sembraron en agar Mac Conkey y se incubaron durante 24 h a una temperatura de 37 °C. Pasado el tiempo de incubación, se tomó una muestra de una de las colonias que

crecieron en agar Mac-Conkey y se inoculó en 50 mL de caldo Luria incubándose a 37 °C durante toda la noche. Posteriormente se centrifugó el cultivo Luria en una centrifuga (Beckman Coulter Avanti Centrifuge® model J-301, Brea CA, USA) a 10,000 rpm por 20 min a 4 °C; se retiró el sobrenadante y el pellet formado se lavó con amortiguador de fosfatos (PBS pH 7.2) estéril. Se centrifugó nuevamente en las mismas condiciones para lavar las células, y el pellet se resuspendió en 1 mL de PBS pH 7.2 estéril y se procedió a determinar el número de UFC de la siguiente manera: se prepararon diluciones desde 10^1 hasta 10^{11} y se sembraron (100 μ L por dilución) en placas de agar Mac-Conkey; se incubaron durante 24 h a una temperatura de 37 °C y se contaron las colonias, correspondientes a una dilución de 5×10^7 UFC/mL.

7.4. Infección urinaria en ratones BALB/c

Se organizaron 4 grupos de 4 ratones BALB/c hembras de 6 semanas, los cuales fueron infectados por vía intrauretral de la siguiente manera: i) *P. mirabilis* ATCC29906; ii) *E.coli* 042; iii) *P. mirabilis* RTX339; iv) 50 μ L de PBS, pH 7.2, sin bacterias, como control negativo de la infección. Los ratones fueron anestesiados con una mezcla de Xilazina (10 mg/kg) y Ketamina (60 mg/kg) (ambos anestésicos de Pisa Agropecuaria, Tula, Hidalgo, México) por vía intraperitoneal. Posteriormente se vació la vejiga de cada ratón mediante un ligero masaje abdominal, se limpió el orificio de la uretra usando una solución aséptica, y se aplicó una pequeña cantidad de lubricante (Lubrigel®, Diporsa SA, CDMX. México) en el orificio de la uretra. Posteriormente se introdujo cuidadosamente un catéter (22 Gx1 BD Systems, city, state, USA) en el ostium uretral externo (3 mm), perpendicular a la uretra, en dirección craneal caudal. Para poder acceder a la vejiga, el catéter se alineó mediante un giro de 180° y se introdujo 7 mm. Por último, se inoculó la dosis infectiva (5×10^7 UFC/50 μ L) usando una jeringa de insulina DB Ultra-fine®, la cual se insertó en el otro extremo del catéter Punzocat® PTFE 22GX1". Para finalizar, se retiró el catéter Punzocat® PTFE 22GX1" y se le dieron varias vueltas al ratón para que el inóculo entrara en contacto con las paredes de la vejiga.

7.5. Obtención de muestras (orina, vejiga y riñones)

Una vez infectados los ratones, se procedió a la obtención y tratamiento de las muestras de orina, sangre y órganos urinarios a los días 0, 2, 4, 7 y 10 días post-infección. Primero se recolectaron muestras de orina, mediante la aplicación de una pequeña presión suprapúbica, en microtubos estériles de 1.5 mL. Posteriormente los animales fueron anestesiados vía intraperitoneal con una mezcla de Xilazina y (10 mg/kg) y Ketamina (60 mg/kg), y se procedió a la recolección de los órganos urinarios (vejiga y riñones), los cuales fueron diseccionaron por la mitad y pesados. Cada mitad fue sometida a un procesamiento diferente: 1) Cuenta de las unidades formadoras de colonia, 2) análisis de la expresión de citocinas proinflamatorias por PCR en tiempo real e 3) inmunohistoquímica (sólo día 7).

7.6. Cuento de unidades formadoras de colonias (UFC)

Las muestras de orina y los homogenizados de los órganos urinarios (vejiga y riñones) fueron tratadas con PBS pH 7.2 estéril y se les realizaron diluciones seriadas desde 10^1 hasta 10^{11} ; posteriormente se sembró 100 μ L de cada dilución en agar Mac-Conkey y se incubó a 37 °C por 24 h. Finalizado el periodo de incubación, se procedió a la cuenta de colonias en las cajas Petri con muestras de orina, vejiga y riñones.

7.7. Extracción de ARN total

A las muestras de vejiga y riñón se les agregó 800 μ L de Trizol Tri-reagent (Cat. No. TR118, Molecular Research Center, Inc, Cincinnati, USA) y se procedió a homogenizarlas; posteriormente se agregó 200 μ L de cloroformo (Sigma-Aldrich, USA) frío, se mezcló por inversión, y se dejó reposar 15 min en hielo. Las muestras se centrifugaron a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C en una centrifuga (eppendorf centrifuge® modelo 5427R). Después se retiró la fase acuosa, se transfirió a un tubo eppendorf, y se agregaron 400 μ L de isopropanol frío, se agitó suavemente por inversión, y se dejó reposar 10 min en hielo. Posteriormente se centrifugaron las muestras a 12,000 rpm durante 15 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante, y se agregó

1 mL de etanol al 75% para lavar el pellet. Se centrifugó a 7500 rpm durante 5 min a 4 °C, se retiró el sobrenadante y se centrifugó una vez más durante un minuto a 7500 rpm. Por último, se retiró el sobrenadante, se dejó secar el exceso de etanol y se agregó 20 µL de agua inyectable estéril. Se verificó la integridad del ARN en un gel de agarosa al 1.5 %, cargando 3 µL de la muestra en cada pozo del gel con 1 µL de buffer de carga. A partir de 1 µL de muestra, se cuantificó la concentración de ARN en el Nanodrop (Thermo Scientific, modelo 2000, Wilmington, USA).

7.8. Retrotranscripción de ARNm a ADNc

A un tubo eppendorf se agregó 2.5 µg de ARNm de vejiga y a otro tubo se agregó 1.5 µg de ARNm de riñón; a cada uno se le agregó 1 µL de Oligo de T (Promega Corporation, Wisconsin, USA) y se llevaron a un volumen de 15 µL con agua inyectable estéril. Posteriormente, los tubos fueron calentados en un termociclador (*TPersonal/Whatman Biometra*, Germany) por 5min a 70 °C. Después se colocaron en hielo y se les agregó 5 µL de buffer enzima (Promega Corporation, USA), 1.5 µL de DNTP's (Promega Corporation, USA), 1 µL de enzima retrotranscriptasa M-MLV (Cat. No. M170A, Promega Madison, MI, USA) y se llevaron a un volumen total de 25 µL con agua inyectable estéril. Por último, los tubos se calentaron en un termociclador (*Whatman Biometra*) durante 60 min a 42 °C. Se verificó la integridad del ADNc en un gel de agarosa al 1.5%, cargando 5 µL de la muestra en cada pozo del gel y se cuantificó la concentración del ADNc a partir de 1 µL de muestra en el Nanodrop 2000.

7.9. Expresión génica de citocinas proinflamatorias por qPCR

Para determinar la expresión génica de las citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-6, IL-8) y del gen constitutivo Actina (Act), se diseñaron oligonucleótidos en la base de datos del National Center for Biotechnology Information USA (NCBI) usando el pick primer. Las secuencias para cada oligo se muestran en la **Tabla 4**.

Tabla 4. Secuencia de oligonucleótidos de citocinas proinflamatorias

Oligonucleótidos	Secuencia
IL-8 Forward	5'-TGCATGGACAGTCATCCACC-3'
IL-8 Reverse	5'-ATGACAGACCACAGAACGGC-3'
IL-6 Forward	5'-CCCCAATTTCCAATGCTCTCC-3'
IL-6 Reverse	5'-CGCATCAGGTTTGCCGAGTA-3'
IL-1 β Forward	5'-TGCCACCTTTTGACAGTGATG-3'
IL-1 β Reverse	5'-TGATGTGCTGCTGCGAGATT-3'
TNF- α Forward	5'-GATCGGTCCCCAAAGGGATG-3'
TNF- α Reverse	5'-TTTGCTACGACGTGGGCTAC-3'
Actina Forward	5'-CTAAGGCCAACGGTGAAAAG-3'
Actina Reverse	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'

La mezcla de reacción se preparó añadiendo a un tubo eppendorf 1 μ L de ADNc (vejiga o riñón), 15 μ L de Master Mix (Cat. No. A150306 Ampliqon, Odense M, Denmark), 0.5 μ L de oligonucleótido Forward, 0.5 μ L de oligonucleótido Reverse, 0.5 μ L de Evagreen (Cat No. 31000, Biotium, Fremont CA, USA), 0.3 μ L de Rox (Cat No. R4526, Sigma Saint Louis MO, USA) y 2.2 μ L de agua inyectable estéril. La mezcla de reacción se incubó en un equipo de PCR-tiempo real (Cat No 9001550, Rotor-Gene Q 6000, QIAGEN Valencia, CA, USA) con las condiciones necesarias (**Tabla 5**).

Tabla 5. Condiciones de reacción de PCR en tiempo real

Desnaturalización	Ciclado (45 ciclos)	Curva Melt
50°C 2 min	95°C 15 seg	75°C–94°C
95°C 10 min	60°C 45 seg	
	72°C 15 seg	

Los resultados se analizaron en el software Rotor- Gene 6000 1.7, para obtener los valores de Ct, los cuales fueron utilización para calcular la expresión relativa de cada citocina mediante el método de doble delta Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) (**Rao y cols, 2013**).

7.10. Obtención de cortes histológicos

Después de 7 días de infección las muestras de vejiga y los riñones ya obtenidas se almacenaron en frascos con formaldehído al 10% durante dos días. Después, se colocaron en cassettes, que fueron introducidos a un histoquinete (Leica-TP1020, Guadalajara) con diferentes solventes (**Tabla 6**); posteriormente fueron incluidos en parafina y se realizaron cortes transversales de 5 μm con un micrótopo (American Optical-820). Se obtuvieron seis laminillas de cada tejido se hicieron (riñón derecho, riñón izquierdo y vejiga); una de las laminillas fue utilizada para tinción con hematoxilina-eosina y las otras para inmunohistoquímica.

Tabla 6. Solventes utilizados en histoquinete

Solvente	Tiempo (horas)
Formol	2
Agua destilada	2
Etanol al 50%	2
Etanol al 70%	2
Etanol al 80%	2
Etanol al 96%	2
Xilol	2
Parafina 3 veces	2

7.10.1. Procedimiento para inmunohistoquímica

Antes de proceder con la inmunohistoquímica, se desparafinaron los cortes de los tejidos (**Tabla 7**).

Tabla 7. Tiempos empleados en cada fase de la desparafinación de los tejidos

Solvente	Tiempo (minutos)
Xilol	10
Xilol- Etanol absoluto	3
Etanol absoluto	3

Etanol al 96%	3
Etanol 70%	3
Agua	5

Para la inmunohistoquímica, se utilizaron los siguientes anticuerpos: CXR1/IL-8 RA (NBP2-16043, Novusbio Biologicals Littleton CO, USA), IL-6 (NB600-1131, Novusbio), IL-1 β , (SC-1349, Santa Cruz Biotechnology, Houston TX, USA) y TNF- α (SC-1250, Santa Cruz Biotechnology), además del kit Cell & Tissue Staining (CTS006, R&D Systems Minneapolis MI, USA). El método utilizado fue el siguiente: se cubrieron las muestras de tejidos con 1-3 gotas de peroxidasa durante 5 min, después, se enjuagaron las muestras con PBS pH 7.2 por 5 min. Posteriormente las muestras se incubaron con 1-3 gotas de suero para bloquear (reactivo G) durante 15 min; no fueron enjuagadas con buffer PBS pH 7.2. Después se añadieron 1-3 gotas de reactivo Avidina, se incubaron por 15 min, y se enjuagaron con buffer PBS pH 7.2. Después se incubaron las muestras con 1-3 gotas de reactivo Biotina por 15 min y se enjuagaron con PBS pH 7.2. Se añadió 50 μ L de anticuerpo (dilución de 1:500), se incubaron las muestras durante 2 horas a 37 °C y se hicieron tres lavados de 15 min. Después, se añadió a las muestras 1-3 gotas de Anticuerpo secundario Biotinilado (Vial A), se incubaron durante una hora a 37° C y se lavaron tres veces con buffer PBS pH 7.2. Posteriormente se incubaron las muestras con 1-3 gotas de HSS-HRP (vial B) durante 30 min y se lavaron con PBS pH 7.2. Se añadieron 200 μ L de solución sustrato-cromógeno (3-amino-9-ethylcarbazol AEC) para cubrir por entero las muestras; se incubaron durante 20 min y se lavaron con buffer PBS pH 7.2. Por último, se añadió a las muestras de 1-3 gotas de hematoxilina Mayer (Cat MFCD00078111, Sigma-Aldrich, Saint Louis, MO), se incubaron durante 2 min antes de enjuagarlas con agua de la llave y finalmente, se les añadió de 1-3 gotas de reactivo para montaje para su posterior observación en el microscopio (DM1000, Leica-Biosystems, CDMX).

7.10.2. Procedimiento para tención con hematoxilina-eosina

De las laminillas obtenidas de los cortes de vejiga y riñones, una de cada grupo de ratones infectados y sin infectar se tiñó con hematoxilina- eosina. Para ello, las laminillas se colocaron en un recipiente que fue sumergido en diferentes solvente y colorante durante diferentes tiempos (**Tabla 8**). Después del xilanol, se les añadió reactivo de montaje (S21022-4, Thermo Scientific, ITA, UK), se cubrieron con un cubreobjetos y se pusieron a secar en una termoplatina durante 30 min.

Tabla 8. Procedimiento de tinción de hematoxilina-eosina

Solvente	Tiempo (segundos)
Xilol 2 veces	10
Etanol absoluto	10
Etanol al 96%	10
Etanol al 80%	10
Etanol 70%	10
Agua destilada	10
Hematoxilina	120
Enjuagar con agua de la llave	30
Agua amoniacal	90
Enjuague rápido con agua destilada	
Etanol absoluto	10
Eosina	90
Etanol al 96% 2 veces	10
Etanol absoluto 2 veces	10
Xilol 3 veces	10

7.11. Análisis estadístico

Los experimentos se realizaron por duplicados y los datos fueron analizados mediante ANOVA de una sola vía seguido de una prueba de Tukey, utilizando el programa Prism 5 Windows Versión 5.01 (GraphPad Software, Inc. California, USA). Los resultados fueron reportados como la media \pm error estándar (ES). Las diferencias fueron consideradas significativas con valores de $p < 0.05$.

8. RESULTADOS

8.1. Pruebas bioquímicas

La **Tabla 9** muestra los resultados de las pruebas bioquímicas realizadas para cada una de las cepas; las pruebas demostraron que las cepas utilizadas correspondían a las especies *P. mirabilis* y *E. coli* (O'Hara y cols., 2000; Koneman y cols, 2001).

Tabla 9. Resultados de pruebas bioquímicas

Cepa	SIM			Ureasa	Citrato	Kliger			VP		RM	
	I	M	S			H ₂ S	F	No F	R	A	R	A
<i>P. mirabilis</i> ATCC	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>P. mirabilis</i> RTX	-	+	+	+	-	+	-	-	-	-	-	+
<i>E.coli</i> 042	+	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-

Positivo (+) y negativo (-) a las pruebas: SIM Indol (I), motilidad (M), sulfuro (S), ácido sulfhídrico (H₂S), fermentadores (F), no fermentadores (No F), voges proskauer (VP), rojo de metilo (RM), rojo (R) y amarillo (A)

8.2. Unidades Formadoras de Colonias

La **Figura 4 A, B y C** muestra las unidades formadoras de colonias en las muestras de orina, vejiga y riñón respectivamente. Los valores que están por arriba de la línea negra indican que la inoculación de los ratones BALB/c con las cepas *P. mirabilis* ATCC, *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339 produjeron una infección (Vitaly y cols., 2016); la infección se produjo en las muestras de vejiga y riñón pero no en las de orina. Las infecciones con *P. mirabilis* RTX339 y *E. coli* 042 generaron la mayor carga bacteriana en vejiga (4×10^5 UFC/g) y riñón (6×10^4 UFC/g) al día 7 p.i. en comparación con vejiga infectada con *P. mirabilis* ATCC29906 y vejiga sin infectar

($p= 0.0001$). Es por esto que la presencia tisular de citocinas proinflamatorias se determinó por inmunohistoquímica únicamente a los siete días de infección.

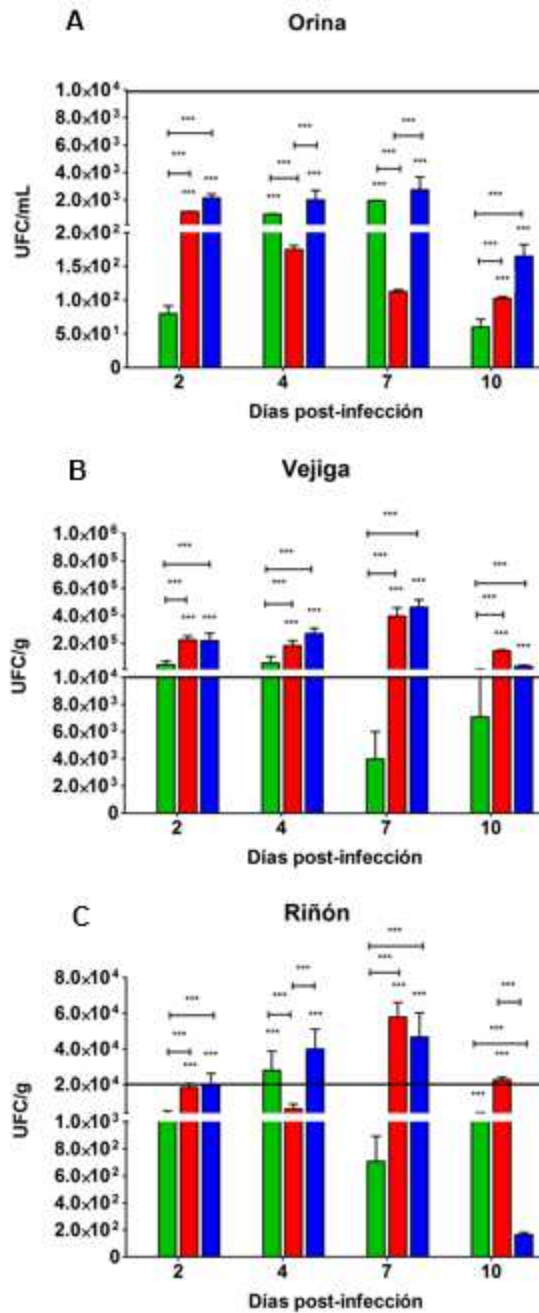


Figura 4. Unidades Formadoras de Colonias (UFC) en A) orina, B) vejiga C) y riñón de ratones hembra BALB/c □ sin infectar e infectados con ■ *P. mirabilis* ATCC29906, ■ *E. coli* 042 y ■ *P. mirabilis* RTX339 a los 2, 4, 7 y 10, contra grupo sin infectar * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$.

Por otra parte, en vejiga, infectada con *P. mirabilis* RTX339 y *E. coli* 042 se observó una menor carga bacteriana a los días 2, 4 y 10 p.i., en comparación con vejiga infectada con *P. mirabilis* ATCC29906 y con riñón sin infectar ($p=0.0001$) (**Figura 4B**).

En la **Figura 4C** se observa que en riñón hubo una menor carga bacteriana con la infección con *P. mirabilis* RTX339 y *E. coli* 042 en el día 2 p.i., en comparación con riñón infectado con *P. mirabilis* ATCC29906 y sin infectar ($p=0.0001$). En los días 4 y 10 p.i. se registró una menor carga bacteriana con la infección con *E. coli* 042 y *P. mirabilis* ATCC29906 en comparación con los ratones infectados con *P. mirabilis* RTX339 y ratones sin infectar ($p=0.0001$).

8.3. Extracción de ARNm y síntesis de ADNc

Se determinaron las concentraciones de ARNm diferentes muestras de vejiga y riñón de ratones infectados y sin infectar. En las muestras de vejiga los valores oscilaron entre 255 y 850 ng/ μ L, en riñón los valores oscilaron entre 2000 y 5000 ng/ μ L; los valores de pureza obtenidos para estos parámetros fueron de 1.6-2.0 tanto en vejiga como en riñón de ratones infectados y sin infectar. Estos valores de pureza y concentración fueron adecuados para realizar la reacción de transcriptasa reversa.

Las concentraciones de ADNc encontradas en muestras de vejiga y riñón de los ratones estudiados estuvieron por encima de los 1000 ng/ μ L en ambos tejidos; dichos valores fueron adecuados para determinar la expresión génica de las citocinas proinflamatorias mediante qPCR.

8.4. Niveles de expresión de citocinas proinflamatorias

En este trabajo se evaluó la expresión de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6) en muestras de vejiga y riñón de ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906, *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339 a los 2, 4, 7 y 10 días p.i. (**Figuras 5A y B a 8A y 8B**)

8.4.1. TNF- α

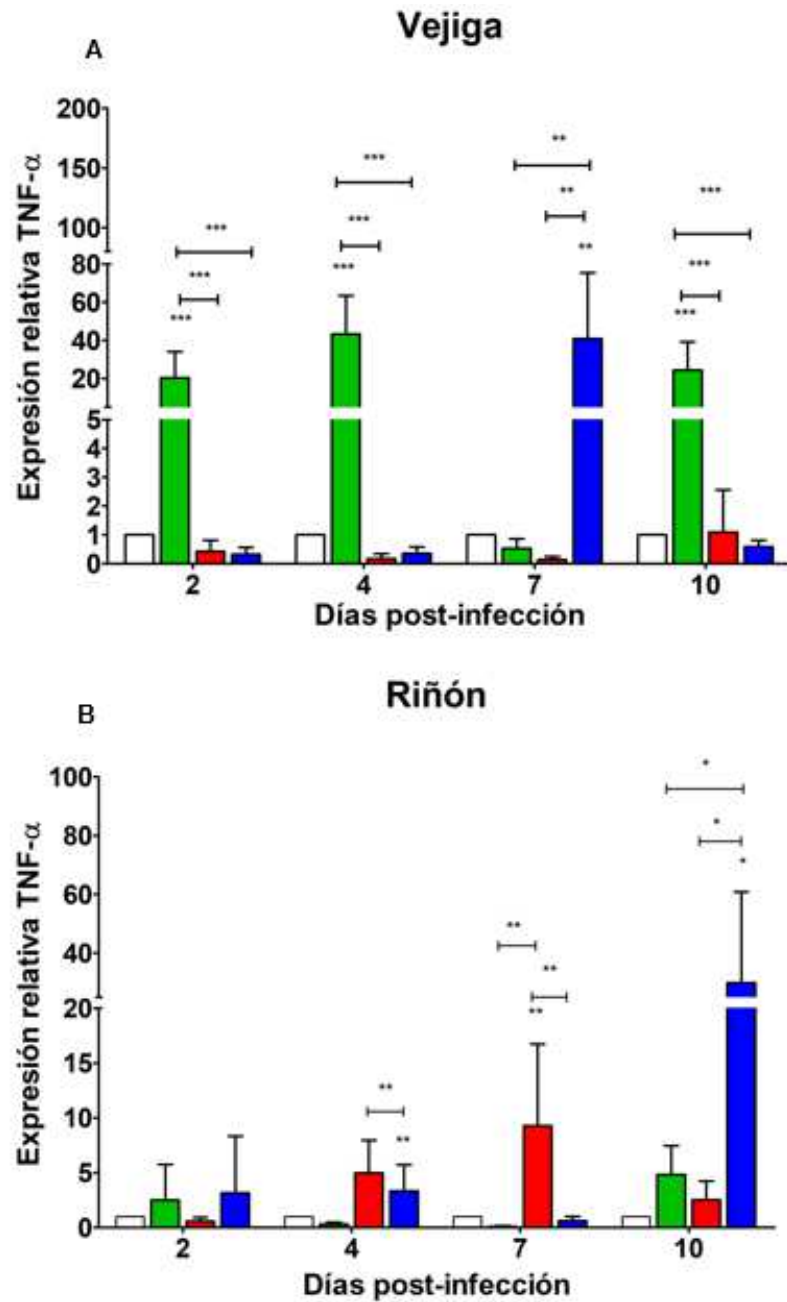


Figura 5. Expresión relativa de TNF- α ARNm en A) vejiga y B) riñón de ratones hembra BALB/c \square sin infectar e infectados con \blacksquare *P. mirabilis* ATCC29906, \blacksquare *E. coli* 042 y \blacksquare *P. mirabilis* RTX339 a los 2, 4, 7 y 10 días p.i., contra grupo sin infectar * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

La **Figura 5A** muestra que la expresión génica de TNF- α fue más alta en vejiga infectada con *P. mirabilis* ATCC29906 y *P. mirabilis* RTX339 a los días 4 y 7 p.i. respectivamente, comparada con vejiga infectada con *E. coli* 042 ($p=0.0001$) y con vejiga sin infectar ($p=0.0020$). La infección con *P. mirabilis* ATCC29906 generó niveles bajos de expresión génica de TNF- α al día 2 y 10 p.i. en comparación con las infecciones con *P. mirabilis* RTX339 y *E. coli* 042 (ambas $p=0.0005$) y los ratones sin infección ($p=0.0001$). Por otra parte, muestras de riñón infectadas con *P. mirabilis* RTX339 expresaron niveles altos de TNF- α al día 10 p.i. en comparación con el grupo sin infectar y los ratones infectados con *E. coli* 042 y *P. mirabilis* ATCC29906 ($p=0.0188$). Se registraron niveles bajos de expresión de TNF- α en ratones infectados con *E. coli* 042 al día 4 y 7 p.i., en comparación con el grupo sin infectar y con los ratones infectados con las otras cepas ($p=0.0020$). En el día 2 p.i. no hubo diferencias significativas (**Figura 5B**).

8.4.2. IL-1 β

La **Figura 6A** muestra el análisis de la expresión génica de IL-1 β en muestras de vejiga. Se observa que los ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906 expresaron niveles altos de IL-1 β al día 4 p.i. en comparación con los ratones infectados con *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339 y con los ratones sin infectar (ambos $p=0.0001$). La infección con *P. mirabilis* RTX339 generó bajos niveles de expresión génica de IL-1 β a los 7 y 10 días p.i. en comparación con los demás grupos y sin infectar ($p=0,001$). No se encontraron diferencias significativas al día 2 p.i. En riñón, los ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906 expresaron niveles altos de IL-1 β los días 4 y 7 p.i. en comparación con los ratones sin infectar e infectados con las otras cepas ($p = 0.0001$). La infección con *E. coli* 042 generó bajos niveles de expresión génica de IL-1 β al día 10 p.i., en comparación con los demás grupos, y sin infectar ($p = 0.0039$). No hubo diferencias significativas al día 2 p.i. (**Figura 6B**).

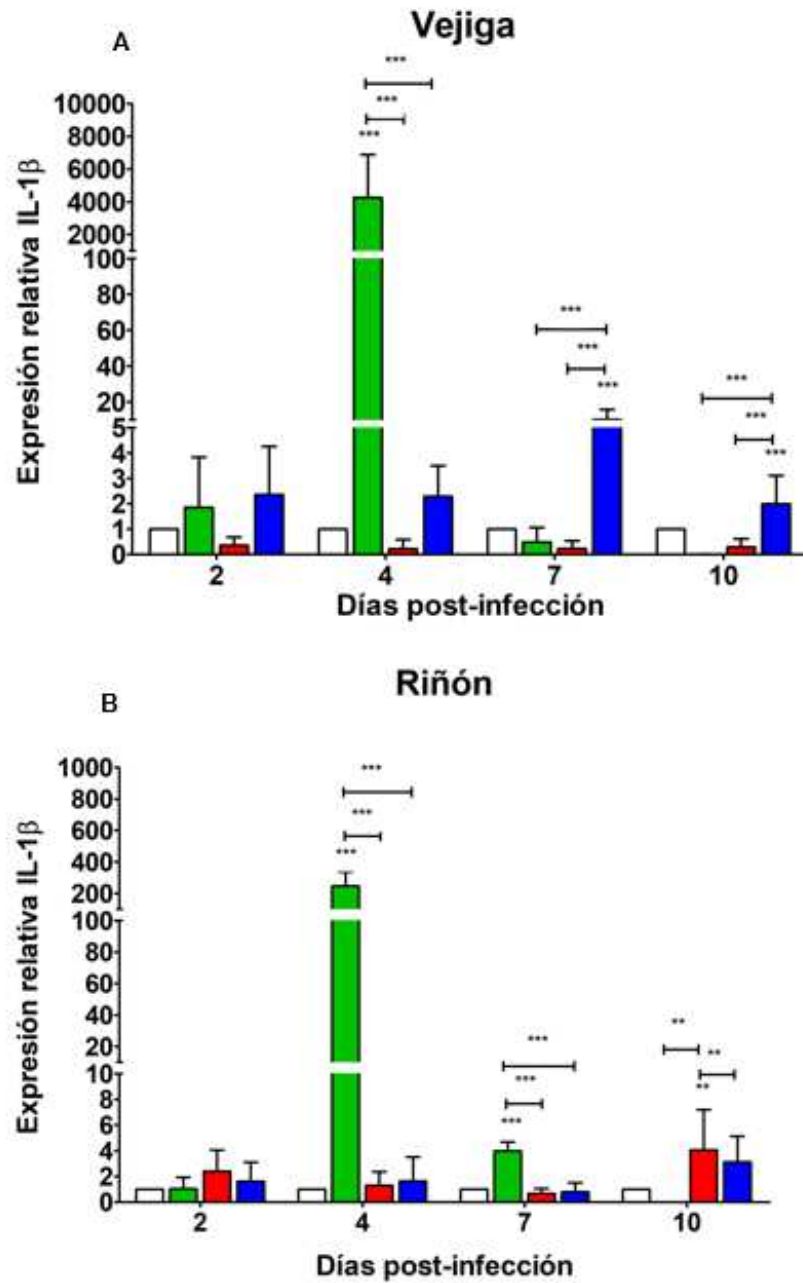


Figura 6. Expresión relativa de IL-1 β ARNm en A) vejiga y B) riñón de ratones hembra BALB/c □ sin infectar e infectados con ■ *P. mirabilis* ATCC29906, ■ *E. coli* 042 y ■ *P. mirabilis* RTX339 a los 2, 4, 7 y 10 días p.i., contra grupo sin infectar * p<0.05, ** p<0.01, *** p<0.001.

8.4.3. IL-8

La **Figura 7A** muestra los niveles de expresión génica de IL-8 en vejiga. La infección con *P. mirabilis* RTX339 indujo los niveles más altos de expresión de esta citocina al día 7 p.i. en comparación con las infecciones con *E. coli* 042 y *P. mirabilis* ATCC29906 y con el grupo sin infectar (ambos $p=0.0001$). Se observaron diferencias significativas entre los bajos niveles de expresión de IL-8 registrados en los días 4 ($p=0.0173$) y 10 p.i. ($p=0.0001$) con la infección provocada con *P. mirabilis* ATCC29906 y *E. coli* 042, respectivamente y la infección con *P. mirabilis* RTX339 y el grupo sin infectar. En el día 2 p.i. no se observaron diferencias significativas. En riñón, la infección con *E. coli* 042 generó niveles altos de expresión de IL-8 al 10 día p.i. en comparación con la infección con *P. mirabilis* RTX339 y *P. mirabilis* ATCC29906 y el grupo sin infectar ($p=0.0184$). Niveles similares de expresión de IL-8 fueron inducidos por las infecciones con *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339 al día 7 p.i. en comparación con la infección con *P. mirabilis* ATCC29906 y el grupo sin infectar ($p=0.0006$). También se observaron niveles bajos de expresión de IL-8 con la infección con *P. mirabilis* RTX339 al día 2 p.i. en comparación con los otros grupos de infección y sin infectar ($p =0.0001$). No se encontraron diferencias significativas al día 4 p.i. (**Figura 7B**).

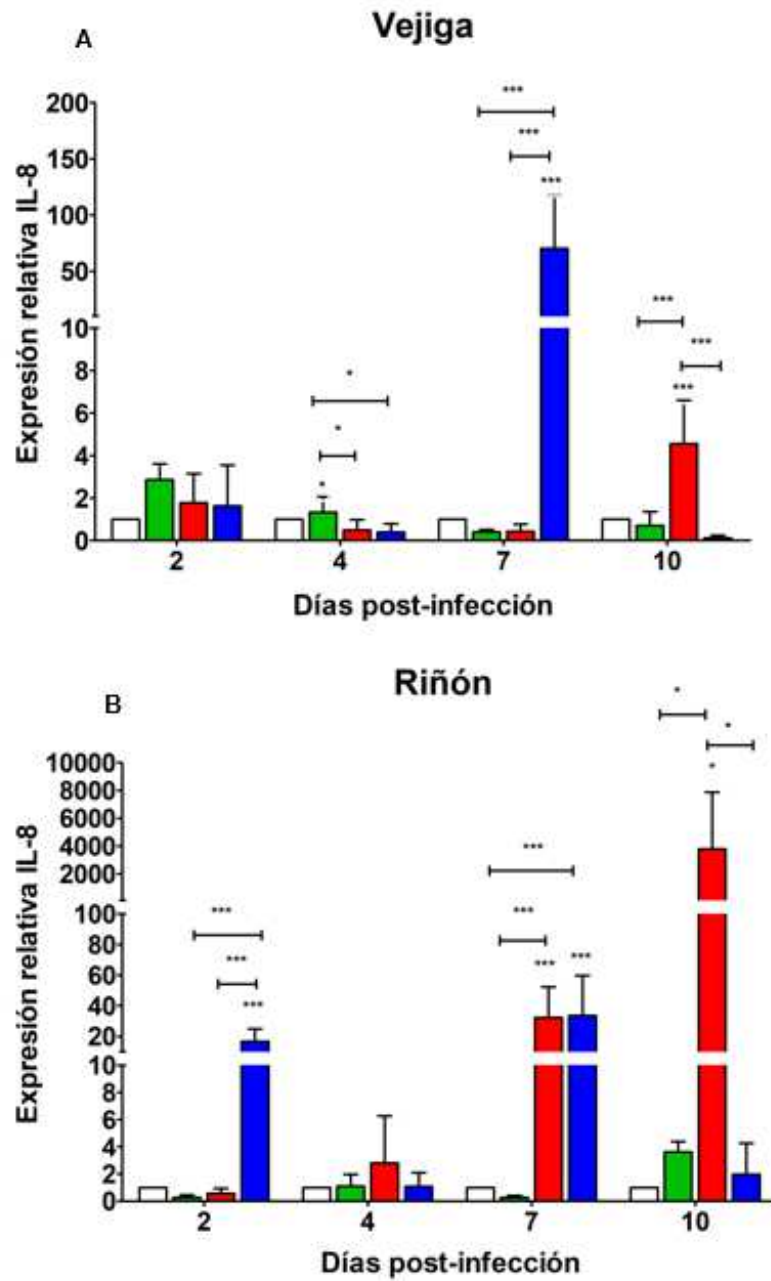


Figura 7. Expresión relativa de IL-8 ARNm en A) vejiga y B) riñón de ratones hembra BALB/c □ sin infectar e infectados con ■ *P. mirabilis* ATCC29906, ■ *E. coli* 042 y ■ *P. mirabilis* RTX339 a los 2, 4 ,7 y 10 días p.i., contra grupo sin infectar * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

8.4.4. IL-6

Con respecto a la expresión génica de IL-6 en vejiga, los niveles más altos de expresión los indujo la infección con *P. mirabilis* RTX339 al día 7 p.i. en comparación con las infecciones con EAEC 042 y *P. mirabilis* ATCC29906 y el grupo sin infectar ($p = 0.0019$). La infección con *E. coli* 042 generó niveles bajos de expresión de IL-6 a los 2,4 y 10 días p.i. en comparación con los otros grupos de infección *P. mirabilis* ATCC29906 y *P. mirabilis* RTX339 y el grupo sin infectar ($p = 0.0001$) (**Figura 8A**). En riñón, la infección con *E. coli* 042 generó los mayores niveles de expresión de IL-6 al día 4 ($p = 0.0222$) y 10 ($p = 0.0001$) p.i. pero indujo niveles bajos de expresión al día 2 ($p = 0.0043$) y 7 p.i. ($p = 0.0001$), en comparación con la infección con *P. mirabilis* ATCC29906 y *P. mirabilis* RTX339 y con el grupo sin infectar. También, la infección con *P. mirabilis* RTX339 indujo una expresión génica baja de IL-6 al día 7 p.i. en comparación con los grupos infectados y el grupo sin infectar ($p = 0.0001$) (**Figura 8B**).

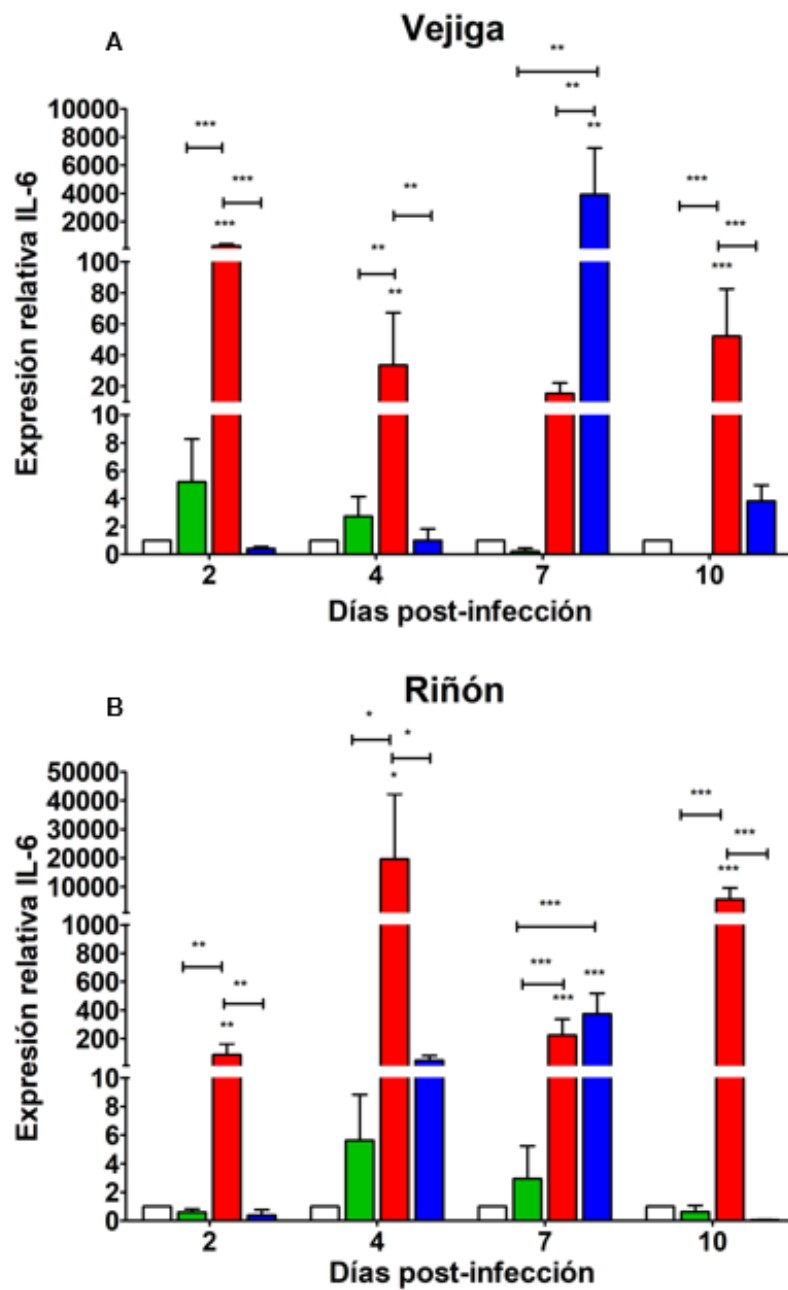


Figura 8. Expresión relativa de IL-6 ARNm en A) vejiga y B) riñón de ratones hembra BALB/c □ sin infectar e infectados con ■ *P. mirabilis* ATCC29906, ■ *E. coli* 042 y ■ *P. mirabilis* RTX339 a los 2, 4, 7 y 10 días p.i., contra grupo sin infectar * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

8.5. Determinación tisular de citocinas proinflamatorias

La determinación por inmunohistoquímica de la presencia tisular de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 se llevó a cabo únicamente al día 7 p.i y de forma visual en el microscopio. En vejiga y en riñón no se estableció presencia (-) de estas citocinas en el grupo de ratones sin infectar (**Figuras 9A y B-12A y B**). La **Tabla 10** muestra el resumen de los resultados obtenidos de inmunohistoquímica.

Tabla 10. Presencia de citocinas proinflamatorias en tejidos de vejiga y riñón por inmunohistoquímica.

Muestras	Citocinas			
	IL-6	IL-8	IL-1 β	TNF- α
riñón derecho sin infectar	-	-	-	-
riñón izquierdo sin infectar	-	-	-	-
vejiga sin infectar	-	-	-	-
riñón derecho <i>P. mirabilis</i> ATCC	-	-	+	+
riñón izquierdo <i>P. mirabilis</i> ATCC	-	-	+	+
vejiga <i>P. mirabilis</i> ATCC	-	+	+	+
riñón derecho <i>E. coli</i> 042	-	++	++	+
riñón izquierdo <i>E. coli</i> 042	-	++	++	+
vejiga <i>E. coli</i> 042	-	+	+	-
riñón derecho <i>P. mirabilis</i> RTX	+++	+++	++	++
riñón izquierdo <i>P. mirabilis</i> RTX	+++	+++	++	++
vejiga <i>P. mirabilis</i> RTX	-	++	+	+

-(ausencia de citocina),+ (muy poca presencia de citocina), ++ (presencia media de citocina) y +++ (mayor presencia de citocina).

8.5.1. TNF- α

En muestras de la vejiga infectada con *P. mirabilis* ATCC29906 y *P. mirabilis* RTX339 se observó una presencia baja (+) de TNF- α , pero no en vejiga infectada con *E. coli* 042. En riñón, la infección con *P. mirabilis* ATCC29906 y *E. coli* 042 indujo una presencia baja (+) de TNF- α . En riñón infectado con *P. mirabilis* RTX339 no se detectó presencia (-) de esta citocina (**Figuras 9A y B**).

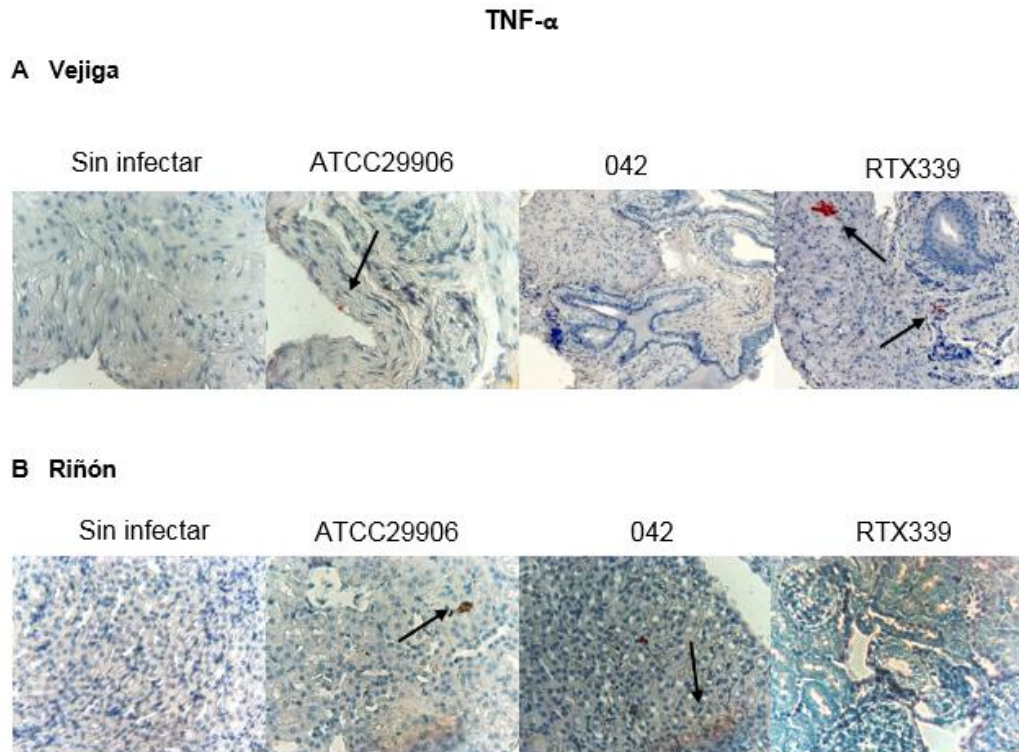


Figura 9. Corte histológico con preparación inmunohistoquímica (40x) de A) vejiga y B) riñón de ratón BALB/c sin infectar y de ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906, *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339. Las flechas señalan reacción positiva para TNF- α .

8.5.2. IL-1 β

La **Figura 10 A y B** muestra la visualización de IL-1 β en vejiga y riñón; la infección con *P. mirabilis* ATCC29906 y *P. mirabilis* RTX339 indujo una baja presencia (+) de IL-1 β en vejiga, mientras que infección con *E. coli* 042 no indujo presencia (-) de IL-

1 β . La presencia de IL-1 β fue baja (+) en riñón infectado con las tres cepas (*P. mirabilis* ATCC29906, *E.coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339)

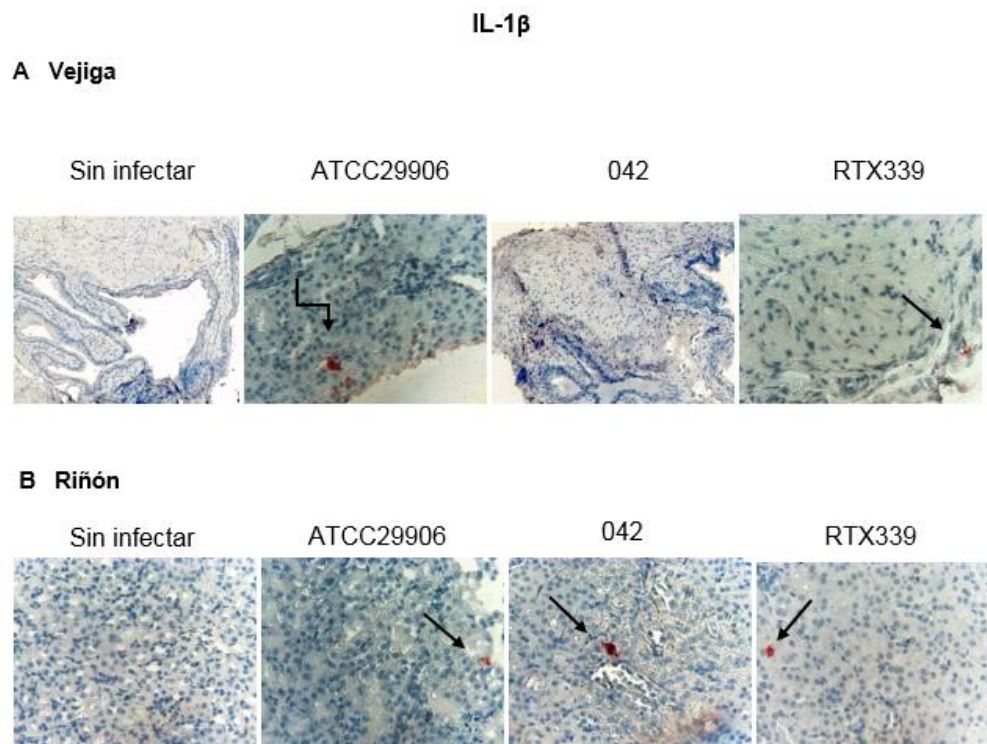


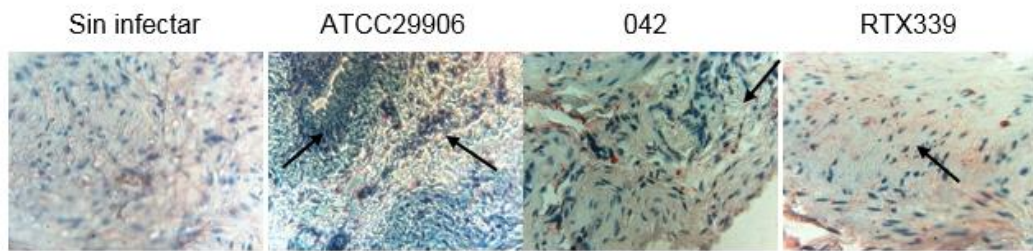
Figura 10. Corte histológico con preparación inmunohistoquímica (40x) de A) vejiga y B) riñón de ratón BALB/c sin infectar y de ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906, *E. coli* 042, y *P. mirabilis* RTX339. Las flechas señalan reacción positiva IL-1 β .

8.5.3. IL-8

La **Figura 11 A y B** muestra que tanto en vejiga como en riñón la infección con *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339 indujo una presencia alta (+++) de IL-8, contraste con la infección con *P. mirabilis* ATCC29906, que indujo una baja presencia (+) de IL-8 en vejiga, pero no indujo presencia (-) de esta citocina en riñón.

IL-8

A Vejiga



B Riñón

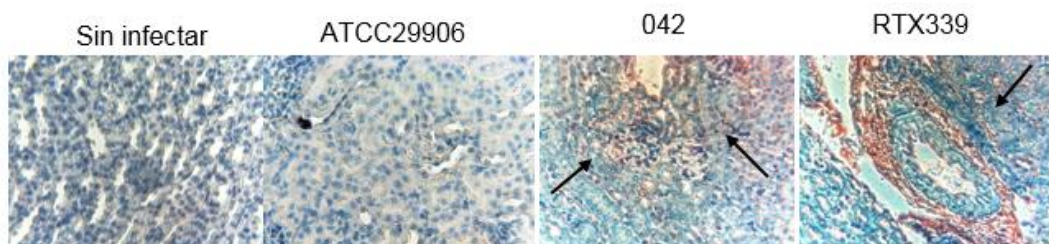


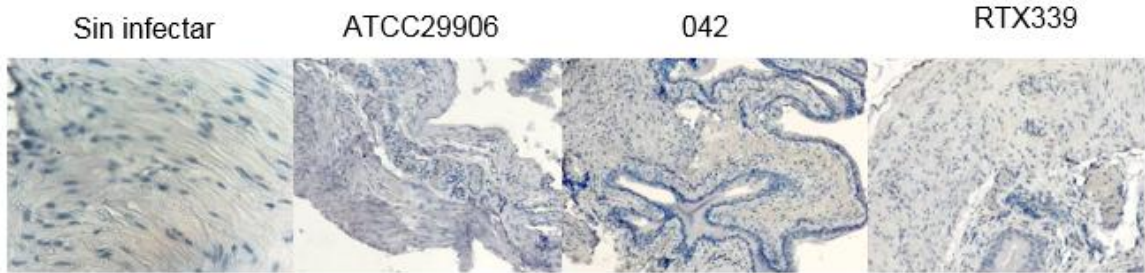
Figura 11. Corte histológico con preparación inmunohistoquímica (40x) de A) vejiga y B) riñón de ratón BALB/c sin infectar y de ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906, *E. coli* 042, y *P. mirabilis* RTX339. Las flechas señalan reacción positiva para IL-8.

8.5.4. IL-6

En vejiga, la infección con las tres cepas no indujo la presencia (-) de IL-8. En riñón, la infección con *P. mirabilis* RTX339 indujo una presencia alta (+++) de IL-6. En contraste, la infección con *P. mirabilis* ATCC29906 y *E. coli* 042 no indujo presencia (-) de IL-6 (**Figura 12 A y B**).

IL-6

A Vejiga



B Riñón

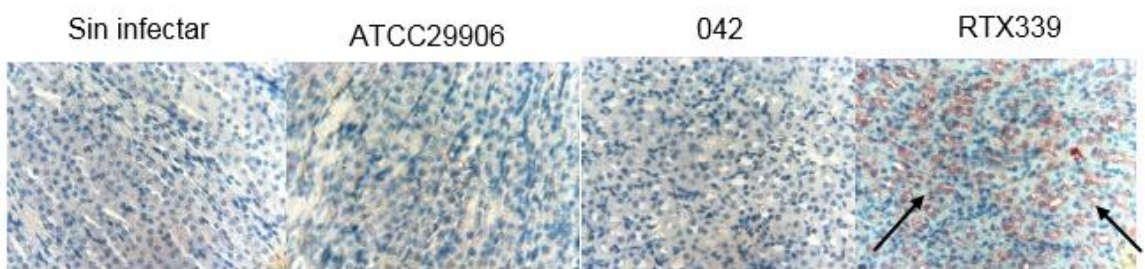


Figura 12. Corte histológico con inmunohistoquímica (40x) de A) vejiga y B) riñón de ratón BALB/c sin infectar y ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906, *E. coli* 042, y *P. mirabilis* RTX339. Las flechas señalan reacción positiva para IL-6.

8.6. Tinción con hematoxilina-eosina

La **figura 13 A y B** muestra cortes de vejiga y riñón de ratones BALB/c teñidos con hematoxilina-eosina. Se puede observar que los ratones sin infectar no mostraron inflamación. Al contrario, los ratones infectados con las tres cepas mostraron una inflamación.

La infección con *P. mirabilis* ATCC29906 provocó en riñón que los túbulos proximales y distales se agrandaran un poco, sin perder su estructura; también, debido a la inflamación se formaron abscesos, los cuales podrían estar llenos de pus (**Figura 13 B**).

La infección con *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339, indujo en vejiga la deformación de las células y el tejido conjuntivo se perdiera. En riñón, la infección con las mismas

bacterias provocó que los túbulos proximales y distales se hincharon hasta perder su forma (**Figura 13 A y B**).

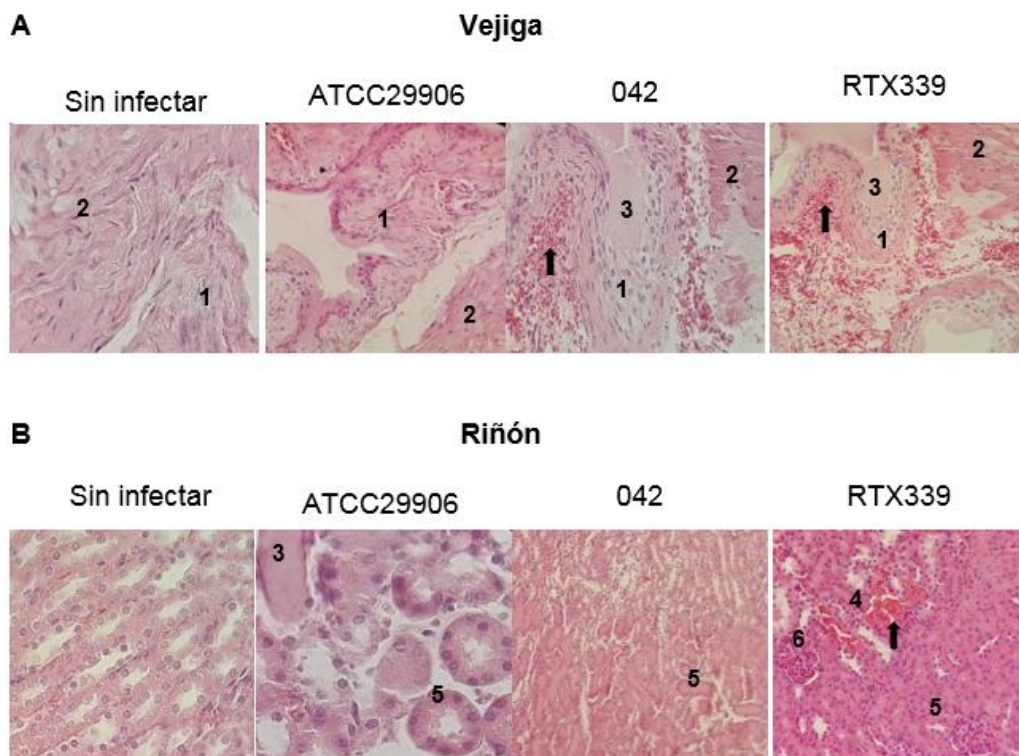


Figura 13. A) Vejiga; con tejido epitelial (1), capas de tejido muscular (2) y → presencia de eritrocitos y abscesos (3). B) Riñón; corteza renal y pelvis con células epiteliales del túbulo proximal (4), células epiteliales del túbulo distal (5), glomérulo (6) y absceso (3). Ratón BALB/c sin infectar y ratones infectados con *P. mirabilis* ATCC29906, *E. coli* 042, y *P. mirabilis* RTX339; inclusión en parafina; H-E; 40x.

9. DISCUSIÓN

Este estudio, determino la presencia de la infección urinaria con cepas uropatógenas *P. mirabilis* ATCC29906 (referencia), *E. coli* 042 y *P. mirabilis* RTX339 (aislada del paciente) en ratones BALB/c hembras a los 2, 4, 7 y 10 días p.i. Los resultados obtenidos indican que la infección urinaria se produjo por vía ascendente, ya que hubo colonización en la vejiga y los riñones. La mayor carga bacteriana (UFC) se registró al 7 día p.i. en vejiga (4×10^5 UFC/g), mientras que la menor carga bacteriana se registró en riñón (4×10^4 UFC/g y 6×10^4 UFC/g), inducidas por infección con *P. mirabilis* RTX339 y *E. coli* 042 respectivamente. La presencia de una mayor carga bacteriana en la vejiga se debe a que es en donde se acumula la mayor cantidad de orina (**Ambruster y cols., 2017**).

Se evaluó por primera vez la expresión génica de citocinas proinflamatorias (TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6) en vejiga y riñón de ratones BALB/c hembras infectados con las cepas antes mencionadas a los 2, 4, 7 y 10 días p.i. Cada cepa alteró de manera diferente a la expresión génica de las citocinas proinflamatorias según el día p.i. y el órgano afectado. En vejiga, la infección con *P. mirabilis* RTX 339 aumento la expresión génica de TNF- α , IL-8 e IL-6 los a los 7 días p.i; debido posiblemente al aumento de la carga bacteriana de esta cepa en vejiga.

En riñón, la infección con *E. coli* 042 indujo expresión génica elevada de IL-8 e IL-6 estas citocinas se expresaron incluso a los 10 días p.i., lo cual podría deberse a la virulencia de esta cepa, que está basada en la expresión de genes de fimbrias (AAF/I, AAF/II y AAF/III). Estas fimbrias han sido ampliamente estudiadas a nivel intestinal y son las que le permiten a *E. coli* 042 adherirse a las células intestinales y colonizar, causando una mayor inflamación (**Boll y cols., 2013; Herzog y cols., 2014**). Más recientemente se reportó que la expresión de estas fimbrias en otras cepas enteroagregativas les permiten adherirse a las células epiteliales de la vejiga y causar una infección urinaria (**Boll y cols., 2013; Herzog y cols., 2014**).

El presente trabajo no estableció ninguna relación entre los factores de virulencia y la producción de citocinas proinflamatorias y la presencia de las mismas en tejidos

de vejiga y riñón. Sin embargo, algunos estudios con otras cepas de bacterias uropatógenas han demostrado que ciertos factores de virulencia como fimbrias, flagelos, LPS y toxinas facilitan la invasión bacteriana y estimulan la expresión de citocinas proinflamatorias tanto a nivel del tracto urinario como de células epiteliales (**Agace y cols., 1993; Armbruster y cols., 2017**).

La diferencia de la expresión génica de las citocinas en los órganos (vejiga y riñón) a los diferentes días, también puede deberse a los mecanismos moleculares que controlan cronológicamente la expresión constitutiva o inducida de los transcritos de ARNm que codifican productos bacterianos, estos últimos subyace a la activación de vías de señalización que conducen a la expresión de transcripciones de citocinas en diferentes puntos temporales, como se documenta en modelos experimentales de infección con *E. coli* y *P. mirabilis* (**Pearson y col., 2011; Sanchez- Villamil y col., 2016; Yañez y cols., 2016**)

La presencia de las citocinas proinflamatorias TNF- α , IL-1 β , IL-8 e IL-6 en tejidos de vejiga y riñón de ratones hembra BALB/c infectados con las cepas antes mencionadas se determinó por inmunohistoquímica únicamente al día 7 p.i., debido a que fue al día 7 p.i. en el que se registró la mayor carga bacteriana. La citocina con mayor presencia, tanto en vejiga como en riñón, fue la IL-8 en infección causada por *P. mirabilis* RTX339; la menor presencia de esta citocina se registró en tejidos infectados con *E. coli* 042. La IL-8 es una quimiocina activadora de neutrófilos el aumento de la presencia de esta citocina en tejido ha sido asociada a una mayor acumulación de neutrófilos en el tejido, lo que provoca una inflamación. (**Baggiolini y Clark-Lewis, 1992**). La presencia de esta citocina coincide con la carga bacteriana de las cepas anteriormente mencionadas. Por el contrario, se ha observado una falta de concordancia entre la presencia de otras citocinas en tejido como TNF- α , IL-1 β e IL-6 y la expresión génica, las cuales podrían deberse por la vía de señalización independiente que induce la expresión de cada citocina, pero también pueden ser el resultado de la técnica utilizada ya que la PCR en tiempo real es un método altamente sensible para detectar transcripciones en una amplia

variedad de células; sin embargo , los productos proteicos no se detectan cuando hay muy pocas células disponibles (**Amsen y cols., 2009**).

En el presente estudio no se cuantificó la presencia de células de inflamación tales como neutrófilos, linfocitos y macrófagos en los tejidos de vejiga y riñón. Sin embargo, la tinción con hematoxilina-eosina realizada al día 7 p.i. (**Figura 13**) mostró una posible inflamación y daño tisular, causado principalmente por infección con *P. mirabilis* RTX339 y *E.coli* 042 en vejiga y riñones (túbulos proximales, distales y glomérulos) mostraron la deformación y presencia de abscesos, lo que también se relaciona con la presencia alta de la citocina IL8 en los tejidos (**Rocha-Ramirez y cols., 2016**)

Este estudio mostró por primera vez un panorama de la expresión génica de citocinas proinflamatorias y de la presencia de las mismas citocinas en tejidos de vejiga y riñón, causando posible inflamación y daño tisular. No obstante, es necesario realizar más investigaciones para evaluar la influencia de factores de virulencia y su relación con la señalización y expresión de citocinas proinflamatorias en los diferentes días de infección, lo que permitiría trabajar en nuevas dianas farmacológicas, algo de gran importancia debido a la resistencia a antibióticos que presentan las especies *P. mirabilis* y *E. coli*.

10. CONCLUSIÓN

El presente trabajo demostró que *P. mirabilis* RTX339 y *E. coli* 042 provocaron una mayor infección en vejiga y riñón que la *P. mirabilis* ATCC29906. También que la expresión de citocinas proinflamatorias en vejiga y en riñón fue diferente de acuerdo a la cepa y a los diferentes días post-infección, siendo la IL-8 la mayormente presente en los tejidos de vejiga y riñón por la infección de ambas cepas.

11. PERSPECTIVAS

La evaluación de la expresión de citocinas proinflamatorias causada por las cepas uropatógenas analizadas en este estudio es relevante ya que podría tener impacto en:

- Detección de factores de virulencia.
- Desarrollo de nuevas estrategias farmacológicas, incluyendo hormonas.
- Implementación del uso de probióticos para prevenir o reducir inflamación a nivel del tracto urinario.

12. REFERENCIAS

Chee WT, Maciej PC. Urinary tract infections in adults. Singapore Med J. 2016; 57(9): 485–490.

Ronald A. The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. Dis Mon.2003; 49(2):71-82

Vitaly S, Kurt N, Truls E. Bjerklund J. Improved Classification of Urinary Tract Infection: Future Considerations. Eur Urol ISSN.2016; 15(4):71-80.

Ahmed AB, Ghadeer AS. Recurrent Urinary Tract Infections Management in Women A review. Sultan Qaboos Univ Med J.2013; 13(3): 359–367.

Reyes-López A, Blandón-Vijil B. Economic evaluation of ceftibuten in the treatment of uncomplicated urinary tract infections in adult Mexican patients. Rev Mex Urol. 2016; 76(1):10-16.

Abbo LM, Hooton TM. Antimicrobial Stewardship and Urinary Tract Infections. Antibiotics (Basel).2014; 3(2): 174–192.

Sheerin N.S. Urinary tract infection. Medicine Elsevier.2011; 39(7):384–389.

Boll EJ, Struve C, Boisen N, Olesen B, Stahlhut GS, Kroghfelt A. Role of Enterococcal *Escherichia coli* Virulence Factors in Uropathogenesis. Infect Immun.2013; 81(4):1164–1171.

Herzog K, Engeler D, Hugentobler M, Beutin L, Sägeser G, Stephan R, Hächler H, Nüesch-Inderbinen M. Diarrheagenic enterococcal *Escherichia coli* causing urinary tract infection and bacteremia leading to sepsis. Infection.2014; 42(2):441-444.

Huang DB, Mohanty A, DuPont HL, Okhuysen PC, Chiang T. A review of an emerging enteric pathogen: enterococcal *Escherichia coli*. J Med Microbiol.2006; 55(10):1303-1311.

Baldo C, Dejato-Rocha SP. Virulence Factors of Uropathogenic *Proteus Mirabilis*- A Mini Review. IJSTR.2014; 3(11):24-27.

Baldo C, Dejato-Rocha SP. Virulence Factors Of Uropathogenic *Proteus Mirabilis*-A Mini Review. IJSTR.2014; 3(11):24-27.

Song J, Abraham SN. Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. Eur J Clin Invest.2008; 38(2):21–28.

Armbruster CE, Smith SN, Johnson AO, De Ornellas D, Eaton KA, Lona–Mody AY, Wu W, Mobley HLT. The Pathogenic Potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by

Other Uropathogens during Polymicrobial Urinary Tract Infection. *Infect Immun.*2017; 85(2): 1-15

Fusco A, Coretti L, Savio V, Buommino E, Lembo F, Donnarumma G. Biofilm Formation and Immunomodulatory Activity of *Proteus mirabilis* Clinically Isolated Strains. *Int J Mol Sci.*2017; 18(2):1-11.

Steiner TS, Lima AA, Nataro JP, Guerrant RL. Enteroaggregative *Escherichia coli* produce intestinal inflammation and growth impairment and cause interleukin-8 release from intestinal epithelial cells. *J Infect Dis.* 1998; 177(1):88-96

Harrington SM, Strauman MC, Abe CM, Nataro JP. Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol.*2005; 7(11):1565-1578.

Rocha-Ramírez LM, Hernández-Chiñas U, Baños-Rojas D, Xicohtencatl-Cortés J, Chávez-Berrocal ME, Rico-Rosillo G, Kretschmer R, Eslava C. Pet serine protease from enteroaggregative *Escherichia coli* stimulates the inflammatory response activating human macrophages. *BMC Microbiol.*2016; 16:1-10.

Gutiérrez-Lucas LR, Mendoza-Hernández G, González-Pedrajo B, Eslava-Campos C, Bustos-Martínez J, Sainz-Espuñes T. Identification of the autotransporter Pet toxin in *Proteus mirabilis* strain isolated from patients with urinary tract infections. *ABC.*2012; 2:283-290.

Jacobsen SM, Shirliff ME. *Proteus mirabilis* biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Virulence.*20; 2(5):460-465.

Calderón-Jaimes E, Casanova-Román G, Galindo-Fraga A, Gutiérrez-Escoto P, Landa-Juárez S, Moreno-Espinosa S, Rodríguez-Covarrubias F, Simón-Pereira L, Valdez-Vázquez R. Diagnóstico y tratamiento de las infecciones en vías urinarias: un enfoque multidisciplinario para casos no complicados. *Bol Med Hosp Infant Mex* .2013; 70(1):3-10.

O'Hara CM, Brenner FW, Miller JM. Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clin Microbiol Rev.*2000; 13(4):534-46.

Schaffer JN, Pearson MM. *Proteus mirabilis* and Urinary Tract Infections. *Microbiol Spectr.*2015; 3(5):1-39.

Okeke IN, Nataro JP. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(5):304-313.

Kaper JB, Nataro JP, Mobley HL. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol.*2004; 2(2):123-140.

Flores-Mireles AL, Walker JN, Caparon M, Hultgren SJ. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13(5):269-284.

Song J, Abraham SN. Innate and adaptive immune responses in the urinary tract. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38(2):21–28.

Ingersoll MA, Albert ML. From infection to immunotherapy: host immune responses to bacteria at the bladder mucosa. *Mucosal Immunol.* 2013; 6(6):1041-1053.

Weichhart T, Haidinger M, Horl WH, Saemann MD. Current concepts of molecular defence mechanisms operative during urinary tract infection. *Eur J Clin Invest.* 2008; 38(2):29–38.

Bahrani FK, Massad G, Lockett CV, Johnson DE, Russell RG, Warren JW, Mobley HL. Construction of an MR/P fimbrial mutant of *Proteus mirabilis*: role in virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun.* 1994; 62(8):3363-3371.

Schilling JD, Mulvey MA, Vincent CD, Lorenz RG, Hultgren SJ. Bacterial invasion augments epithelial cytokine responses to *Escherichia coli* through a lipopolysaccharide-dependent mechanism. *J Immunol.* 2001; 166(2):1148-1155.

Roelofs JJ, Rouschop KM, Teske GJ, Claessen N, Weening JJ, van der Poll T, Florquin S. The urokinase plasminogen activator receptor is crucially involved in host defense during acute pyelonephritis. *Kidney Int.* 2006; 70(11):1942-1947

Umpiérrez, Scavone P, Romanin D, Marqués JM, Chabalgoity JA, Rumbo M, Zunino P. Innate immune responses to *Proteus mirabilis* flagellin in the urinary tract. *Microbes Infect.* 2013; 15(10-11):688-696.

Soman N. A. and Yuxuan M. The nature of immune responses to urinary tract infections. *Nat. Rev. Microbiol.* 2015; 15:655–663

Kurts C, Panzer U, Anders HJ, Rees AJ. The immune system and kidney disease: basic concepts and clinical implications. *Nat. Rev. Immunol.* 2013; 13:738–753.

Imig JD, Ryan MJ. Immune and Inflammatory Role in Renal Disease. *Compr Physiol.* 2013; 3(2): 957–976.

Kaissling B, Le Hir M. Characterization and distribution of interstitial cell types in the renal cortex of rats. *Kidney Int.* 1994; 45(3):709-20.

Backhed F, Soderhall M, Ekman P, Normark S, Richter-Dahlfors A. Induction of innate immune responses by *Escherichia coli* and purified lipopolysaccharide correlate with organ-and cellspecific expression of Toll-like receptors within the human urinary tract. *Cell Microbiol.* 2001; 3:153–158.

Fleshner M, Frank M, Maier SF. Danger Signals and Inflammasomes: Stress-Evoked Sterile Inflammation in Mood Disorders. *Neuropsychopharmacology*. 2017; 42(1):36-45.

Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signalling. *Nat Rev Immunol*.2004; 4(7):499-511.

Lim KH, Staudt LM. Toll-Like Receptor Signaling. doi: 10.1101/cshperspect.a011247.

Kawasaki T, Kawai T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. *Front Immunol*.2014; 5: 461-464.

Spencer JD, Schwaderer AL, Becknell B, Watson J, Hains DS. The innate immune response during urinary tract infection and pyelonephritis. *Pediatr Nephrol*.2014; 29(7):1139-1149.

Dinarello CA. Historical Review of Cytokines. *Eur J Immunol*.2007; 37(1):S34–S45.

Kelso A. Cytokines: principles and prospects. *Immunol Cell Biol*.1998; 76(4):300-317.

Agace W, Hedges S, Andersson U, Andersson J, Ceska M, Svanborg C. Selective cytokine production by epithelial cells following exposure to *Escherichia coli*. *Infect Immun*.1993; 61(2):602-609.

Peinnequin A, Mouret C, Birot O, Alonso A, Mathieu J, Clarençon D, Agay D, Chancerelle Y, Multon E. Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol*.2004; 5:3-10.

Carswell EA, Old LJ, Kassel RL, Green S, Fiore N, Williamson B. An endotoxin-induced serum factor that causes necrosis of tumors. *Proc Natl Acad Sci U S A*.1975; 72(9):3666–3670.

Spriggs DR, Deutsch S, Kufe DW. Genomic structure, induction, and production of TNF-alpha. *Immunol Ser*.1992; 56:3–34.

Parameswaran N, Patial S. Tumor necrosis factor- α signaling in macrophages. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*.2010; 20(2):87-103.

Boraschi D, Tagliabue A. The interleukin-1 receptor family. *Semin Immunol*. 2013; 25(6):394-407.

Garlanda C, Dinarello CA, Mantovani A. The interleukin-1 family: back to the future. *Immunity*.2013; 39(6): 1003–1018.

Dinareello CA. Interleukin-1 in the pathogenesis and treatment of inflammatory diseases. *Blood*.2011; 117:3720–3732.

Turner MD, Nedjai B, Hurst T, Pennington DJ. Cytokines and chemokines: At the crossroads of cell signalling and inflammatory disease. *Biochim Biophys Acta*. 2014; 1843(11):2563-2582.

Baggiolini M, Clark-Lewis I. Interleukin-8, a chemotactic and inflammatory cytokine. *FEBS Lett*.1992; 307(1):97-101.

Koch AE, Polverini PJ, Kunkel SL, Harlow LA, DiPietro LA, Elner VM, Elner SG, Strieter RM. Interleukin-8 as a macrophage-derived mediator of angiogenesis. *Science*.1992; 258(5089):1798-1801.

Hammond ME, Lapointe GR, Feucht PH, Hilt S, Gallegos CA, Gordon CA, Giedlin MA, Mullenbach G, Tekamp-Olson P. IL-8 induces neutrophil chemotaxis predominantly via type I IL-8 receptors. *J Immunol*. 1995; 155(3):1428-33.

Jücker M, Abts H, Li W, Schindler R, Merz H, Günther A, von Kalle C, Schaadt M, Diamantstein T, Feller AC, Expression of interleukin-6 and interleukin-6 receptor in Hodgkin's disease. *Blood*.1991; 77:2413–2418.

Scheller J, Chalaris A, Schmidt-Arras D, Rose-John S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. *Biochim Biophys Acta*.2011; 1813(5):878-888.

Kishimoto T. IL-6: from its discovery to clinical applications, *Int. Immunol*.2010; 22:347–352.

Grabe M, Bishop MC, Bjerklund-Johansen TE, Botto H, Çek M, Lobel B, et al. Guidelines on the management of urinary and male genital tract infections. European Association of Urology 2008. Disponible en: http://www.uroweb.org/fileadmin/user_upload/Guidelines/The%20Management%20of%20Male%20Urinary%20and%20Genital%20Tract%20Infections.pdf.

Bartoletti R, Cai T, Wagenlehner FM, Naber K, Bjerklund-Johansen TE. Treatment of Urinary Tract Infections and Antibiotic Stewardship. *European Urology Supplement* 2016; 16:81–87.

Adamus-Bialek W, Zajac E, Parniewski P, Kaca W. Comparison of antibiotic resistance patterns in collections of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis* uropathogenic strains. *Mol Biol Rep*.2013; 40(4):3429-3435.

Abbo LM, Hooton TM. Antimicrobial Stewardship and Urinary Tract Infections. *Antibiotics (Basel)*.2014; 3(2): 174–192.

Kechagia M, Basoulis D, Konstantopoulou S, Dimitriadi D, Gyftopoulou K, Skarmoutsou N, Fakiri EM. Health Benefits of Probiotics: A Review. ISRN Nutr.2013; 2013:1-7.

Uehara S, Monden K, Nomoto K, Seno Y, Kariyama R, Kumon H. A pilot study evaluating the safety and effectiveness of *Lactobacillus* vaginal suppositories in patients with recurrent urinary tract infection. Int J Antimicrob Agents.2006; 28 (1):S30-4.

Raz R, Stamm WE. A controlled trial of intravaginal estriol in postmenopausal women with recurrent urinary tract infections. Send to N Engl J Med.1993; 329(11):753-756.

Jepson RG, Williams G, Craig JC. Cranberries for preventing urinary tract infections. Cochrane Database Syst Rev.2012; 10: 1-8.

Zafriri D, Ofek I, Adar R, Pocino M, Sharon N. Inhibitory activity of cranberry juice on adherence of type 1 and type P fimbriated *Escherichia coli* to eucaryotic cells. Antimicrob Agents Chemother.1989; 33(1):92-98.

Rao X, Huang X, Zhou Z, Lin X. An improvement of the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method for quantitative real-time polymerase chain reaction data analysis. Biostat Bioinforma Biomath.2013; 3(3):71–85.

Koneman EW, Allen SD, Janda WM, Schreckenberger PC, Winn WC. Diagnóstico Microbiológico. Quinta edición. Philadelphia. Panamericana. 2001

Pearson MM, Yep A, Smith SN, Mobley HL. Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the murine urinary tract: virulence and nitrogen assimilation gene expression. Infect Immun. 2011; 79(7):2619-2631.

Sanchez-Villamil J, Tapia-Pastrana G, Navarro-Garcia F. Pathogenic Lifestyles of *E. coli* Pathotypes in a Standardized Epithelial Cell Model Influence Inflammatory Signaling Pathways and Cytokines Secretion. Front Cell Infect Microbiol. 2016; 6: 120-130

Yáñez D, Izquierdo M, Ruiz-Perez F, Nataro JP, Girón JA, Vidal RM, Farfan MJ. The Role of Fibronectin in the Adherence and Inflammatory Response Induced by Enterococcal *Escherichia coli* on Epithelial Cells. Front Cell Infect Microbiol. 2016; 8 (6):166

Amsen D, de Visser KE, Town T. Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. Methods Mol Biol. 2009; 511:107-142

ANEXOS

Anexo 1. Carta de aceptación del bioterio



UNIVERSIDAD AUTONOMA METROPOLITANA
Unidad Xochimilco
División de Ciencias Biológicas y de la Salud

UPEAL • bioterio

DCBS. CICAL.014.14

29 de Enero del 2014.

Dra. Teresita Del Rosario Sainz Espuñes
Sistemas Biológicos
P r e s e n t e.

Por este conducto se le informa que de acuerdo con el "Manual de Organización y Procedimientos del Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio".

El CICAL-UAM-X en su reunión del día 29 de enero del presente año decidió APROBAR, su protocolo de **INVESTIGACIÓN No. 111/2014** titulado:

"Caracterización de factores de virulencia en cepas de bacterias aisladas en México"

Este protocolo tendrá una vigencia de 5 años a partir de la fecha.

Atentamente

M. en C. Rosario C. Vargas Solis
Representante del Departamento
El Hombre y su Ambiente
Presidenta

M. en C. Alejandro Palma Ramos
Representante del Departamento
Sistemas Biológicos

Dra. Yvonne M. Heuze de Icaza
Coordinadora de la UPEAL-Bioterio
Secretaria

Dr. Jaime Amadeo Bustos Martinez
Representante del Departamento
Atención a la Salud

Dr. Miguel Angel Zavala Sánchez
Representante del Departamento
Sistemas Biológicos


MVZ Luis Pedro Moles Cervantes
Representante del Departamento
Producción Agrícola y Animal

MVZ E. Heriberto Quintana Flores
Jefe de Proyecto de la UPEAL-Bioterio



Calzada del Hueso No. 1100, Col. Villa Quietud, Del. Coyoacán, México 04960, D.F.
Tel. 5483-7195 Fax: 5483-7585 e-mail: ymheuze@correo.xoc.uam.mx

Anexo2. Cartas de participación de eventos científicos



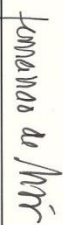


**La Universidad Autónoma Metropolitana
Unidad Xochimilco**

**Otorga la Presente
CONSTANCIA a:**

*Araceli Melendez Avalos, María Elisa
Drago Serrano, Jorge Ismael Castañeda
Sanchez, Alejandro Palma Ramos.*

Por su participación como **EXPOSITOR** del cartel titulado "Análisis de la expresión de TNF- α en un modelo murino de infección causada por bacterias uropatogénicas" con eje temático en **FARMACOGENÉTICA** del 5to Simposio Iberoamericano en Farmacia Social "Dra. Marina Altagracia Martínez", "Farmacoepidemiología, La Farmacia para Grandes Poblaciones".

Realizado en la Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Ciudad de México, los días 21 y 22 de Junio de 2018.

Dr. Fernando de León González
Rector de Unidad

Mtro. Rafael Díaz García
Director de la División de Ciencias
Biológicas y de la Salud

Dr. Karina Sánchez Herrera
Coordinadora de la Licenciatura de
Química Farmacéutica Biológica

Anexo 3. Artículo



Impact Factor	Available
1.311	1956 - 2019
Volumes	Issues
64	379
Articles	Open Access
5,326	56 Articles



Analysis of inflammatory cytokine expression in the urinary tract of BALB/c mice infected with *Proteus (P.) mirabilis* and enteroaggregative *Escherichia (E.) coli* (EAEC) strains

Araceli Melendez-Avalos¹ · Teresita Sainz-Espuñes² · Laura Estela Castrillón-Rivera² · Felipe Mendoza-Pérez² · Alejandro Palma-Ramos² · Jorge Ismael Castañeda-Sánchez² · Elisa Maria Drago-Serrano²

Received: 24 September 2018 / Accepted: 25 April 2019
© Institute of Microbiology, Academy of Sciences of the Czech Republic, v.v.i. 2019

Abstract

This study aimed to analyze the proinflammatory cytokine mRNA expression in the urinary tract of BALB/c mice infected with bacterial strains with uropathogenic potential. Groups of four 6-week-old female BALB/c mice were intraurethrally inoculated with 5×10^7 colony-forming units (CFU) of *P. mirabilis* ATCC29906, EAEC O42, *P. mirabilis* RTX339, or sterile saline (control group) and then sacrificed at 0, 2, 4, 7, or 10 days post-infection (p.i.). Samples were cultured to determine the CFU/mL in urine or CFU/g in the bladders and kidneys. Cytokine expression (tumor necrosis factor (TNF)- α and interleukin (IL)-1 β , -6, and -8) was evaluated in the target organs using real-time PCR and immunohistochemistry; histology was examined with hematoxylin and eosin staining. The results are presented as the means and standard deviations and were compared using one-way ANOVA, with $p < 0.05$ indicating significant differences. Bacteriuria was not detected in the infected groups; bacterial colonization occurred in the target organs at all time points, but was higher in mice infected with EAEC O42 or *P. mirabilis* RTX339 at 7 days p.i. The expression of all cytokine mRNAs was seen, but only the levels of the IL-8 protein increased in situ at 7 days p.i. in the *P. mirabilis* RTX339 and EAEC O42 groups in both organs. Morphological alterations, observed in all of the infected groups, were more prominent in the EAEC O42 and *P. mirabilis* RTX339 groups. The findings provide insights into the uropathogenicity and inflammatory cytokine expression in the urinary tract of mice infected with three previously untested bacterial strains.

Keywords *Proteus mirabilis* · Enteroaggregative *Escherichia coli* · Ascending urinary tract infection · Urinary tract inflammation

Introduction

Urinary tract infections (UTIs) are leading cause of morbidity and hospitalizations among at-risk populations. Clinically, UTIs are categorized as uncomplicated and complicated. Uncomplicated UTIs are commonly detected in immunocompetent women during the fertile period. Complicated UTIs are

observed in long-term catheterized patients and in subjects with structural abnormalities of the urinary tract (Kumar et al. 2015; Tandogdu and Wagenlehner 2016). UTIs refer to infections in any part of the urinary tract that is normally sterile, including the kidneys, ureters, bladder, and urethra. Anatomically, UTIs are classified according to location: cystitis (bladder), pyelonephritis (kidneys), and urosepsis (a

✉ Elisa Maria Drago-Serrano
mdrago@correo.xoc.uam.mx; dragome@yahoo.com

Araceli Melendez-Avalos
arazeli3@gmail.com

Teresita Sainz-Espuñes
netsainz@hotmail.com

Laura Estela Castrillón-Rivera
lrivera@correo.xoc.uam.mx

Felipe Mendoza-Pérez
fmendoza@correo.xoc.uam.mx

Alejandro Palma-Ramos
alpalma@correo.xoc.uam.mx

Jorge Ismael Castañeda-Sánchez
jordyfilm@yahoo.com.mx

¹ Maestría en Ciencias Farmaceuticas, Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, CP 04960 CDMX, Mexico

² Departamento de Sistemas Biologicos, Universidad Autonoma Metropolitana Unidad Xochimilco, Calzada del Hueso No. 1100, CP 04960 CDMX, Mexico

systemic infection from UTI) (Kumar et al. 2015; Tandogdu and Wagenlehner 2016). UTIs are predominantly caused by multidrug-resistant uropathogenic *Escherichia (E.) coli* (UPEC) and *Proteus (P.) mirabilis* strains (Tandogdu and Wagenlehner 2016). Currently, the multidrug-resistant diarrheagenic pathotype of enteroaggregative *E. coli* (EAEC) is recognized as an etiological agent of UTIs (Hebbelstrup Jensen et al. 2014).

A presumable step in EAEC pathogenicity is the colonization of tissue surfaces, which has been shown in vitro in human cancer-epithelial cell lines derived from the bladder and colon infected with EAEC O42 (Boll et al. 2013; Yáñez et al. 2016). Epithelial colonization appears to entail the interaction of EAEC components, such as aggregative adherence fimbria (AAF), with host receptors, such as fibronectin (an extracellular matrix protein) and MUC1 (an epithelial transmembrane mucin) (Boll et al. 2017; Yáñez et al. 2016). During colonization, EAEC components, such as AAF, flagellin, and plasmid-encoded toxin (Pet), trigger the proinflammatory response characterized by interleukin (IL)-1 β , -6, -8, and tumor necrosis factor (TNF)- α production, as well as neutrophil recruitment, as reported in models of epithelial cell infection in vitro (Boll et al. 2012; Harrington et al. 2005; Rocha-Ramírez et al. 2016; Steiner et al. 2000). Mechanisms underlying the generation and expression of proinflammatory mediators appear to involve the activation of signaling pathways triggered by the interaction of EAEC antigens with host receptors, such as toll-like receptors (TLRs), as described in vitro (Goyal et al. 2010; Khan et al. 2004; Sanchez-Villamil et al. 2016).

The uropathogenic enterobacterium *P. mirabilis* has many types of fimbria (mannose-resistant *Proteus*-like (MR/P) fimbriae, *P. mirabilis* fimbriae (PMF), and uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria) that promote colonization and biofilm formation, as evidenced in the murine model of ascending UTI (Jansen et al. 2004; Massad et al. 1994; Pellegrino et al. 2013; Zunino et al. 2003). The ability of *P. mirabilis* to generate biofilms, flagellin, and urease is related to the expression and/or production inflammatory ILs and chemokines, as observed in cultures of infected cells in vitro (Fusco et al. 2017; Umpiérrez et al. 2013) and in the model of ascending UTI in CBA/J mice (Armbruster et al. 2017).

Inflammation is a mechanism of innate immunity that is a double-edged sword, as it is essential for pathogen elimination and exerts deleterious effects on the functional and structural integrity of the urinary tract (Ambite et al. 2016). The inflammatory cytokine response in the urinary tract following *P. mirabilis* infection in CBA/J mice has recently been documented (Armbruster et al. 2017), but data on this response to a UTI caused by EAEC are unavailable. In vivo studies provide substantive insights into the host-pathogen interactions that result in the inflammatory response in the urinary tract induced by pathogenic bacteria. Thus, the goal of this study was to analyze the induction of proinflammatory cytokine

mRNA expression by bacterial strains that have not previously been tested in the model of ascending UTI in BALB/c mice.

Materials and methods

Animals

Six-week-old female BALB/c mice were provided ad libitum access to food (Laboratory Rodent Diet 5001 LabDiet, Saint Louis, MO, USA) and water and maintained in a noiseless room with a 12:12-h light/dark cycle (lights on at 7 am) at 20 °C and relative humidity 55% in the animal facilities of “Unidad de Producción y Experimentación de Animales de Laboratorio, (UPEAL) Universidad Autónoma Metropolitana, Unidad Xochimilco”. The protocol (No. 111) was approved by the “Comité Interno para el Cuidado y Uso de Animales de Laboratorio (CICUAL)” under the Mexican federal regulations for animal experimentation and care (NOM-062-ZOO-1999, Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), Mexico).

Bacterial strains

The bacterial strains assayed in this study included the EAEC O42 prototypic wild strain isolated from a child with watery diarrhea (Hebbelstrup Jensen et al. 2014), *P. mirabilis* RTX339 strain isolated from a hospitalized patient with recurrent UTIs (Gutiérrez-Lucas et al. 2012), and *P. mirabilis* ATCC29906 strain. Bacterial strains were cultured on MacConkey agar (Cat. No. 7112 MCD LAB, Estado de Mexico, Mexico) at 37 °C for 24 h. Bacterial purity was confirmed morphologically by Gram staining (Cat No. 541, Hycel, Mexico City, Mexico) and biochemically using an API20 system (Biomerieux, Ciudad de Mexico, Mexico).

Each bacterial strain was cultured overnight in 50 mL of Luria broth at 37 °C and then centrifuged at 12,100g 4 °C, 20 min (Beckman Coulter Avanti Centrifuge model J-301, Brea, California, USA). The bacterial cells were washed once by suspending the pellets in sterile phosphate buffer (PBS; pH 7.2), centrifuged, and resuspended in sterile PBS as described above. Bacterial suspensions were diluted 10 \times in sterile PBS, and 100 μ L of each 10 \times dilution was plated on MacConkey agar plates and incubated overnight at 37 °C. Isolated colonies were counted to adjust the colony-forming units (CFU) of the bacterial suspensions to 5 \times 10⁷ CFU/mL as described in a previous study (Hagberg et al. 1983). For infections, 5 \times 10⁷ CFU were suspended in 50 μ L of Luria broth.

Protocol for establishing an ascending urinary infection in BALB/c mice

The experimental model of infection in BALB/c mice was established using previously reported protocols (Hagberg et al. 1983; Moayeri et al. 1991), with some modifications. Groups of four 6-week-old BALB/c female mice were anesthetized with an intraperitoneal injection of a mixture containing 10 mg/kg body mass xylazine and 60 mg/kg body mass ketamine (both from Pisa Agropecuaria, Tula Hidalgo, Mexico). Afterwards, the bladder of each mouse was emptied through gentle rubbing and a gel lubricant (Lubrigel®, Diporsa SA, Ciudad de Mexico, Mexico) was applied to the urethral cavity before infection. A sterile catheter (22 Gx1, BD Systems, Sandy, Utah, USA) fitted to a tuberculin syringe was inserted into the urinary tract (7 mm in length) to deliver the bacterial suspension containing 5×10^7 CFU/50 μ L. Gentle massage was applied to mice to enable the contact of bacterial inoculum with the walls of the bladder.

Sample collection

At 0, 2, 4, 7, and 10 days p.i., mice were euthanized with isoflurane before collecting blood samples via cardiac puncture. Sampling was conducted at all time points under sterile conditions and included the collection of urine, bladder, and kidneys (right and left lobules). Urine samples (100–500 μ L) and pre-weighed portions of bladders and kidneys were processed for culture assays. The bladder and kidneys were divided in portions (i) to analyze the proinflammatory cytokine response using quantitative real-time polymerase chain reaction (RT-PCR), (ii) to visualize the presence of inflammatory cytokines (TNF- α , IL-1 β , IL-6, and IL-8) using immunohistochemistry, and (iii) for a histological examination with hematoxylin and eosin staining.

Sample cultures

Organs were homogenized according to infection protocols described for *P. mirabilis* (Armbruster et al. 2017; Jansen et al. 2004) and EAEC (Boll et al. 2013). Briefly, individual portions of bladders and kidneys were completely homogenized in sterile PBS (pH 7.2) using a sterile pestle (Cat No. 47747-358, VWR International, Philadelphia, USA) fitted to a manual homogenizer (Cat No. 47747-370 VWR). The resulting tissue homogenates and urine samples were serially diluted 10 \times with sterile PBS, and 100 μ L of each dilution was plated on MacConkey agar. After an overnight incubation at 37 $^{\circ}$ C, isolated colonies were counted to evaluate CFU/mL in urine or CFU/g in bladders and kidneys.

Real-time polymerase chain reaction

Total RNA was extracted from portions of tissue samples with Tri-reagent® (Cat. No. TR118, Molecular Research Center, Inc., Cincinnati, USA) according to the manufacturer's instructions. Total RNA was used as template for cDNA synthesis with M-MLV reverse transcriptase (Cat. No. M170A, Promega, Madison Michigan, USA).

For quantitative RT-PCR analyses, reaction mixtures for each cytokine assayed and the actin control were prepared in microtubes (Cat. No. 311-08-051, Axygen, Union City, California, USA) containing 1 μ L of cDNAs (from bladder or kidney), 15 μ L of Master Mix (Cat. No. A150306 Ampliqon, Odense M, Denmark), 0.5 μ L each of forward and reverse primers (Table 1), 0.5 μ L of Evagreen (Cat No. 31000, Biotium, Fremont, California, USA), 2.2 μ L of sterile injectable water, and 0.3 μ L of Rox (Cat No. R4526, Sigma Saint Louis, Missouri, USA). The Rox reference dye was included according to the technical instructions to run the RT-PCR assays in a real-time PCR cycler (Rotor Gene 6000, Qiagen, Valencia, California, USA) using the following thermocycling conditions: (1) denaturation at 50 $^{\circ}$ C for 2 min and 95 $^{\circ}$ C for 10 min; (2) 45 cycles of 95 $^{\circ}$ C for 15 s, 60 $^{\circ}$ C for 45 s, and 72 $^{\circ}$ C for 15 s; and (3) a melting curve analysis from 75 to 94 $^{\circ}$ C. Data were analyzed with RotorGene 6000 1.7 software (Qiagen) to determine the threshold cycle (Ct) values. The relative mRNA expression was calculated according to the comparative 2 $^{-\Delta\Delta}$ Ct method. Actin was used as housekeeping gene.

Histological examination

Sections of bladders and kidneys were fixed with formaldehyde, embedded in paraffin, and thereafter transversally cut into 5 mm-thick slices. Slices were stained with hematoxylin and eosin for histological examinations. Other slices were sequentially deparaffinized with xylene, xylene, absolute

Table 1 Primer sequences of cytokines for the quantitative reverse transcriptase polymerase chain reaction

Primers	Sequence
IL-8 forward	5'-TGCATGGACAGTCATCCACC-3'
IL-8 reverse	5'-ATGACAGACCACAGAACGGC-3'
IL-6 forward	5'-CCCCAATTTCCAATGCTCTCC-3'
IL-6 reverse	5'-CGCATCAGGTTTGCCGAGTA-3'
IL-1 β forward	5'-TGCCACCTTTTGACAGTGATG-3'
IL-1 β reverse	5'-TGATGTGCTGCTGCGAGATT-3'
TNF- α forward	5'-GATCGGTCCCCAAAGGGATG-3'
TNF- α reverse	5'-TTTGCTACGACGTGGGCTAC-3'
Actin forward	5'-CTAAGGCCAACGGTGAAAAG-3'
Actin reverse	5'-ACCAGAGGCATACAGGGACA-3'

ethanol, 96% ethanol, and 70% ethanol and water prior to immunohistochemistry.

Immunohistochemistry

Immunohistochemistry assays were performed using the tissue staining kit (CTS006, R&D Systems, Minneapolis, USA) according to the manufacturer's instructions. Tissue samples were incubated for 2 h at 37 °C with primary antibodies against CXR1/IL-8 RA (NBP2-16043, Novus Biologicals, Littleton, Colorado, USA), IL-6 (NB600-1131, Novus Biologicals) IL-1 β (SC-1349, Santa Cruz Biotechnology, Houston, TX, USA), and TNF- α (SC-1250, Santa Cruz Biotechnology). After washes with sterile PBS (pH 7.2), samples were treated with 3-amino-9-ethylcarbazole (AEC) until the desired intensity was observed, after which the samples were counterstained with Mayer's hematoxylin (Cat MFCD00078111, Sigma-Aldrich, Saint Louis, Missouri, USA). Tissue samples were observed at 40 \times magnification with an optical microscope (DM1000, Leica-Biosystems, Wetzlar, Germany).

Statistical analysis

Experiments were repeated twice, unless stated otherwise, and data are reported as the means and standard deviations (SD). Comparisons of data from multiple groups were analyzed using one-way ANOVA with GraphPad Prism 5 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA), and differences among groups detected with a post hoc Tukey test were regarded significant at $p < 0.05$.

Results

Bacterial infection

The evaluation of bladder samples (Fig. 1) revealed higher bacterial counts in mice infected with either EAEC O42 or *P. mirabilis* RTX339 than in the uninfected control on all days p.i. and the *P. mirabilis* ATCC29906-infected group on days 2, 4, and 7 p.i. Significant differences in bacterial loads between EAEC O42 and *P. mirabilis* RTX339 were not observed at any time point after the infection.

In the kidneys (Fig. 1), higher bacterial loads were observed in mice infected with *P. mirabilis* ATCC29906 on day 4 p.i., EAEC O42 on days 2, 7, and 10 p.i., or *P. mirabilis* RTX339 on days 2, 4, and 7 p.i. than in uninfected mice. Comparisons among the infected mice indicated higher bacterial loads in mice infected with either EAEC O42 or *P. mirabilis* RTX339 than in mice infected with *P. mirabilis* ATCC29906 on days 2 and 7 p.i. In mice infected with a *P. mirabilis* strains, bacterial loads were higher than in mice

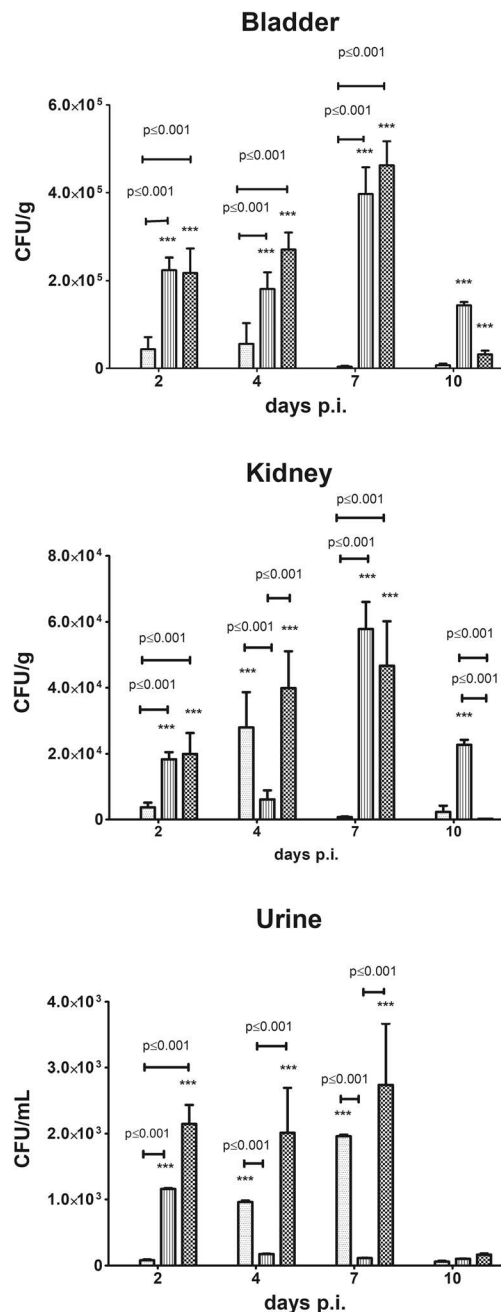


Fig. 1 Colony forming units (CFU) in the bladder, kidney, and urine samples from female BALB/c mice that were \square uninfected or infected with \square *P. mirabilis* ATCC29906, \square EAEC O42 or \square *P. mirabilis* RTX339 and then sacrificed on days 2, 4, 7, and 10 p.i. Data are presented as the means \pm standard deviations (SD). * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ above the columns indicate significant differences compared with the uninfected group, and p values above the bars indicate differences among the infected groups

infected with EAEC O42 on day 4 p.i., whereas mice infected with EAEC O42 presented higher bacterial loads than mice infected with either *P. mirabilis* strain on day 10 p.i. No other differences were observed.

According to the urine bacterial counts (Fig. 1), the urine samples from all groups of infected mice contained less than 1×10^4 CFU/mL, a cutoff for bacteriuria (Hannan et al. 2010). However, compared with the uninfected control group, higher bacterial loads were observed in mice infected with *P. mirabilis* ATCC29906 on days 4 and 7 p.i., EAEC O42 on day 2 p.i., or *P. mirabilis* RTX339 on days 2, 4, and 7 p.i. Comparisons among the infected groups indicated higher bacterial loads in mice infected with either EAEC O42 or *P. mirabilis* RTX339 than in mice infected with *P. mirabilis* ATCC29906 on day 2 p.i., without differences between these strains. Higher bacterial loads were observed in mice infected with the *P. mirabilis* strains than in mice infected with EAEC O42 on days 4 and 7 p.i. without differences between these strains on those days.

Cytokine mRNA expression

Among the assayed groups, higher levels of the TNF- α mRNA were detected in the bladder of mice infected with *P. mirabilis* ATCC29906 on days 2, 4, and 10 p.i. or with *P. mirabilis* RTX339 on day 7 p.i. (Fig. 2). In the kidney, higher relative levels of the TNF- α mRNA were measured in EAEC O42-infected mice on day 7 p.i. or in mice infected with *P. mirabilis* RTX339 on day 10 p.i. (Fig. 2).

In the bladder, higher levels of the IL-1 β mRNA were detected in mice infected with *P. mirabilis* ATCC29906 on day 4 p.i. or with *P. mirabilis* RTX339 on day 7 p.i. than in the other groups (Fig. 3). In the kidney, higher levels of the IL-1 β mRNA were detected in *P. mirabilis* ATCC29906-infected mice on days 4 and 7 p.i. and in the EAEC O42-infected group on day 10 p.i. than in the other groups (Fig. 3).

An analysis of bladder samples from all groups revealed higher levels of the IL-8 mRNA in mice infected with *P. mirabilis* RTX339 on day 7 p.i. or with EAEC O42 on day 10 p.i. (Fig. 4). In the kidneys, higher levels of the IL-8 mRNA were measured in mice infected with *P. mirabilis* RTX339 on day 2 p.i. and with EAEC O42 on day 10 p.i. than in the other groups. Finally, in groups infected with either EAEC O42 or *P. mirabilis* RTX339, higher levels of the IL-8 mRNA were detected on day 7 p.i. than in the other groups, without differences between groups (Fig. 4).

Comparisons among all groups revealed higher expression of the IL-6 mRNA in the bladder tissues from mice infected with EAEC O42 on days 2, 4, and 10 p.i. or with *P. mirabilis* RTX339 on day 7 p.i. (Fig. 5). In the kidneys, higher levels of the IL-6 mRNA were detected in mice infected with EAEC O42 on days 2, 4, and 10 p.i. than in the other groups. Moreover, in mice infected with either EAEC O42 or *P. mirabilis* RTX339, higher expression of the IL-6 mRNA was detected on day 7 p.i. than in the other groups (Fig. 5).

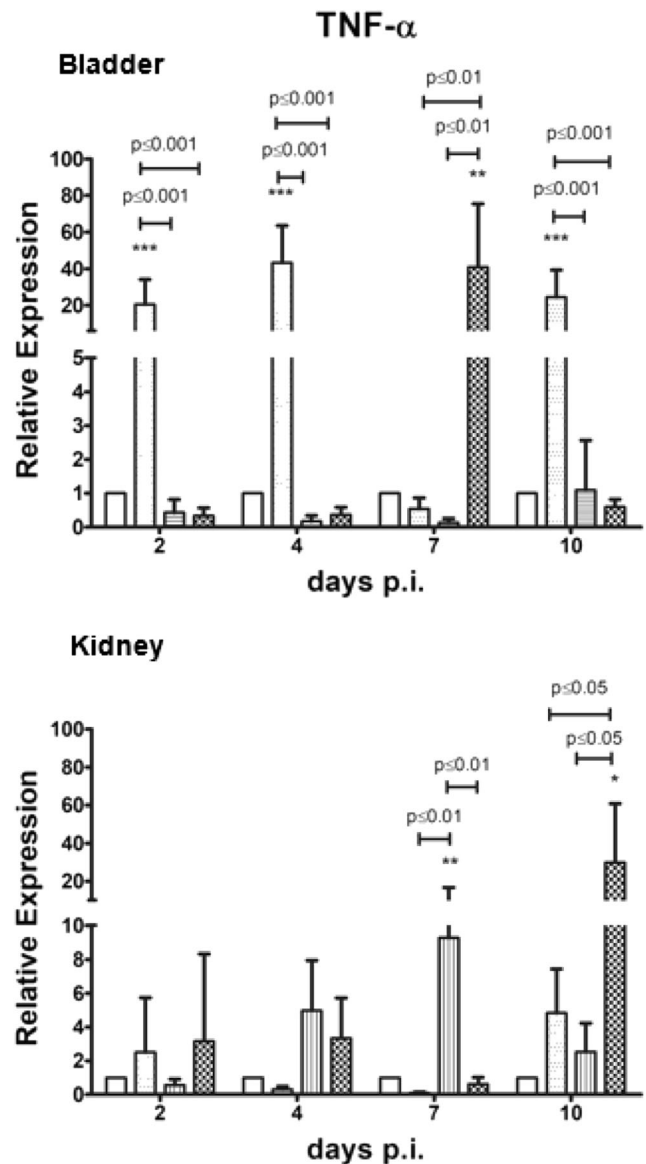


Fig. 2 Relative expression of the TNF- α mRNA in bladder and kidney samples from female BALB/c mice that were \square uninfected or infected with \dots *P. mirabilis* ATCC29906, |||| EAEC O42 or ■ *P. mirabilis* RTX339 and sacrificed on days 2, 4, 7, and 10 p.i. Data are presented as the means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ above the columns indicate significant differences compared with the uninfected group and p values above the bars indicate differences among the infected groups

Immunohistochemical staining for cytokines

The expression of proinflammatory cytokines was assessed using immunohistochemistry at all time points. However, IL-8 was only detected on day 7 p.i. among all the cytokines evaluated. IL-8 staining was prominently visualized in both the bladders and kidneys of mice infected with either *P. mirabilis* RTX339 or EAEC O42. In contrast, faint IL-8 staining was only detected in the bladder of the *P. mirabilis* ATCC29906-infected group (Fig. 6).

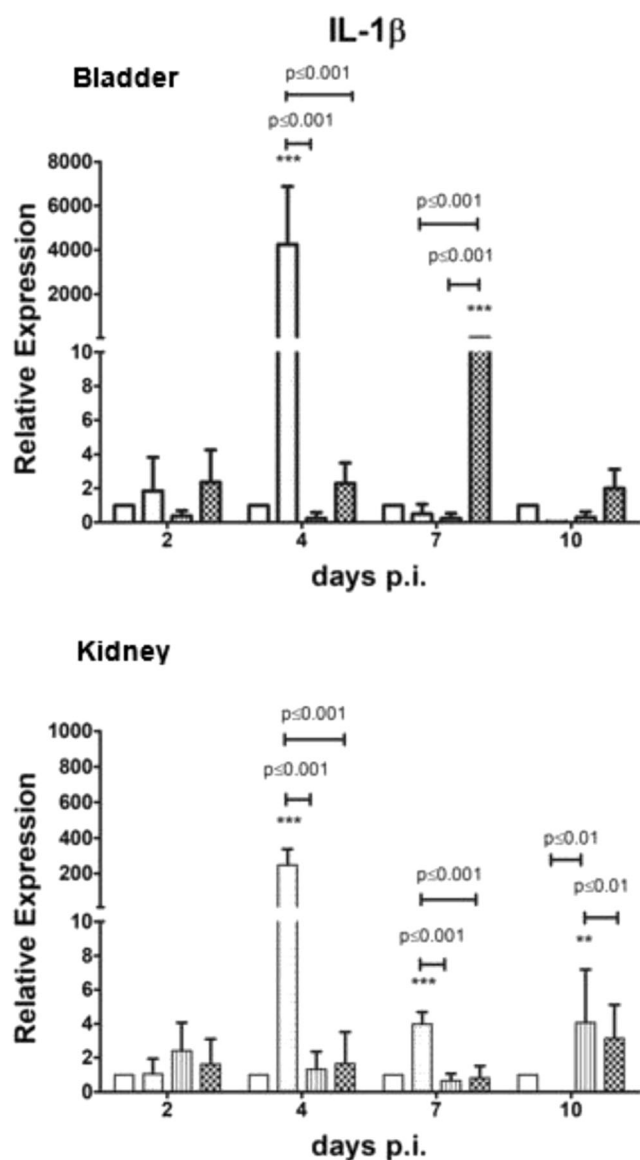


Fig. 3 Relative expression of the IL-1 β mRNA in the bladder and kidney samples from female BALB/c mice that were \square uninfected or infected with \square *P. mirabilis* ATCC29906, \square EAEC O42 or \square *P. mirabilis* RTX339 and then sacrificed on days 2, 4, 7, and 10 p.i. Data are presented as the means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ above the columns indicate significant differences compared with the uninfected group, and p values above the bars indicate differences among the infected groups

Histological examination

Histological examinations performed on day 7 p.i. indicated that all bacterial strains altered the normal architecture of the bladder compared with the uninfected group; prominent morphological changes were observed in tissues infected with EAEC O42 and *P. mirabilis* RTX339 compared with *P. mirabilis* ATCC29906. In the kidneys, a prominent loss of morphological integrity was observed following the EAEC O42 and *P. mirabilis* RTX339 infections, while swelling and

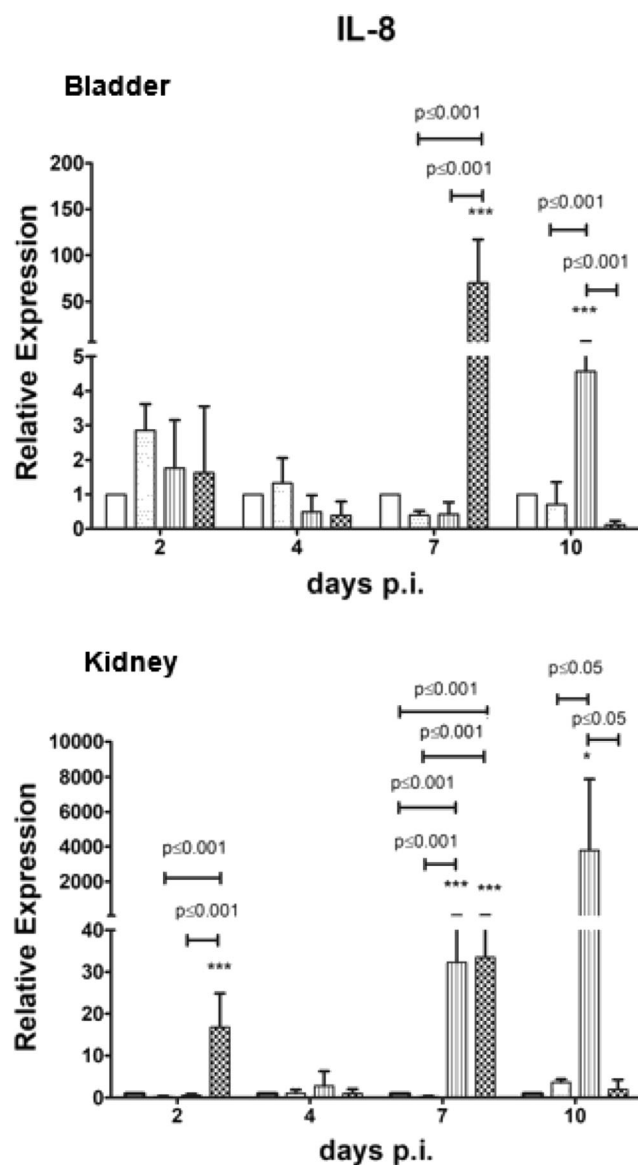


Fig. 4 Relative expression of the IL-8 mRNA in the bladder and kidney samples from female BALB/c mice that were \square uninfected or infected with \square *P. mirabilis* ATCC29906, \square EAEC O42 or \square *P. mirabilis* RTX339 and sacrificed on days 2, 4, 7, and 10 p.i. Data are presented as the means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ above the columns indicate significant differences compared with the uninfected group and p values above the bars indicate differences among the infected groups

an enlargement of the renal tubules was observed in mice infected with *P. mirabilis* ATCC 29906 (Fig. 6).

Discussion

The inflammatory cytokine response has been described in the urinary tract following a *P. mirabilis* infection in vivo (Armbruster et al. 2017), whereas this response to an EAEC infection has not yet been addressed. To our knowledge, this

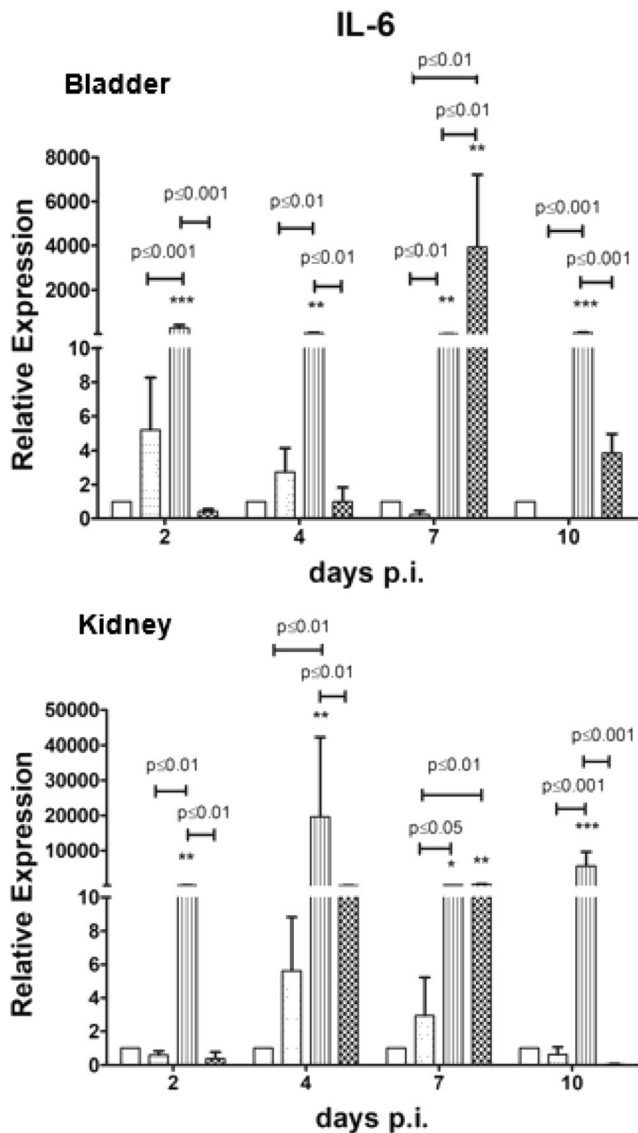


Fig. 5 Relative expression of the IL-6 mRNA in the bladders and kidneys from female BALB/c mice that were \square uninfected or infected with \dots *P. mirabilis* ATCC29906, |||| EAEC O42 or ■ *P. mirabilis* RTX339 and sacrificed on days 2, 4, 7, and 10 p.i. Data are presented as the means \pm SD. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, and *** $p < 0.001$ above the columns indicate significant differences compared with the uninfected group and p values above the bars indicate differences among the infected groups

study is the first to analyze the bacterial colonization and mRNA expression of proinflammatory cytokines in the urinary tracts of mice infected with three bacterial strains that were previously untested in the model of ascending UTIs.

An overall analysis of the findings did not reveal bacteriuria in mice infected with any bacterial strain, although bacterial loads were counted in the bladder and/or kidneys as analyzed target tissues. Bacterial urinary clearance may result from excretion and/or phagocytosis, as suggested in a previous study (Hagberg et al. 1983). In the present study, the *P. mirabilis* RTX339 strain isolated from patients with

recurrent UTIs was tested. Therefore, the bladder acts a reservoir for uropathogenic bacteria causing chronic infections that are intermittently cleared via the urine without causing bacteriuria (Schilling et al. 2002).

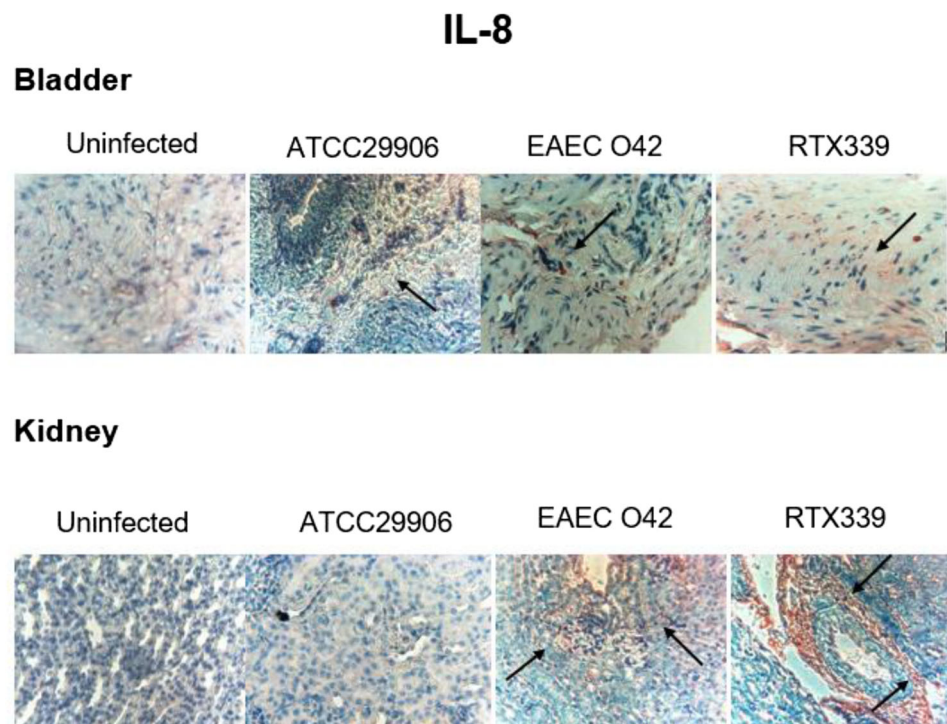
In the present study, bacterial strains showed a divergent pattern of persistence in the bladder and kidney at each time point, suggesting their ability to adapt and proliferate, evidencing their uropathogenic capacities. In addition, based on the data, the contributions of unknown components underlie the bacterial uropathogenicity. Virulence factors do not always determine the bacterial persistence, as documented in assays of infection with EAEC mutant strains in vitro (Boll et al. 2013) and in murine models of opportunistic wild-type *P. mirabilis* strains (Pearson and Mobley 2007; Sosa et al. 2006).

Unlike the experimental settings of infection using EAEC mutant strains in OF-1 outbred mice (Boll et al. 2013) or *P. mirabilis* in inbred CBA (Armbruster et al. 2017; Jansen et al. 2004; Massad et al. 1994) or outbred CD-1 mouse strains (Umpiérrez et al. 2013; Zunino et al. 2003), the present study was conducted in BALB/c inbred mice and low bacterial loads were observed in the organs from mice infected with each of the bacterial strains tested. The low extent of bacterial colonization may result from various factors, such as the (i) modalities of infection via the transurethral or intravesicular route, (ii) volume and CFU of the bacterial inoculum (Hagberg et al. 1983; Moayeri et al. 1991), and (iii) the genetic background that partially accounts for the low persistence of UTIs in BALB/c mice (Hagberg et al. 1983; Hannan et al. 2010).

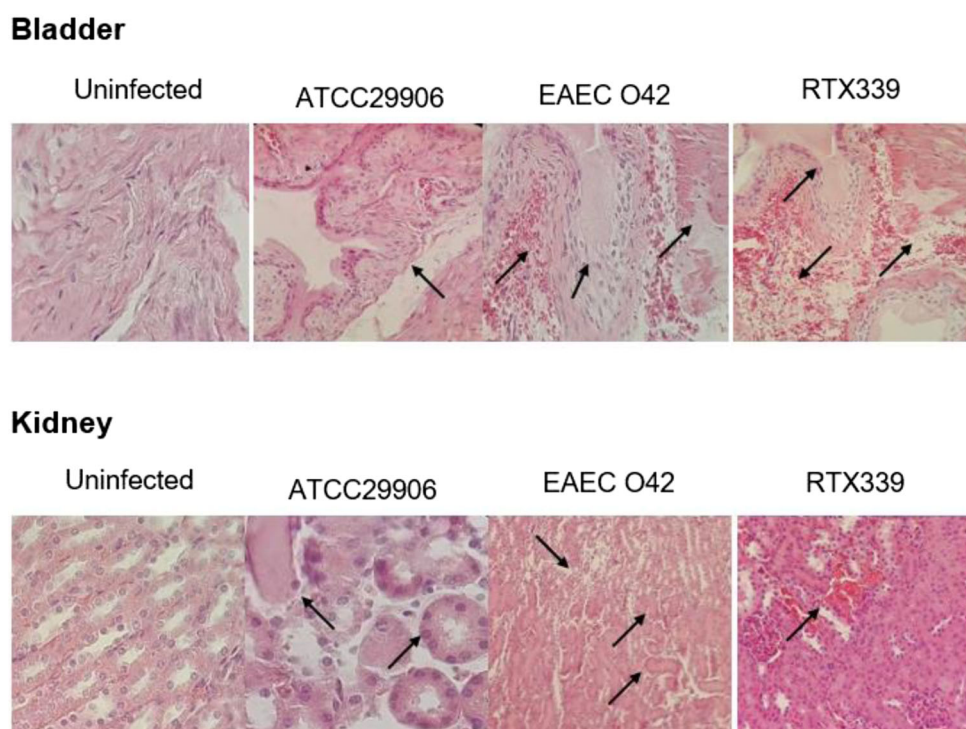
The overall analysis revealed a divergent response between the cytokine mRNA expression at each time point and the bacterial loads in target organs. These findings may result from the molecular mechanisms that chronologically control the constitutive or induced expression of mRNA transcripts encoding bacterial products; the latter underlie the activation of signaling pathways leading to the expression of cytokine transcripts at different time points, as documented in experimental models of infection with EAEC and *P. mirabilis* (Pearson et al. 2011; Sanchez-Villamil et al. 2016; Yáñez et al. 2016). Synchronization of the molecular mechanisms that sense the host milieu is critical for bacterial survival and multiplication, as described in a murine model of UTIs with *P. mirabilis* (Pearson et al. 2011).

With the exception of IL-8 levels on day 7 p.i., concordance between the relative mRNA levels of cytokines and their immunohistochemical detection was not found. A lack of concordance between mRNA expression and the tissue localization of cytokines such as TNF- α has been observed in other experimental settings (Rugo et al. 1992). Apparent discrepancies may reflect independent signaling pathways that induce the expression of each cytokine but may also result from technical issues. Quantitative RT-PCR is a highly sensitive method for detecting transcripts in a wide array of cells;

Fig. 6 Image of the immunohistochemical staining for IL-8 (upper panel) and histological examination using hematoxylin and eosin staining (bottom panel) in bladder and kidney samples from female BALB/c mice that were uninfected or infected with *P. mirabilis* ATCC29906, EAEC O42, or *P. mirabilis* RTX339 and sacrificed on day 7 p.i. In the upper panel, arrows indicate the in situ location of the IL-8 protein. In the bottom panel, arrows in the bladder depict tissue deformation and the presence of erythrocytes; in the kidney, arrows highlight renal tubule swelling (*P. mirabilis* ATCC 29906), tissue deformation (EAEC O42), and the presence of damaged erythrocytes (*P. mirabilis* RTX339). Microscopic images were captured at 40× magnification



Hematoxylin-Eosin



however, the protein products are not detected when very few cells are available (Amsen et al. 2009).

In general terms, the expression of the IL-8 mRNA on day 7 p.i. matched the bacterial loads of EAEC O42 and

P. mirabilis RTX339 in both target organs. Moreover, IL-8 expression was concordant with the visualization of the IL-8 protein in the bladders and kidneys of mice infected with *P. mirabilis* RTX339 and EAEC O42. Similar to the results

of this assay, bacterial loads and/or inflammatory responses in the bladder and/or kidney have previously been observed at 7 days p.i (Umpiérrez et al. 2013).

Upregulation of the IL-8 mRNA/protein has been confirmed in vitro and is associated with some enteroaggregative EAEC components, such as, fimbria, flagellin, and plasmid-encoded toxin (Pet) (Harrington et al. 2005; Rocha-Ramírez et al. 2016; Steiner et al. 2000). IL-8 plays a key role in the pathogenicity of EAEC by promoting the recruitment of phagocytic cells and, ultimately, epithelial damage (Rocha-Ramírez et al. 2016). *P. mirabilis* has been shown to induce the production of proinflammatory biomarkers, including cytokines and chemokines (CCL20, CXCL20, and CCL2), as well as bladder leukocyte recruitment in vivo (Armbruster et al. 2017; Umpiérrez et al. 2013). Furthermore, the increased production of IL-8 induced by *P. mirabilis* is associated with a lack of mobility and a retarded capacity to generate biofilms in vitro (Fusco et al. 2017).

Histological examinations with hematoxylin and eosin staining indicated that the *P. mirabilis* RTX339 strain displayed a greater ability than *P. mirabilis* ATCC29906 to cause substantial morphological changes and damage in the bladder and kidney. These phenotypic traits may result from virulence factors acquired from different isolates and may reveal the opportunistic nature of *P. mirabilis* isolates (Sosa et al. 2006). Like *P. mirabilis* RTX339, EAEC O42 caused substantial morphological alterations in both target organs. These findings suggest a potential role for EAEC O42 as a causal agent of UTIs, although its preferred niche is the intestinal tract (Hebbelstrup Jensen et al. 2014).

In conclusion, *P. mirabilis* ATCC29906, EAEC O42, and *P. mirabilis* RTX339 activated IL-8 signaling and induced damage in the bladder and kidney on day 7 p.i. The differences in the responses of all of the parameters may result from phenotypic virulence traits and from their interactions with the host inflammatory response. Although BALB/c mice are a useful model for assessing the pathogenicity of enteropathogenic strains (Saha et al. 2013), the current model of ascending UTIs in BALB/c mice was valuable for examining the uropathogenicity of the three bacterial strains. These findings may be an experimental reference for clinical studies intended to ascertain the potential diagnostic applications of urinary biomarkers of inflammation for bacterial strains commonly associated with enteric diarrhea (Nunes et al. 2017).

Acknowledgements The authors thank Dr. Julia Perez Ramos (Lab Biología Experimental UAMX) and Dr. Osvaldo Lopez (Lab Histopatología UAMX) for allowing us to use a rotor-Gene 6000 and microtome, respectively.

Authors' contributions Melendez-Avalos Araceli: performed the experiments, analyzed the data, and designed the figures.

Sainz Espuñes Teresita: conceived the study.

Castrillón-Rivera Laura Estela: contributed to the bacterial count assays.

Mendoza-Pérez Felipe: provided advice on the experiments and processed the data.

Palma-Ramos Alejandro: provided advice on the immunohistochemistry assay.

Castañeda-Sánchez Jorge Ismael: primer design and provided advice on the RT-PCR assay.

Drago-Serrano Maria Elisa: wrote the paper.

Funding information Araceli Melendez Avalos (Fellowship No. 600558) was provided financial support by the Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) during her studies in the program of Maestría en Ciencias Farmacéuticas (MCF), Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Xochimilco (UAMX).

Compliance with ethical standards

Conflict of interest The authors declare that they have no conflict of interest.

References

- Ambite I, Nagy K, Godaly G, Puthia M, Wullt B, Svanborg C (2016) Susceptibility to urinary tract infection: benefits and hazards of the antibacterial host response. *Microbiol Spectr* 4(3). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.UTI-0019-2014>
- Amsen D, de Visser KE, Town T (2009) Approaches to determine expression of inflammatory cytokines. *Methods Mol Biol* 511:107–142. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-447-6_5
- Armbruster CE, Smith SN, Johnson AO, DeOrnellas V, Eaton KA, Yep A, Mody L, Wu W, Mobley HL (2017) The pathogenic potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by other Uropathogens during Polymicrobial urinary tract infection. *Infect Immun* 85(2):e00808–e00816. <https://doi.org/10.1128/IAI.00808-16>
- Boll EJ, Struve C, Sander A, Demma Z, Nataro JP, McCormick BA, Krogfelt KA (2012) The fimbriae of enteroaggregative *Escherichia coli* induce epithelial inflammation in vitro and in a human intestinal xenograft model. *J Infect Dis* 206(5):714–722. <https://doi.org/10.1093/infdis/jis417>
- Boll EJ, Struve C, Boisen N, Olesen B, Stahlhut SG, Krogfelt KA (2013) Role of enteroaggregative *Escherichia coli* virulence factors in uropathogenesis. *Infect Immun* 81(4):1164–1171. <https://doi.org/10.1128/IAI.01376-12>
- Boll EJ, Ayala-Lujan J, Szabady RL, Louissaint C, Smith RZ, Krogfelt KA, Nataro JP, Ruiz-Perez F, McCormick BA (2017) Enteroaggregative *Escherichia coli* adherence fimbriae drive inflammatory cell recruitment via interactions with epithelial MUC1. *MBio* 8(3):e00717–e00717. <https://doi.org/10.1128/mBio.00717-17>
- Fusco A, Coretti L, Savio V, Buommino E, Lembo F, Donnarumma G (2017) Biofilm formation and immunomodulatory activity of *Proteus mirabilis* clinically isolated strains. *Int J Mol Sci* 18(2):E414. <https://doi.org/10.3390/ijms18020414>
- Goyal A, Konar M, Setia A, Narang A, Ghosh S (2010) Galactose specific adhesin of enteroaggregative *E. coli* induces IL-8 secretion via activation of MAPK and STAT-3 in INT-407 cells. *Biochim Biophys Acta* 1800(6):574–579. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2010.03.009>
- Gutiérrez-Lucas LR, Mendoza-Hernández G, González-Pedrajo B, Eslava-Campos C, Bustos-Martínez JA, Sainz-Espuñes T (2012) Identification of the autotransporter pet toxin in *Proteus mirabilis* strain isolated from patients with urinary tract infections. *Adv Biol Chem* 2:283–290. <https://doi.org/10.4236/abc.2012.23036>

- Hagberg L, Engberg I, Freter R, Lam J, Olling S, Svanborg Edén C (1983) Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. *Infect Immun* 40(1):273–283
- Hannan TJ, Mysorekar IU, Hung CS, Isaacson-Schmid ML, Hultgren SJ (2010) Early severe inflammatory responses to uropathogenic *E. coli* predispose to chronic and recurrent urinary tract infection. *PLoS Pathog* 6(8):e1001042. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001042>
- Harrington SM, Strauman MC, Abe CM, Nataro JP (2005) Aggregative adherence fimbriae contribute to the inflammatory response of epithelial cells infected with enteroaggregative *Escherichia coli*. *Cell Microbiol* 7(11):1565–1578
- Hebbelstrup Jensen B, Olsen KE, Struve C, Kroghfelt KA, Petersen AM (2014) Epidemiology and clinical manifestations of enteroaggregative *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev* 27(3):614–630. <https://doi.org/10.1128/CMR.00112-13>
- Jansen AM, Locketell V, Johnson DE, Mobley HL (2004) Mannose-resistant *Proteus*-like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. *Infect Immun* 72(12):7294–7305
- Khan MA, Kang J, Steiner TS (2004) Enteroaggregative *Escherichia coli* flagellin-induced interleukin-8 secretion requires toll-like receptor 5-dependent p38 MAP kinase activation. *Immunology* 112(4):651–660
- Kumar S, Dave A, Wolf B, Lerma EV (2015) Urinary tract infections. *Dis Mon* 61(2):45–59
- Massad G, Locketell CV, Johnson DE, Mobley HL (1994) *Proteus mirabilis* fimbriae: construction of an isogenic pmfA mutant and analysis of virulence in a CBA mouse model of ascending urinary tract infection. *Infect Immun* 62(2):536–542
- Moayeri N, Collins CM, O'Hanley P (1991) Efficacy of a *Proteus mirabilis* outer membrane protein vaccine in preventing experimental *Proteus* pyelonephritis in a BALB/c mouse model. *Infect Immun* 59(10):3778–3786
- Nunes KO, Santos ACP, Bando SY, Silva RM, Gomes TAT, Elias WP (2017) Enteroaggregative *Escherichia coli* with uropathogenic characteristics are present in feces of diarrheic and healthy children. *Pathog Dis* 75(8). <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx106>
- Pearson MM, Mobley HL (2007) The type III secretion system of *Proteus mirabilis* HI4320 does not contribute to virulence in the mouse model of ascending urinary tract infection. *J Med Microbiol* 56(Pt 10):1277–1283
- Pearson MM, Yep A, Smith SN, Mobley HL (2011) Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the murine urinary tract: virulence and nitrogen assimilation gene expression. *Infect Immun* 79(7):2619–2631. <https://doi.org/10.1128/IAI.05152-11>
- Pellegrino R, Scavone P, Umpiérrez A, Maskell DJ, Zunino P (2013) *Proteus mirabilis* uropathelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *Pathog Dis* 67(2):104–107. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12027>
- Rocha-Ramírez LM, Hernández-Chiñas U, Baños-Rojas D, Xicohtencatl-Cortés J, Chávez-Berrocal ME, Rico-Rosillo G, Kretschmer R, Eslava CA (2016) Pet serine protease from enteroaggregative *Escherichia coli* stimulates the inflammatory response activating human macrophages. *BMC Microbiol* 16(1):158. <https://doi.org/10.1186/s12866-016-0775-7>
- Rugo HS, O'Hanley P, Bishop AG, Pearce MK, Abrams JS, Howard M, O'Garra A (1992) Local cytokine production in a murine model of *Escherichia coli* pyelonephritis. *J Clin Invest* 89(3):1032–1039
- Saha DR, Guin S, Krishnan R, Nag D, Koley H, Shinoda S, Ramamurthy T (2013) Inflammatory diarrhea due to enteroaggregative *Escherichia coli*: evidence from clinical and mice model studies. *Gut Pathog* 5(1):36. <https://doi.org/10.1186/1757-4749-5-36>
- Sanchez-Villamil J, Tapia-Pastrana G, Navarro-García F (2016) Pathogenic Lifestyles of *E. coli* Pathotypes in a Standardized Epithelial Cell Model Influence Inflammatory Signaling Pathways and Cytokines Secretion. *Front Cell Infect Microbiol* 6:120
- Schilling JD, Lorenz RG, Hultgren SJ (2002) Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole on recurrent bacteriuria and bacterial persistence in mice infected with uropathogenic *Escherichia coli*. *Infect Immun* 70(12):7042–7049
- Sosa V, Schlapp G, Zunino P (2006) *Proteus mirabilis* isolates of different origins do not show correlation with virulence attributes and can colonize the urinary tract of mice. *Microbiology* 152(Pt 7):2149–2157
- Steiner TS, Nataro JP, Poteet-Smith CE, Smith JA, Guerrant RL (2000) Enteroaggregative *Escherichia coli* expresses a novel flagellin that causes IL-8 release from intestinal epithelial cells. *J Clin Invest* 105(12):1769–1777
- Tandogdu Z, Wagenlehner FM (2016) Global epidemiology of urinary tract infections. *Curr Opin Infect Dis* 29(1):73–79. <https://doi.org/10.1097/QCO.0000000000000228>
- Umpiérrez A, Scavone P, Romanin D, Marqués JM, Chabalgoity JA, Rumbo M, Zunino P (2013) Innate immune responses to *Proteus mirabilis* flagellin in the urinary tract. *Microbes Infect* 15(10–11):688–696. <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2013.06.007>
- Yáñez D, Izquierdo M, Ruiz-Perez F, Nataro JP, Girón JA, Vidal RM, Farfan MJ (2016) The role of fibronectin in the adherence and inflammatory response induced by Enteroaggregative *Escherichia coli* on epithelial cells. *Front Cell Infect Microbiol* 6:166. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2016.00166>
- Zunino P, Sosa V, Allen AG, Preston A, Schlapp G, Maskell DJ (2003) *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. *Microbiology* 149(Pt 11):3231–3237

Publisher's note Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.