



BENEMÉRITA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE PUEBLA

Facultad de Medicina

Licenciatura en Biomedicina

Eje de Microbiología



“Determinación de sistemas de captación de hierro, de la adhesina de colonización entérica y del filogrupo G en una colección de *E. coli* aislada de infección de tracto urinario”

TESIS


QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:

LICENCIADO EN BIOMEDICINA

PRESENTA:

Héctor Akio Watanabe Rodríguez

DIRECTORA DE TESIS:

D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández 

PUEBLA, PUE.

JULIO, 2025

AGRADECIMIENTOS ACADÉMICOS

A la D.C. Margarita María de la Paz Arenas Hernández, por incluirme en el grupo de trabajo del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos (LBME) y confiar en mí para llevar a cabo este proyecto, gracias a su dirección, acompañamiento y conocimientos compartidos fue posible su realización.

A la D.C. Lucía Soto Urzúa y el D.C. Luis Javier Martínez por su apoyo para las revisiones críticas del proyecto. Agradezco su paciencia y disposición para solucionar todas mis dudas.

A la Vicerrectoría de Investigación y Estudios de Posgrado, por el apoyo financiero por parte de la beca “Haciendo ciencia en la BUAP”.

A la Facultad de Medicina por su apoyo financiero para permitirme presentar mi trabajo “Determinación de sideróforos en un cepario de *Escherichia coli*” en el Congreso Nacional de la Asociación Mexicana de Infectología y Microbiología Clínica.

AGRADECIMIENTOS PERSONALES

A mi familia, a mi madre, mi padre, mi hermana y mi abuela. Gracias por apoyarme a lo largo de todo este camino, sin su apoyo no hubiera llegado hasta aquí. Ha habido muchos retos en el camino y no hubiera podido llegar siquiera a la mitad de no haber sido por todos sus sacrificios, los quiero mucho.

A mis compañeros de laboratorio: Gracias Mon por acompañarme desde el primer momento en que pisé el laboratorio, por siempre tener la disponibilidad para ayudarme a resolver mis dudas y compartirme un poco de tus conocimientos. A Lucero por estar ahí siempre que lo necesitaba y escuchar mis quejas cuando los experimentos me frustraban. A Judith que aunque no convivimos por mucho tiempo disfruté cada plática y broma que tuvimos. A Lety por tener la mejor actitud siempre que trabajamos juntos, es admirable tu dedicación y capacidad para con la investigación. A Liz porque nunca escuché un “no” salir de tu boca cada que te pedía un favor y ser la mejor organizatriz de convivios. A Majo por cada sesión de chisme de la que fuimos parte, la caminata saliendo del laboratorio siempre fue más agradable conversando contigo. A Roberto por siempre animar cada día del laboratorio con el simple hecho de estar, las bromas nunca faltaron a tu lado y me ayudabas a levantarme los días que no me sentía del todo bien. A Irina por los juegos de “adivina quien...” y siempre estar dispuesta a escucharme (trauma bond), gracias por abrir tu corazón conmigo. Cada una de nuestras interacciones, hasta las que podrían parecer insignificantes, las llevaré por siempre en mis recuerdos y a donde sea que vaya llevaré a cada uno de ustedes, los quiero.

A Rebeca. Mi confidente y mejor amiga incluso desde antes de regresar a actividades presenciales, has estado ahí de primera mano en mis peores momentos y en los mejores. Siempre fuiste y sigues siendo esa luz en mi vida cuando más lo necesito, hemos cambiado y crecido tanto y no me cansaré de agradecerle a la vida por cruzar nuestros caminos. Estoy seguro de que dejarás una gran huella en el mundo de la ciencia, pero incluso ganando un premio Nobel, esa huella no estaría cerca de la marca que dejas en mi vida, te quiero mucho y se que llegarás muy muy lejos, tiembla ciencia, la D.C. máxima va en camino.

A Damián. Siempre has estado ahí para escucharme y desahogarme las veces que fuera necesario. Cada vez que me caía, tu compañía me daba la fuerza necesaria para levantarme y un abrazo, una llamada o un mensaje es todo lo que hacía falta para animarme. Admiro mucho la dedicación y pasión que le pones a las cosas que te gustan y me inspiras día con día a ser la mejor versión que puedo ser. Nada es seguro en esta vida, pero sí sé que pase lo que pase estarás ahí para mí, así como yo siempre estaré para ti todo el tiempo que la vida me permita, te amo y no creo que eso cambie como mínimo, de aquí a que me muera.

¡Sí se pudo!

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	6
1.1 Generalidades de infección de tracto urinario	6
1.2 Adhesinas	9
1.3 Sistemas de captación de hierro	17
1.4 Metabolismo de hierro	28
1.5 Patogénesis de UPEC en una infección de tracto urinario	29
1.6 Signos y síntomas de ITU por UPEC	33
1.7 Tratamiento	33
2. ANTECEDENTES	33
2.1 Antecedentes directos	35
3. JUSTIFICACIÓN	36
4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	37
5. OBJETIVOS	38
6.1 Objetivo general	38
6.2 Objetivos específicos	38
6. METODOLOGÍA	39
6.1 Material biológico	39
6.2 Preparación de caldo LB	39
6.3 Determinación fenotípica de sideróforos	39
6.4 Extracción genómica por lisis alcalina	40
6.5 Extracción genómica por caldo hervido	40
6.6 Diseño de oligonucleótidos	40
6.7 Estandarización de PCR	40
6.8 Determinación de genes por PCR en DNA genómico del cepario ...	41
6.9 Electroforesis en gel de agarosa	42
6.10 Purificación de DNA	42
7. ESQUEMA DE TRABAJO	43

8. RESULTADOS	44
8.1 Estandarización de la amplificación del gen <i>ybgD</i> en cepas UPEC del filogrupo B2 y F.	44
8.2 Determinación de los genes de la adhesina <i>uc/D</i> y de la subunidad principal <i>uc/A</i> en cepario de mujeres	46
8.3 Determinación fenotípica de sideróforos	48
8.4 Diseño de oligonucleótidos de <i>irp2</i>, <i>iroN</i>, <i>sitA</i> y <i>tonB</i> y determinación del entorno genético	50
8.5 Determinación de los genes que codifican para sistemas de captación de hierro en un cepario de <i>E. coli</i> 2015-2016 obtenido de varones y mujeres cursando con ITU	54
8.5.1 Estandarización de la amplificación de <i>entF</i> que codifica para la péptido sintasa no ribosomal de enterobactina	55
8.5.2 Determinación del gen de síntesis de enterobactina <i>entF</i> por PCR en cepario de varones y mujeres	55
8.5.3 Estandarización de la amplificación por PCR del transportador <i>tonB</i> y el importador <i>sitA</i>	56
8.5.4 Determinación de los genes <i>tonB/sitA</i> por PCR en cepario de varones y mujeres	57
8.5.5 Estandarización de la amplificación del gen receptor de salmoquelina <i>iroN</i>	58
8.5.6 Determinación del receptor de salmoquelina <i>iroN</i> por PCR en el cepario de varones y mujeres	59
8.5.7 Estandarización de la amplificación del gen de síntesis de yersiniabactina <i>irp2</i>	59
8.5.8 Determinación del gen <i>irp2</i> por PCR en el cepario de varones y mujeres	60
8.6 Análisis de resultados de genes de sideróforos	61
8.7 Comparación entre fenotipo y genotipo de genes de síntesis de sideróforos (<i>iucD*</i>, <i>entF</i> e <i>irp2</i>)	66
9. DISCUSIÓN	67
10. CONCLUSIONES	71
11. PERSPECTIVAS	72
12. ANEXOS	73
13. BIBLIOGRAFÍA	88

1. INTRODUCCIÓN

1.1 GENERALIDADES DE INFECCION DE TRACTO URINARIO

El criterio de Kass es un parámetro que considera bacteruria cuando una muestra de orina tiene 100,000 bacterias/ml, lo que indica una infección de tracto urinario (ITU). Tomando en cuenta el cuadro clínico y los factores de riesgo del paciente se pueden clasificar como complicadas, cuando el hospedero tiene alteraciones neurológicas, inmunológicas o estructurales del sistema urinario, exacerbando el daño que sufre por el o los agentes causales de la enfermedad; cuando no se encuentran este tipo de condiciones se consideran no complicadas, es decir, el tracto urinario del paciente no tiene anomalías (Zhou *et al.*, 2023a).

La ITU se puede presentar en más de una ocasión debido a la diversidad de microorganismos que pueden causar dicha infección, a las características de virulencia del agente etiológico, al incremento de la resistencia bacteriana ante terapias antimicrobianas, a la susceptibilidad del hospedero y a las condiciones ambientales, si esto ocurre en un periodo no mayor a seis meses o bien, se diagnostican tres procesos infecciosos en un año, se habla de una ITU recurrente (ITUr) (Epp *et al.*, 2010). El principal agente etiológico a nivel mundial de las ITU es *Escherichia coli* uropatógena (UPEC), seguido por *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis* y *Proteus mirabilis* (Flores-Mireles *et al.*, 2015)

Cuando el patógeno llega a la uretra, la progresión de la enfermedad depende del número de microorganismos inoculados y las defensas del hospedero. A partir de aquí puede ascender a la vejiga y comenzar a colonizarla, causando una infección de vías inferiores también llamada cistitis; el proceso infeccioso no está limitado a solo una zona, puede ascender por los uréteres hasta el parénquima renal y comenzar una infección de vías superiores o pielonefritis. Cuando estas infecciones se diseminan por el torrente sanguíneo se puede llegar a una urosepsis, un estado grave de infección sistémica que puede ocasionar un choque séptico, condición de disfunción orgánica debido a una respuesta inmune fulminante ocasionada por la complicación de un proceso infeccioso (Agarwal *et al.*, 2012a)

E. coli es un bacilo Gram negativo anaerobio facultativo perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, es una bacteria incapaz de formar esporas, gracias a flagelos peritricos puede ser móvil, metabólicamente son catalasa positivos y oxidasa negativos. Este microorganismo mide aproximadamente 1.1-1.5 μm de ancho por 2-6 μm de largo y pertenece al microbioma natural del humano, colonizando el intestino pocas horas después del nacimiento, sin embargo, existen algunas cepas potencialmente patógenas que causan distintos cuadros clínicos y perjuicios a la salud. Dentro de estas bacterias se han reportado al menos 181 antígenos O, 56 antígenos H y 80 antígenos K, dentro de dicha diversidad se encuentran los grupos O1:H4, O1:H6, O2:H2, O4:H5, O6:H1, O7:H-, O25:H4, O75:H7, O7:H6, O18ac:H7, O75:H5 y O7:H4 que son asociados a UPEC. Según su filogenia se clasifican en A, B1, B2, C, D, E, F y el recientemente añadido filogrupo G (Cortez-de la Puente, Lozano-Zarain, *et al.*, 2024).

En 2016, Lu y colaboradores reportaron en la flora intestinal de marmotas en China, dos variantes filogenéticas de *E. coli* a las que se les denominó G y H, que comparten similitud con los filogrupos B2 y F. El microbioma intestinal de dicho animal contaba con una gran selección de genes de virulencia que se sospecha fueron adquiridos por las cepas del filogrupo G, de ahí su potencial como patógeno humano, caso contrario al H que no implica amenaza alguna. (Lu *et al.*, 2016a).

Tomando en cuenta lo anterior, Clermont y cols. en 2019 anexaron el filogrupo G a su metodología de tipificación filogenética llamada “Clermont typing”, añadiendo el gen *ybgD* (proteína fimbrial putativa) como específico para la identificación de dicho filogrupo (Clermont *et al.*, 2019a). Dicho gen se encuentra dentro del operón *ybgOPQD* y se infiere que

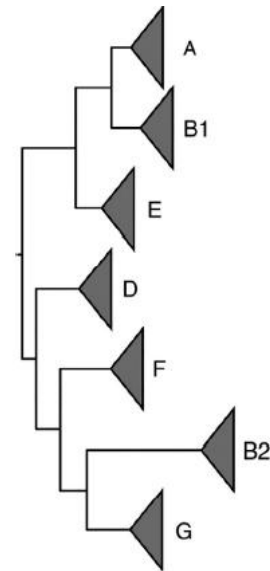


Figura 1: Relación filogenética inferida en *E. coli*, Tomado de Clermontt, 2019.

es la subunidad principal de una fimbria perteneciente a la vía chaperona-ayudador, sin embargo, algunos autores lo consideran como un operón crítico, dificultando su estudio (Korea *et al.*, 2010).

E. coli se clasifica en patotipos divididos en dos principales grupos: 1) Las diarreogénicas, que incluyen a las categorías de *E. coli* enteropatógena (EPEC), enterohemorrágica (EHEC), enterotoxigénica (ETEC), enteroinvasiva (EIEC), enteroagregativa (EAEC), de difusión adherente (DAEC) y adherente invasiva (AIEC) y como indica su nombre, su potencial patogénico es a nivel gastrointestinal; 2) las extraintestinales (ExPEC) por otro lado, tienen la capacidad de iniciar infección en próstata, tracto urinario, torrente sanguíneo y en otras regiones no intestinales, con una facilidad para movilizarse y no limitar su daño a un solo sitio, estas corresponden a *E. coli* de meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* asociada a sepsis (SEPEC), *E. coli* patógena aviar (APEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC), siendo esta última el enfoque principal del presente trabajo (Sarowska *et al.*, 2019).

Estos patotipos cuentan con factores de virulencia (FV) importantes y en algunos casos específicos, obtenidos por transferencia horizontal de genes, también están relacionados con adquisición de genes de resistencia a antibióticos. En UPEC, los FV se clasifican en factores de adherencia (adhesinas fimbriales y afimbriales), de daño celular (toxinas), de captación de hierro (sideróforos y receptores) y de evasión de la respuesta inmune (endotoxina, biofilm, cápsula e invasinas) (Croxen & Finlay, 2010).

Dentro de las adhesinas se encuentran los pili tipo 1, P, S, Dr, F1C, Afa, Curli, Iha y Ag43. Las toxinas incluyen la toxina autotransportadora secretada (Sat), la toxina autotransportadora vacuolizante (Vat) (ambas pertenecen a la familia de serin proteasas autotransportadoras), la hemolisina A y el factor necrotizante citotóxico (CNF). Los sistemas de captación de hierro incluyen sideróforos como enterobactina, salmoquelina, aerobactina y yersiniabactina, receptores FepE, Iron, lutA y FyuA respectivamente y sistemas de importación como *sitABCD* y *tonB* que juegan un papel muy importante para cubrir los requerimientos de hierro de UPEC (Lüthje & Brauner, 2014).

1.2 ADHESINAS

Dentro del tracto urinario la adherencia es clave, pues de ella depende la resistencia de UPEC contra la fuerza que ejerce el flujo normal de orina. Los factores de adherencia de UPEC más estudiados incluyen: Los pili o fimbrias tipo 1, P, F1C/S y AFA, pertenecientes a las fimbrias cuyo mecanismo de biogénesis es la vía chaperona-ayudador (CU por sus siglas en inglés) (Sarowska *et al.*, 2019). De igual forma, las adhesinas fimbriales se dividen en tipo 1 si su adherencia es sensible a manosa y tipo 2 cuando son resistentes (Barrios-Villa *et al.*, 2023).

Fimbria tipo 1

También denominada T1F, además de su sensibilidad a manosa, es reconocida por su capacidad de generar enlaces estables con glucoproteínas encontradas a lo largo del urotelio en vías inferiores y superiores. En las células sombrilla de la vejiga se encuentran proteínas α -D-manosiladas, mientras que en vías urinarias superiores α -Gal(1-4) β -Gal, ambos residuos son detectados por las fimbrias 1 y P, sin embargo, el principal tipo de molécula que funge como receptor son las uroplaquinas. Estas glucoproteínas se clasifican en grupos I, II y III, siendo UPIa y UPIIIa las más comunes (Tomasek *et al.*, 2022).

Los genes que codifican los elementos que componen a la fimbria T1F son codificados por el operón *fim* (*fim*BEAICDFGH), con un tamaño de 8.7 kpb y se encuentra altamente conservado. Estructuralmente es una fimbria similar a un cabello, con una longitud de 1-2 μ m, la base tiene una forma helicoidal que conforme se adelgaza hasta formar el extremo fimbrial (Isidro-Coxca *et al.*, 2024).. SecYEG secreta subunidades de pilina que formarán un complejo con la chaperona FimC y serán reconocidos por el extremo N-terminal de FimD, liberando la pilina (ahora FimA) y formando así la base de la fimbria. La punta fibrilar está constituida de FimF, FimG y la adhesina FimH (Staerk *et al.*, 2022).

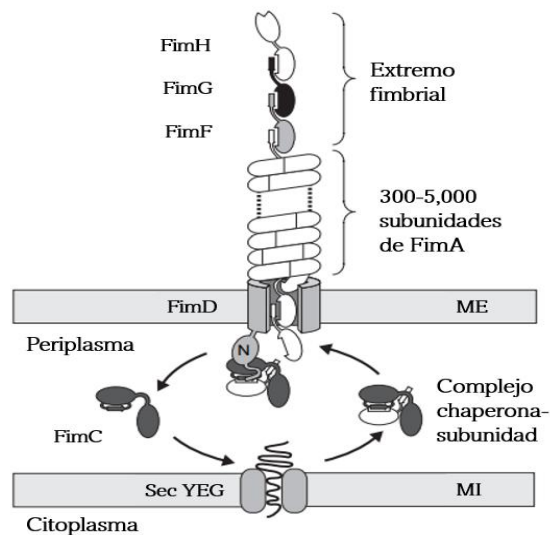


Figura 2: Representación gráfica de la estructura de **T1F** e interacción entre sus subunidades. **FimB** y **FimE**: Proteínas reguladoras de expresión. **FimA**: Subunidad estructural. **FimI**, **FimF** y **FimG**: Subunidades secundarias. **FimC** y **D**: Chaperona y ayudadora molecular respectivamente. **FimH**: Adhesina en extremo distal, reconocido por receptores del hospedero, reconoce a D-manosa. Traducido de Capitani, 2006.

FimA genera una estructura similar a una hélice con un centro hueco (cuatro subunidades por vuelta), lo que le provee un equilibrio entre rigidez y flexibilidad para resistir el flujo de orina (Reisner *et al.*, 2014).

La T1F se encuentra en UPEC con una frecuencia de 86-100%, cuentan con mayor afinidad a la manosa del endotelio vesical, posee un mecanismo transcripcional "On/Off", lo que resulta en la expresión del operón fimbrial cuando detecta glucoproteínas vesicales y si al subir el tracto genitourinario detecta otro tipo de moléculas, la expresión de dicho operón es reprimido en menor o mayor medida para favorecer la expresión de otro tipo de adhesinas como la fimbria P. Durante una infección de vías superiores la principal función de esta adhesina es promover la adherencia interbacteriana, facilitando procesos como la formación de biofilm y colonias intracelulares (Whelan *et al.*, 2023).

Fimbria tipo S

Resistente a manosa, es codificada por el operón *sfa*, encontrado en una porción de una isla de patogenicidad adquirida por transferencia horizontal. Reconoce sialoglicoproteínas como los residuos de α -sialil-2,3- α -galactosa encontrados en

glicoproteínas uroepiteliales en vejiga y riñones. Sin embargo, este tipo de proteínas también se encuentran en el sistema nervioso central, en el endotelio vascular del cerebro puntualmente, por esto mismo, la fimbria tipo S está relacionada con casos de meningitis neonatal. De igual forma, tiene una expresión variable que responde a osmolaridad y concentración de glucosa principalmente (Behzadi, 2020).

Estructuralmente tiene similitud con las fimbrias tipo 1, P, F1C y F9. Tridimensionalmente forman una hélice de un diámetro de 7 nm y una punta distal de 2 nm de ancho. Son codificadas por el operón cromosomal *sfaCBADEFGSH* de 8 kb. SfaB y SfaC son moléculas reguladoras, SfaA es la subunidad principal, SfaE es la chaperona molecular, SfaF es la proteína ayudadora que forma un canal de membrana externa por donde pasan las subunidades fimbriales, SfaG y SfaS son las subunidades secundarias y SfaH es la adhesina, quien interacciona con sialoproteínas (Bien *et al.*, 2012).

SfaB y SfaC contribuyen en la regulación de la expresión variable (variación de fase), censando factores ambientales como la temperatura y la glucosa (Klemm *et al.*, 2010).

La estructura cuaternaria de la fimbria tipo S se encuentra en un 30% de cepas UPEC aisladas de muestras clínicas y se ha encontrado también en la PAI-III de la cepa 536 (Dobrindt *et al.*, 2001). Adicionalmente esta fimbria tiene actividad plasminógena, lo que podría aumentar las actividades plasminolíticas extracelulares bacterianas. Este tipo de adhesinas le proveen elevada diseminación, estando relacionadas a ITU de vías superiores y procesos urosépticos (Jahandeh *et al.*, 2015).

Fimbria F1C

La fimbria F1C reconoce Gal-Nac- β -1,4-Gal- β , encontrado en uréteres, glomérulo, membranas y mucosa urinaria, endotelio vesical, renal y en los túbulos distales de las nefronas. Son expresadas por el operón *focAICDFGH*, con un tamaño de 8.3 kb. Cuenta con cierta homología con el operón de la fimbria tipo 1 como el tamaño, distribución y función de sus genes (Lasaro *et al.*, 2009).

Esta fimbria F1C tienen 1 μm de largo y 7 nm de ancho, los componentes que contribuyen a su biosíntesis son: FocA (subunidad principal), FocF y FocG (subunidades secundarias) y FocH (adhesina). FocI (molécula reguladora), FocC (chaperona) y FocD (ayudador). La homología estructural de las subunidades principales y secundarias entre las fimbrias S y F1C es tanta, que en algunos casos se llegan a formar fimbrias híbridas, compartiendo subunidades de *fim* y *foc* en una sola fimbria sin alterar su funcionalidad. Adicionalmente, cuando interactúa con las células uroteliales induce la liberación de interleucinas y citocinas proinflamatorias como IL-8 (reclutamiento y activación de neutrófilos), IL-1 β (reclutamiento de leucocitos), IL-6 y TNF- α (producción de proteínas de fase aguda) al enlazar los receptores a las células uroteliales (Werneburg & Thanassi, 2018).

Fimbria P

Esta fimbria cuenta con resistencia a manosa, interviene en aproximadamente el 70% de la adherencia de UPEC. Reconoce secuencias de α -D-galactopiranosil-1,4- β -D-galactopiranosido encontrada en esfingolípidos, esta molécula está presente en glicolípidos como el globotriosilceramida 3, 4 y 5 (GbO3, GbO4, GbO5). Un gran número de estos glicolípidos se encuentran en el epitelio renal, debido a esto tienen una mayor expresión y función en pielonefritis o ITU superior (Behzadi, 2018).

La interacción entre la adhesina de la fimbria P y los esfingolípidos que reconoce inicia una cascada de señalización que resulta en la liberación de ceramidas, que a su vez media la activación de la vía TLR4 que incluye citocinas proinflamatorias (IL-6 e IL-8) y la activación de algunos grupos de leucocitos. La secreción de estos elementos del sistema inmunológico causa inflamación, lo que contribuye a la eliminación de bacterias UPEC. Sin embargo, en paralelo con la eliminación bacteriana, se genera un daño en el tejido renal (principal causa de pielonefritis aguda) (Whelan *et al.*, 2023).

El pilus P o Pap (pilus asociado a pielonefritis) es codificada por el operón cromosomal *pap/BAHCDJKEFG* de 10 kb localizado en PAIs. Sus genes codifican la expresión de las siguientes proteínas: PapG (adhesina distal), PapF (proteína adaptadora o subunidad secundaria), PapE (proteína adaptadora o subunidad

secundaria), PapK (proteína adaptadora o subunidad secundaria), PapA (subunidad estructural) y PapH (subunidad de termino o subunidad secundaria). Otros genes que codifican proteínas relacionadas son PapI y PapB (moléculas reguladoras), PapC (molécula ayudadora), PapD (chaperona molecular) y PapJ (subunidad secundaria). Cada fimbria P tiene la capacidad de generar ligeras variaciones individuales entre ellas, resultando en que no siempre una misma proteína tendrá la misma función entre las fimbrias (Chahales & Thanassi, 2015). Además, son reconocidos tres alelos de PapG en UPEC, PapGI, PapGII (más común en cepas UPEC, relacionado en pielonefritis y bacteremia), y PapGIII (cistitis aguda) (Behzadi, 2018).

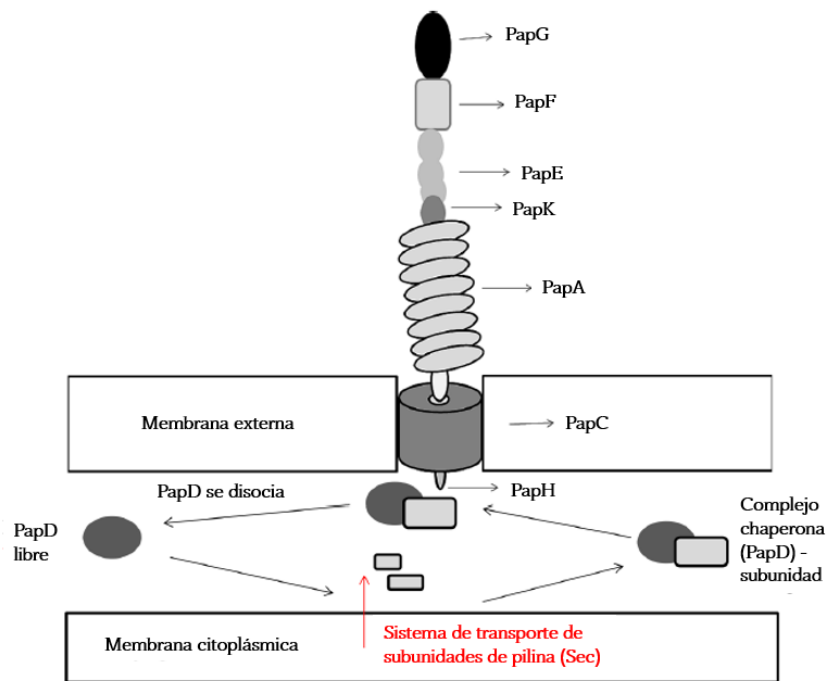


Figura 1: Representación esquemática de la estructura de la fimbria P e interacción entre sus proteínas. Traducido de Laverty, 2014.

En su disposición tridimensional, la punta distal de la fimbria P está compuesta por una subunidad de la adhesina PapG, una de PapF, y entre cinco a diez de PapE que es seguida por la proteína adaptadora PapK. En comparación con la fimbria 1 en la cual su extremo está compuesto de tres tipos de subunidades (FimH, FimG y FimF), la fimbria P contiene cuatro subunidades incluyendo PapG, F, E y K (Chahales & Thanassi, 2015).

La biogénesis y formación de la fimbria P en cepas UPEC es similar a la del tipo 1. Las subunidades estructurales de la fimbria son translocadas respectivamente hacia el espacio periplásmico a través de la maquinaria molecular SecYEG y luego hacen complejos de chaperonas PapD-PapA. La subunidad fimbrial principal es codificada por los genes *papA*, *papEF* codifica subunidades reguladoras y *papG* codifica la adhesina terminal, por lo que el gen *papG* es usado como un marcador molecular para determinar la prevalencia de fimbrias P en aislados de UPEC. Se ha reportado la presencia del operón *pap* en un 14-28% en cistitis causada por UPEC, 5-7% en *E. coli* comensal y 71-91% en aislados de pielonefritis por UPEC (Waksman, 2017).

La regulación del operón *pap* a través de la variación de fase involucra la formación de patrones de metilación que resultan de la competencia entre la adenin metilasa de DNA (Dam) y la proteína reguladora sensible a leucina (Lrp). La región reguladora está conformada de dos genes, el primero es *papI* que activa la fase de “encendido” al interactuar con complejos Lrp-*pap* DNA. El segundo gen es *papB*, quien activa la transcripción de *papI* pero también puede reprimirla cuando la concentración de la proteína es muy alta (Hernday *et al.*, 2003).

Fimbrias Dr

Incluyen un amplio rango de adhesinas fimbriales (Dr y F1845) y afimbriales (Afa-I, Afa-II, Afa-III). Resistentes a manosa, su diversidad de receptores incluye: Antígeno de grupo sanguíneo Dr (Dra), factor acelerador de la descomposición (DAF)/CD55, α -5- β -1-integrina (receptor de fibronectina), moléculas de adherencia celular relacionadas a antígeno carcinoembrionario (CEA) y colágeno tipo IV (Álvarez-Fraga *et al.*, 2022).

Gracias a estas adhesinas, UPEC puede adherirse a células del uroepitelio en vejiga y riñón (cápsula de Bowman). La fimbria Dr es codificada por el operón *draABCDPE*, cuyas funciones incluyen: DraA (regulador transcripcional), DraB (chaperona), DraC (ayudador), DraD (invasina), DraP (proteína contribuyente en un novedoso mecanismo de traducción dependiente del fraccionamiento de mRNA), DraE (adhesina) (Servin, 2005).

En su distribución espacial las subunidades principales DraE y DraD se localizan en la punta distal. Inicialmente la fimbria se produce en estructura lineal y cuando DraE ha sido polimerizada es completada por un proceso de “cubrimiento” (tapa) que es logrado por subunidades DraD de invasión. A pesar de estar ubicados dentro del mismo operón, la expresión de DraC, D y E es independiente entre sí (Zavalyov *et al.*, 2010).

Aunque estas adhesinas sean las principales no son las únicas, a lo largo de todo el uroepitelio se encuentra una gran diversidad de receptores que son reconocidos por diversos componentes de adhesinas.

Adhesina Ucl

La fimbria Ucl, anteriormente conocida como F-17 like, es codificada por el operón *ucl*/ABCD que codifica para las proteínas: UclA (subunidad principal), UclB (chaperona molecular), UclC (ayudadora) y UclD (adhesina). Promueve la formación de biofilm y la unión a células uroepiteliales exfoliadas, está relacionada filogenéticamente con fimbria Uca de *Proteus mirabilis* (*P. mirabilis*) (Spaulding *et al.*, 2017).

Es importante mencionar que recientemente ha sido reportada en UPEC como una estructura que facilita la adherencia bacteriana al epitelio intestinal, concordando con la hipótesis de que el tracto gastrointestinal es el reservorio de UPEC. Esta idea es respaldada por la relación filogenética que comparte con *P. mirabilis*, de quien se cree fue obtenido dicho operón dentro de una isla de patogenicidad (PAI), debido a su capacidad de transferencia horizontal; a nivel proteico, UcaD, UclD y la adhesina GafD, que está relacionada con la fimbria F17/G, comparten similitud en aminoácidos, compartiendo casi un 40% de su secuencia (Hancock *et al.*, 2022).

Esta fimbria es codificada por el operón cromosómico *ucl* de la cepa prototipo de UPEC CFT073, con una longitud de 4,957 nucleótidos y que posee 4 genes estructurales con sentido 5' a 3' en conformación policistronica, los cuales, codifican para: La subunidad principal UclA, la chaperona UclB, ayudadora UclC y la adhesina UclD (Figura 3). La subunidad UclA es la menos conservada de todas pero el operón en general no presenta muchas variaciones. Se encuentra 3.8 kb río arriba del operón fimbrial P en PAI-*leuX* en UPEC cepas F11, UTI89 y 83972 mientras que en la cepa 536 este operón reside en PAI-*seIC* (Wurpel *et al.*, 2016a).

La adhesina UclD (F17-like) se une a los O-glicanos de las criptas a nivel de colon, a diferencia de la adhesina FimH del pili tipo 1, que se une a residuos de manosa en las criptas superiores del colon (Klein & Hultgren, 2020).

Con ayuda de análisis bioinformáticos y ensayos de expresión fue comparado el nivel de expresión de UclA entre las cepas UPEC F11 y UTI89 encontrando un polimorfismo de nucleótido único (SNP) en la región del promotor, afectando al promotor del operón *ucl*. Esto último resulta en ligeras variaciones en los niveles de expresión de la fimbria UclA (Wurpel *et al.*, 2013).

OxyR es un regulador transcripcional que responde ante estrés oxidativo promoviendo la expresión de fimbrias. Este comportamiento se ha encontrado en

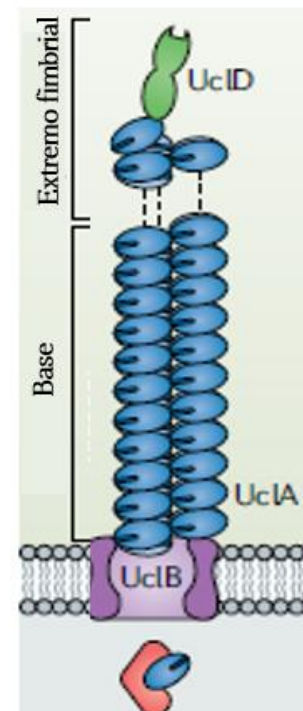


Figura 3: Estructura de la fimbria Ucl. traducido de Klein, 2020.

Serratia marcescens y *Porphyromonas gingivalis*, sin embargo, dicho regulador no es exclusivo de estas especies (Shanks *et al.*, 2007). Los niveles de oxígeno disponibles a lo largo del tracto gastrointestinal disminuyen gradualmente hasta llegar a condiciones anaeróbicas a nivel de intestino delgado, sin embargo, se puede llegar a encontrar oxígeno disponible en la mucosa intestinal, lo que llevó a Hancock y cols. en 2022 a sugerir que algunas especies de ExPEC responden ante este choque aerobio promoviendo la expresión de Ucl y garantizando su adherencia fuera de su nicho original (Hancock *et al.*, 2022).

Tabla 1: Descripción de las adhesinas más comunes en UPEC

Adhesina	Genes	Receptor	Tejido
Fimbria tipo 1	<i>fimBEAICDFGH</i>	Proteínas α -D-manosiladas, α -Gal(1-4) β -Gal, UPIa, Ila y IIIa.	Vejiga y riñón
Fimbria tipo S	<i>sfaCBADEGGSH</i>	Sialoproteinas (α -sialil-2,3- α -galactosa)	Vejiga
Fimbria tipo P	<i>papIBAHCDJKEFG</i>	Glicolípidos (galactopiranosil)	Riñón
Fimbria F1C	<i>focAICDFGH</i>	Gal-Nac- β -1,4-Gal- β	Riñón, uréteres y vejiga
Fimbria Dr	<i>draABCDPE</i>	Dra, DAF (CD55), α -5- β -1-integrina, CEA y colágeno IV	Urotelio vesical y riñón
Adhesina <i>ucl</i>	<i>uclAD</i>	O-glicanos	Criptas intestinales

1.3 SISTEMAS DE CAPTACIÓN DE HIERRO

Como muchas otras especies bacterianas, UPEC tiene la capacidad de sintetizar complejos quelantes con una afinidad alta al hierro, con el fin de usarlo en sus propios procesos metabólicos como la síntesis de DNA y proteínas. Una vez que estos agentes quelantes son expulsados de la bacteria, su alta afinidad al hierro les

permite formar un complejo que será reconocido por receptores específicos encontrados en la membrana externa para reabsorberlo y extraer el ion metálico para su aprovechamiento metabólico. En condiciones reductoras (como ambientes hipóxicos) el hierro se encuentra de forma libre en un estado ferroso Fe^{2+} , que puede ser reducido a un estado férrico Fe^{3+} una vez formado el complejo Fe-Sideróforo para facilitar su ingreso a la bacteriana.

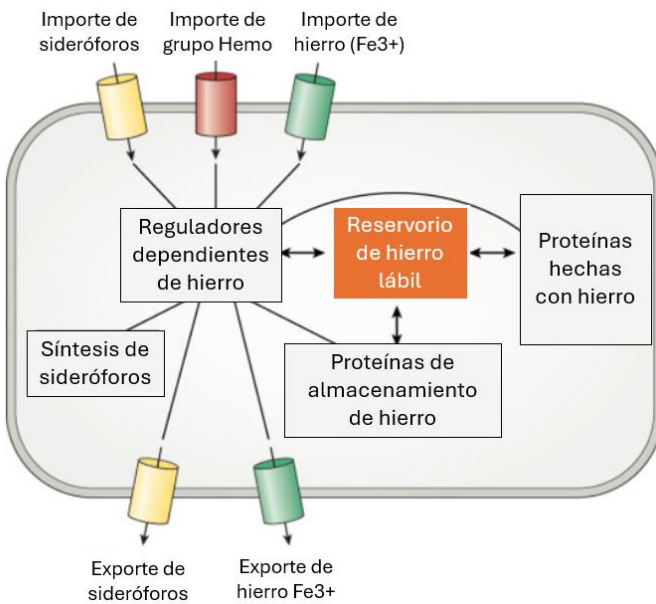


Figura 4: Esquema del metabolismo bacteriano del hierro y su transporte celular. Traducido de Bradley, 2020.

El arsenal de sideróforos, sus respectivos receptores y transportadores (presentes tanto en membrana externa como en la interna) conforman los sistemas de captación de hierro, contribuyendo a la supervivencia bacteriana y, por ende, a su virulencia.

E. coli y otras bacterias Gram negativas transportan complejos Fe-sideróforo a través de receptores de membrana externa como el complejo TonB-ExbB-ExbD, el cual obtiene energía a través de la fuerza protón-motriz (Garénaux *et al.*, 2011).

Sideróforos

Como se menciona anteriormente, UPEC tiene requerimientos nutricionales que debe cumplir para garantizar su supervivencia, entre ellos se encuentra el hierro. De este ion dependen procesos metabólicos importantes como la replicación de ADN, producción de enzimas y respiración celular. A diferencia de otras zonas

anatómicas, el sistema genitourinario tiene una limitada disponibilidad de hierro (0.1 μM por litro) para superar este obstáculo, UPEC cuenta con una colección de sideróforos que son descritos a continuación (Robinson, 2018):

- ENTEROBACTINA:

Este sideróforo de tipo catecolato tiene una alta distribución entre cepas de *E. coli* intestinales y en aislados urinarios de *Klebsiella*, *Enterobacter* y *Citrobacter*. Enterobactina o Ent actúa quelando iones de Fe^{3+} usando tres moléculas de 2,3-dihidroxibenzoilserina (DHBS) unidas covalentemente (catecoles), lo que le provee una elevada afinidad al ion. Es codificado por el operón cromosomal *ent*ABCDEF (que se encuentra altamente conservado) y sintetizado por un sistema no ribosomal de péptido-sintasa. Se forman estructuras repetidas de N-(2,3-dihidroxibenzoil)serina, posteriormente, estableciendo enlaces estéricos forman un núcleo de trilactona compuesto de tres DHBS. Interesantemente, a pesar de no tener la capacidad de producir dicho sideróforo, muchas especies bacterianas en el tracto urinario pueden usar enterobactina como fuente de hierro como *Enterobacter*, *Klebsiella* y *Citrobacter*. La biosíntesis de enterobactina está mediada por los genes *entD* y *entF* (péptido sintasas biosintéticas de enterobactina), mientras que su captura por *fepE* (receptor de enterobactina) Su estructura le provee una alta afinidad al Fe^{3+} frente a moléculas de captura de hierro del humano como siderocalina (SCN) (Zou *et al.*, 2024).

SCN es una molécula distribuida a lo largo del organismo, cuya función implica tomar el hierro en estado libre y formar complejos con alta afinidad, evitando así que los microorganismos lo usen para sus procesos metabólicos. En suero, SCN es capaz de acoplar sideróforos bacterianos a su estructura y secuestrar iones metálicos aprovechando la afinidad del propio sideróforo, sin embargo, en un ambiente como la orina, SCN opta por formar complejos con catecoles (metabolitos propios del hospedero), es entonces que Ent demuestra su particular habilidad para formar un complejo con iones tanto Fe^{2+} como Fe^{3+} , ya capturados por los complejos SCN-Catecol. (Shields-Cutler *et al.*, 2015).

Se cree que el pH es un factor importante que afecta el microambiente durante una ITU, el nivel de acidez de la orina determinaría si SCN forma complejos con catecoles (pH>6.5) o con enterobactina (pH<6.0) (Paragas *et al.*, 2014).

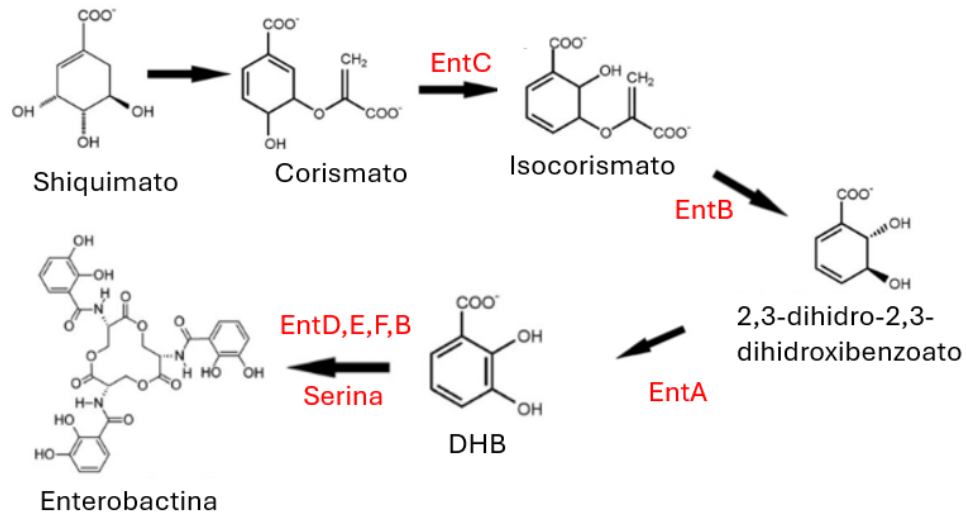


Figura 5: Proceso biosintético de enterobactina y enzimas involucradas. EntC: Isocorismato sintasa, EntB: Isocorismatasa, EntA: 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato dehidrogenasam, EntDEFB: Sistema de péptido sintetas no ribosomales. DHB: Dihidroxibenzoil. Editado de Ma Li y Payne 2012.

- SALMOQUELINA

Salmoquelina es un sideróforo que surge de modificaciones estructurales de enterobactina, que incluyen la C-glucosilación de dos catecoles y la hidrolisis del anillo trilactona, el resultado es un sideróforo más hidrofílico y capaz de evadir por completo su captura por SCN, ya que estas alteraciones estructurales impiden su adecuado reconocimiento; a pesar de tener una mayor afinidad al hierro, la síntesis de salmoquelina implica un gasto energético mayor al requerido con la síntesis de enterobactina e incluso yersiniabactina (Hantke *et al.*, 2015).

Las enzimas necesarias para la transición de enterobactina a salmoquelina son codificadas por el operón *iroA* (*iroBCDEN*) el cual incluye a: los genes *iroB* e *iroD* que sintetizan las enzimas responsable de formar el enlace de carbono entre

glucosa y DHBS, *iroC* exportador de salmoquelina en membrana interna, *iroE* que lineariza la molécula de salmoquelina previa a su exportación (se cree que también juega un papel importante en la degradación de complejos salmoquelina-Fe para ser internalizados por el transportador tipo ABC FepBDGC) y finalmente *iroN* que funciona como importador de membrana externa de salmoquelina (Figura 6) (Lin *et al.*, 2005).

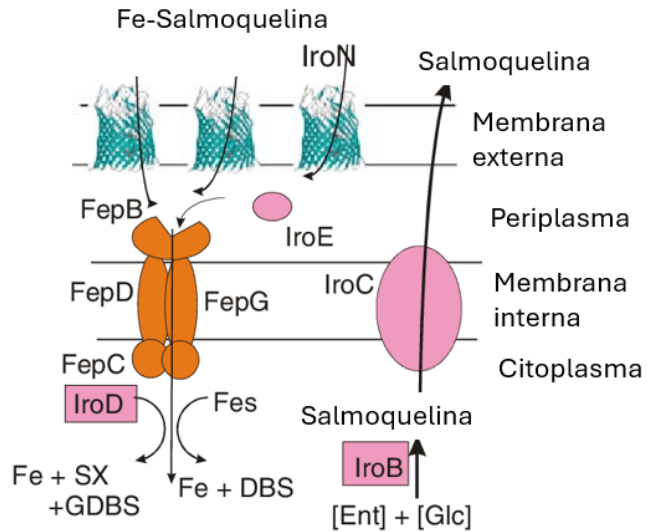


Figura 6: Representación del importe y exporte de hierro por parte de salmoquelina. Editado de Hankte, 2002.

En ensayos con cepas clínicas de UPEC se ha encontrado que la expresión del gen *iroN* aumenta durante una ITU y al comparar los niveles de salmoquelina producida entre *E. coli* aislada de muestras fecales contra urinarias, en estas últimas son mayores (Hagan *et al.*, 2010).

- AEROBACTINA

Sideróforo tipo hidroxamato, identificado inicialmente en *Aerobacter aerogenes* ahora puede encontrarse en cepas UPEC. Es codificado por el operón *iucABCD*, tanto en cromosoma como en plásmidos asociados a virulencia. Sin embargo, para su completo aprovechamiento requiere genes del operón conservado *fhuBCD*, que expresa el sistema de captura de hidroxamatos (Robinson *et al.*, 2018). L-lisina comienza el proceso de biosíntesis, donde el gen *lucD* funcionará como una monooxigenasa que da lugar a N6-hidroxi-L-lisina (hLys), *lucB* es una enzima con actividad acetiltransferasa, tanto *lucA* como *lucC* pertenecen a un grupo de ligasas y se cree cuentan con actividad péptido sintasa no ribosomal, quienes añadirán un

citrato para generar una molécula funcional de aerobactina (figura 7) (Mydy *et al.*, 2020).

La afinidad de aerobactina al Fe^{3+} , comparada con otros sideróforos, es menor, sin embargo, una vez que el complejo aerobactina- Fe^{3+} es internalizado el metabolismo bacteriano extrae el ion de manera no destructiva, permitiendo la reutilización de los componentes del sideróforo para una futura liberación. Aunado a este proceso, las enzimas presentes en su síntesis tienen una alta capacidad de reconocimiento de sustratos, evitando así la producción de moléculas análogas no funcionales o deficientes (Bailey *et al.*, 2018).

Algunas cepas tienen la capacidad de expresar el importador *lutA* a pesar de no contar con los genes responsables de su síntesis, reconociendo sideróforos de bacterias vecinas en el medio e importando el complejo aerobactina- Fe^{3+} como si fuera suyo (piratería de sideróforos) (Henderson *et al.*, 2009). Existen estudios con muestras clínicas que indican una mayor presencia del operón *iutABCD* en cepas aisladas de vejiga, riñones y sangre contra las de muestras fecales; Parker en 2016 encontró que había una relación entre cepas *iucD+* y resistencia a fluoroquinolonas en cepas clínicas aisladas de varones, algunos genes del sistema de aerobactina se encuentran en cepas multidrogo resistentes como la *E. coli* ST131(ExPEC) sin embargo, el fundamento detrás de esta relación aún no está claro (Johnson *et al.*, 2017; Parker *et al.*, 2016).

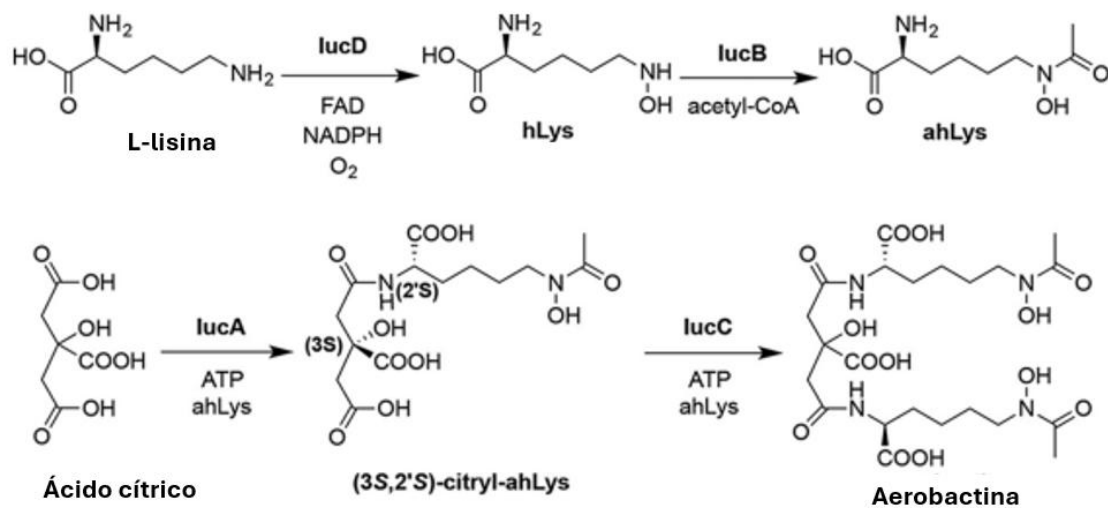


Figura 7: Proceso de biosíntesis de aerobactina y enzimas involucradas. lucD: Monooxigenasa, lucB: Acetiltransferasa, lucA y C: Ligasas y péptido sintasas. hLys: N6-hidroxi-L-lisina Traducido de Bailey 2018.

- YERSINIABACTINA (Ybt)

Este sideróforo de tipo mixto fue encontrado y estudiado inicialmente en *Yersinia pestis*. Los genes que codifican el sistema de yersiniabactina se encuentran en una isla de alta patogenicidad (HPI) que regula la expresión de dicho sistema según los requerimientos de hierro. Esta isla ha logrado diseminarse a lo largo de diversas especies de enterobacterias urinarias como *Klebsiella*, *Enterobacter*, *Citrobacter* y UPEC. YbtA es un factor de transcripción del cual depende la expresión de los cuatro operones encontrados en esta isla. Al igual que con aerobactina, UPEC puede reciclar Ybt para reaprovechar sus componentes (Heffernan *et al.*, 2024).

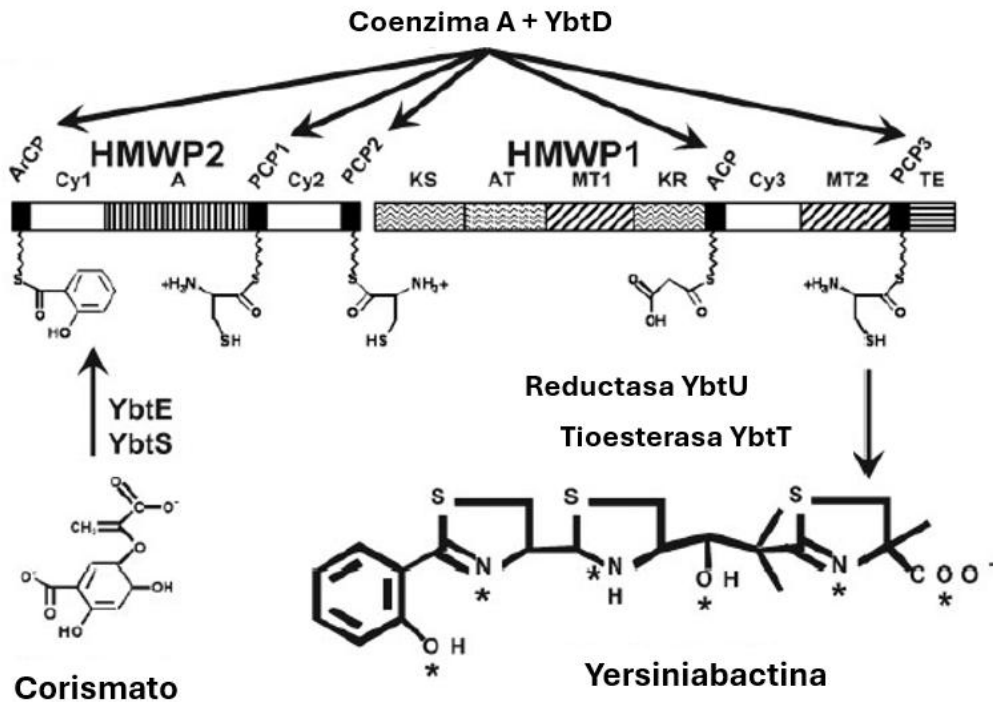


Figura 8: Proceso de biosíntesis de yersiniabactina (Ybt). Dominios enzimáticos de la proteína de alto peso molecular 2 (HMWP2) y 1 (HMWP1): ArCP (transportador de grupo arilo), Cy1 (acondensación/ciclación), A (adenilación), PCP (transportador de peptidil), KS (ketoacil sintetasa), AT (aciltransferasa), MT (metiltransferasa), KR (β -keto reductasa), ACP (transportador de grupo acilo), TE (tioesterasa). Traducido de Miller, 2010.

La biosíntesis de yersiniabactina está mediada por un complejo sistema enzimático. YbtD, con actividad fosfopanteteinil transferasa mueve el motivo 4'-fosfopanteteina desde la coenzima A hacia los dominios de transporte ArCP, PCP1, PCP2, ACP y PCP3 encontrados en los dominios de las proteínas HMWP1 y HMWP2 que recibirán los siguientes sustratos: Acido salicílico adenilado, tres cisteínas y malonato. El ácido corísmico es convertido a ácido salicílico por YbtS, el cual procede a ser adenilado por YbtE, proceso mediado por su unión al sitio ArCP de HMWP2. Los dominios de HMWP2 son ciclados y condensan dos cisteínas para formar dos anillos de tiazolina, mientras que los dominios de HMWP1 añaden un ligador de malonil para que una tercera cisteína pase a ser el anillo de tiazolina faltante. Para concluir, YbtU reduce el anillo tiazolidina para formar la estructura final y una vez formado el sideróforo, este es liberado por un complejo de tioesterasas encontrado en un dominio de HMWP1 (Figura 8) (Perry & Fetherston, 2011).

Se cree que yersiniabactina tiene otras funciones además de sideróforo convencional, tomando en cuenta la cantidad de genes que contiene la isla, por ejemplo, se ha demostrado *in vitro* que Ybt es capaz de formar complejos estables con otros iones metálicos además de hierro como, cobalto, níquel e incluso es capaz de reconocer cobre (Cu^{2+}) en el medio e importarlo, para así impedir su oxidación y que pase a su estado Cu^{1+} , el cual es altamente tóxico. (Chaturvedi *et al.*, 2012).

Tabla 2: Características y clasificación de los sideróforos producidos por UPEC, operones y genes responsables de su síntesis y captura.

Sideróforo	Tipo	Sintetizado por	Importado por
Enterobactina	Catecolato	<i>entABCDEFS</i>	<i>fepABCDEG, fes</i>
Salmoquelina	Catecolato	<i>iroB, iroC, iroE</i>	<i>iroD, iroN</i>
Aerobactina	Hidroxamato	<i>iucABCD</i>	<i>iutA</i>
Yersiniabactina	Mixto	<i>irp1, irp2</i>	<i>fyuA, ybtPQ</i>

Importadores de Hierro

Una vez que en el espacio extracelular se forman los complejos sideróforo- Fe^{+3} , necesitan ser reconocidos por receptores que permitan su importación desde la membrana externa para su futuro aprovechamiento (Mey *et al.*, 2021).

- Transportadores dependientes de TonB (TDTB)

Una vez que un sideróforo forma su complejo exitoso con el hierro, procede a ser reconocido por su receptor y en este momento comienza una compleja serie de interacciones moleculares que garantizará la internalización de Fe^{3+} y su futuro aprovechamiento metabólico.

Este grupo de transportadores reconoce principalmente complejos de hierro, sin embargo, tiene la capacidad de interactuar con cobalamina, algunos carbohidratos e incluso, recordando el caso de Ybt, otros iones metálicos como níquel (Schauer *et al.*, 2008). Algunas moléculas de bajo peso tienen la capacidad de ingresar a la membrana externa de forma pasiva, pero cuando hablamos de moléculas de un mayor tamaño y una baja concentración como los sideróforos, estas requieren una mayor energía, función principal de TonB y las proteínas ExbB-ExbD con las que forma un complejo (Noinaj *et al.*, 2010).

De manera clásica, la estructura de los TDTB consiste en un canal B transmembranal de 22 láminas que rodea un dominio globular de “enchufe”, este

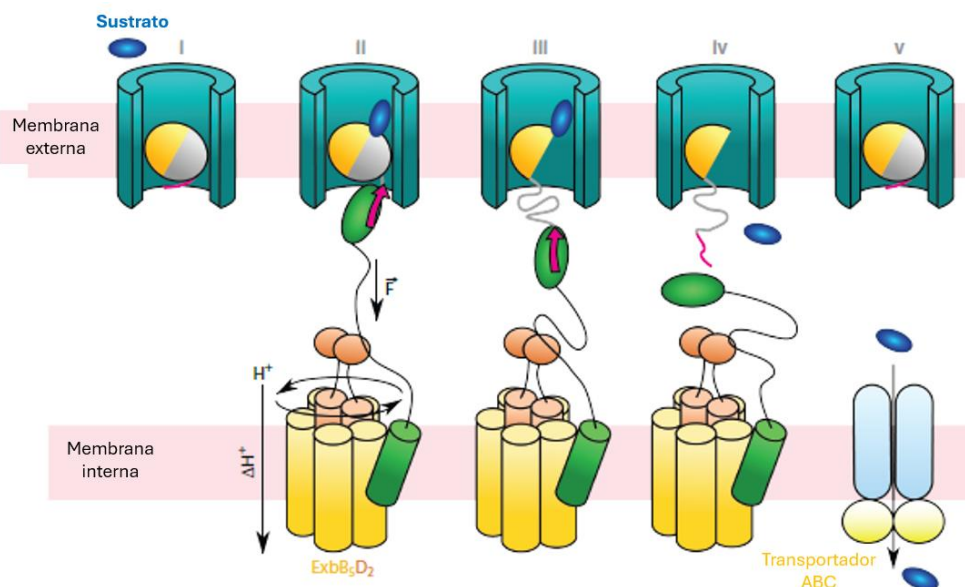


Figura 9: Representación gráfica del mecanismo de transporte de hierro por TonB. I) En su estado basal el dominio de enchufe en el TDTB tiene un subdominio fuerte y otro débil (gris), siendo este último donde se encuentra la la caja TonB (rosa). II) Cuando un sustrato (azul) es reconocido, la caja TonB se expone al periplasma donde será reconocida por el extremo carboxilo de TonB y comienza la transducción de energía. III) TonB (verde) está unido al motor molecular ExbBD (amarillo) en el dominio de membrana interna, su rotación resulta en una tracción con dirección hacia el periplasma que genera cambios conformacionales en el subdominio de enchufe débil y el sustrato ingresa al periplasma. IV) La unión caja TonB-TonB se rompe (mecanismo aún no descrito) y el subdominio de enchufe débil regresa a su conformación original, cerrando nuevamente el canal. V) Para que el sustrato logre entrar a la membrana interna requiere de importadores ABC. Traducido de Silale & Berg, 2023.

último dominio posee la caja TonB en su amino terminal, una secuencia señal de aminoácidos que permitirá su reconocimiento por otra proteína (Noinaj et al., 2010).

Cinco subunidades de ExbB y dos de ExbD forman un complejo con TonB a nivel de membrana interna. Cuando el sustrato es reconocido por el TDTB, su caja TonB es expuesta hacia el espacio periplásmico, donde TonB desde la membrana interna extiende su extremo carboxilo para reconocer la caja. ExbB-ExbD funcionan como motor molecular, cuando cualquiera de los dos comienza a rotar por acción de la fuerza protón motriz que genera cambios conformacionales en TonB, provocando una tracción en el dominio de enchufe del TDTB, alterándolo estructuralmente y liberando espacio en el canal. Esta vía libre permite que el sustrato llegue hasta el periplasma, donde será reconocido por una proteína de unión periplásmica (PBP) para su importación a través de la membrana citoplasmática. Una vez liberado el sustrato el enlace Caja TonB-TonB se rompe y el dominio de conexión regresa a su estructura original, cerrando nuevamente el transportador (figura 9) (Silale & Van Den Berg, 2025).

En *E. coli* se encuentran diversos genes TDTB a lo largo del cromosoma, como *btuB*, *fhuE*, *cirA*, *fecA* y *fhuA*. La expresión de los genes a cargo de la homeostasis de hierro se encuentra altamente regulados por el represor transcripcional llamado Fur (regulador de captura de hierro). Cuando la concentración de Fe^{+2} aumenta, Fur se acopla a una región del DNA de genes de síntesis y transporte férrico, dicha unión impide su expresión. Por otro lado, cuando la concentración intracelular de Fe^{+2} es limitado, la proteína Fur no se une a las cajas Fur en la región promotora de

los genes diana, por ende, la expresión de factores de biosíntesis de sideróforos y metabolismo de hierro no se reprime (Gao *et al.*, 2023).

- Transportador Sit

La forma más común en la que se encuentra el hierro en el ambiente es formando un complejo con proteínas de captura y como se ha mencionado anteriormente, la concentración de hierro libre es muy escasa, sin embargo, eso no significa que sea inexistente. Los iones de Fe^{2+} , por su tamaño, pueden atravesar fácilmente la membrana externa gracias a porinas inespecíficas y cuando llegan al periplasma se enfrentan al transportador tipo ABC Sit (SitABCD). SitA funge como la PBP reconociendo Fe^{2+} y una vez que se enlazan, se dirigen hacia el complejo transmembranal de membrana interna conformado por SitC y SitD, SitB funciona como la ATPasa en la región citoplásmica del complejo SitCD (Figura10) (Fisher *et al.*, 2009).

Este sistema fue encontrado inicialmente en *Salmonella* y diseñado para transportar Mn^{2+} principalmente. Actualmente este sistema se ha diseminado en otras especies como *Shigella*, EIEC, APEC y UPEC (Sabri *et al.*, 2006). Los genes responsables de la expresión del transportador se encuentran en el operón *sit* ubicado en islas de patogenicidad, sin embargo, su tamaño y localización varía ampliamente incluso entre especies cercanas, en el caso de UPEC, la isla de *sit* se encuentra en el cromosoma de las cepas CFT037, 536 y MG1655 (cepa *E. coli* K-12) con un tamaño de 56, 32 y 47 kb respectivamente (Desvaux *et al.*, 2020).

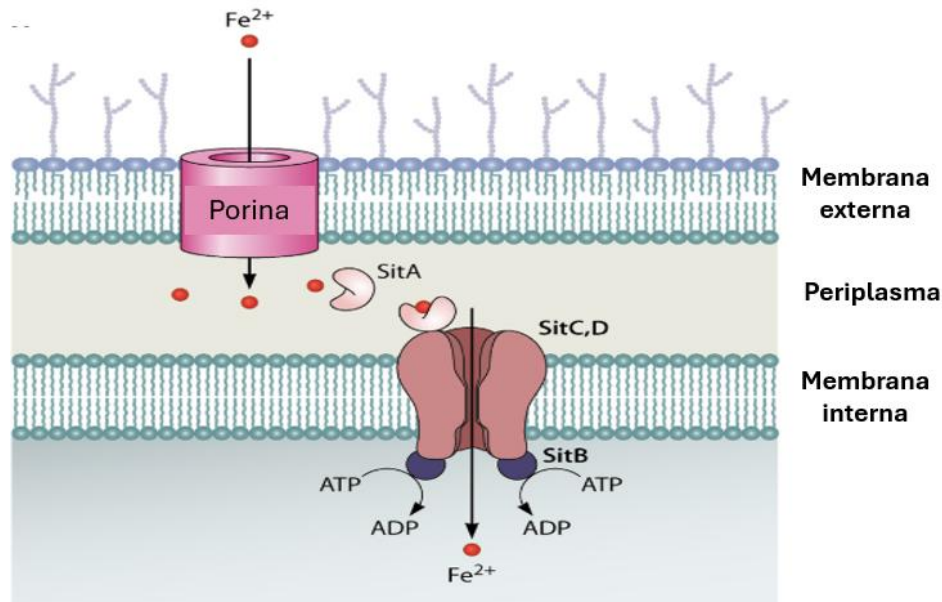


Figura 10: Representación gráfica del mecanismo de importe de Fe^{2+} y funcionamiento del complejo Sit. SitA (proteína de unión periplásmica PBP), SitC,D (complejo de membrana citoplasmática) y SitB (ATPasa). Traducido de Mey A., Gómez-Garzón C. y Payne S., 2021.

1.4 METABOLISMO DE HIERRO

A nivel intestinal (duodeno) ocurre la principal absorción de nutrientes y el hierro no es excepción. Para que este ion llegue al torrente sanguíneo es necesaria la intervención de los enterocitos y dos proteínas de unión a hierro: El transportador de metales divalentes tipo 1 (DMT1), que permite la entrada del hierro al enterocito y la ferroportina, responsable de su diseminación al sistema circulatorio (Marchetti *et al.*, 2020).

Debido a sus características físicoquímicas, el hierro no puede circular en estado libre, requiriendo de proteínas para su almacenamiento y transporte. Una vez que llega a la sangre, la hemoglobina de los eritrocitos tomará el ion, mientras que, en plasma, hasta dos átomos de hierro se unen a la transferrina (transferrina sérica), siendo esta su principal forma de movimiento. Cuando la concentración de hierro intracelular aumenta, la ferritina captura más de 4,000 átomos del ion y si lo requiere, puede actuar como reservorio y liberarlo según sus requerimientos metabólicos (Brissot *et al.*, 2019).

Existen otras proteínas que participan en el transporte de hierro, como la ferroportina, una proteína de eflujo de hierro en estado ferroso (Fe^{2+}) que permite la liberación de hierro y con ayuda de una ferroxidasa Fe^{2+} pasa a su estado férrico (Fe^{3+}), acoplándose con la transferrina sérica para su distribución, que entre otros blancos incluye su captura por lactoferrina, quien dirigirá el hierro al hígado para su aprovechamiento bioquímico (Theurl *et al.*, 2005).

De forma fisiológica, el hígado produce una hormona peptídica con un tamaño de 25 aminoácidos, la hepcidina, quien será responsable de mediar el transporte de hierro bajo condiciones de infección bacteriana. La IL-6 liberada por procesos inflamatorios estimula la expresión de la hepcidina, uniéndose a ferroportina para que, después de la fosforilación de un residuo de tirosina se induzca la degradación de la proteína. Lo anterior resulta en la disminución de la biodisponibilidad del hierro, entorpeciendo la supervivencia de patógenos extracelulares, mientras que la concentración de hierro intracelular aumenta (Andrews, 2008). La hemopexina es una proteína de fase aguda que aumenta su actividad durante procesos infecciosos, esta es expresada por hepatocitos y captura grupos hemo libres para reciclarlos en sus procesos celulares.

1.5 PATOGÉNESIS DE UPEC EN UNA ITU

La longitud de la uretra, la cercanía del meato urinario a la zona perineal y la sensibilidad ante factores ambientales son algunos motivos por los cuales estadísticamente, una mujer tiene un 50% de posibilidad de contraer una ITU al menos una vez en su vida; cuando es diagnosticada en dos ocasiones en un periodo menor de seis meses, o bien, son diagnosticadas tres infecciones a lo largo del último año se habla de una infección de tracto urinario recurrente (ITUr) (Lazarus & Gupta, 2024).

Actualmente es conocido que cierto número de UPEC se encuentra dentro del tracto intestinal humano, pues en cultivos tomados de individuos cursando una ITU estos microorganismos son los mismos encontrados en el intestino del mismo paciente. Estos microorganismos logran llegar al tracto urinario por medio de la ruta ascendente o la vía fecal-perineal-uretral. Estas infecciones son más comunes en

mujeres debido a su anatomía, la uretra se encuentra próxima a las zonas vulvar y perineal y por un arrastre mecánico producto de prácticas sexuales, colocación de sonda, higiene, etc., dichos agentes patógenos llegan desde la zona fecal. Se cree que microorganismos provenientes del tracto gastrointestinal lograron adaptarse al ambiente asociado al tracto genitourinario producto de una deslocalización y a partir de aquí evolucionaron para convertirse en UPEC, de ahí la presencia de adhesinas y fimbrias asociadas a ambientes intestinales (por ejemplo, el operón fimbrial *ucl*) (Spaulding *et al.*, 2017).

En el momento en que UPEC llega a la uretra la progresión de la enfermedad depende del número de bacterias y la capacidad de las defensas del huésped, puede ascender a la vejiga y comenzar a colonizarla causando una infección de vías inferiores o cistitis, y por otro lado subir por los uréteres hasta el parénquima renal y ahí comienza una infección de vías superiores o pielonefritis (Agarwal *et al.*, 2012b). Cuando estas infecciones se diseminan por el torrente sanguíneo se puede llegar a una urosepsis, condición de disfunción orgánica debido a una respuesta inmune fulminante ocasionada por la complicación de un proceso infeccioso proveniente del tracto urinario (Bonkat *et al.*, 2019).

Durante las infecciones de tracto urinario recurrentes (rUTIs) UPEC logra asentarse no necesariamente dentro del tracto urinario. En 2019, Forde y colaboradores analizaron el comportamiento y la reincidencia de rUTI en una mujer de la tercera edad durante 5 años. Los resultados sugirieron que la cepa responsable de la ITU se encontraba también en el tracto intestinal, siendo esta la fuente de las reincidencias (Forde *et al.*, 2019).

Se considera que, durante la colonización inicial, UPEC invade las células epiteliales de la vejiga. De Nisco y colaboradores hicieron un análisis histológico en biopsias de vejiga de pacientes post menopausia con rUTI y encontraron diversas especies bacterianas y signos de una respuesta inmune activa como linfocitos, células plasmáticas y alteraciones estructurales de las células uroteliales; se ha demostrado también la capacidad que tiene UPEC de formar colonias bacterianas intracelulares (IBCs), así mientras reduce sus procesos metabólicos al mínimo (sobre todo la

replicación celular) adquiere un estado quiescente, estadio que dificulta aún más el reconocimiento por parte de los mecanismos de defensa del hospedero. Sin embargo, esto no es permanente, pues a pesar de su aparente inactividad, estas colonias cuentan con el potencial de reactivarse e iniciar un nuevo proceso infeccioso al reaccionar ante un estímulo externo (coinfeción, desregulación del sistema inmunológico, trauma) (De Nisco *et al.*, 2019).

Existe un diverso grupo factores que, de diversas formas, facilitan el progreso de la enfermedad, entorpeciendo la respuesta fisiológica normal ante agentes patógenos.

- El uso de espermicidas perturba el microbioma vaginal, generando oportunidades para que se genere una infección.
- Factores que facilitan la deslocalización bacteriana, incluyen sexo femenino, prácticas sexuales, embarazo, menopausia y alteraciones estructurales como fístulas y catéteres
- Agentes que comprometan la respuesta inmunológica como personas en los extremos de la vida, uso de corticosteroides y comorbilidades como diabetes.

1.6 SIGNOS Y SINTOMAS DE ITU POR UPEC

La cantidad e intensidad de los signos está ligada a la localización de la infección, siendo las vías altas las más complicadas. Los síntomas de las UTIs comprenden un amplio rango. Cuando existe una presencia de microorganismos sin signos o síntomas aparentes se habla de una bacteriuria asintomática, pero cuando el daño comienza a ser visible, comúnmente se presenta como un síndrome miccional, que comprende signos como poliuria, disuria, dolor suprapúbico, molestia intestinal y en algunos casos, orina con olor fuerte y piuria (presencia de glóbulos blancos o pus en orina), estos últimos signos encontrados más frecuentemente en pielonefritis (Zhou *et al.*, 2023b).

1.7 TRATAMIENTO

Según la guía de referencia “Diagnóstico y Tratamiento de la Infección Aguda del Tracto Urinario en la Mujer” publicada en el portal del Instituto Mexicano del Seguro Social (IMSS):

ITU baja. En mujeres no gestantes se sugieren 160/800 mg de trimetoprima/sulfametoxazol (TMP/SMZ) o 100 mg de nitrofurantoina, dos veces al día por 3 días en ambos casos. Si con la opción inicial no se observa mejoría, se inicia tratamiento con el segundo antibiótico. En caso de falla terapéutica se procede con 250 mg de ciprofloxacino cada 12 h por 3 días y en las regiones donde se haya reportado una resistencia considerable contra TMP/SMZ, se opta por una dosis única de 3 g de fosfomicina. Como tratamiento auxiliar para la disuria, se pueden administrar 100 mg de fenzopiridina 3 veces al día durante las primeras 48 horas.

ITU alta. En casos de pielonefritis siempre se realiza un urocultivo y se inicia un tratamiento con quinolonas que, según el resultado, será corregido para cumplir 14 días bajo medicación. Las alternativas terapéuticas de las quinolonas incluyen: 500 mg de ciprofloxacino dos veces al día y 160/800 mg de TMP/SMZ si no se reporta resistencia.

ITUr. La recurrencia se presenta dentro del primer año del cuadro inicial en hasta el 50% de las mujeres. El tratamiento de elección en mujeres no embarazadas es la

Nitrofurantoina, 100 mg dos veces al día por 5 días con una eficacia de 90-95%, sin embargo, no se recomienda en casos de pielonefritis. El trimetoprim es otra opción en casos de infecciones de vías altas, 160/800 mg dos veces al día por 3 días con una eficacia de 86-100%, pero si se sospecha de una resistencia antimicrobiana debe evitarse (Christine M. Chu, MD; Jerry L. Lowder, MD, 2017).

2. ANTECEDENTES

Filogrupo G (gen *ybgD*)

Korea C, y cols. en Francia 2010, estudiaron siete operones con función desconocida en la cepa *E. coli* K-12, se sospechaba que estaban relacionados con procesos de adhesión. Entre los operones estudiados se encuentra el *ybg* (*ybgOQPD*) y encontraron similitudes en su secuencia con fimbrias tipo 1, sin embargo, tuvo un nivel de expresión muy bajo lo que dificultó su investigación (Korea *et al.*, 2010).

En 2016, Lu y colaboradores reportaron haber encontrado dos variantes filogenéticas en la flora intestinal de marmotas en China, a estas se les denominó G y H, compartían similitud con los filogrupos B2 y F, el microbioma intestinal de dicho animal contaba con una gran selección de genes de virulencia, por lo que estos nuevos grupos filogenéticos, especialmente el G, se determinaron como potenciales patógenos humanos (Lu *et al.*, 2016b).

Clermont comenzó a desarrollar un método para poder clasificar filogenéticamente cepas de *E. coli*, en 2019 actualizó su denominado “Clermont typing” para incluir el gen *ybgD* (adhesina fimbrial), que fue propuesto como específico para filogrupo G (Clermont *et al.*, 2019b). Hasta el momento no se ha reportado la determinación de dicho gen en poblaciones de UPEC, tanto internacional como nacionalmente.

Adhesina fimbrial Ucl

Wurpel y cols. en 2016 realizaron un análisis proteómico en UPEC para identificar origen, prevalencia y homología de las proteínas relacionadas con su virulencia.

Algunas proteínas encontradas incluyen proteínas superficiales, sistemas de captación de hierro, adhesinas clásicas y una proteína fimbrial asociada a una PAI de *P. mirabilis* denominada UCA-like (Ucl) (Wurpel *et al.*, 2016b) .

Hancock y cols. en 2022 estudiaron la regulación de la expresión de *ucl* en diversas cepas, siendo la UTI89 una de ellas, y su relación con OxyR, un regulador transcripcional que reacciona ante estrés oxidativo. Encontraron que factores estresantes, como la baja concentración de oxígeno en el intestino, generan una mutación puntual en la región reguladora del operón que al ser reconocida por OxyR incrementa la expresión de *ucl* (Hancock *et al.*, 2022).

Sistemas de captación de hierro

Torres y cols. en 2001 evaluaron el papel del importador de sideróforos TonB durante el proceso de invasión. Desarrollaron cepas CFT073 mutantes en *tonB* encontrando que la mutante es incapaz de usar el grupo hemo, enterobactina y aerobactina como fuente de hierro. Cuando estas mutantes se encontraron con otras bacterias que sí logran expresar *tonB*, su crecimiento fracasa (Torres *et al.*, 2001).

Karimian y cols. en el 2012 determinaron una gran variedad de genes de virulencia en una colección de 123 cepas de *E. coli* aisladas de ITUs por medio de PCR en Irán. Dentro de los genes amplificados se encontraron *iron* e *irp2*, con una frecuencia del 50.4% y 11.38% respectivamente (Aazam *et al.*, 2012).

Searle y cols. en 2015 determinaron la presencia de genes relacionados con síntesis e importación de sideróforos en dos grupos de cepas de *E. coli* provenientes de muestras ambientales (grupo 1) y fecales (grupo 2) en Reino Unido. Por medio de PCR múltiple se analizaron genes responsables de la biosíntesis y reconocimiento de enterobactina como *entA* (dihidroxibenzoato deshidrogenasa), *entB* (2,3-dihidro-2,3-dihidrobencato sintetasa), *entC* (isocorismato sintetasa), *entE* (polipéptido de biosíntesis) y *fepA* (receptor de enterobactina). Estos genes fueron encontrados en 73/96 (76%) y 26/61 (42.6%) para los grupos 1 y 2 respectivamente (Searle *et al.*, 2015).

En 2016, Jamalli y cols. determinaron la presencia de los genes *iucA* (sintetasa de aerobactina), *iroN* (Importador de membrana externa de salmoquelina) e *irp2* (Proteína de alto peso molecular en síntesis de yersiniabactina) por PCR. Aislaron un total de 170 cepas de *E. coli* provenientes de ITUs activas en Irán, dichas cepas fueron incubadas en medio M9 con concentraciones de 0.1, 0.5 y 1 mM Fe(II) y Fe (III) y procedieron con la identificación genotípica. La frecuencia fue la siguiente: *iucA*=29 (17.1%), *iroN*=52 (30.6%) e *irp2*=116 (68.2%) (Jamalli *et al.*, 2016) .

Ballesteros-Monrreal y cols. en 2020 determinaron la presencia de varios genes de virulencia en 150 cepas de UPEC aisladas de mujeres gestantes y no gestantes de los estados de Sonora y Puebla. Dentro de los genes estudiados se encuentran *iucD* (síntesis de aerobactina) que fue positiva en el 85% e *iha* (adhesina homóloga IrgA) observándose en un 60% del cepario (Ballesteros-Monrreal *et al.*, 2020).

Tanabe y cols. en 2022 realizaron una amplia caracterización de genes de virulencia relacionados con adherencia, toxinas, evasión inmune, invasión y captación de hierro en una colección de 112 cepas de *E. coli* aisladas de orina con $\geq 10^5$ UFC por ml, esto con el objetivo de determinar cepas híbridas según su colección genética. Dentro de los genes analizados se encuentran: *irp2*=59 (52.7%), *sitA*=58 (51.8%), *iucD*=41 (36.6%) y *iroN*=5 (4.5%) (Tanabe *et al.*, 2022) .

2.1 ANTECEDENTES DIRECTOS

Pedroza Nain en el 2022 usando los oligonucleótidos para *ybgD*, tomando como referencia a Clermont 2019, y por medio de PCR *in silico* encontró que ninguno de los genomas de UPEC analizados (n=55) al filogrupo G. También visualizó el entorno genético de la fimbria entérica Ucl y diseñó los oligonucleótidos para *ucID* y *uclA* (Pedroza Nain, 2022).

Cortez de la Puente y Huelgas Méndez, ambos en 2020, realizaron la determinación y clasificación filogenética del cepario ISSSTE 2015-2016 de mujeres y de varones respectivamente. En su cepario (n=51), Cortez reportó 8 cepas en el filogrupo A, 1 para el B1, 19 para el B2, 8 para el C, 10 para el D, 3 para el F y 1 para el E y Clado I respectivamente; Huelgas en su cepario (n=24) reportó: 2 cepas para el filogrupo

A, 14 para el B2, 4 para el C, 1 cepa para el D, E y clado I respectivamente y además una cepa de filogrupo indeterminado. Sus resultados fueron tomados en cuenta para elegir las cepas de los filogrupos B2 y F para determinar la presencia del gen *ybgD* (proteína fimbrial putativa) en ellas (Cortez 2020, Huelgas 2020).

Cortez de la Puente en 2024 secuenció el genoma completo de la cepa 123-I, esto fue útil para la estandarización de la amplificación por PCR de los genes *uclD* y *uclA*, usando como DNA templado extracción genómica de dicha cepa (Cortez-de la Puente, Rocha-Gracia, et al., 2024).

3. JUSTIFICACIÓN

Las ITU en México y en el mundo son de las infecciones más frecuentes, afectando más a mujeres que a hombres y dentro de la población más susceptible se encuentran las mujeres embarazadas. A la semana 24 del boletín epidemiológico de 2025, fueron reportados un total de 1,561,545 casos de ITU en todo el país, de los cuales un 77.3% (n=1,207,032) casos corresponden a mujeres, mientras que el 22.7% restante (n=354, 513) a varones. Contrastando el número de casos con el año pasado, observamos un aumento de alrededor de 30,000 casos (n=1,531,178).

Las infecciones pueden ser comunitarias o nosocomiales y representan grandes gastos médicos, se han aislado cepas resistentes a los antibióticos complicando el estado y diagnóstico del individuo, así como su tratamiento.

En México existen pocos estudios que informen sobre estos factores de virulencia y resistencia de cepas de *E. coli* provenientes de ITU. Es por lo tanto crucial investigar su comportamiento para diseñar estrategias terapéuticas y de control altamente efectivas capaces de combatir con mayor eficacia la infección, disminuir la capacidad de generar resistencia y reducir el impacto económico que tiene para el sistema de salud pública. En el presente estudio se determinaron características fenotípicas y genotípicas relacionadas a la filogenia y la virulencia de ExPEC con la finalidad de comprender los mecanismos moleculares y genéticos por los cuales provoca enfermedad.

4. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

Tomando en cuenta la alta prevalencia de las ITU en nuestro país, es importante comprender el proceso de patogénesis de dicha enfermedad, es así como podremos ampliar el panorama terapéutico y sugerir en un futuro nuevos blancos que no dependan exclusivamente de antibióticos.

Los sideróforos corresponden a un factor de virulencia importante de UPEC, toman el hierro del hospedero y lo usan para llevar a cabo sus procesos metabólicos, este proceso irrumpe de manera importante la homeostasis del hospedero y combinado con los otros factores de virulencia implica un daño considerable.

La clasificación filogenética permite realizar una estimación sobre la virulencia de la cepa a estudiar ya que esta clasificación está relacionada con la variación de los genes que posee. Debido a lo anterior, se sabe que el grupo filogenético con mayor virulencia potencial es el B2. Tomando en cuenta que el filogrupo G es una variante relativamente nueva y que comparte similitudes con el B2, estudiar su prevalencia y potencial de daño es importante.

El primer paso en todo proceso infeccioso es la adherencia y posteriormente la colonización del tejido y UPEC no es la excepción, una gran variedad de adhesinas fimbriales y afimbriales están relacionadas con dicho proceso, como lo es la fimbria Ucl. Se cree que el origen de la fimbria Ucl yace en el genoma de bacterias pertenecientes al microbioma intestinal y es una pieza clave para el mantenimiento de UPEC en el intestino, a través de la adherencia y colonización del tracto intestinal lo que le permite a UPEC mantenerse como reservorio en ese hábitad.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivo General

- Determinar el filogrupo G, genes fimbriales *ucl*, la expresión de sideróforos y los genes que codifican para sistemas de captación de hierro de UPEC de varones y mujeres cursando una ITU.

5.2. Objetivos Particulares

1. Estandarizar la amplificación del gen *ybgD* (proteína fimbrial putativa) y determinar el filogrupo G en un cepario de *E. coli* 2015-2016 de varones y mujeres cursando una ITU.
2. Determinar los genes de la adhesina *uclD* y de la subunidad fimbrial principal *uclA* en cepario de mujeres.
3. Determinar la expresión fenotípica de sideróforos.
4. Diseñar oligonucleótidos para los genes que codifican sistemas de captación de hierro: *entF*, *irp2*, *iroN*, *sitA* y *tonB* usando el genoma de la cepa prototipo de UPEC CFT073 y determinar su entorno genético.
5. Determinar los genes que codifican para sistemas de captación de hierro en un cepario de *E. coli* 2015-2016 obtenido de varones y mujeres cursando con ITU.

6.METODOLOGÍA

6.1 Material biológico

Las 75 cepas con las que se trabajó fueron recolectadas del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) de Puebla, México. Dichas muestras provienen de pacientes con un rango de edad de 21 a 86 años en las mujeres (n=51) y de 46 a 91 años en varones (n=24), siendo un total de 75 cepas. Fueron obtenidas durante el periodo de junio del 2015 a febrero del 2016, identificadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos mediante morfología colonial en medios selectivos y pruebas bioquímicas.

6.2 Preparación de agar/caldo Luria Bertani (LB)

Se utilizó medio LB líquido para los cultivar las diversas cepas sobre las que se trabajó. La metodología se encuentra descrita a detalle en el apartado de “Anexos”.

6.3 Determinación fenotípica de sideróforos

Se preparó agar CAS para la determinación fenotípica de sideróforos y una vez las cepas fueron inoculadas y posteriormente incubadas el diámetro del halo producido fue medido. La metodología se encuentra descrita a detalle en el apartado de “Anexos”.

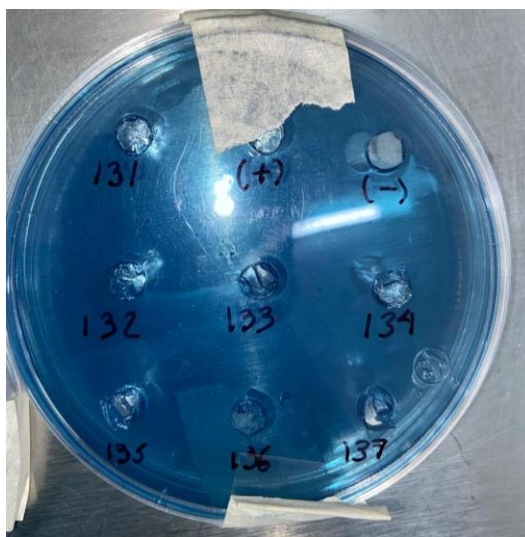


Figura 11: Imagen representativa de un ejemplo de placa con medio CAS horadado previo a la inoculación de las cepas 131-I a la 137-I. (-) Control negativo. (+) Control positivo.

6.4 Extracción genómica por lisis alcalina

El DNA templado para las reacciones de PCR fue obtenido por lisis alcalina y cuantificado por espectrofotometría. La metodología se encuentra descrita a detalle en el apartado de “Anexos”.

6.5 Extracción genómica por caldo hervido

El DNA templado para las reacciones de PCR para la determinación del filogrupo G fue obtenido por caldo hervido. La metodología se encuentra descrita a detalle en el apartado de “Anexos”.

6.6 Diseño de oligonucleótidos

El genoma de la cepa UPEC CFT073, con código de acceso NCBI: NC_004431.1. sirvió como base para el diseño de los primers. Herramientas bioinformáticas como “DNA Star” y “SnapGene” sirvieron como apoyo adicional para el diseño de un par de oligonucleótidos por cada gen: *entF* (peptidasa no ribosomal de enterobactina), *sitA* (receptor de hierro libre Fe³⁺), *irp2* (HMWP2 de yersiniabactina), *tonB* (transportador de sideróforos de membrana externa), *iroN* (importador de salmoquelina).

6.7 Estandarización de PCR

Con base en la T_m del certificado enviado por el proveedor de los oligonucleótidos, se eligió un rango de temperatura de alineamiento por cada par y por medio de un gradiente de temperatura se determinaron las condiciones necesarias para amplificación de cada uno de los genes de interés, tomando también en cuenta el tiempo de extensión de acuerdo con el tamaño del amplicón deseado y la velocidad de polimerización de la Taq DNA (Tabla 3).

Los oligonucleótidos para la amplificación de los genes fimbriales *uclA*, *uclD* y *ybgD*, este último para la determinación del filogrupo G, ya se encontraban en el LBME, su función y tamaño del amplificado se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3: Características de los oligonucleótidos usados en la amplificación de genes fimbriales *ucl* y en la determinación del filogrupo G

Gen	Función:	Amplicón	Referencia
<i>uclA</i>	Subunidad fimbrial principal de fimbria <i>ucl</i>	817 pb	Wurpel, 2016
<i>uclD</i>	Adhesina <i>ucl</i> (O-glicanos en criptas intestinales)	1226 pb	Wurpel, 2016
<i>ybgD</i>	Adhesina fimbrial	177 pb	Clermont, 2019

6.8 Determinación de genes por PCR en DNA genómico del cepario

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* enzimática que amplifica la secuencia de ADN deseada. Esto es posible gracias a que se utiliza la enzima ADN polimerasa, la cual puede sintetizar copias del ADN de las células. Para realizar la PCR se usó el templado o molde (ADN genómico), un buffer, cloruro de magnesio (MgCl₂), H₂O, taq polimerasa (Dream Taq Thermo Scientific, código 10160790), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y oligonucleótidos. Estos componentes interactúan entre sí en las etapas de la PCR, que constan en desnaturalización, alineamiento y extensión. Durante la desnaturalización, las cadenas de ADN son expuestas a altas temperaturas (aproximadamente 95 °C), lo que resulta en la separación de las cadenas que se usarán como templado en el siguiente paso. En el alineamiento, los oligonucleótidos se alinean al extremo 3' del templado de la fase anterior, provocando que estos dos se unan y formen un complejo. Para esto, se necesita una temperatura entre 50 y 65 °C aproximadamente que varía dependiendo de las características fisicoquímicas de los oligonucleótidos usados. Por último, durante la extensión, la polimerasa actúa en el complejo templado-oligonucleótidos, mediando la adición de los dNTP's para amplificar el fragmento en cadenas completas repetidas de ADN, esto a una temperatura de 72 °C. Las condiciones de amplificación específicas para cada gen de interés en el presente estudio se encuentran en el apartado "Anexos".

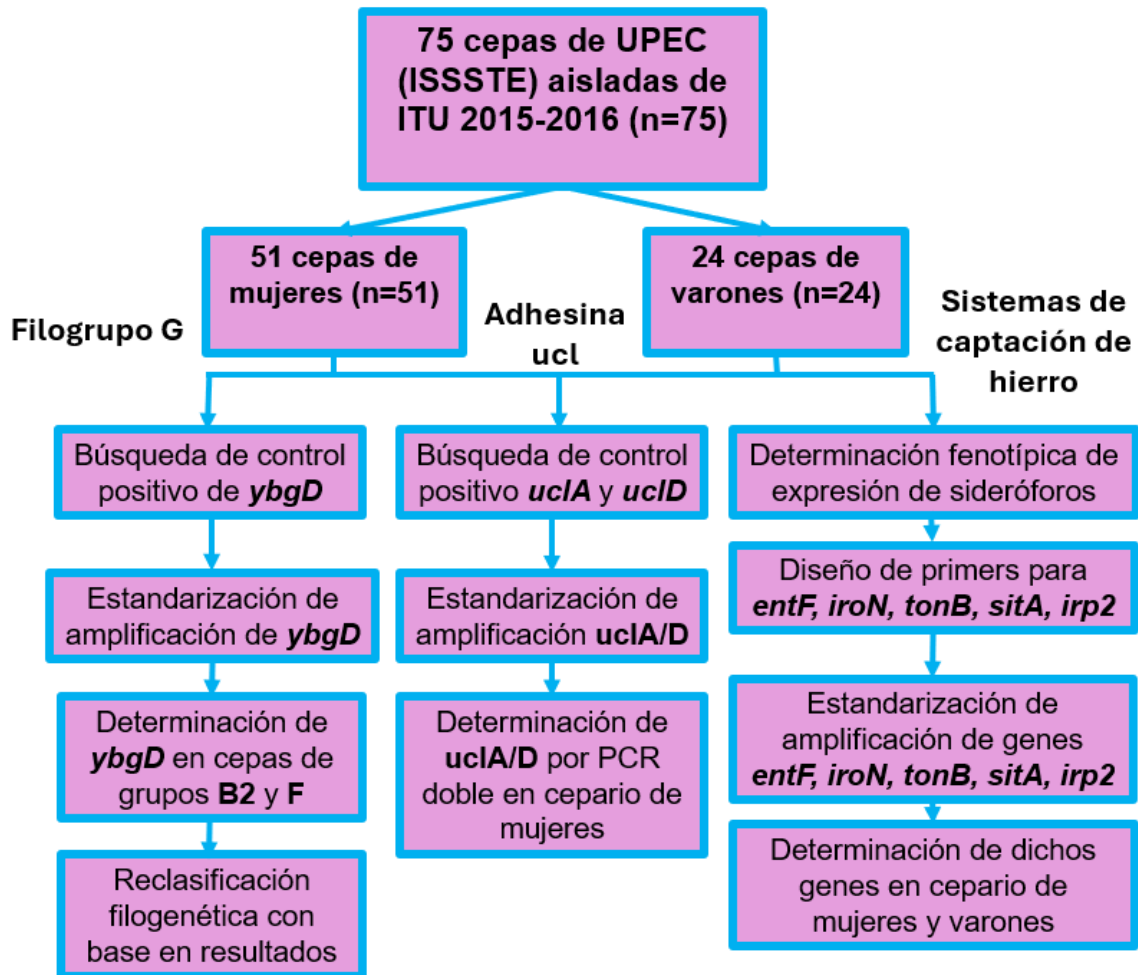
6.9 Electroforesis en gel de agarosa

La visualización de los productos de PCR fue mediante un corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.7% y usando un transiluminador. La metodología se encuentra descrita a detalle en el apartado de “Anexos”.

6.10 Purificación de DNA

Se utilizó el kit de recuperación de DNA de gel ZR-96 Zymoclean con número de catálogo D4021. Se siguió el procedimiento indicado por el fabricante y al finalizar se cuantificó la concentración de DNA usando un espectrofotómetro de microvolumen “Nanodrop”. Para confirmar el resultado se hizo un corrimiento electroforético de la elución final en un gel de agarosa al 0.7%.

7.ESQUEMA DE TRABAJO



8. RESULTADOS

8.1 Determinación del grupo filogenético G. Estandarización de la amplificación del gen *ybgD* en cepas UPEC de filogrupos B2 y F.

Para la determinación de filogrupo G fue necesario encontrar un control positivo para amplificar el gen *ybgD*. Filogenéticamente los grupos B2 y F son los más cercanos al G, con esta información se seleccionaron solo aquellas cepas que previamente fueron clasificadas como B2 o F (Cortez 2020 y Huelgas 2020) (Tabla 4). En el grupo B2 se encontraron 3 cepas: 101, 105 y 150, mientras que del filogrupo F 33 cepas: 102, 103, 107, 110, 112, 113, 114, 115, 118, 119, 126, 128, 129, 130, 136, 138, 140, 141, 147, 149, 153, 156, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 163, 164, 167, 168 y 170.

Tabla 4: Cepas pertenecientes a los filogrupos “B2” y “F”, potenciales candidatas para control positivo de *ybgD*.

FILOGRUPO	CEPAS	TOTAL
B2	MUJERES: 107, 112, 113, 114, 119, 136, 138, 140, 141, 147, 149, 153, 156, 157, 158, 160, 163, 164, 170	19
	VARONES: 102, 103, 110, 115, 118, 126, 128, 129, 130, 159, 161, 162, 167, 168	14
F	MUJERES: 101, 105, 150	3
	VARONES: N/A	0

Para la estandarización se probó un rango de temperatura de 58.2°C a 61.4°C, la temperatura elegida fue 59°C. Las condiciones de amplificación completas para el gen *ybgD*, se encuentran descritas en el apartado “Anexos”.

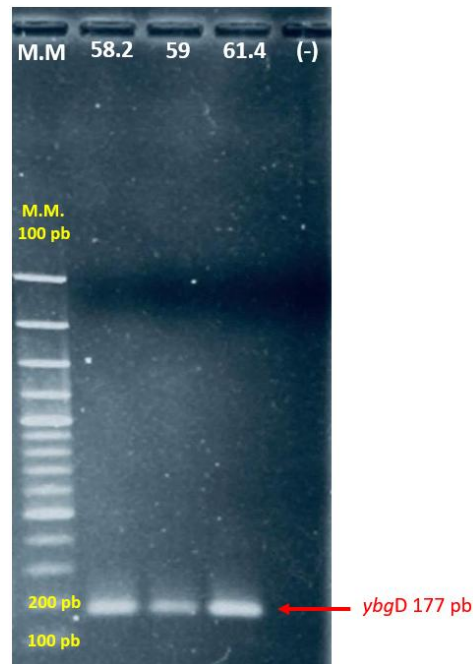


Figura 11: Estandarización de la amplificación del gen *ybgD*. Corrimiento electroforético de los resultados de PCR con gradiente de temperatura. Se observa amplificación en las temperaturas 58.2, 59 y 61.4. (-) Control negativo. M.M. Marcador de peso molecular de 100 pb ThermoScientific.

Las cepas 101 (B2) y 102 (F) inicialmente amplificaron el gen *ybgD*. Sin embargo, al continuar los ensayos se observó una alta frecuencia en la amplificación de *ybgD* entre las cepas analizadas. Para corroborar la veracidad de las muestras positivas se realizó una PCR con cepas de *E. coli* usadas como controles pertenecientes a otros grupos filogenéticos como la *E. coli* K12 MC4100 (filogrupo A), EHEC EDL933 (filogrupo E) y UPEC GAGI (filogrupo B2) y la cepa 117-I (cepario varones, filogrupo C), esta última perteneciendo al cepario de varones proveniente del ISSSTE y previamente clasificada en el LBME.

Incluso cambiando el DNA templado de extracción genómica (lisis alcalina y caldo hervido) el resultado fue el mismo (figura 11). Las cepas de filogrupos C, A y E amplificaron *ybgD* al igual las de B2 y F, resultado que no concuerda con la premisa propuesta por Clermont, que establece a dicho gen como específico para el filogrupo G. Las cepas para las que se determinó:

- Filogrupo B2: 102, 103, 110 de varones y la 107, 112 y 113 de mujeres.
- Filogrupo F: 101, 105 y 150 de mujeres.

Dichas cepas resultaron positivas y de las cepas 105 y 107 se purificaron los fragmentos amplificados para mandar a secuencias.

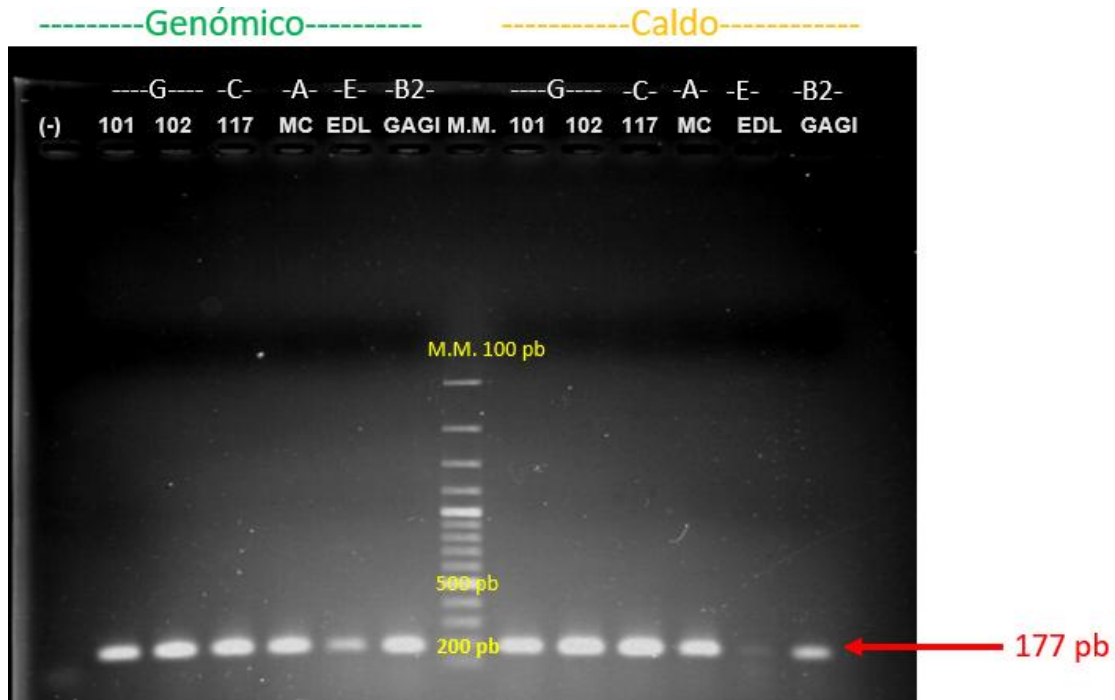


Figura 12. Determinación de filogrupo G. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.7% de los resultados de amplificación por PCR del gen *ybgD* (177 pb). Del lado izquierdo del marcador de peso molecular (M.M.) se observa amplificación en muestras de ADN obtenidas por lisis alcalina (Genómico) y del lado derecho usando ADN obtenido por caldo hervido (Caldo). Se usó un marcador de peso molecular de 100 pb de la marca Thermo Scientific.

8.2 Determinación de los genes de la adhesina *ucID* y de la subunidad principal *ucIA* en cepario de mujeres.

Debido a la diferencia en tamaño entre los genes *ucIA* (817 pb) y *ucID* (1226 pb) se decidió estandarizar la PCR como múltiple, por lo que se propuso un gradiente de temperatura de $61 \pm 5.9^{\circ}\text{C}$. La muestra control utilizada fue la cepa ISSSTE-123. Se usó como DNA templado el DNA genómico de la cepa 123-I (Cortez de la Puente, 2024). Siguiendo las indicaciones de la enzima taq polimerasa (DreamTaq) se ajustó el tiempo de extensión según el tamaño del amplicón. Con esta consideración se obtuvo la correcta amplificación de los genes *ucIA/ucID* con una temperatura de 58.4°C (figura 12). Con esto se ajustaron las condiciones finales de PCR y se procedió a hacer la determinación para todo el cepario.

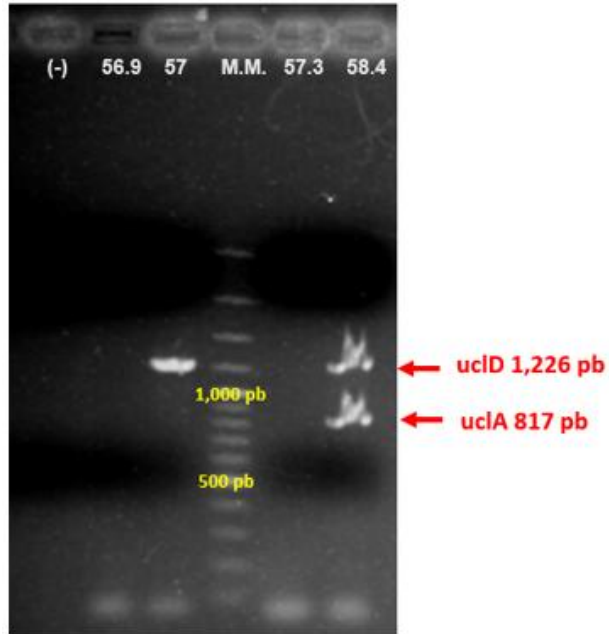


Figura 13: Estandarización de la amplificación de los genes fimbriales *uclA* y *uclD*. Corrimiento electroforético de los resultados de PCR con gradiente de temperatura. A los 57°C solamente amplifica *uclD*, mientras que a 58.4°C logran amplificar *uclA* y *uclD* simultáneamente.

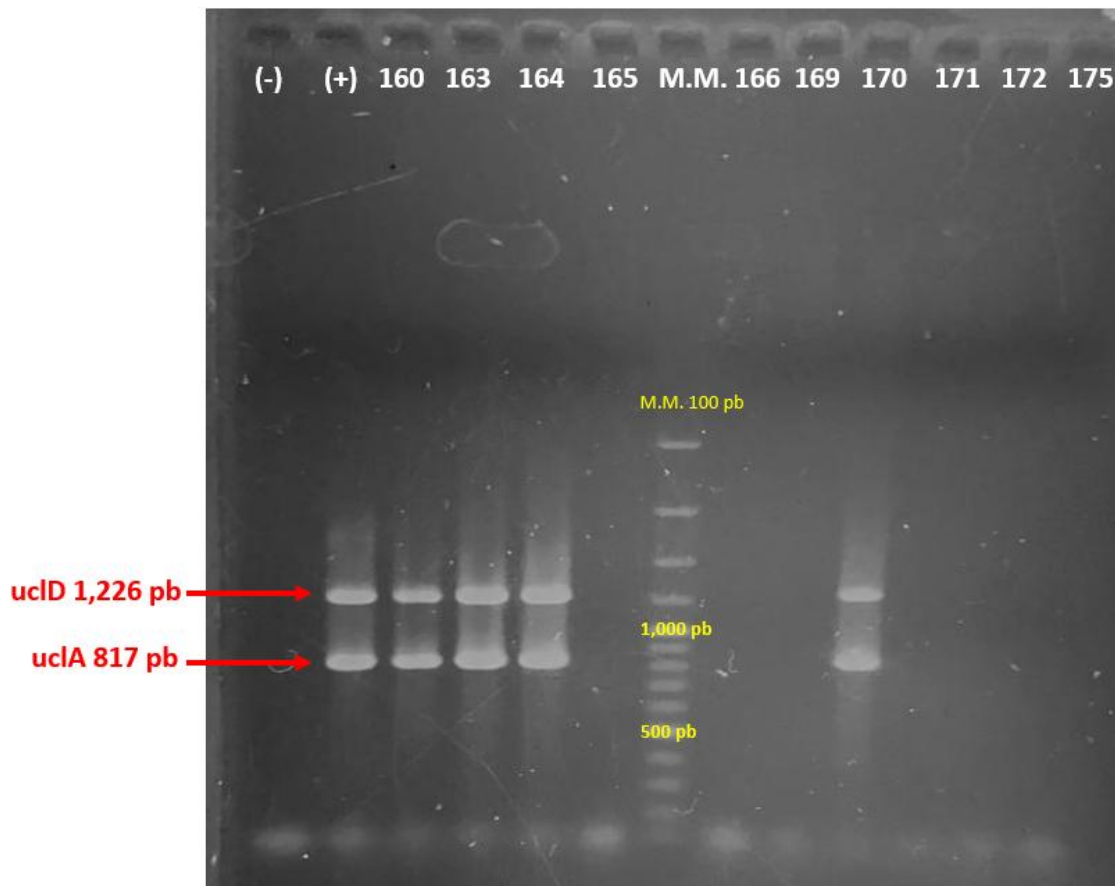


Figura 14: Análisis de la determinación por PCR de los genes fimbriales *uclA* y *uclD*. Resultado de la amplificación por PCR de *uclD* (1,226 pb) y *uclA* (817 pb). Gel de agarosa al 0.7% representativo mostrando la amplificación de dichos genes en diez cepas. (-) Control negativo. (+) Control positivo usando DNA genómico de la cepa UPEC CFT073 como templado. M.M. Marcador de peso molecular de 100 pb de la marca Thermo Scientific.

De las 51 cepas de mujeres, 12 fueron positivas para *uclA/D* (23%) que corresponden a las cepas 107, 112, 114, 120, 147, 156, 157, 158, 160, 163, 164 y 170, encontrando tanto *uclA* como *uclD* simultáneamente en todos los casos.

8.3 Determinación fenotípica de sideróforos

A 51 cepas de mujeres y 24 de varones adultos mayores cursando una ITU (n= 75) se les realizó un ensayo fenotípico de producción de sideróforos utilizando medio sólido de casaminoácidos (Ver material y métodos). De las 75 cepas en total, 70 fueron positivas (93%).

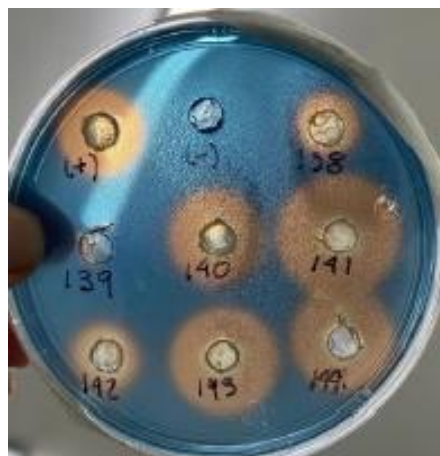


Figura 15: Imagen representativa de la determinación fenotípica de sideróforos. Placa de agar CAS con viraje a color naranja, indicando un resultado positivo. Se pueden observar algunas de las cepas con mayor producción de sideróforos como la 141, 143, 144 y otras cepas con un menor índice de producción como la 138 y la 142. (-) Control negativo y (+) control positivo que fue la cepa J96.

Un 95% de las cepas de varones fueron positivas, con un diámetro de halo promedio de 1.5 cm, para las mujeres un 92% positivas con un diámetro promedio de 1 cm. Las cepas que resultaron negativas fueron la 135, 139, 165 y 169 en mujeres y la 125 en el caso de varones (figura 15).



Figura 16: Comparación del fenotipo de producción de sideróforos comparados entre mujeres, con un diámetro promedio de 1 cm y varones con un promedio de 1.5 cm.

Tomando en cuenta los datos obtenidos se realizaron análisis estadísticos para determinar que el promedio del diámetro de halo de todas las cepas fue de 1.22 cm.

Se calculó la desviación estándar con el fin de encontrar las cepas que, por el diámetro de sus halos, superan el promedio de manera estadísticamente significativa. El valor de la desviación estándar fue 0.53, para determinar si el diámetro de cada cepa se encuentra cercano al promedio se estableció un límite mínimo de 0.7 cm y un límite máximo de 1.7 cm. Aquellas muestras con un diámetro menor al límite inferior y mayores al límite máximo cuentan con valores más alejados de la media muestral (Louden *et al.*, 2011).

Tabla 5: Cepas que, por su diámetro, son estadísticamente significativas al superar el límite máximo (1.7 cm)		
Número de cepa	Origen	Diámetro de halo (cm)
104	Mujeres	2.3
105	Mujeres	2
106	Mujeres	2.1
110	Varones	2.1
117	Varones	2.1
141	Mujeres	2.1

143	Mujeres	1.9
144	Varones	1.8
145	Mujeres	2.4
148	Mujeres	2
149	Mujeres	2

Resultado del análisis estadístico se determinó que las muestras con diámetro menor a 0.68 cm (límite mínimo) y mayor que 1.76 cm (límite máximo) son estadísticamente significativas. Las once muestras que superaron el límite máximo demostraron su elevada capacidad de producir sideróforos con respecto a otras del mismo cepario.

8.4 Diseño de oligonucleótidos de *irp2*, *entF*, *iroN*, *sitA* y *tonB* y determinación del entorno genético

El genoma utilizado como referencia para el diseño de oligonucleótidos fue el de la cepa UPEC CFT073, con código de acceso NC_004431.1 en NCBI y se utilizaron herramientas adicionales como “DNA Star” y “SnapGene”.

Tabla 6: Características de los genes que codifican para sistemas de captación de hierro en UPEC y de los oligonucleótidos diseñados para su amplificación por PCR.

Gen	Tamaño del gen	Localización en genoma	Codifica para:	Amplicón	Nombre	%G/C	Tamaño
<i>irp2</i>	4,230 pb	2,227,110–2,231,378	Proteína de alto peso molecular 2 (HMWP2) Biosíntesis de Ybt	4350 pb	Irp2-F	39%	23 pb
					Irp2-R	59%	22 pb
<i>iroN</i>	2,178 pb	1,198,162–1,200,339	Importador de membrana externa de salmoquelina	2345 pb	iroN-F	43%	23 pb
					iroN-R	42%	24 pb
<i>entF</i>	3,882 pb	656,385 – 660,266	Péptidosintasa no ribosomal de enterobactina	3969 pb	entF-F	60%	20 pb
					entF-R	42%	19 pb

tonB	768 pb	1,554,965 – 1,555,732	Transportador activo de membrana externa de sideróforos	814 pb	tonB-F	55%	20 pb
					tonB-R	61%	18 pb
sitA	858 pb	1,449,293 – 1,450,150	Subunidad A de receptor de hierro libre sitABCD	1002 pb	sitA-F	60%	20 pb
					sitA-R	45%	20 pb

En el diseño de cada par de oligonucleótidos se cuidó que estos amplificaran un fragmento que incluyera el gen completo y regiones río arriba y abajo con la finalidad de tener la posibilidad de secuenciar a partir de la amplificación del DNA templado de la cepa control UPEC CFT073.

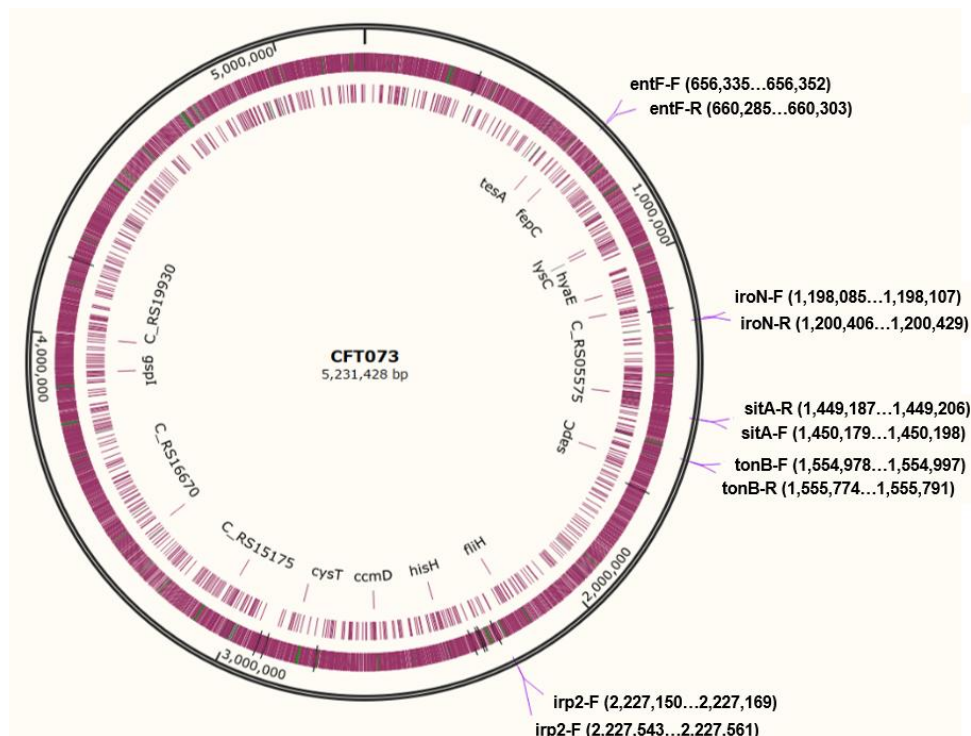


Figura 17: Visualización del genoma de la cepa UPEC CFT073 y la localización de los oligonucleótidos diseñados dentro de este.

Además, se verifico que la localización del gen correspondiera con lo reportado en la bibliografía respecto a los genes aledaños. Enseguida se muestran las imágenes del entorno genético de cada uno de los genes amplificados en este estudio involucrados en la captación de hierro y la localización de los oligonucleótidos.

- Entorno genético del gen *entF*, que codifica para la peptidosintasa no ribosomal de enterobactina

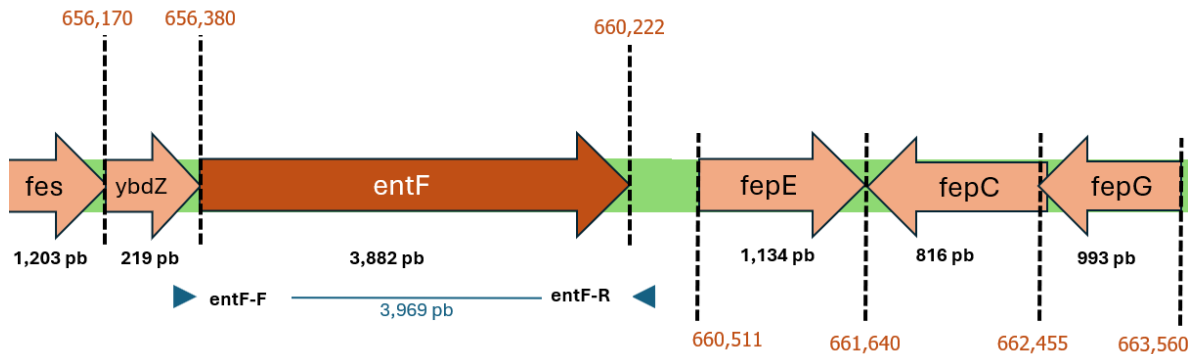


Figura 18: Entorno genético del gen *entF* (síntesis de enterobactina). Se observan otros genes como *fes* (esterasa de enterobactina), *ybdZ* (auxiliar en síntesis de enterobactina), *pepE* (receptor de enterobactina), *pepC* y *pepG* (componentes del transportador ABC). Los oligonucleótidos diseñados se observan en flecha azul (*entF-F* y *entF-R*) con un amplicón de 3,969 pb.

Los genes relacionados con los sistemas de regulación, síntesis y captura de enterobactina se encuentran distribuidos a lo largo de aproximadamente 20 000 nt en el genoma. El gen *entF* está separado de *entA*, *B*, *C*, *D*, *E* y *S* por los genes *pep* responsables de su sistema de captura.

- Entorno genético del transportador de sideróforos *tonB* y del transportador de hierro Fe^{3+} *sitA*

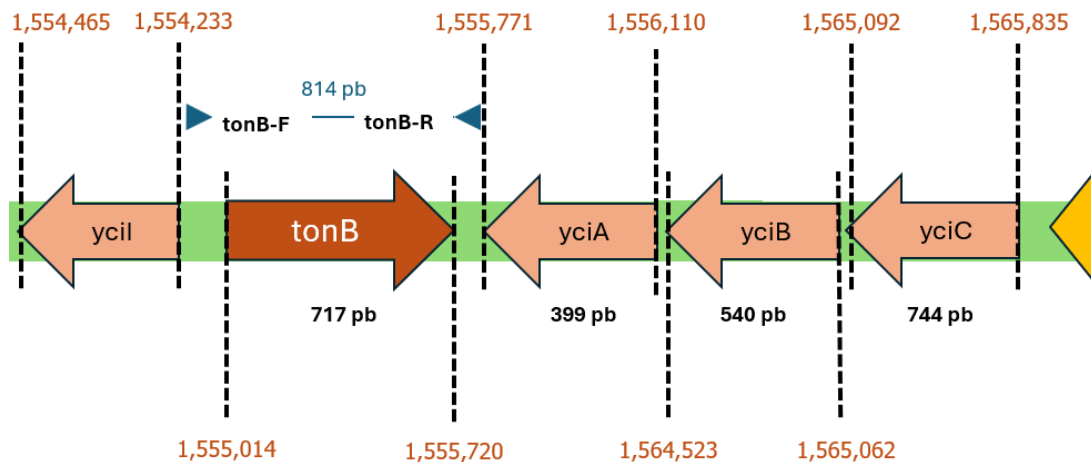


Figura 19: Entorno genético del gen *tonB* (transportador de sideróforos). Se observan otros genes de la familia *yci*, como *yciB* (proteína de septación A) que está relacionada con la homeostasis

de la envoltura celular bacteriana. Los oligonucleótidos diseñados se observan en flecha azul (*tonB-F* y *tonB-R*) con un amplicón de 814 pb.

El gen *tonB* se encuentra flanqueado por dos proteínas de la familia *yci*, dicha familia está relacionada con la envoltura bacteriana como su biogénesis y mantenimiento. *yciA* codifica para una acyl-CoA thioester hidrolasa y *yciB* codifica para la proteína de septación A, las funciones de *yciI* y de *yciC* aún no se tienen claras.

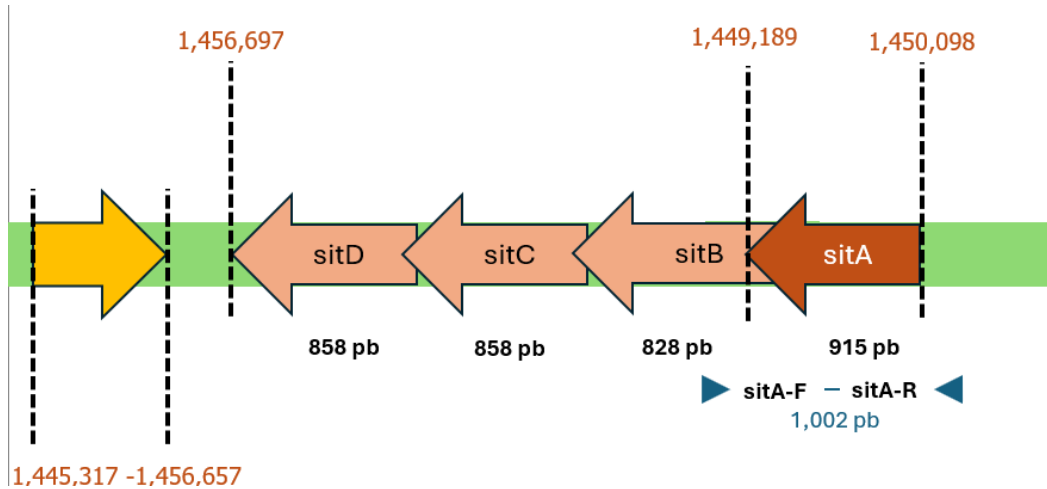


Figura 20: Entorno genético del gen *sitA* (transportador de hierro libre). *sitA* (PBP de Fe^{2+}). *sitB* (ATPasa), *sitC* y *sitD* (subunidad de complejo de membrana citoplasmática). Los oligonucleótidos diseñados se observan en flecha azul (*sitA-F* y *sitA-R*) con un amplicón de 1,002 pb.

Los genes del operón *sitABCD* se encuentran seriados sin separaciones entre ellos y con una conformación divergente. Lo observado concuerda con lo esperado en la bibliografía.

- Entorno genético del receptor de salmoquelina *iroN*

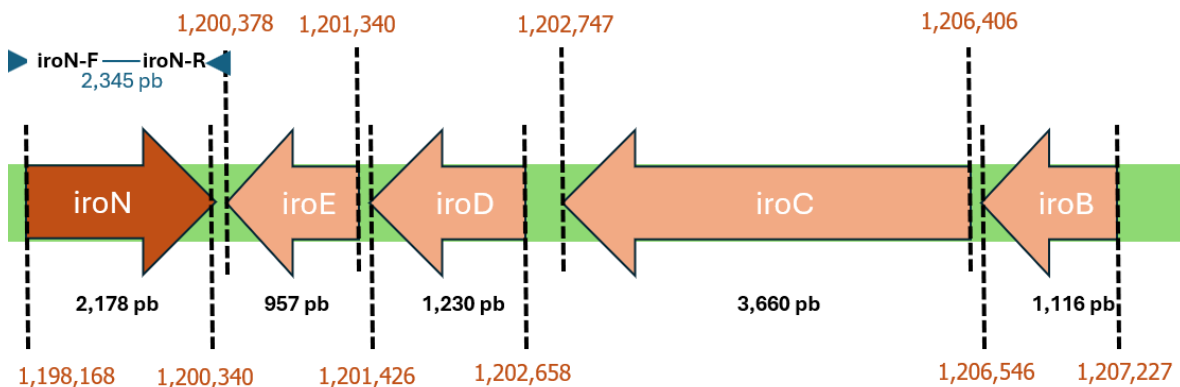


Figura 21: Entorno genético del gen *iroN* (receptor de salmoquelina). *iroE*, *iroD* (tioesterasas), *iroC* (transportador ABC), *iroB* (glucosiltransferasa). Los oligonucleótidos diseñados se observan en flecha azul (*iroN-F* y *iroN-R*) con un amplicón de 2,345 pb.

- Entorno genético de la HMWP2 de yersiniabactina *irp2*

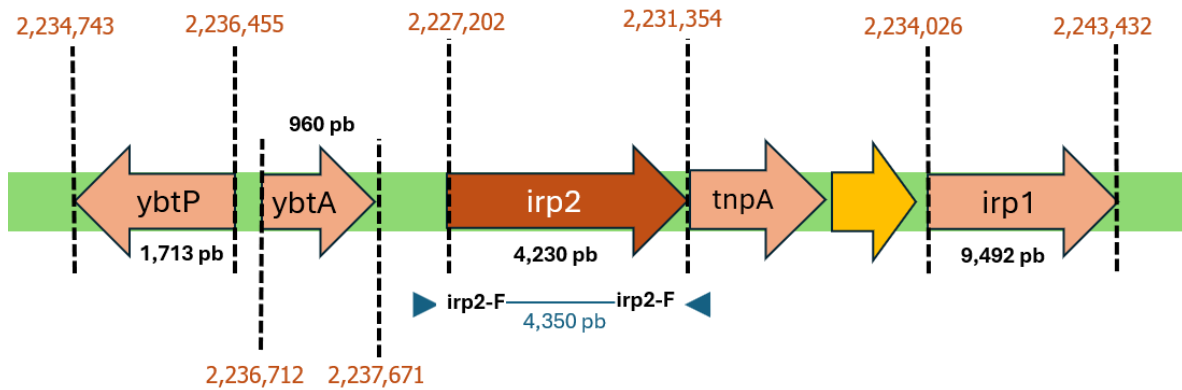


Figura 22: Entorno genético del gen *irp2* en genoma de CFT073. *ybtP* (proteína de unión a ATP), *ybtA* (regulador transcripcional), *irp2* (HMWP2), *tnpA* (transposasa), *irp1* (HMWP1). Los oligonucleótidos diseñados se observan en flecha azul (*irp2-F* e *irp2-R*) con un amplicón de 4,350pb.

Los genes del sistema de yersiniabactina en UPEC no se encuentran tan cercanos entre sí y a diferencia de otros sideróforos, sus genes no se encuentran agrupados en operones. Para analizar mejor el entorno genético se comparó con el genoma de la cepa *Yersinia pestis* 91001 (NCBI: AE017042.1) y se puede observar cómo los genes del sistema tienen mayor cercanía entre ellos, son consecutivos y su orientación transcripcional es diferente.

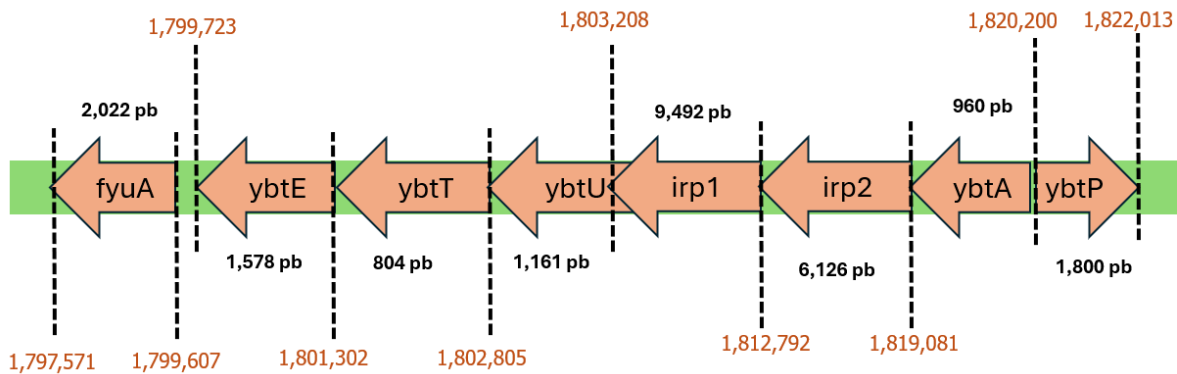


Figura 23: Entorno genético del gen *irp2* en genoma de *Yersinia pestis* 91001. *ybtP* (proteína de unión a ATP), *ybtA* (regulador transcripcional), *irp2* (HMWP2), *irp1* (HMWP1), *ybtU* (reductasa de yersiniabactina), *ybtT* (tioesterasa), *ybtE* (salicil AMP ligasa), *fyuA* (receptor de yersiniabactina).

8.5 Determinación de los genes que codifican para sistemas de captación de hierro en un cepario de *E. coli* 2015-2016 obtenido de varones y mujeres cursando con ITU.

8.5.1 Estandarización de la amplificación de *entF* que codifica para la péptido sintasa no ribosomal de enterobactina

Para la estandarización de la PCR y con base en las T_m del par de oligonucleótidos se propuso un gradiente de temperatura de alineamiento en un rango de 58.7 a 64 °C, la temperatura final seleccionada para su amplificación fue de 63.4 °C. Las condiciones de amplificación establecidas fueron:

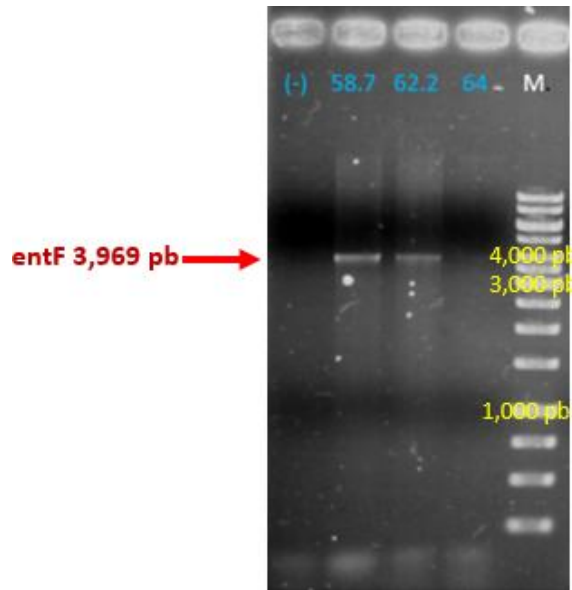


Figura 24: Estandarización de la amplificación por PCR del gen de enterobactina (*entF*). En azul se muestra el control negativo (-) y las temperaturas usadas. Usando como DNA templado extracción genómica de CFT073.

8.5.2 Determinación del gen de síntesis de enterobactina *entF* por PCR en cepario de varones y mujeres

De las 75 cepas que se analizaron solo 4 fueron positivas, siendo la 128, 130 y 165 en mujeres y la 168 en varones (5.3%).

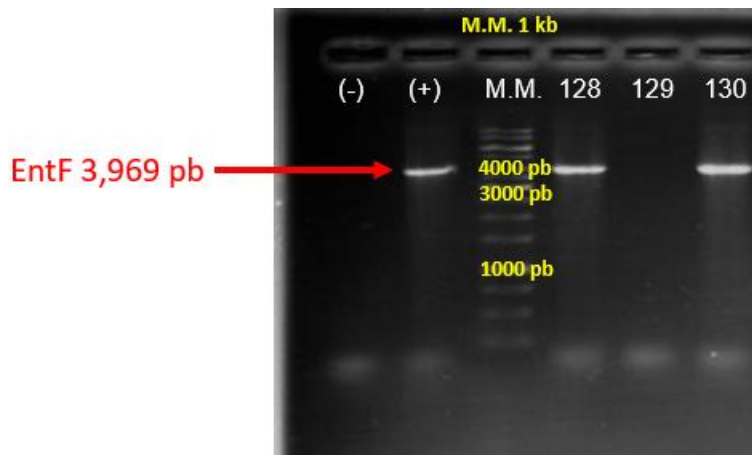


Figura 25: Análisis de la determinación de enterobactina por PCR. Resultado de la amplificación por PCR de *entF* (3,969 pb) en cepario UPEC de varones y mujeres (n=75). Gel de agarosa al 0.7% representativo mostrando la amplificación del gen en tres cepas usando DNA genómico como templado. (-). Control negativo (+) Control positivo usando DNA genómico de la cepa UPEC CFT073 como templado. (M.M.) Marcador de peso molecular de 1 kb de la marca Thermo Scientific.

8.5.3 Estandarización de la amplificación por PCR del transportador *tonB* y el importador *sitA*

Se decidió hacer una PCR múltiple de *tonB* y *sitA* considerando que los amplificados son de diferente tamaño y los oligonucleótidos poseen Tm cercanos. Para la estandarización de la PCR se propuso un gradiente de temperatura de alineamiento de un rango de 60 a 71.5 °C, se encontró que la temperatura más adecuada para la amplificación de ambos genes es de 60.3 °C

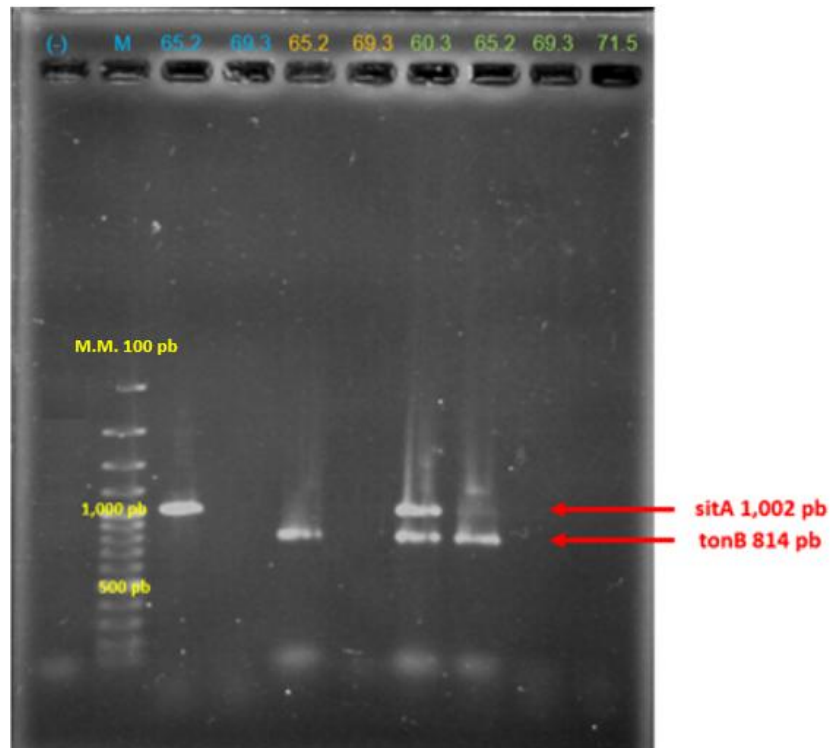


Figura 26: Estandarización de la amplificación por PCR de los genes de importadores *sitA* y *tonB*. Corrimiento electroforético en gel de agarosa al 0.7%. En el gradiente se comparó la estandarización con oligos de *sitA* exclusivamente (color azul), solo de *tonB* (color naranja) y de *sitA* y *tonB* al mismo tiempo (color verde). (M.M.) Marcador de peso molecular de 100 pb de Thermo Scientific.

8.5.4 Determinación de *tonB/sitA* por PCR en el cepario de varones y mujeres

De las 75 cepas estudiadas 29 fueron positivas para *tonB* y *sitA* (38.6%), 10 fueron positivas para *tonB* exclusivamente (13%) y 6 fueron positivas solo para *sitA* (8%).

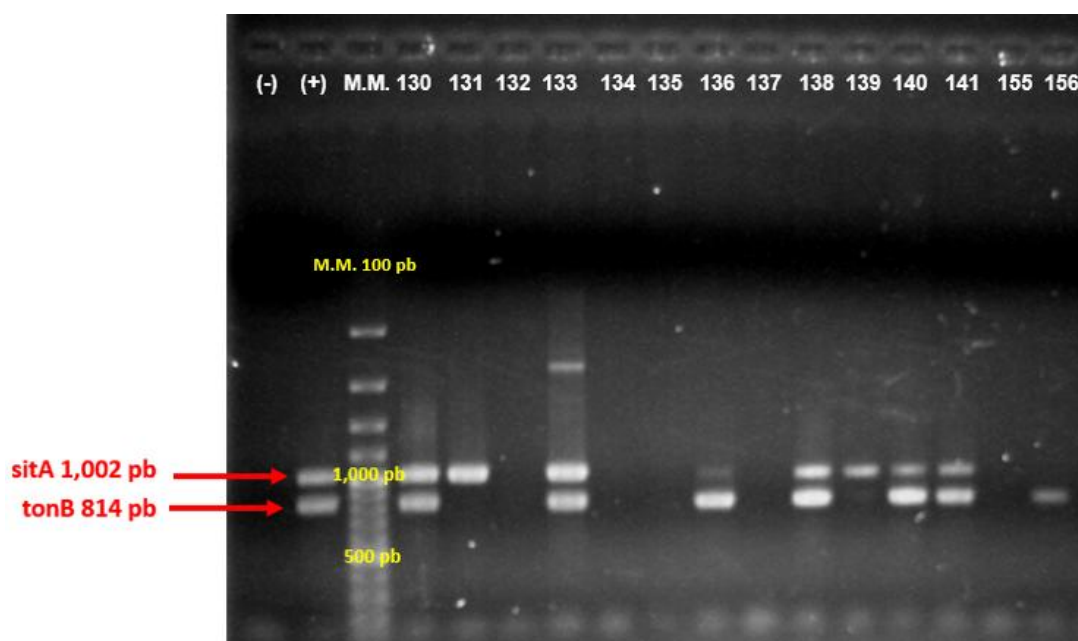


Figura 27: Análisis de la determinación por PCR de los genes de los transportadores *tonB* y *sitA* en el cepario ISSSTE 205-2016 (n=75). Resultado de la amplificación por PCR de *tonB* (814 pb) y *sitA* (1,002 pb) respectivamente en el cepario de mujeres y varones (n=75). Gel de agarosa al 0.7% representativo mostrando la amplificación del gen en 14 cepas usando DNA genómico como templado. (-). Control negativo (+) Control positivo usando DNA genómico de la cepa UPEC CFT073 como templado. (M.M.) Marcador de peso molecular de 100 pb de la marca Thermo Scientific.

31 cepas resultaron negativas para ambos genes, entre las que se encuentran la 103, 108, 109, 110, 111, 112, 116, 120, 122, 124, 127, 132, 134, 135, 137, 139, 143, 146, 148, 151, 152, 155, 165, 166, 167, 168, 169, 171, 174 y 175 (41.3%).

Tabla 7: Resultado de la amplificación de los transportadores *tonB/sitA* comparado por sexo

GENES	CEPAS
<i>tonB/sitA</i> (+/+)	MUJERES: 104, 105, 106, 107, 114, 119, 121, 123, 133, 136, 138, 140, 141, 147, 149, 150, 153, 170, 172. VARONES: 102, 117, 118, 126, 128, 130, 159, 161, 173.

<i>tonB</i> (+/-)	MUJERES: 113, 145, 156, 157, 158, 160, 163, 164. VARONES: 125, 162.
<i>sitA</i> (-/+)	MUJERES: 101, 131, 142, VARONES: 129, 144, 154,

8.5.5 Estandarización de la amplificación del gen del receptor de salmoquelina *iroN*

El rango del gradiente de temperatura propuesto fue de 60.3 a 63 °C, siendo 61.9 la temperatura elegida.

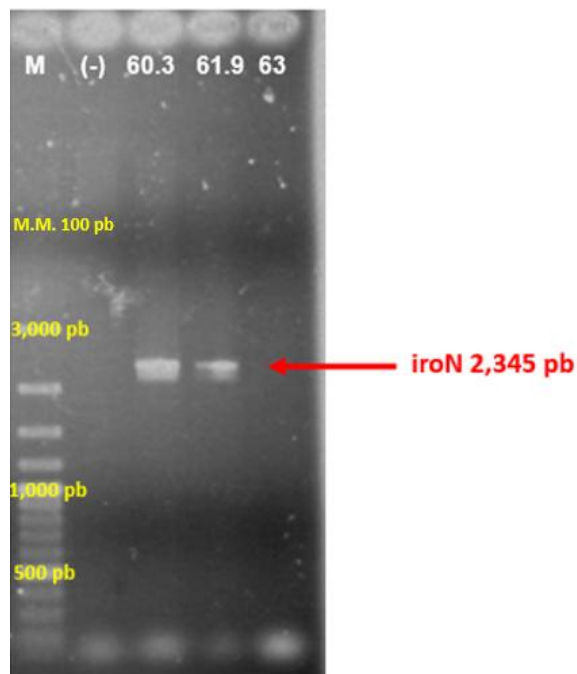


Figura 28: Estandarización de la amplificación por PCR del gen del receptor de salmoquelina *tonB*. Se muestra amplificación en las temperaturas 60.3 y 61.9, pero no en 63°C. Se usó como DNA templado extracción genómica de CFT073.

8.5.6 Determinación por PCR del receptor de salmoquelina *iroN* en el de varones y mujeres

De las 75 cepas estudiadas, 19 fueron positivas para *iroN* (25.3%), que corresponden a la 101, 104, 105, 106, 107, 109, 113, 116, 121, 123, 130, 133, 135, 166 y 169 en mujeres y la 115, 118, 159 y 162 en el caso de los varones.

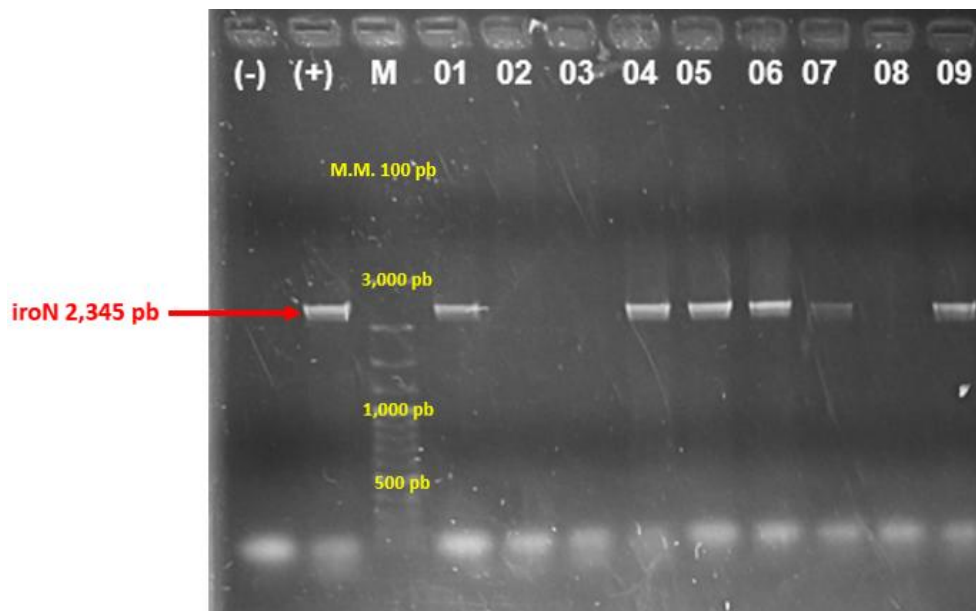


Figura 29: Determinación del receptor de salmoquelina *iroN* en el cepario ISSSTE 2015-2016 (n=75). Resultado de la amplificación por PCR de *iroN* (2,345 pb) en cepario de mujeres y varones (n=75). Gel de agarosa al 0.7% representativo mostrando la amplificación del gen en 14 cepas usando DNA genómico como templado. (-). Control negativo (+) Control positivo usando DNA genómico de la cepa UPEC CFT073 como templado. (M.M.) Marcador de peso molecular de 100 pb de la marca Thermo Scientific.

8.5.7 Estandarización de la amplificación de yersiniabactina *irp2*

Inicialmente se intentó estandarizar *irp2* junto con *entF* para una PCR múltiple, sin embargo, la amplificación no fue efectiva al colocarlos en la misma reacción, optando por una PCR individual. El rango del gradiente de temperatura propuesto en este caso fue de 58.7 a 62.2°C, siendo esta última la seleccionada.

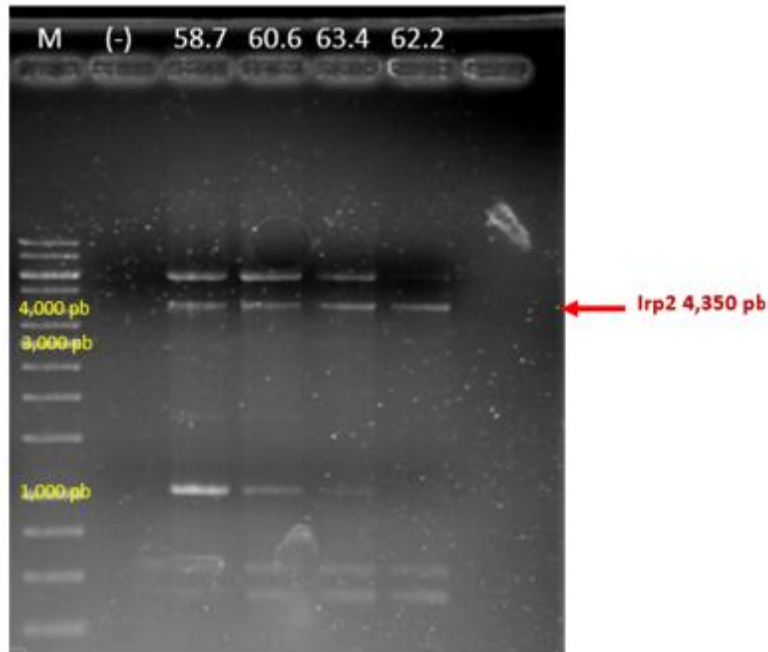


Figura 30: Estandarización de la amplificación por PCR del gen *irp2* que codifica para yersiniabactina (*HMWP2*). Se muestra amplificación de *irp2* (4,350 pb) a las temperaturas 58.7, 60.6, 63.5 y 62.2°C, a la última temperatura de 62.2°C se pierden algunas bandas inespecíficas. Se usó como DNA templado extracción genómica de CFT073.

8.5.8 Determinación de *irp2* por PCR en el cepario de varones y mujeres

De las 75 cepas, 8 fueron positivas para *irp2* (10%), que corresponden a las cepas 101, 104, 107, 114, 121, 122, 124 y 139 en mujeres. Ninguna cepa de varones fue positiva.

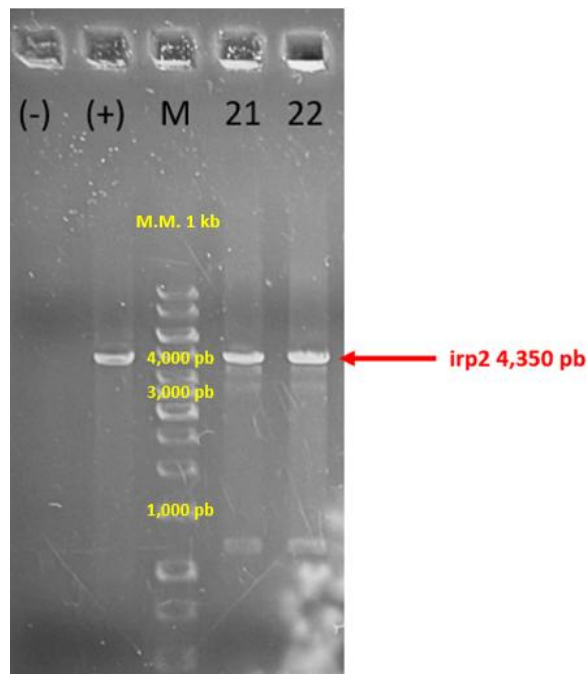


Figura 31: Determinación del gen de la proteína de síntesis de yersiniabactina *irp2* en el cepario ISSSTE 2015-2016 (n=75). Resultado de la amplificación por PCR de *irp2* (4,350 pb) en cepario de mujeres y varones (n=75). Gel de agarosa al 0.7% representativo mostrando la amplificación del gen en dos cepas usando DNA genómico como templado. (-). Control negativo (+) Control positivo usando DNA genómico de la cepa UPEC CFT073 como templado. (M.M.) Marcador de peso molecular de 1 kb de la marca Thermo Scientific.

8.6 Análisis de resultados de genes de sideróforos

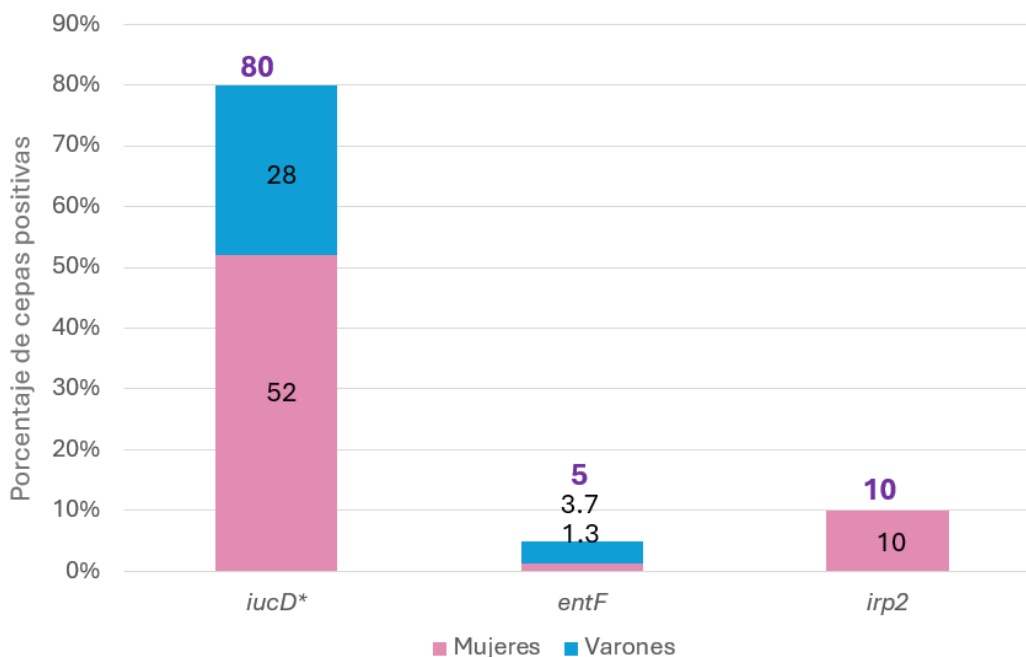


Figura 32: Porcentaje y relación de cepas positivas para los genes de síntesis de sideróforos: aerobactina (*iucD*), enterobactina (*entF*) y yersiniabactina (*irp2*) según el sexo (n=75). *iucD* estuvo presente en el 80% (n=60) del cepario, donde el 52% (n=39) corresponde a mujeres y un 28% (n=21) a varones. *entF* estuvo presente en el 5% (n=4) de todo el cepario, donde un 1.3% (n=1) corresponde a mujeres y 3.7% (n=3) a varones. *irp2* estuvo presente en un 10% (n=8) del cepario, únicamente encontrándose en mujeres. Los datos de *iucD** reportados por Cortez y Huelgas en 2020 fueron usados como referencia para este análisis con fines comparativos. El color rosa corresponde a cepas de mujeres mientras que el azul a varones.

Para realizar un análisis más completo, se tomaron resultados de los genes *iucD* e *iha*, siendo estos reportados por Cortez y Huelgas en el año 2020 en el LBME, quienes trabajaron con el mismo cepario.

Comparando los resultados obtenidos por PCR de los genes de sideróforos encontramos que el gen con mayor prevalencia fue *iucD* con un 80% (Cortez y Huelgas en 2020), seguido de *irp2* con 10% y finalmente *entF* en 5%. Comparando según el sexo podemos observar que el cepario de mujeres tiene mayor presencia de genes que codifican para sideróforos en comparación del de varones (figura 31).

Con respecto a los genes relacionados a la captación de hierro, en el cepario ISSSTE 2015-2016 (n=75) los genes con mayor prevalencia fueron *tonB* con un 52%, seguido de *iha* con un 50.6% (Cortez y Huelgas en 2020) y *sitA* con un 46.6%. El gen que se encontró con menor frecuencia en comparación con los anteriores fue *iroN* en un 25.3% (figura 32).

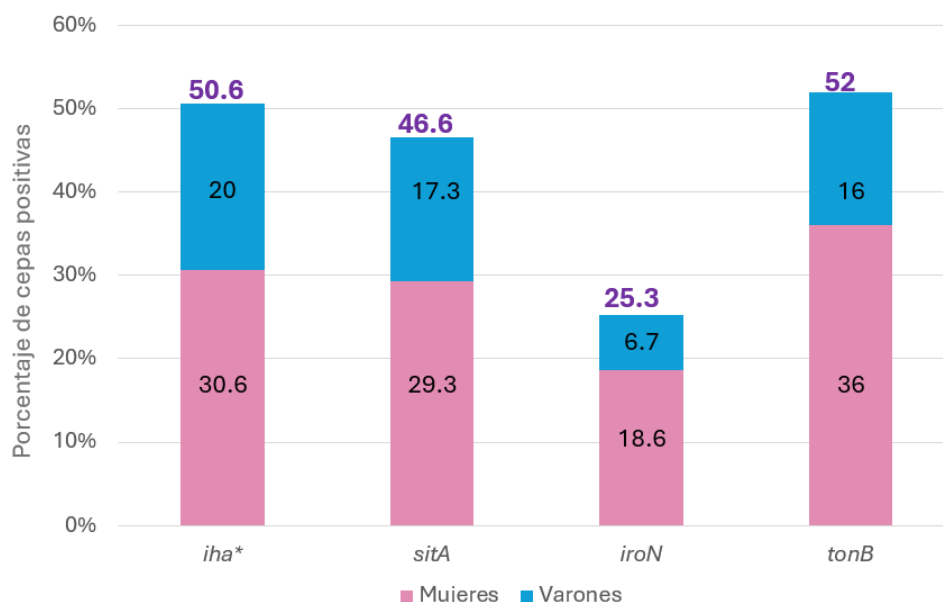


Figura 33: Porcentaje y relación de cepas positivas para los genes de transporte y captación de hierro como la adhesina homóloga IrgA (*iha*), la proteína de unión periplásmica (*sitA*), el receptor de salmoquelina (*iroN*) y el importador de sideróforos (*tonB*) según el sexo (n=75). *iha* estuvo presente en el 50.6% (n=38) del cepario, donde un 30.6% (n=23) corresponde a mujeres y un 20% (n=15) a varones. *sitA* estuvo presente en un 46.6% (n=35), donde un 29.3% (n=22) corresponde a mujeres y un 17.3% (n=13) a varones. *iroN* estuvo presente en un 25.3% (n=19) donde un 18.6% (n=14) pertenece a mujeres y un 6.7% (n=5) a varones. *tonB* estuvo presente en un 52% (n=39) donde un 36% (n=27) corresponde a mujeres y un 16% (n=12) a varones. Los datos de *iha** fueron tomados de los resultados reportados por Cortez y Huelgas en 2020 con fines comparativos. El color rosa corresponde al cepario de mujeres y el azul al de varones.

La relación de cada una de las cepas y el resultado de la amplificación de cada uno de los genes estudiados se plasma a continuación, las cepas en color rosado pertenecen a mujeres y las de color azul a varones:

Tabla 8: Resultados de la determinación por PCR de genes de sistemas de captación de hierro de cada cepa.										
Cepa	Sideróforos				Captación				Total	
	<i>iucD*</i>	<i>entF</i>	<i>irp2</i>		<i>iha*</i>	<i>sitA</i>	<i>iroN</i>	<i>tonB</i>		
101-I	+	-	+	2	+	+	+	-	3	5
102-I	+	-	-	1	-	+	-	+	2	3
103-I	+	-	-	1	+	-	-	-	1	2

104-I	+	-	+	2	-	+	+	+	3	5
105-I	+	-	-	1	-	+	+	+	3	4
106-I	+	-	-	1	-	+	+	+	3	4
107-I	+	-	+	2	+	+	+	+	4	6
108-I	-	-	-	0	-	-	-	-	0	0
109-I	+	-	-	1	-	-	+	-	1	2
110-I	+	-	-	1	+	-	-	-	1	2
111-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
112-I	+	-	-	1	+	-	-	-	1	2
113-I	+	-	-	1	+	-	+	+	3	4
114-I	+	-	+	2	-	+	-	+	2	4
115-I	+	-	-	1	+	+	+	+	4	5
116-I	-	-	-	0	-	-	+	-	1	1
117-I	+	-	-	1	-	+	-	+	2	3
118-I	+	-	-	1	+	+	+	+	4	5
119-I	+	-	-	1	+	+	-	+	3	4
120-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
121-I	-	-	+	1	-	+	+	+	3	4
122-I	+	-	+	2	+	-	-	-	1	3
123-I	+	-	-	1	-	+	+	+	3	4
124-I	-	-	+	1	-	-	-	-	0	1
125-I	-	-	-	0	+	-	-	+	2	2
126-I	+	-	-	1	+	+	-	+	3	4
127-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
128-I	+	+	-	2	+	+	-	+	3	5
129-I	+	-	-	1	+	+	-	-	2	3
130-I	+	+	-	2	+	+	+	+	4	6
131-I	-	-	-	0	-	+	-	-	1	1
132-I	-	-	-	0	-	-	-	-	0	0
133-I	+	-	-	1	+	+	+	+	4	5
134-I	-	-	-	0	-	-	-	-	0	0
135-I	+	-	-	1	-	-	+	-	1	2
136-I	-	-	-	0	+	+	-	+	3	3
137-I	-	-	-	0	-	-	-	-	0	0
138-I	+	-	-	1	+	+	-	+	3	4
139-I	+	-	+	2	+	-	-	-	1	3
140-I	+	-	-	1	+	+	-	+	3	4
141-I	+	-	-	1	+	+	-	+	3	4
142-I	-	-	-	0	-	+	-	-	1	1
143-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
144-I	+	-	-	1	-	+	-	-	1	2
145-I	+	-	-	1	-	-	-	+	1	2
146-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
147-I	-	-	-	0	+	+	-	+	3	3
148-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1

149-I	-	-	-	0	+	+	-	+	3	3
150-I	+	-	-	1	-	+	-	+	2	3
151-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
152-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
153-I	-	-	-	0	+	+	-	+	3	3
154-I	+	-	-	1	+	+	-	-	2	3
155-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
156-I	+	-	-	1	+	-	-	+	2	3
157-I	+	-	-	1	+	-	-	+	2	3
158-I	+	-	-	1	+	-	-	+	2	3
159-I	+	-	-	1	+	+	+	+	4	5
160-I	+	-	-	1	+	-	-	+	2	3
161-I	+	-	-	1	+	+	-	+	3	4
162-I	+	-	-	1	+	-	+	+	3	4
163-I	+	-	-	1	+	-	-	+	1	3
164-I	+	-	-	1	+	-	-	+	2	3
165-I	+	+	-	2	-	-	-	-	0	2
166-I	-	-	-	0	-	-	+	-	1	1
167-I	+	-	-	1	+	-	-	-	1	2
168-I	+	+	-	2	+	-	-	-	1	3
169-I	+	-	-	1	-	-	+	-	1	2
170-I	+	-	-	1	+	+	-	+	3	4
171-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
172-I	+	-	-	1	+	+	-	+	3	4
173-I	+	-	-	1	-	+	-	+	2	3
174-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
175-I	+	-	-	1	-	-	-	-	0	1
N total	60	4	8		38	35	19	39		
%	80	5.3	10.6		50.6	46.6	25.3	52		

En color rosa se observa el número de cepa aislada de orina en mujeres y en azul aislado de varones.

Podemos observar que lo más común es que las cepas tengan solo un gen de síntesis, con un 69.3% del cepario total perteneciendo a este grupo, mientras que ninguna cepa resultó positiva para los tres genes (Figura 33).

Contrastando con los genes de importación de hierro se encontró que el 28% del cepario total cuenta con tres de los cuatro genes estudiados, siendo esta su distribución más común. Solo un 8% de cepas cuentan con los cuatro genes (Figura 34).

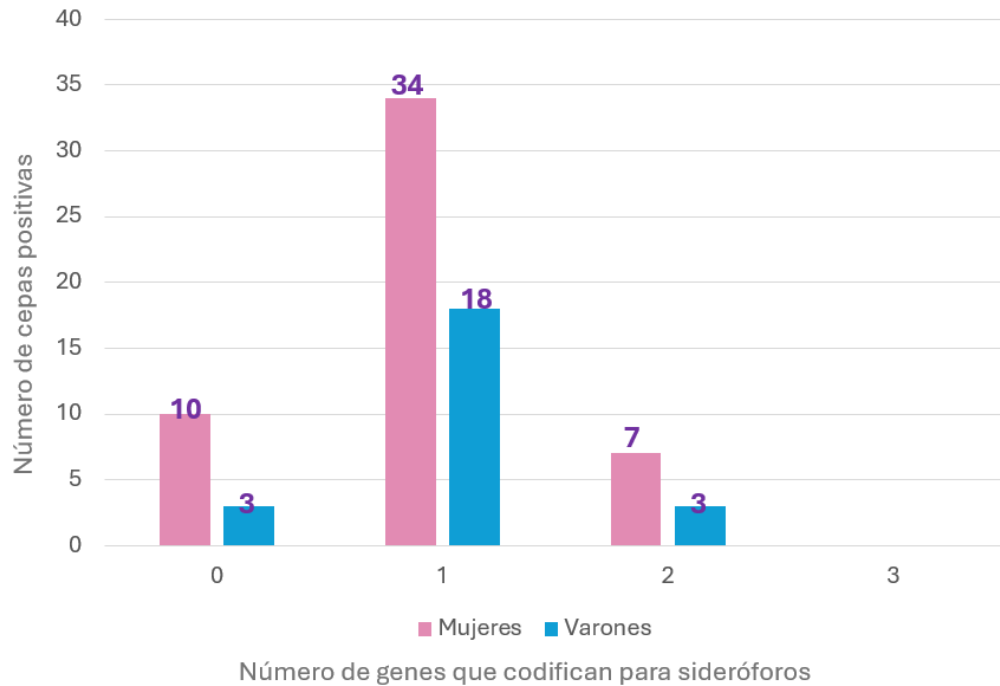


Figura 34: Agrupación de cepas (divididas por sexo) según la cantidad de genes de síntesis de sideróforos (*iucD, *entF* e *irp2*) posee, desde ninguno (n=0) hasta todos los estudiados (n=3) en un cepario de UPEC.** 13 cepas no amplificaron ningún gen de síntesis, donde 10 pertenecen al cepario de mujeres y 3 al de varones. 52 cepas resultaron positivas para solo un gen donde 34 pertenecen a mujeres y 18 a varones. 10 cepas fueron positivas para dos genes de síntesis donde 7 pertenecen a mujeres y 3 a varones. Ninguna cepa resultó positiva para los tres genes determinados. El color rosa representa cepas de mujeres y el azul las de varones.

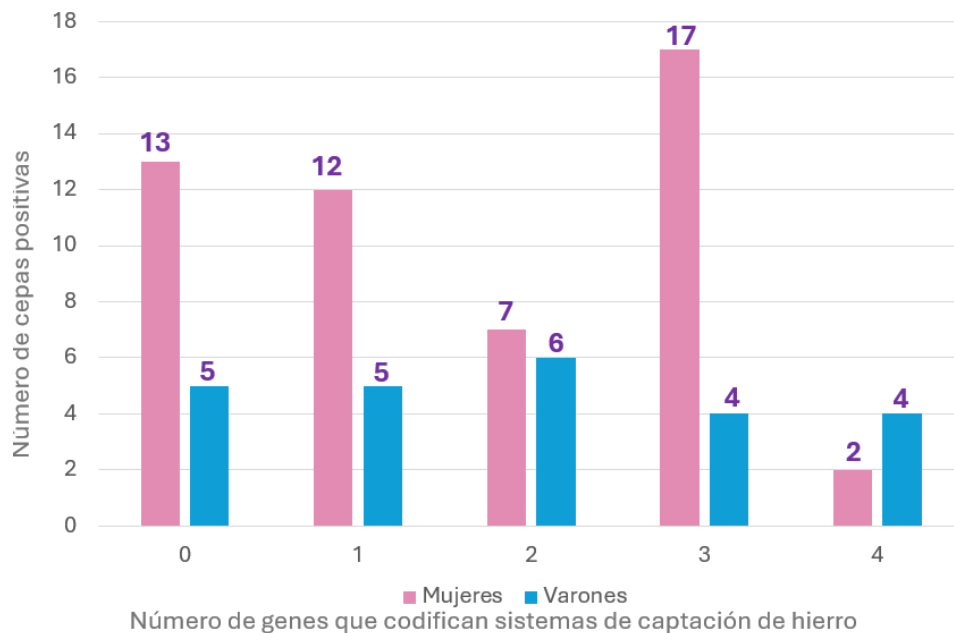


Figura 35: Agrupación de cepas (divididas por sexo) según la cantidad de genes de captación de hierro que posee (*iha, *sitA*, *iroN* y *tonB*) desde ninguno (n=0), hasta todos los estudiados**

(n=4) en un cepario de UPEC. 18 cepas resultaron negativas para la amplificación de los genes de captura donde 13 corresponden a mujeres y 5 a varones. 17 cepas fueron positivas para solo un gen donde 12 son de mujeres y 5 de varones. 13 fueron positivas para dos genes donde 7 corresponden a mujeres y 6 a varones. 21 cepas fueron positivas para tres genes donde 17 corresponden a mujeres y 4 a varones. 6 cepas resultaron positivas para todos los genes en su totalidad, donde 2 corresponden a mujeres y 4 a varones. El color rosa representa las mujeres mientras que el azul a los varones.

8.7 Comparación entre fenotipo y genotipo de síntesis de sideróforos (genes *iucD**, *entF* e *irp2*)

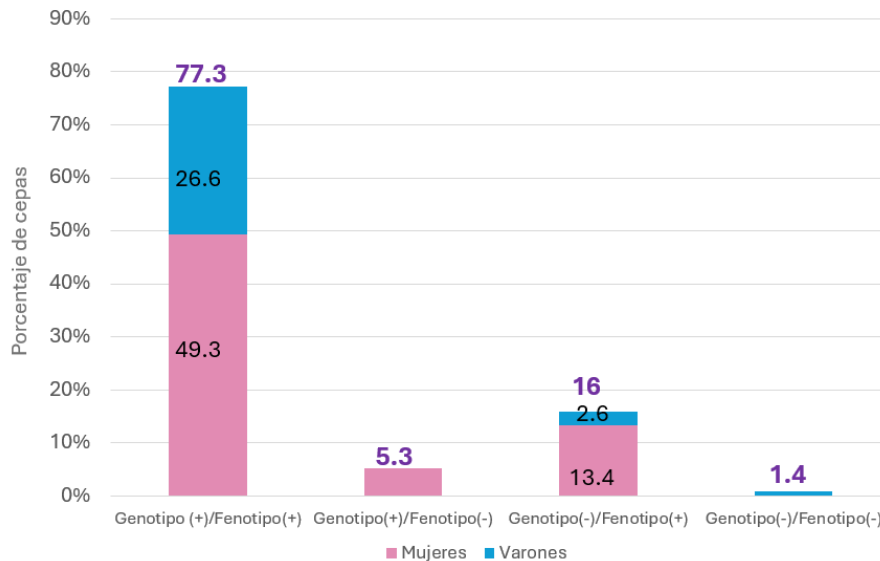


Figura 36: Comparación de fenotipo contra genotipo de sideróforos según el sexo. El fenotipo y genotipo positivo (+/+) se encontró en un 77.3% de las cepas (n=58), dentro de las cuales 37 pertenecen al cepario de mujeres y 21 al de varones. Genotipo positivo y fenotipo negativo (+/-) se observó en un 5.3% de las cepas (n=4) todas perteneciendo a mujeres. Genotipo negativo y fenotipo positivo (-/+) se encontró en un 16% de todas las cepas (n=12) donde 10 pertenecen a mujeres y 2 a varones. El genotipo y fenotipo negativo se observó en 1.4% (n=1) de las cepas, correspondiendo al cepario de varones.

Cerca del 80% de las cepas (77.3%) fueron positivas tanto en genotipo (determinación de PCR) como en fenotipo (ensayo cualitativo de producción de sideróforos en medio CAS) en síntesis de sideróforos. En la conformación genotipo positivo y fenotipo negativo únicamente se encontraron cepas de mujeres, mientras que en genotipo y fenotipo negativo solo hay una cepa de varones.

DISCUSIÓN

Clermont en 2019 propone al gen *ybgD* como específico para la identificación del filogrupo G, pero si así lo fuera, no se observaría su amplificación en cepas filogenéticamente más alejadas de las B2 y F, como se observa en las cepas MC4100 (filogrupo A) y EDL933 (filogrupo E). Naturalmente, UPEC cuenta con una plasticidad genética muy elevada, de ahí la dificultad para diseñar marcadores moleculares específicos para su identificación, además, las cepas del presente estudio son aislados clínicos, lo que les da cierta impredecibilidad genómica debido a que existen muchas más variables que alteran su comportamiento al compararla con una cepa controlada en el laboratorio. Abram y cols. en 2021 realizaron un análisis tipo Mash (secuenciación del genoma completo) en 10,667 genomas de *E. coli* y *Shigella* con el fin de clasificarlos por filogrupos. En dicho estudio encontraron que el 9% de sus genomas no son tipificables por técnicas de PCR *in silico*, otro 7% no concordaba con las predicciones arrojadas por Clermon Typing, en especial con el filogrupo G. De los 96 genomas que por la metodología Mash asociaron a dicho filogrupo, el Clermon Typing generó discrepancias en 47 lo que invita a preguntarse si el gen elegido como específico para dicho filogrupo es tan específico como se propone (Abram et al., 2021). Algunos grupos de trabajo han intentado estudiar con mayor profundidad el gen *ybgD*, sin embargo, a pesar de encontrar su operón en el genoma, sus genes permanecen inactivos en condiciones de laboratorio lo que dificulta su análisis, este concepto se conoce como operón críptico (Korea etl al., 2010).

De las 51 cepas estudiadas un 23% resultaron positivas a *uclA* y *uclD* simultáneamente (12/51). Tomando en cuenta que ambos genes se presentan a la vez, podemos inferir que las cepas positivas cuentan con el operón fimbrial *ucl* en su información genética y la posibilidad de adherirse a las criptas intestinales, evidenciando la relación evolutiva entre los patotipos intestinales y extraintestinales.

El 92% de las cepas de mujeres expresaron sideróforos en los ensayos fenotípicos con un diámetro de halo promedio de 1 cm, mientras que en varones se expresaron en un 95% y con 1.5 cm de diámetro promedio, sin embargo, de las 10 muestras

reportadas con mayor producción de sideróforos, 8 (104, 105, 106, 110, 117, 141, 143, 144, 145, 148 y 149) pertenecen a mujeres. Según reportes, aunque las ITU sean más comunes en mujeres, en varones se observan infecciones complicadas con mayor frecuencia. Aunque en la presente colección el grupo de varones tenga un promedio de diámetro mayor al de mujeres, la mayoría de las muestras con resultados fenotípicos más significativos pertenecen a este último grupo.

Comparando los datos se puede observar cómo algunas muestras fenotípicamente positivas resultan negativas a la PCR de los genes relacionados a los genes de síntesis de sideróforos.

- **Mujeres:** 116, 131, 134, 136, 137, 142, 147, 149, 153 y 166
- **Varones:** 108 y 132

Curiosamente, a pesar de que las cepas 110 (2.1 cm), 143 (1.9 cm) y 148 (2 cm), resulten negativas para *entF*, *iroN*, *sitA*, *tonB* e *irp2*, corresponden a tres de las diez cepas con mayor producción de sideróforos, con diámetros de 2.1 cm, 1.9 cm y 2 cm respectivamente. Tomando en cuenta esta información, podemos inferir que dichas cepas cuentan con otros sistemas de captación diferentes a los considerados en este estudio. UPEC es conocido por ser un microorganismo con una variedad genética considerable, por lo que existe la posibilidad de que cuente con otros sideróforos o receptores de los cuales aún no se tiene suficiente información, pues el ensayo fenotípico no determina la cantidad ni el tipo de sideróforos presentes, solo evidencia su expresión.

Por otro lado, existen otras muestras fenotípicamente negativas, pero que resultaron positivas en al menos un gen de síntesis de sideróforos en la amplificación por PCR.

- **Mujeres:** 135 (*iucD*), 139 (*iucD*, *irp2*), 165 (*iucD*, *entF*) y 169 (*iucD*)

Esto podría sugerir que la expresión de sus sideróforos depende de factores ambientales específicos para su expresión (temperatura, nutrientes, interacción microbiana, pH, osmolaridad, oxígeno, etc.). Recordemos que a pesar de que los medios de cultivo contienen todos los nutrientes necesarios para que un

microorganismo crezca *in vitro*, estos jamás lograrán emular las condiciones ambientales dentro del organismo a la perfección.

Las cepas 135, 169 y 125, con resultado fenotipo negativo, cuentan con la presencia de genes relacionados a receptores e importadores, lo que implica una capacidad para tomar sideróforos provenientes de microorganismos aledaños y tomarlo como suyo, concepto conocido como piratería de sideróforos (Byun et al., 2020).

Las cepas que contaron con mayor diversidad de genes relacionados a sistemas de hierro tanto sideróforos como transportadores fueron:

- **104:** *iucD*, *irp2*, *sitA*, *iroN* y *tonB*
- **107:** *iucD*, *irp2*, *sitA*, *iroN*, *iha* y *tonB*
- **130:** *iucD*, *entF*, *sitA*, *iroN*, *iha* y *tonB*

Se han realizado estudios sobre la presencia de enterobactina en cepas de *E. coli*, como es el caso de Henderson y cols., que en 2009 compararon la presencia de los sideróforos aerobactina, enterobactina, salmoquelina y yersiniabactina en cepas de *E. coli* aisladas de tracto gastrointestinal contra otras obtenidas del tracto genitourinario. La presencia de enterobactina fue elevada, pues el 100% de las 21 cepas de tracto urinario fueron positivas. En el presente trabajo, sin embargo, el gen *entF* (serin-sintasa) fue positivo en 4 de 75 muestras (5.3%), tomando en cuenta que UPEC surge de reservorios intestinales, la baja presencia de dicho gen podría deberse a la intervención de factores ambientales a los que se ve expuesta la bacteria durante el tránsito del tracto gastrointestinal hacia el genitourinario, sufriendo modificaciones genéticas cuyo grado aún no podríamos determinar. Por otro lado, existe la posibilidad de que las cepas que resultaron negativas no requieren producir dicho sideróforo porque cuentan con otros en su arsenal o simplemente, en su ambiente nativo su fuente de hierro provenía de sideróforos liberados por bacterias vecinas que sí pueden producirlo.

Behnouch y cols. en 2016 determinaron la presencia de genes relacionados a la síntesis de yersiniabactina, aerobactina y el receptor de salmoquelina en una colección de 170 cepas de UPEC aisladas de ITU, dentro de los genes estudiados

se encuentra *iroN* (receptor de salmoquelina), que fue encontrado en un 30.6% (52/170). El resultado obtenido en el presente proyecto no está tan alejado de lo reportado por Behnosuh, con un 25.3% de cepas positivas (19/75) podemos decir que no hay una diferencia significativa entre ellos. Otro de los genes estudiados por Behnoush incluye a *irp2* (HMWP2), que estuvo presente en el 68.2% de sus muestras (116/170), mientras que en esta colección solo un 10% contaban con el gen (8/75). Debido a que *irp2* se encuentra en una isla de patogenicidad y sumado a la variabilidad genética propia de UPEC, su permanencia está ligada a su aprovechamiento. Hasta la fecha no se han reportado cepas de *Yersinia* con deleción espontanea de la isla, sin embargo, hacen falta estudios analizándola en UPEC para determinar si comparten la misma estabilidad.

El 52% de las cepas cuentan con el gen *tonB*, mientras que *sitA* se encuentra en un 46.6%. Debido a que la disponibilidad del hierro en estado libre es baja, es razonable que el importador *sitA* tenga una menor presencia que *tonB*, la bacteria puede prescindir del ion en estado libre, pero no tanto de sideróforos. *iroN* fue observado en un 25.3% de las cepas, podemos inferir que esto se debe a que salmoquelina es un sideróforo que surge de modificaciones a la enterobactina como respuesta contra la inmunidad del hospedero, es probable que los individuos de donde provienen las cepas aisladas contaran con una respuesta inmune insuficiente propia al estrés ocasionado por el proceso infeccioso (ITU) o por alguna otra razón, lo que disminuye la necesidad del microorganismo de contar con el receptor para dicho sideróforo. También existe la posibilidad de que debido al paso del tiempo bajo condiciones de laboratorio las cepas hayan sufrido una reducción genómica y perdido genes que no requiere en condiciones *in vitro*, sin embargo, haría falta realizar un análisis con mayor profundidad.

Las cepas que no contaron con genes de sideróforos ni de receptores fueron las **108, 132, 134** y la **137**. Dichas cepas no hubieran sobrevivido en el ambiente sin la capacidad de aprovechar el hierro de alguna forma, lo que sugiere que cuentan con otros genes de síntesis o de captación de hierro que no fueron analizados en el

presente estudio. Otros posibles genes para analizar son propuestos en el apartado de “Perspectivas”.

CONCLUSIONES

La identificación del filogrupo G por PCR no depende de un solo gen, es necesario realizar análisis genómicos más profundos para proponer otros genes adicionales y demostrar su especificidad.

La presencia simultánea de *uclA* y *uclD* indica que las muestras positivas tienen la posibilidad de expresar una adhesina funcional. Encontrar la fimbria *ucl* en cepas de UPEC demuestra su relación con el nicho gastrointestinal. Evolutivamente UPEC surge a partir de colonias de *E. coli* localizadas en el colon y al permanecer mucho tiempo en el tracto genitourinario la necesidad de contar con la información genética de adhesinas inactivas disminuye y puede llegar a perderse.

Fenotípicamente hablando, a pesar de que el diámetro promedio en el grupo de mujeres fue menor que en el grupo de varones (1 cm y 1.5 cm de halo cada uno), dentro de las cepas aisladas de mujeres se encuentran ocho de las diez cepas con una producción de sideróforos mayor al promedio.

Los genes de síntesis que incluyen *entF* e *irp2* se encontraron en un 5% y 10% en ese orden, esto es una menor frecuencia comparando con el gen de aerobactina *iucD* que se encontró en el 80% del cepario total.

Los genes de captación de hierro *iha*, *sitA* y *tonB* tuvieron una distribución cercana estando en el 50.6%, 46.6% y 52% del cepario respectivamente. El receptor de salmoquelina fue el que menor presencia tuvo siendo positivo en el 25.3% de las cepas.

A pesar de que existan diversos factores ambientales de los que dependa la liberación de sideróforos, su aprovechamiento no está ligado a su capacidad para sintetizarlos, mientras UPEC cuente con los receptores de hierro necesarios, puede tomar sideróforos de bacterias vecinas como fuente de dicho ión.

Conocer la distribución de genes que posee UPEC nos permite saber sus fortalezas y potencial patógeno, la creciente crisis causada por la resistencia antimicrobiana nos orilla a analizar el panorama completo por el cual este microorganismo genera el daño y en un futuro, desarrollar otras herramientas terapéuticas con un enfoque distinto.

PERSPECTIVAS

- Analizar a profundidad genomas de cepas control de *E. coli*, como la GAGI (filogrupo B2) para la identificación de genes del filogrupo G, pues el gen *ybgD* por sí solo no es concluyente.
- Determinar los niveles expresión de los genes *ucl* por medio de QT-PCR.
- Profundizar en el por qué algunas cepas UPEC cuentan con la adhesina entérica Ucl y otras no a pesar de su origen en un reservorio intestinal.
- Para completar el perfil de sistemas de captación de hierro en UPEC diseñar oligonucleótidos para otros genes relacionados con la síntesis como: *iroB* (síntesis de salmoquelina) e *irp1* (síntesis de yersiniabactina), y de captación como *fepA* (importe de enterobactina) y *fyuA* (receptor de yersiniabactina).
- Estudiar y comparar el impacto que distintos factores ambientales ejercen sobre la expresión de sistemas de captación de hierro y su aprovechamiento.

10. Anexos

Material biológico

Las 75 cepas con las que se trabajó fueron recolectadas del Instituto de Seguridad y Servicios Sociales de los Trabajadores del Estado (ISSSTE) de Puebla, México. Dichas muestras provienen de pacientes con un rango de edad de 21 a 86 años en las mujeres (n=51) y de 46 a 91 años en varones (n=24), siendo un total de 75 cepas. Fueron obtenidas durante el periodo de junio del 2015 a febrero del 2016, identificadas en el Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos mediante morfología colonial en medios selectivos y pruebas bioquímicas.

Preparación de agar/caldo Luria Bertani (LB)

Para preparar un litro de caldo LB se pesaron 5 g de NaCl, 5 g de extracto de levadura y 10 g de peptona de caseína. Se colocaron todos los componentes y se disolvieron en un litro de agua destilada usando agitación magnética aproximadamente 10 o 15 minutos para que estos se rehidrataran. Posteriormente se ajusta el pH a 7.8 y el caldo se distribuye en tubos de ensayo, frascos o matraces de acuerdo con las necesidades del experimento. Esterilizar a 121 °C, con una presión de 15 lbs por 15 minutos. Para preparar agar LB añadir agar bacteriológico al 1.5% y permitir la hidratación antes de esterilizar. Al salir de esterilización agitar suavemente para homogeneizar.

Determinación fenotípica de sideróforos

Para la preparación del agar cromo azurol S (CAS) se añadieron 100 ml de MM9 a 750 ml de agua destilada y 32.24 g de PIPES, una vez disuelto se ajustó el pH a 6.8. Se agregaron 15 g de agar bacteriológico y después se esterilizó en autoclave a 15 lb de presión durante 20 minutos, se retiraron de la olla y se dejó atemperar hasta que llegó a 50°C. Para continuar se añaden 30 ml de casaminoácidos estériles y 10 ml de solución de glucosa al 20%. Lentamente y por las paredes internas del matraz se colocaron 100 ml de solución Cromo Azurol S al 60%. Finalmente, el contenido se vertió en placas estériles y se esperó a que gelifique. Una vez gelificado, el agar se horadó con ayuda de pipetas Pasteur de vidrio estériles.

Para el ensayo se tomaron 80 µL de precultivo y fue incubado en 3 ml de LB desferrado hasta alcanzar una DO_{600nm} de 0.1. Para desferrarlo se prepararon volúmenes iguales de LB y 8-hidroxiquinolina al 3% y se homogenizó en un matraz de vidrio por 5 minutos, para después transferir la solución a un matraz de separación y dejar en reposo por 4 horas; el LB se recuperó en un vaso de precipitado de vidrio, donde después de 10-15 minutos de reposo (esto para permitir que residuos de cloroformo se evaporen) fue distribuido en tubos con 3 ml cada uno para esterilizar durante 15 minutos a 15 lb de presión.

Después se tomaron 25 µL del cultivo y se colocaron en una placa de agar CAS previamente horadada (esperar a que sequen los pocillos). Se incubó con la tapa hacia abajo durante 24 h a 37°C, para así determinar el cambio de color característico (naranja) de la presencia de sideróforos en el medio de cultivo en caso de ser positivo (Louden et al., 2011).

Extracción genómica por lisis alcalina

Para el precultivo se inocularon 10 µl de criovial en medio LB, se incubó a 37°C en agitación toda la noche, 80 µl del precultivo se inocularon en 5ml de caldo LB y fue incubado una vez más aproximadamente 4 h a 37°C a 200 rpm hasta obtener una DO_{600nm} de 0.4-0.6. Posteriormente se tomaron 500 µl y se obtuvo el paquete celular por centrifugación a 12000 rpm por 5 minutos. Se decantó el sobrenadante y la

pastilla celular se congeló hasta su uso. Para continuar el procedimiento se añadieron 570 μ l de solución 1 en condiciones de esterilidad y se lleva al vortex por 30 segundos, después se añadieron 60 μ l de SDS al 20%, se invirtió suavemente antes de llevar al vortex por 20 segundos evitando la formación de burbujas. Se colocaron los tubos en un termobloque precalentado, ajustado a 80°C por 5 minutos y se dejó atemperar. Se agregaron 2 μ l de RNAsa y se incubó por 45 minutos a 37°C. Se dejó unos minutos a temperatura ambiente y se adicionaron 200 μ l de NaCl 5M antes de invertir suavemente durante 20 segundos, se dejaron reposar las muestras por un minuto y se continuó con otro minuto en el vortex antes de dejarse un último minuto en reposo. Se incubó 5 minutos en hielo y posteriormente se centrifugó 10 minutos a 12,000 rpm. En tubos nuevos y correctamente rotulados se traspasó el sobrenadante de los tubos recientemente centrifugados y se agregaron 800 μ l de isopropanol, para invertir durante 1 minuto. Fue centrifugado otra vez por 20 minutos a 12,000 rpm y se retiró el sobrenadante, para continuar se añadieron 800 μ l de etanol al 70% y se centrifugó por 5 minutos a 12,000 rpm. Este paso se repitió de 1-3 veces dependiendo de los contaminantes presentes en la muestra. Para concluir se puso a secar la pastilla en estufa y se resuspendió en 75 μ l de Tris 10 mM pH 8, con ayuda del vortex se homogeniza y se refrigeraron las muestras.

Extracción genómica por caldo hervido

El precultivo se homogenizó y se vertió el contenido a un tubo eppendorf nuevo (tres cuartos de la capacidad máxima), se centrifugó durante 5 minutos a 12,000 rpm, al salir de la centrifuga se debe observar un botón al fondo del tubo y el sobrenadante se desecha en un frasco de vidrio procurando que dicho botón no se pierda. Se agregaron 600 μ l de agua destilada estéril al tubo y se resuspendió con la punta de una micropipeta. Posteriormente se colocaron las muestras en gradilla y se llevaron a ebullición en un recipiente resistente a la temperatura y al agua durante 15 minutos. Una vez pasado este tiempo se retiró del calor y las muestras se atemperaron durante 5-10 minutos, para proseguir con otro ciclo en la centrifuga por 15 minutos a 13,000 rpm. Finalmente se recuperó el sobrenadante y se colocó en

tubos nuevos correctamente rotulados, se cubrieron con papel parafilm y se almacenaron en refrigeración a 4°C hasta su uso.

Diseño de oligonucleótidos

El genoma de la cepa UPEC CFT073, con código de acceso NCBI: NC_004431.1. sirvió como base para el diseño de los primers. Herramientas bioinformáticas como “DNA Star” y “SnapGene” sirvieron como apoyo adicional para el diseño de un par de oligonucleótidos por cada gen: *entF* (peptidasa no ribosomal de enterobactina), *sitA* (receptor de hierro libre Fe³⁺), *irp2* (HMWP2 de yersiniabactina), *tonB* (transportador de sideróforos de membrana externa), *iroN* (importador de salmoquelina).

Estandarización de PCR

Con base en la T_m del certificado enviado por el proveedor de los oligonucleótidos, se eligió un rango de temperatura de alineamiento por cada par y por medio de un gradiente de temperatura se determinaron las condiciones necesarias para amplificación de cada uno de los genes de interés, tomando también en cuenta el tiempo de extensión de acuerdo con el tamaño del amplicón deseado y la velocidad de polimerización de la Taq DNA (Tabla 3).

Los oligonucleótidos para la amplificación de los genes fimbriales *uclA*, *uclD* y *ybgD*, este último para la determinación del filogrupo G, ya se encontraban en el LBME, su función y tamaño del amplificado se muestran en la Tabla 3.

Determinación de genes por PCR en DNA genómico del cepario

La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) es una técnica *in vitro* enzimática que amplifica la secuencia de ADN deseada. Esto es posible gracias a que se utiliza la enzima ADN polimerasa, la cual puede sintetizar copias del ADN de las células. Para realizar la PCR se usó el templado o molde (ADN genómico), un buffer, cloruro de magnesio (MgCl₂), H₂O, taq polimerasa (Dream Taq Thermo Scientific, código 10160790), desoxirribonucleótidos trifosfatados (dNTPs) y oligonucleótidos. Estos

componentes interactuaran entre sí en las etapas de la PCR, que constan en desnaturalización, alineamiento y extensión. Durante la desnaturalización, las cadenas de ADN son expuestas a altas temperaturas (aproximadamente 95 °C), lo que resulta en la separación de las cadenas que se usarán como templado en el siguiente paso. En el alineamiento, los oligonucleótidos se alinean al extremo 3' del templado de la fase anterior, provocando que estos dos se unan y formen un complejo. Para esto, se necesita una temperatura entre 50 y 65 °C aproximadamente que varía dependiendo de las características fisicoquímicas de los oligonucleótidos usados. Por último, durante la extensión, la polimerasa actúa en el complejo templado-oligonucleótidos, mediando la adición de los dNTP's para amplificar el fragmento en cadenas completas repetidas de ADN, esto a una temperatura de 72 °C.

Las condiciones de amplificación de cada gen son las siguientes:

Condiciones de amplificación de <i>ybgD</i> (177 pb)			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	3'	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30''	30 ciclos
Alineamiento	59°C	30''	30 ciclos
Extensión	72°C	18''	30 ciclos
Extensión final	72°C	7'	1 ciclo

Condiciones de amplificación de <i>entF</i> (3,969 pb)			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	94°C	5'	1 ciclo
Desnaturalización	94°C	1'	30 ciclos
Alineamiento	63.4°C	1'	30 ciclos
Extensión	72°C	5'	30 ciclos

Extensión final	72°C	10'	1 ciclo
------------------------	------	-----	---------

Condiciones de amplificación de <i>tonB</i> (814 pb) y <i>sitA</i> (1,002 pb)			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	5'	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30''	30 ciclos
Alineamiento	60.3°C	30''	30 ciclos
Extensión	72°C	1'	30 ciclos
Extensión final	72°C	7'	1 ciclo

Condiciones de amplificación de <i>iroN</i> (2,375 pb)			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	5'	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	30''	30 ciclos
Alineamiento	61.9°C	30''	30 ciclos
Extensión	72°C	2'20''	30 ciclos
Extensión final	72°C	7'	1 ciclo

Condiciones de amplificación de <i>irp2</i> (4,350 pb)			
ETAPA	TEMPERATURA	TIEMPO	CICLOS
Desnaturalización inicial	95°C	5'	1 ciclo
Desnaturalización	95°C	1'	30 ciclos
Alineamiento	62.2°C	1'	30 ciclos
Extensión	72°C	4'30''	30 ciclos
Extensión final	72°C	7'	1 ciclo

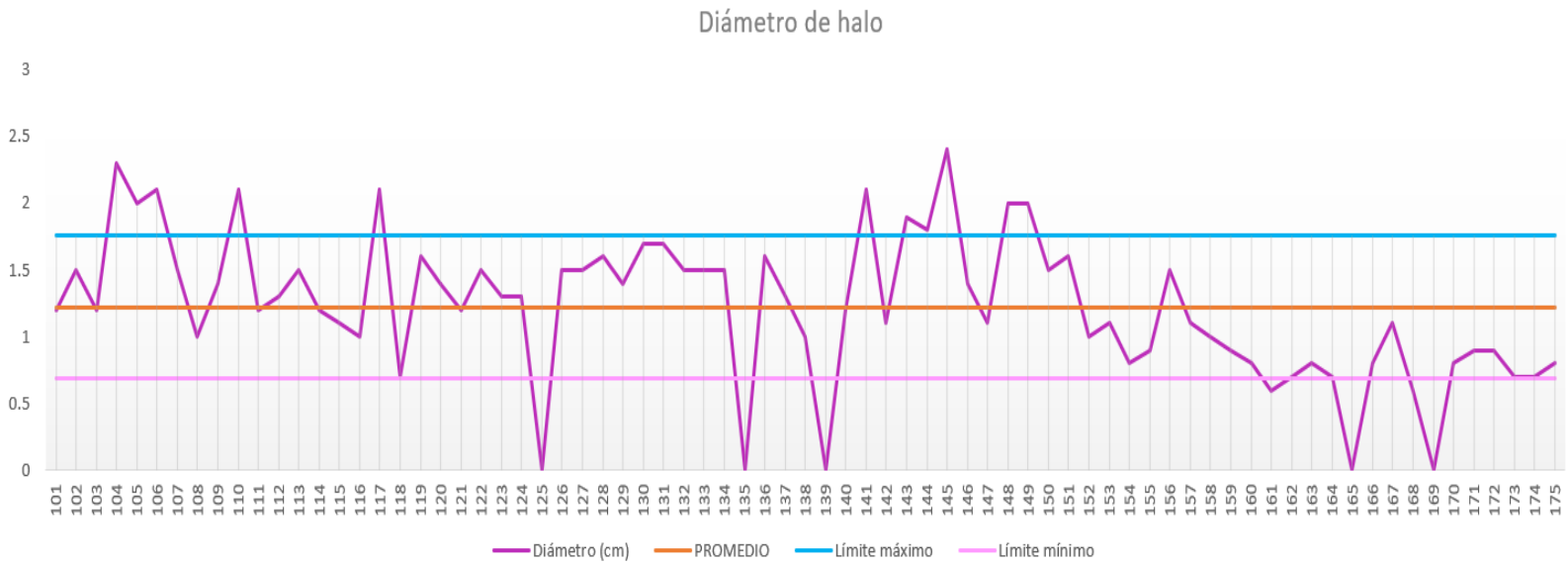
Electroforesis en gel de agarosa

Para el análisis de los productos deseados de la PCR, se utilizó la técnica de electroforesis horizontal en gel de agarosa. La electroforesis separa fragmentos de ADN y con base en la distancia recorrida se puede estimar su tamaño, gracias a la visualización que se genera mediante la tinción con bromuro de etidio (BET). Para la separación de los fragmentos de ADN se usó el buffer de corrida TAE (Tris-Acetato EDTA). Para preparar el gel de agarosa al 0.7% se pesaron entre 0.7 a 1 g de agarosa (dependiendo del tamaño de la cámara) y se agregó TAE 0.5X como buffer de corrida. Posteriormente se aumentó la temperatura para que la agarosa logre llegar a su punto de fusión y haya una solución homogénea. Una vez la temperatura bajó a 50°C aproximadamente se vertió sobre el molde para preparar el gel, se colocó el peine y se dejó gelificar a temperatura ambiente. El gel fue colocado en la cámara de electroforesis una vez gelificado y se cubrió con TBE o TAE. Para la visualización se mezclaron las muestras junto con un buffer de carga especial para electroforesis y se colocaron en los pozos dejados por el peine. Para correr la electroforesis se utilizó un voltaje de 60 V durante 15 minutos y posteriormente subió a 100 V hasta el final del gel. Finalmente, los geles se revelaron con bromuro de etidio y se analizaron en un transiluminador.

Purificación de DNA

Se utilizó el kit de recuperación de DNA de gel ZR-96 Zymoclean con número de catálogo D4021. Se siguió el procedimiento indicado por el fabricante y al finalizar se cuantificó la concentración de DNA usando un espectrofotómetro de microvolumen "Nanodrop". Para confirmar el resultado se hizo un corrimiento electroforético de la elución final en un gel de agarosa al 0.7%.

DESVIACIÓN ESTANDAR DE LA DETERMINACIÓN FENOTÍPICA DE SIDERÓFOROS.



RESULTADOS DE LA DETERMINACIÓN DE UCL

No. De cepa	V/M	uclA	uclD
101	M	(-)	(-)
104	M	(-)	(-)
105	M	(-)	(-)
106	M	(-)	(-)
107	M	(+)	(+)
109	M	(-)	(-)
111	M	(-)	(-)
112	M	(+)	(+)
113	M	(-)	(-)
114	M	(+)	(+)
116	M	(-)	(-)
119	M	(-)	(-)
120	M	(+)	(+)

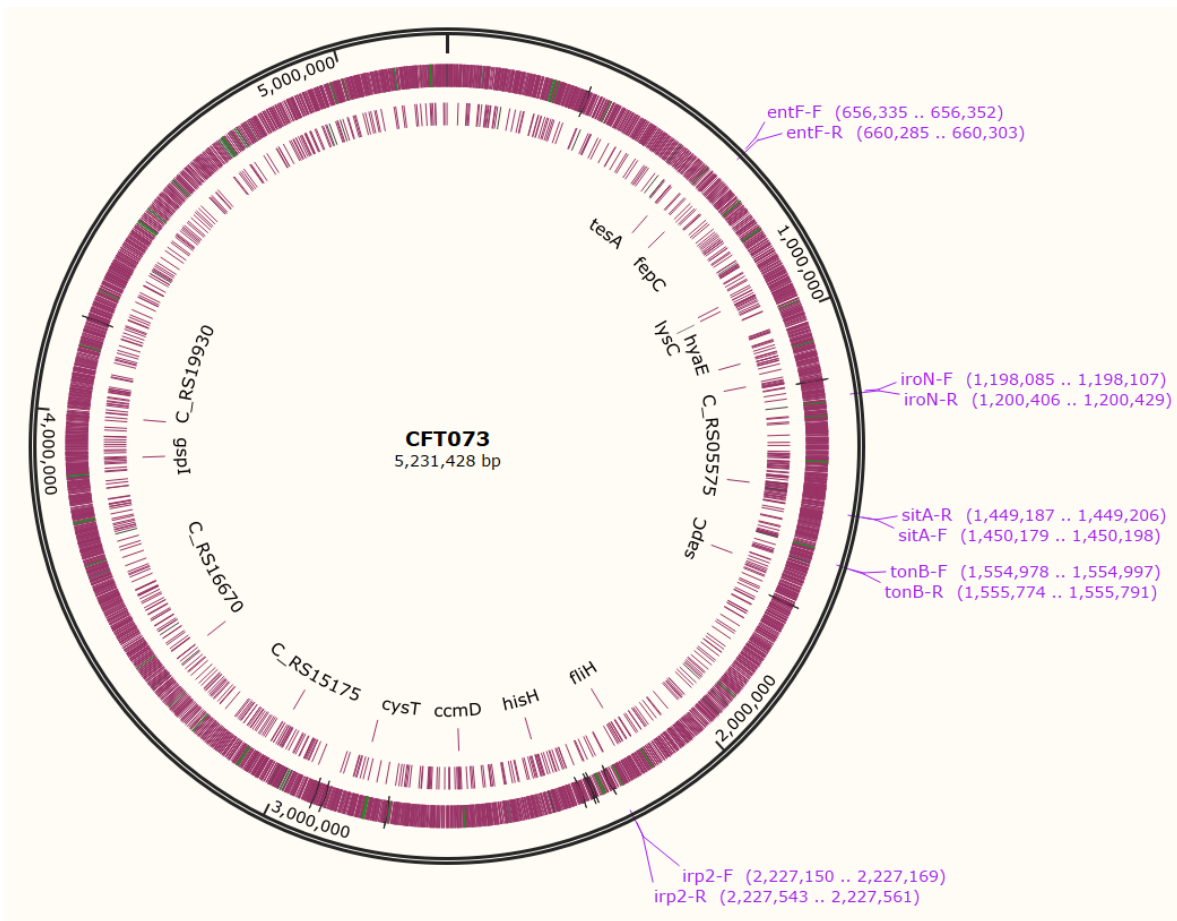
121	M	(-)	(-)
122	M	(-)	(-)
123	M	(-)	(-)
124	M	(-)	(-)
131	M	(-)	(-)
133	M	(-)	(-)
134	M	(-)	(-)
135	M	(-)	(-)
136	M	(-)	(-)
137	M	(-)	(-)
138	M	(-)	(-)
139	M	(-)	(-)
140	M	(-)	(-)
141	M	(-)	(-)
142	M	(-)	(-)
143	M	(-)	(-)
145	M	(-)	(-)
146	M	(-)	(-)
147	M	(+)	(+)
148	M	(-)	(-)
149	M	(-)	(-)
150	M	(-)	(-)
151	M	(-)	(-)
152	M	(-)	(-)
153	M	(-)	(-)
156	M	(+)	(+)
157	M	(+)	(+)
158	M	(+)	(+)
160	M	(+)	(+)
163	M	(+)	(+)
164	M	(+)	(+)
165	M	(-)	(-)
166	M	(-)	(-)
169	M	(-)	(-)
170	M	(+)	(+)
171	M	(-)	(-)
172	M	(-)	(-)
175	M	(-)	(-)

Resultados de ensayos fenotípicos y genotípicos de sistemas de captación.

No. De cepa	V/M	Diámetro en placa (cm)	Enterobactina (<i>ent</i>)	Salmoquelina (<i>iroN</i>)	Receptor de sideróforos (<i>tonB</i>)	Transporte de hierro (<i>sitA</i>)	Yersiniabactina (<i>irp2</i>)
101	M	1.2	(-)	(+)	(-)	(+)	(+)
102	V	1.5	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
103	V	1.2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
104	M	2.3	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
105	M	2	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
106	M	2.1	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
107	M	1.5	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
108	V	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
109	M	1.4	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
110	V	2.1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
111	M	1.2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
112	M	1.3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
113	M	1.5	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
114	M	1.2	(-)	(-)	(+)	(+)	(+)
115	V	1.1	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
116	M	1	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
117	V	2.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
118	V	0.7	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
119	M	1.6	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
120	M	1.4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
121	M	1.2	(-)	(+)	(+)	(+)	(+)
122	M	1.5	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
123	M	1.3	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
124	M	1.3	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
125	V	SIN HALO	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
126	V	1.5	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
127	V	1.5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
128	V	1.6	(+)	(-)	(+)	(+)	(-)
129	V	1.4	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
130	V	1.7	(+)	(+)	(+)	(+)	(-)
131	M	1.7	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
132	V	1.5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
133	M	1.5	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
134	M	1.5	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
135	M	SIN HALO	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)

136	M	1.6	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
137	M	1.3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
138	M	1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
139	M	SIN HALO	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
140	M	1.2	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
141	M	2.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
142	M	1.1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
143	M	1.9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
144	V	1.8	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
145	M	2.4	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
146	M	1.4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
147	M	1.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
148	M	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
149	M	2	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
150	M	1.5	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
151	M	1.6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
152	M	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
153	M	1.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
154	V	0.8	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
155	V	0.9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
156	M	1.5	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
157	M	1.1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
158	M	1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
159	V	0.9	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
160	M	0.8	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
161	V	0.6	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
162	V	0.7	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
163	M	0.8	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
164	M	0.7	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
165	M	SIN HALO	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
166	M	0.8	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
167	V	1.1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
168	V	0.6	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
169	M	SIN HALO	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
170	M	0.8	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
171	M	0.9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
172	M	0.9	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
173	V	0.7	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
174	V	0.7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
175	M	0.8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)

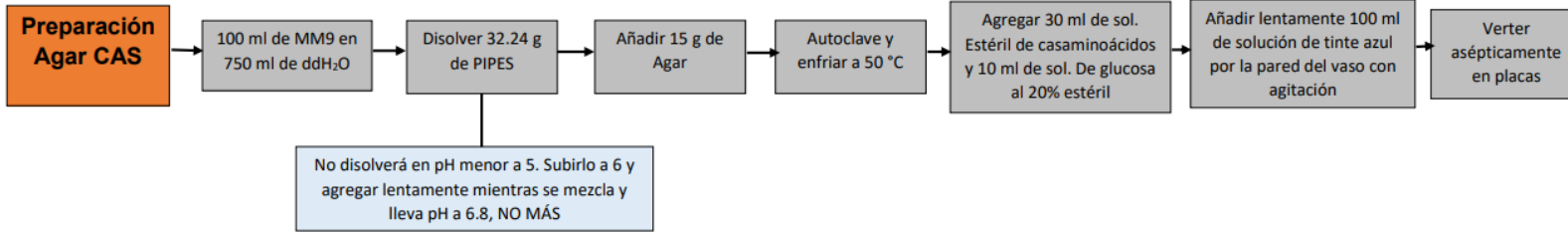
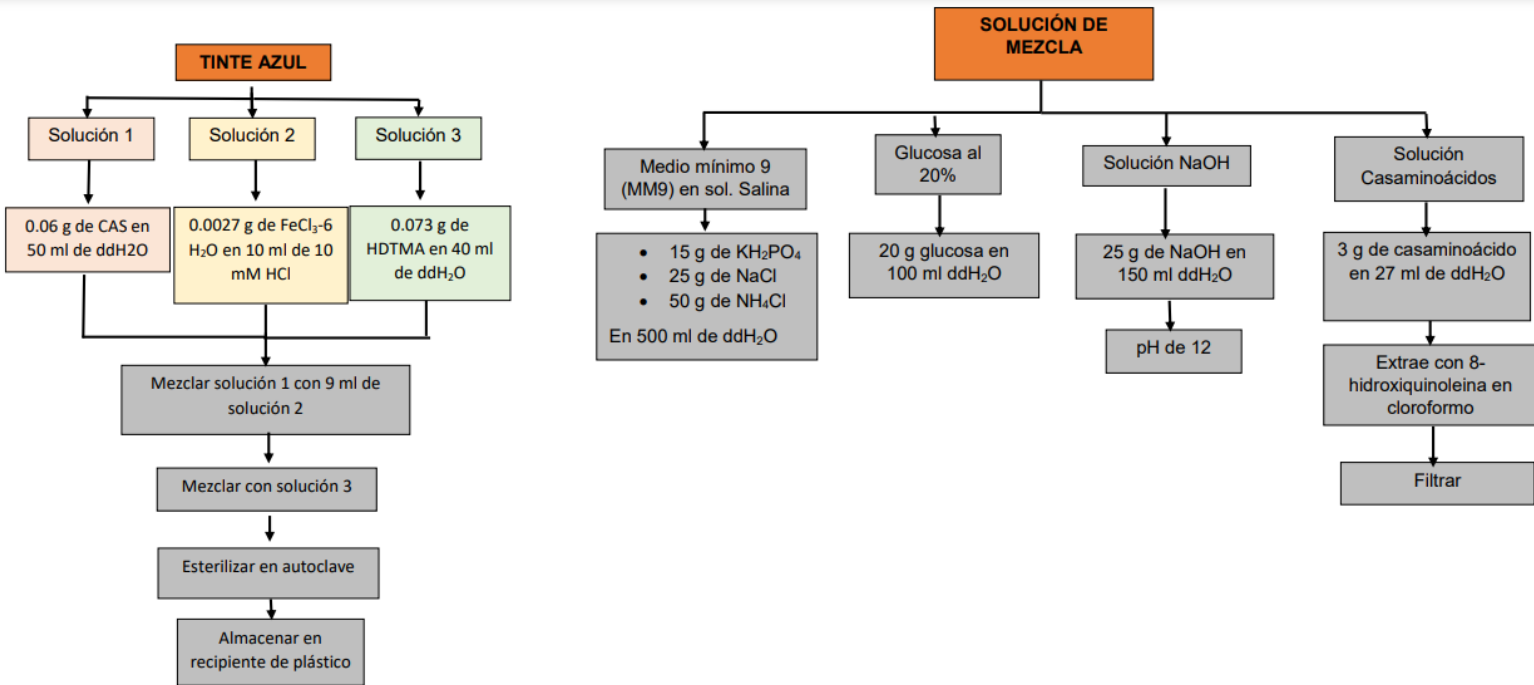
Visualización de oligonucleótidos diseñados en CFT073 por medio de "SnapGene"



SISTEMAS DE CAPTACIÓN DE HIERRO

No. De cepa	V/M	Diámetro en placa (cm)	Enterobactina	Salmoquelina	Receptor sideróforos	Transporte de Yersinia
101	M	1.2	(-)	(+)	(-)	(+)
102	V	1.5	(-)	(-)	(+)	(-)
103	V	1.2	(-)	(-)	(-)	(-)
104	M	2.3	(-)	(+)	(+)	(+)
105	M	2	(-)	(+)	(+)	(-)
106	M	2.1	(-)	(+)	(+)	(-)
107	M	1.5	(-)	(+)	(+)	(+)
108	V	1	(-)	(-)	(-)	(-)
109	M	1.4	(-)	(+)	(-)	(-)
110	V	2.1	(-)	(-)	(-)	(-)
111	M	1.2	(-)	(-)	(-)	(-)
112	M	1.3	(-)	(-)	(-)	(-)
113	M	1.5	(-)	(+)	(+)	(-)
114	M	1.2	(-)	(-)	(+)	(+)
115	V	1.1	(-)	(+)	(+)	(-)
116	M	1	(-)	(+)	(-)	(-)
117	V	2.1	(-)	(-)	(+)	(-)
118	V	0.7	(-)	(+)	(+)	(-)
119	M	1.6	(-)	(-)	(+)	(-)
120	M	1.4	(-)	(-)	(-)	(-)
121	M	1.2	(-)	(+)	(+)	(+)
122	M	1.5	(-)	(-)	(-)	(+)
123	M	1.3	(-)	(+)	(+)	(-)
124	M	1.3	(-)	(-)	(-)	(+)
125	V	SIN HALO	(-)	(-)	(+)	(-)
126	V	1.5	(-)	(-)	(+)	(-)
127	V	1.5	(-)	(-)	(-)	(-)
128	V	1.6	(+)	(-)	(+)	(-)
129	V	1.4	(-)	(-)	(-)	(-)
130	V	1.7	(+)	(+)	(+)	(-)
131	M	1.7	(-)	(-)	(-)	(-)
132	V	1.5	(-)	(-)	(-)	(-)
133	M	1.5	(-)	(+)	(+)	(-)
134	M	1.5	(-)	(-)	(-)	(-)
135	M	SIN HALO	(-)	(+)	(-)	(-)
136	M	1.6	(-)	(-)	(+)	(-)

137	M	1.3	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
138	M	1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
139	M	SIN HALO	(-)	(-)	(-)	(-)	(+)
140	M	1.2	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
141	M	2.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
142	M	1.1	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
143	M	1.9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
144	V	1.8	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
145	M	2.4	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
146	M	1.4	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
147	M	1.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
148	M	2	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
149	M	2	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
150	M	1.5	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
151	M	1.6	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
152	M	1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
153	M	1.1	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
154	V	0.8	(-)	(-)	(-)	(+)	(-)
155	V	0.9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
156	M	1.5	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
157	M	1.1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
158	M	1	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
159	V	0.9	(-)	(+)	(+)	(+)	(-)
160	M	0.8	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
161	V	0.6	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
162	V	0.7	(-)	(+)	(+)	(-)	(-)
163	M	0.8	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
164	M	0.7	(-)	(-)	(+)	(-)	(-)
165	M	SIN HALO	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
166	M	0.8	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
167	V	1.1	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
168	V	0.6	(+)	(-)	(-)	(-)	(-)
169	M	SIN HALO	(-)	(+)	(-)	(-)	(-)
170	M	0.8	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
171	M	0.9	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
172	M	0.9	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
173	V	0.7	(-)	(-)	(+)	(+)	(-)
174	V	0.7	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)
175	M	0.8	(-)	(-)	(-)	(-)	(-)



10. BIBLIOGRAFÍA

- Aazam, K., Hassan, M., & Mahbobe, M. (2012). Detection of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in patients with urinary tract infections in Iran. *African Journal of Microbiology Research*, 6(39), 6811–6816. <https://doi.org/10.5897/ajmr12.1462>
- Abram, K., Udaondo, Z., Bleker, C., Wanchai, V., Wassenaar, T. M., Robeson, M. S., & Ussery, D. W. (2021). Mash-based analyses of *Escherichia coli* genomes reveal 14 distinct phylogroups. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-020-01626-5>
- Agarwal, J., Srivastava, S., & Singh, M. (2012a). Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. En *Indian Journal of Medical Microbiology* (Vol. 30, Número 2, pp. 141–149). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.96657>
- Agarwal, J., Srivastava, S., & Singh, M. (2012b). Pathogenomics of uropathogenic *Escherichia coli*. En *Indian Journal of Medical Microbiology* (Vol. 30, Número 2, pp. 141–149). Wolters Kluwer Medknow Publications. <https://doi.org/10.4103/0255-0857.96657>
- Alvarez-Fraga, L., Phan, M.-D., Goh, K. G. K., Thi, N., Nhu, K., Hancock, S. J., Allsopp, L. P., Peters, K. M., Forde, B. M., Roberts, L. W., Sullivan, M. J., Totsika, M., Beatson, S. A., Ulett, G. C., & Schembri, M. A. (2022). Differential Afa/Dr Fimbriae Expression in the Multidrug-Resistant *Escherichia coli* ST131 Clone.
- Andrews, N. C. (2008). Forging a field: The golden age of iron biology. *Blood*, 112(2), 219–230. <https://doi.org/10.1182/blood-2007-12-077388>
- Bailey, D. C., Alexander, E., Rice, M. R., Drake, E. J., Mydy, L. S., Aldrich, C. C., & Gulick, A. M. (2018). Structural and functional delineation of aerobactin biosynthesis in hypervirulent *Klebsiella pneumoniae*. *Journal of Biological Chemistry*, 293(20), 7841–7852. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA118.002798>
- Ballesteros-Monrreal, M. G., Arenas-Hernández, M. M. P., Enciso-Martínez, Y., Martínez-De la Peña, C. F., Rocha-Gracia, R. D. C., Lozano-Zaraín, P., Navarro-Ocaña, A., Martínez-Laguna, Y., & de la Rosa-López, R. (2020). Virulence and resistance determinants of uropathogenic *Escherichia coli* strains isolated from pregnant and non-pregnant women from two states in Mexico. *Infection and Drug Resistance*, 13, 295–310. <https://doi.org/10.2147/IDR.S226215>
- Behzadi, P. (2018). Uropathogenic *Escherichia coli* and Fimbrial Adhesins Virulome. En *Urinary Tract Infection - The Result of the Strength of the Pathogen, or the Weakness of the Host*. InTech. <https://doi.org/10.5772/intechopen.71374>
- Behzadi, P. (2020). Classical chaperone-usher (CU) adhesive fimbriome: uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) and urinary tract infections (UTIs). En *Folia Microbiologica* (Vol. 65, Número 1, pp. 45–65). Springer. <https://doi.org/10.1007/s12223-019-00719-x>

- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. En *International Journal of Nephrology* (Vol. 2012). <https://doi.org/10.1155/2012/681473>
- Bonkat, G., Cai, T., Veeratterapillay, R., Bruyère, F., Bartoletti, R., Pilatz, A., Köves, B., Geerlings, S. E., Pradere, B., Pickard, R., & Wagenlehner, F. M. E. (2019). Management of Urosepsis in 2018. *European Urology Focus*, 5(1), 5–9. <https://doi.org/10.1016/j.euf.2018.11.003>
- Brissot, P., Troadec, M. B., Loréal, O., & Brissot, E. (2019). Pathophysiology and classification of iron overload diseases; update 2018. En *Transfusion Clinique et Biologique* (Vol. 26, Numéro 1, pp. 80–88). Elsevier Masson SAS. <https://doi.org/10.1016/j.tracli.2018.08.006>
- Byun, H., Jung, I. J., Chen, J., Valencia, J. L., & Zhu, J. (2020). Siderophore piracy enhances *Vibrio cholerae* environmental survival and pathogenesis. *Microbiology (United Kingdom)*, 166(11), 1038–1046. <https://doi.org/10.1099/mic.0.000975>
- Chahales, P., & Thanassi, D. G. (2015). Structure, Function, and Assembly of Adhesive Organelles by Uropathogenic Bacteria. *Microbiology Spectrum*, 3(5). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.uti-0018-2013>
- Chaturvedi, K. S., Hung, C. S., Crowley, J. R., Stapleton, A. E., & Henderson, J. P. (2012). The siderophore yersiniabactin binds copper to protect pathogens during infection. *Nature Chemical Biology*, 8(8), 731–736. <https://doi.org/10.1038/nchembio.1020>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019a). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- Clermont, O., Dixit, O. V. A., Vangchhia, B., Condamine, B., Dion, S., Bridier-Nahmias, A., Denamur, E., & Gordon, D. (2019b). Characterization and rapid identification of phylogroup G in *Escherichia coli*, a lineage with high virulence and antibiotic resistance potential. *Environmental Microbiology*, 21(8), 3107–3117. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.14713>
- Cortez-de la Puente, I. M., Lozano-Zarain, P., Rocha-Gracia, R. del C., Martínez-de la Peña, C., Baca, B. E., & Arenas-Hernández, M. M. de la P. (2024). *Escherichia coli* uropatógena: ejemplo de plasticidad genómica. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 27. <https://doi.org/10.22201/fesz.23958723e.2024.687>
- Cortez-de la Puente, I. M., Rocha-Gracia, R. del C., Lozano-Zarain, P., Barrios-Villa, E., & Arenas-Hernández, M. M. P. (2024). Draft genome of three uropathogenic *Escherichia coli* strains. *Microbiology Resource Announcements*, 13(7). <https://doi.org/10.1128/mra.00192-24>

- Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 8, Número 1, pp. 26–38). <https://doi.org/10.1038/nrmicro2265>
- De Nisco, N. J., Neugent, M., Mull, J., Chen, L., Kuprasertkul, A., de Souza Santos, M., Palmer, K. L., Zimmern, P., & Orth, K. (2019). Direct Detection of Tissue-Resident Bacteria and Chronic Inflammation in the Bladder Wall of Postmenopausal Women with Recurrent Urinary Tract Infection. *Journal of Molecular Biology*, 431(21), 4368–4379. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2019.04.008>
- Desvaux, M., Dalmasso, G., Beyrouthy, R., Barnich, N., Delmas, J., & Bonnet, R. (2020). Pathogenicity Factors of Genomic Islands in Intestinal and Extraintestinal *Escherichia coli*. En *Frontiers in Microbiology* (Vol. 11). Frontiers Media S.A. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.02065>
- Dobrindt, U., Blum-Oehler, G., Hartsch, T., Gottschalk, G., Ron, E. Z., Fünfstück, R., & Hacker, J. (2001). S-fimbria-encoding determinant sfaI is located on pathogenicity island III536 of uropathogenic *Escherichia coli* strain 536. *Infection and Immunity*, 69(7), 4248–4256. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.7.4248-4256.2001>
- Epp, A., Larochelle, A., Lovatsis, D., Walter, J. E., Easton, W., Farrell, S. A., Girouard, L., Gupta, C., Harvey, M. A., Robert, M., Ross, S., Schachter, J., Schulz, J. A., Wilkie, D., Ehman, W., Domb, S., Gagnon, A., Hughes, O., Konkin, J., ... Marshall, C. (2010). Recurrent Urinary Tract Infection. *Journal of Obstetrics and Gynaecology Canada*, 32(11), 1082–1090. [https://doi.org/10.1016/S1701-2163\(16\)34717-X](https://doi.org/10.1016/S1701-2163(16)34717-X)
- Fisher, C. R., Davies, N. M. L. L., Wyckoff, E. E., Feng, Z., Oaks, E. V., & Payne, S. M. (2009). Genetics and virulence association of the *Shigella flexneri* sit iron transport system. *Infection and Immunity*, 77(5), 1992–1999. <https://doi.org/10.1128/IAI.00064-09>
- Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: Epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 13, Número 5, pp. 269–284). Nature Publishing Group. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>
- Forde, B. M., Roberts, L. W., Phan, M. D., Peters, K. M., Fleming, B. A., Russell, C. W., Lenherr, S. M., Myers, J. B., Barker, A. P., Fisher, M. A., Chong, T. M., Yin, W. F., Chan, K. G., Schembri, M. A., Mulvey, M. A., & Beatson, S. A. (2019). Population dynamics of an *Escherichia coli* ST131 lineage during recurrent urinary tract infection. *Nature Communications*, 10(1). <https://doi.org/10.1038/s41467-019-11571-5>
- Gao, M., Zhao, T., Zhang, C., Li, P., Wang, J., Han, J., Zhang, N., Pang, B., & Liu, S. (2023). Ferritinophagy-mediated iron competition in RUTIs: Tug-of-war between UPEC and host. En *Biomedicine and Pharmacotherapy* (Vol. 163). Elsevier Masson s.r.l. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114859>

- Garénaux, A., Caza, M., & Dozois, C. M. (2011). The Ins and Outs of siderophore mediated iron uptake by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. En *Veterinary Microbiology* (Vol. 153, Números 1–2, pp. 89–98). <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2011.05.023>
- Hagan, E. C., Lloyd, A. L., Rasko, D. A., Faerber, G. J., & Mobley, H. L. T. (2010). *Escherichia coli* global gene expression in urine from women with urinary tract infection. *PLoS Pathogens*, 6(11). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1001187>
- Hancock, S. J., Lo, A. W., Ve, T., Day, C. J., Tan, L., Mendez, A. A., Phan, M. D., Nhu, N. T. K., Peters, K. M., Richards, A. C., Fleming, B. A., Chang, C., Ngu, D. H. Y., Forde, B. M., Haselhorst, T., Goh, K. G. K., Beatson, S. A., Jennings, M. P., Mulvey, M. A., ... Schembri, M. A. (2022). Ucl fimbriae regulation and glycan receptor specificity contribute to gut colonisation by extra-intestinal pathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 18(6). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010582>
- Hantke, K., Nicholson, G., Rabsch, W., & Winkelmann, G. (s/f). Salmochelins, siderophores of *Salmonella enterica* and uropathogenic *Escherichia coli* strains, are recognized by the outer membrane receptor IroN. www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.0737682100
- Heffernan, J. R., Wildenthal, J. A., Tran, H., Katumba, G. L., McCoy, W. H., & Henderson, J. P. (2024). Yersiniabactin is a quorum-sensing autoinducer and siderophore in uropathogenic *Escherichia coli*. *mBio*, 15(2). <https://doi.org/10.1128/mbio.00277-23>
- Henderson, J. P., Crowley, J. R., Pinkner, J. S., Walker, J. N., Tsukayama, P., Stamm, W. E., Hooton, T. M., & Hultgren, S. J. (2009). Quantitative metabolomics reveals an epigenetic blueprint for iron acquisition in uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS Pathogens*, 5(2). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000305>
- Hernday, A. D., Braaten, B. A., & Low, D. A. (2003). The Mechanism by which DNA Adenine Methylase and PapI Activate the Pap Epigenetic Switch which consist of one or more stably nonmethylated DNA sequences. DNA methylation patterns, in turn, can modulate the binding of regulatory proteins, and thus control. En *Molecular Cell* (Vol. 12).
- Isidro-Coxca, M. I., Ortiz-Jiménez, S., & Puente, J. L. (2024). Type 1 fimbria and P pili: regulatory mechanisms of the prototypical members of the chaperone-usher fimbrial family. En *Archives of Microbiology* (Vol. 206, Número 9). Springer Science and Business Media Deutschland GmbH. <https://doi.org/10.1007/s00203-024-04092-3>
- Jahandeh, N., Ranjbar, R., Behzadi, P., & Behzadi, E. (2015). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence genes: Invaluable approaches for designing dna microarray probes. En *Central European Journal of Urology* (Vol. 68, Número 4, pp. 452–458). Polish Urological Association. <https://doi.org/10.5173/cej.2015.625>
- Jamalli, A., Khasheii, B., & Anvari, S. (s/f). Frequency evaluation of genes encoding siderophores and the effects of different concentrations of Fe ions on growth rate of uropathogenic *Escherichia coli*. <http://ijm.tums.ac.ir>
- Johnson, J. R., Porter, S., Thuras, P., & Castanheira, M. (2017). The pandemic H30 subclone of sequence type 131 (ST131) as the leading cause of multidrug-resistant *Escherichia coli*

- infections in the United States (2011-2012). *Open Forum Infectious Diseases*, 4(2).
<https://doi.org/10.1093/ofid/ofx089>
- Klein, R. D., & Hultgren, S. J. (2020). Urinary tract infections: microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. En *Nature Reviews Microbiology* (Vol. 18, Número 4, pp. 211–226). Nature Research. <https://doi.org/10.1038/s41579-020-0324-0>
- Klemm, P., Hancock, V., & Schembri, M. A. (2010). Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. En *Environmental Microbiology Reports* (Vol. 2, Número 5, pp. 628–640). <https://doi.org/10.1111/j.1758-2229.2010.00166.x>
- Korea, C. G., Badouraly, R., Prevost, M. C., Ghigo, J. M., & Beloin, C. (2010). *Escherichia coli* K-12 possesses multiple cryptic but functional chaperone-usher fimbriae with distinct surface specificities. *Environmental Microbiology*, 12(7), 1957–1977.
<https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2010.02202.x>
- Lasaro, M. A., Salinger, N., Zhang, J., Wang, Y., Zhong, Z., Goulian, M., & Zhu, J. (2009). F1C fimbriae play an important role in biofilm formation and intestinal colonization by the *Escherichia coli* commensal strain nissle 1917. *Applied and Environmental Microbiology*, 75(1), 246–251. <https://doi.org/10.1128/AEM.01144-08>
- Lazarus, J. E., & Gupta, K. (2024). Recurrent UTI in Women—Risk Factors and Management. En *Infectious Disease Clinics of North America* (Vol. 38, Número 2, pp. 325–341). W.B. Saunders. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2024.03.010>
- Lin, H., Fischbach, M. A., Liu, D. R., & Walsh, C. T. (2005). In vitro characterization of salmochelin and enterobactin trilactone hydrolases IroD, IroE, and Fes. *Journal of the American Chemical Society*, 127(31), 11075–11084. <https://doi.org/10.1021/ja0522027>
- Louden, B. C., Haarmann, D., & Lynne, A. M. (2011). Use of Blue Agar CAS Assay for Siderophore Detection. *Journal of Microbiology & Biology Education*, 12(1), 51–53.
<https://doi.org/10.1128/jmbe.v12i1.249>
- Lu, S., Jin, D., Wu, S., Yang, J., Lan, R., Bai, X., Liu, S., Meng, Q., Yuan, X., Zhou, J., Pu, J., Chen, Q., Dai, H., Hu, Y., Xiong, Y., Ye, C., & Xu, J. (2016a). Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of *Marmota himalayana* in Qinghai-Tibet plateau of China. *Emerging Microbes and Infections*, 5(12).
<https://doi.org/10.1038/emi.2016.122>
- Lu, S., Jin, D., Wu, S., Yang, J., Lan, R., Bai, X., Liu, S., Meng, Q., Yuan, X., Zhou, J., Pu, J., Chen, Q., Dai, H., Hu, Y., Xiong, Y., Ye, C., & Xu, J. (2016b). Insights into the evolution of pathogenicity of *Escherichia coli* from genomic analysis of intestinal *E. coli* of *Marmota himalayana* in Qinghai-Tibet plateau of China. *Emerging Microbes and Infections*, 5(12).
<https://doi.org/10.1038/emi.2016.122>
- Lüthje, P., & Brauner, A. (2014). Virulence Factors of Uropathogenic *E. coli* and Their Interaction with the Host. En *Advances in Microbial Physiology* (Vol. 65, pp. 337–372). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/bs.ampbs.2014.08.006>

- Marchetti, M., De Bei, O., Bettati, S., Campanini, B., Kovachka, S., Gianquinto, E., Spyraakis, F., & Ronda, L. (2020). Iron metabolism at the interface between host and pathogen: From nutritional immunity to antibacterial development. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 21, Número 6). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/ijms21062145>
- Mydy, L. S., Bailey, D. C., Patel, K. D., Rice, M. R., & Gulick, A. M. (2020). The Siderophore Synthetase *lucA* of the Aerobactin Biosynthetic Pathway Uses an Ordered Mechanism. *Biochemistry*, *59*(23), 2143–2153. <https://doi.org/10.1021/acs.biochem.0c00250>
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K. (2010). TonB-dependent transporters: Regulation, structure, and function. En *Annual Review of Microbiology* (Vol. 64, pp. 43–60). <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134247>
- Paragas, N., Kulkarni, R., Werth, M., Schmidt-Ott, K. M., Forster, C., Deng, R., Zhang, Q., Singer, E., Klose, A. D., Shen, T. H., Francis, K. P., Ray, S., Vijayakumar, S., Seward, S., Bovino, M. E., Xu, K., Takabe, Y., Amaral, F. E., Mohan, S., ... Barasch, J. (2014). α -Intercalated cells defend the urinary system from bacterial infection. *Journal of Clinical Investigation*, *124*(7), 2963–2976. <https://doi.org/10.1172/JCI71630>
- Parker, K. S., Wilson, J. D., Marschall, J., Mucha, P. J., & Henderson, J. P. (2016). Network Analysis Reveals Sex- and Antibiotic Resistance-Associated Antivirulence Targets in Clinical Uropathogens. *ACS Infectious Diseases*, *1*(11), 523–532. <https://doi.org/10.1021/acsinfecdis.5b00022>
- Perry, R. D., & Fetherston, J. D. (2011). Yersiniabactin iron uptake: Mechanisms and role in *Yersinia pestis* pathogenesis. En *Microbes and Infection* (Vol. 13, Número 10, pp. 808–817). <https://doi.org/10.1016/j.micinf.2011.04.008>
- Reisner, A., Maierl, M., Jörger, M., Krause, R., Berger, D., Haid, A., Tesic, D., & Zechner, E. L. (2014). Type 1 fimbriae contribute to catheter-associated urinary tract infections caused by *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*, *196*(5), 931–939. <https://doi.org/10.1128/JB.00985-13>
- Robinson, A. E., Heffernan, J. R., & Henderson, J. P. (2018). The iron hand of uropathogenic *Escherichia coli*: The role of transition metal control in virulence. En *Future Microbiology* (Vol. 13, Número 7, pp. 813–829). Future Medicine Ltd. <https://doi.org/10.2217/fmb-2017-0295>
- Sabri, M., Léveillé, S., & Dozois, C. M. (2006). A SitABCD homologue from an avian pathogenic *Escherichia coli* strain mediates transport of iron and manganese and resistance to hydrogen peroxide. *Microbiology*, *152*(3), 745–758. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28682-0>
- Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. (2019). Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: Recent reports. En *Gut Pathogens* (Vol. 11, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s13099-019-0290-0>

- Schauer, K., Rodionov, D. A., & de Reuse, H. (2008). New substrates for TonB-dependent transport: do we only see the “tip of the iceberg”? *En Trends in Biochemical Sciences* (Vol. 33, Número 7, pp. 330–338). <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2008.04.012>
- Searle, L. J., Méric, G., Porcelli, I., Sheppard, S. K., & Lucchini, S. (2015). Variation in siderophore biosynthetic gene distribution and production across environmental and faecal populations of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, *10*(3). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0117906>
- Shanks, R. M. Q., Stella, N. A., Kalivoda, E. J., Doe, M. R., O’Dee, D. M., Lathrop, K. L., Feng, L. G., & Nau, G. J. (2007). A *Serratia marcescens* OxyR homolog mediates surface attachment and biofilm formation. *Journal of Bacteriology*, *189*(20), 7262–7272. <https://doi.org/10.1128/JB.00859-07>
- Shields-Cutler, R. R., Crowley, J. R., Hung, C. S., Stapleton, A. E., Aldrich, C. C., Marschall, J., & Henderson, J. P. (2015). Human urinary composition controls antibacterial activity of siderocalin. *Journal of Biological Chemistry*, *290*(26), 15949–15960. <https://doi.org/10.1074/jbc.M115.645812>
- Silale, A., & Van Den Berg, B. (2025). *129 On: Mon. 52*. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-032421>
- Spaulding, C. N., Klein, R. D., Ruer, S., Kau, A. L., Schreiber, H. L., Cusumano, Z. T., Dodson, K. W., Pinkner, J. S., Fremont, D. H., Janetka, J. W., Remaut, H., Gordon, J. I., & Hultgren, S. J. (2017). Selective depletion of uropathogenic *E. coli* from the gut by a FimH antagonist. *Nature*, *546*(7659), 528–532. <https://doi.org/10.1038/nature22972>
- Tanabe, R. H. S., Dias, R. C. B., Orsi, H., de Lira, D. R. P., Vieira, M. A., Dos Santos, L. F., Ferreira, A. M., Rall, V. L. M., Mondelli, A. L., Gomes, T. A. T., Camargo, C. H., & Hernandez, R. T. (2022). Characterization of Uropathogenic *Escherichia coli* Reveals Hybrid Isolates of Uropathogenic and Diarrheagenic (UPEC/DEC) *E. coli*. *Microorganisms*, *10*(3). <https://doi.org/10.3390/microorganisms10030645>
- Theurl, I., Fritsche, G., Ludwiczek, S., Garimorth, K., Bellmann-Weiler, R., & Weiss, G. (2005). The macrophage: A cellular factory at the interphase between iron and immunity for the control of infections. *BioMetals*, *18*(4), 359–367. <https://doi.org/10.1007/s10534-005-3710-1>
- Tomasek, K., Leithner, A., Glatzova, I., Lukesch, M. S., Guet, C. C., & Sixt, M. (2022). Type 1 piliated uropathogenic *Escherichia coli* hijack the host immune response by binding to CD14. *eLife*, *11*. <https://doi.org/10.7554/ELIFE.78995>
- Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A., & Payne, S. M. (2001). TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: Aerobactin and heme transport and TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity*, *69*(10), 6179–6185. <https://doi.org/10.1128/IAI.69.10.6179-6185.2001>

- Waksman, G. (2017). Structural and Molecular Biology of a Protein-Polymerizing Nanomachine for Pilus Biogenesis. En *Journal of Molecular Biology* (Vol. 429, Número 17, pp. 2654–2666). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2017.05.016>
- Werneburg, G. T., & Thanassi, D. G. (2018). Pili Assembled by the Chaperone/Usher Pathway in *Escherichia coli* and *Salmonella*. *EcoSal Plus*, 8(1). <https://doi.org/10.1128/ecosalplus.esp-0007-2017>
- Whelan, S., Lucey, B., & Finn, K. (2023). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC)-Associated Urinary Tract Infections: The Molecular Basis for Challenges to Effective Treatment. En *Microorganisms* (Vol. 11, Número 9). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/microorganisms11092169>
- Wurpel, D. J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K., & Schembri, M. A. (2013). Chaperone-Usher Fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS ONE*, 8(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052835>
- Wurpel, D. J., Totsika, M., Allsopp, L. P., Webb, R. I., Moriel, D. G., & Schembri, M. A. (2016a). Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells. *Journal of Proteomics*, 131, 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.001>
- Wurpel, D. J., Totsika, M., Allsopp, L. P., Webb, R. I., Moriel, D. G., & Schembri, M. A. (2016b). Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells. *Journal of Proteomics*, 131, 177–189. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.001>
- Zavyalov, V., Zavyalov, A., Zav'Yalova, G., & Korpela, T. (2010). Adhesive organelles of Gram-negative pathogens assembled with the classical chaperone/usher machinery: Structure and function from a clinical standpoint. En *FEMS Microbiology Reviews* (Vol. 34, Número 3, pp. 317–378). <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2009.00201.x>
- Zhou, Y., Zhou, Z., Zheng, L., Gong, Z., Li, Y., Jin, Y., Huang, Y., & Chi, M. (2023a). Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Número 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241310537>
- Zhou, Y., Zhou, Z., Zheng, L., Gong, Z., Li, Y., Jin, Y., Huang, Y., & Chi, M. (2023b). Urinary Tract Infections Caused by Uropathogenic *Escherichia coli*: Mechanisms of Infection and Treatment Options. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 24, Número 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms241310537>

Zou, Z., Robinson, J. I., Steinberg, L. K., & Henderson, J. P. (2024). Uropathogenic *Escherichia coli* wield enterobactin-derived catabolites as siderophores. *Journal of Biological Chemistry*, 300(1). <https://doi.org/10.1016/j.jbc.2023.105554>