

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

***Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención Bioanálisis
Clínico-Molecular, Hematología y Medicina Transfusional***

“DETERMINACIÓN DE UNIÓN DE HEPARINA A CEPAS PATOGENICAS DE *Escherichia coli*: ROL DE SISTEMAS FIMBRIALES CHAPERONA-UJIER”

JORGE ALEJANDRO RUBIO SANDOVAL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FELIPE DEL CANTO FUENTES
Programa de Microbiología y Micología
Instituto de Ciencias Biomédicas
Facultad de Medicina
Universidad de Chile

24 DE JULIO DE 2023

UNIVERSIDAD DE CHILE
FACULTAD DE MEDICINA
Escuela de Tecnología Médica



TESIS PROFESIONAL

***Para optar al título profesional de Tecnólogo Médico con mención Bioanálisis
Clínico-Molecular, Hematología y Medicina Transfusional***

“DETERMINACIÓN DE UNIÓN DE HEPARINA A CEPAS PATOGENICAS DE *Escherichia coli*: ROL DE SISTEMAS FIMBRIALES CHAPERONA-UJIER”

JORGE ALEJANDRO RUBIO SANDOVAL

DIRECTOR DE TESIS:

DR. FELIPE DEL CANTO FUENTES

Una firma manuscrita en tinta azul sobre un fondo blanco rectangular. La firma parece ser 'F. Del Canto Fuentes'.

Firma

24 DE JULIO DE 2023

Santiago, 22 de noviembre de 2023

ACTA CURSO TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

El **Sr. Jorge Alejandro Rubio Sandoval**, estudiante de Tecnología Médica con Mención en Bioanálisis Clínico Molecular, Hematología y Medicina Transfusional, cumpliendo con los requisitos establecidos en el plan de estudio, realizó durante el noveno semestre de la carrera, la Tesis Profesional titulada: **“DETERMINACIÓN DE UNIÓN DE HEPARINA A CEPAS PATOGENICAS DE Escherichia coli: ROL DE SISTEMAS FIMBRIALES CHAPERONA-UJIER”**, dirigida por el **Prof. Felipe Del Canto** académico del Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La Escuela de Tecnología Médica designó para su corrección una Comisión integrada por: la **Profa. Cecilia Toro Ugalde** y el **Prof. Victor García**, ambos académicos del Programa de Microbiología y Micología, Instituto de Ciencias Biomédicas, Facultad de Medicina de la Universidad de Chile.

La calificación obtenida se detalla a continuación:

Correctora 1 Cecilia Toro Ugalde	6.60	25%
Corrector 2 Victor García	6.81	25%
Tutor(es) Guía:		
Evaluación intermedia	6.10	25%
Nota final tutor	7.00	25%
Nota final tesis profesional	6.63	

En consecuencia el estudiante **Jorge Alejandro Rubio Sandoval** aprueba satisfactoriamente la asignatura.



Profa. Rosana Muñoz Videla
Coordinador(a) curso
Trabajo de Investigación



HERNÁN RODRIGO
TORRES RIVERA
15.932.579-2
24/11/2023 - 15:42
ESTE DOCUMENTO CONTIENE FIRMA ELECTRÓNICA AVANZADA
<https://ceropapel.uchile.cl/validacion/verificador>
CV: 6560eeaf0f08e45f30d9cdeb

Prof. Hernán Torres
PEC curso
Trabajo de Investigación

DEDICATORIA

A mi familia, amigas y amigos;

A Andrés y Ruco por su compañía durante este tiempo.

AGRADECIMIENTOS

A Proyecto FONDECYT 1200979 por el financiamiento de esta investigación;

Al Programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile por la facilitación de sus dependencias;

A Dr. Felipe del Canto, Team FDC e integrantes del laboratorio por su continua orientación y apoyo durante este tiempo.

ÍNDICE

RESUMEN	7
<i>Escherichia coli</i>	8
Factores de virulencia	11
Fimbrias chaperona-ujier	12
Antecedentes de actividad biológica de fimbrias CU con heparina	14
HIPÓTESIS	18
OBJETIVO GENERAL	18
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	18
MATERIALES Y MÉTODOS	19
1. Transformación por electroporación de E. coli BL21 Δ ABCF con pET-3a vacío, E. coli BL21 Δ ABCF/fimD y E. coli BL21 Δ ABCF/papC	19
2. Extracción total de proteínas, SDS-PAGE e inmunoblot para detección de FimD y PapC	20
3. Detección de FimD y PapC en la superficie de E. coli BL21 Δ ABCF/fimD y E. coli BL21 Δ ABCF/papC mediante fluorimetría	22
4. Ensayos de unión de heparina a E. coli HB101, E. coli HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073	24
5. Ensayos de unión de heparina a E. coli HB101 y UPEC CFT073 con bloqueo de Manosa 1%	26
6. Ensayos de unión de heparina a E. coli HB101 con bloqueo de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD y anti-EcpA y a UPEC CFT073 con bloqueo de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD, anti-EcpA, anti-PapA y anti-PapC.	27
RESULTADOS	30
1. Inmunoblot para detección de FimD y PapC en cepas recombinantes E. coli BL21 Δ ABCF/fimD y E. coli BL21 Δ ABCF/papC	30
2. Detección de FimD y PapC E. coli BL21 Δ ABCF/fimD y E. coli BL21 Δ ABCF/papC mediante fluorimetría	33
3. Ensayos de unión de heparina a E. coli HB101, E. coli HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073	34
4. Ensayos de bloqueo de unión de heparina a E. coli HB101 y UPEC CFT073 con manosa 1%	36
5. Ensayos de unión de heparina a E. coli HB101 con bloqueo de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD y anti-EcpA y UPEC CFT073 con bloqueo de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD, anti-EcpA, anti-PapA y anti-PapC	37
DISCUSIÓN	40
CONCLUSIONES	45
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	46
ANEXOS	52

RESUMEN

Escherichia coli es una bacteria que coloniza normalmente el tracto gastrointestinal. Sin embargo, existen cepas patogénicas que se han generado por adquisición de elementos genéticos móviles que codifican factores de virulencia. Entre ellos se encuentran las fimbrias, estructuras filamentosas ensambladas por distintos sistemas, incluyendo el sistema chaperona-ujier (CU), que cumplen un rol clave en la colonización. La heparina, un glicosaminoglicano, puede interferir con la adherencia de una cepa de *E. coli* diarreogénica y, además, prevenir las infecciones urinarias recurrentes, cuya primera causa es *E. coli*, lo que sugiere que esta molécula podría unirse directamente a estructuras en la superficie bacteriana. Sin embargo, entre la amplia diversidad de determinantes de adherencia de *E. coli*, sólo una proteína, YcbS, componente de un sistema fimbrial CU, ha sido identificada como determinante de unión a heparina. Hasta hoy, no está claro si los distintos patotipos de *E. coli* unen heparina directamente, ni tampoco si hay otros determinantes para tal potencial unión. Por esta razón, el objetivo de este estudio fue determinar si cepas patogénicas de *E. coli* unen heparina, utilizando sistemas fimbriales CU. Para esto, se realizaron ensayos de unión de heparina a distintas cepas de *E. coli*, para luego determinar el efecto de potenciales bloqueadores de esta interacción, como manosa y anticuerpos contra proteínas de fimbrias CU. Los resultados indicaron que todas las cepas de *E. coli* evaluadas (patogénicas y no patogénicas) unen heparina, y que los ujieres fimbriales FimD y PapC, para *E. coli* HB101 (no patogénica) y UPEC CFT073 (uropatogénica), respectivamente, determinan parcialmente esta interacción. Estos resultados contribuyen al conocimiento de la interacción de heparina con estructuras de superficie de *E. coli*, lo que podría constituir la base de futuras estrategias de prevención de infecciones por este patógeno.

INTRODUCCIÓN

Escherichia coli

Escherichia coli (*E. coli*) corresponde a una especie bacteriana del género perteneciente a la familia Enterobacteriaceae, incluida en el orden de los Enterobacterales. Es un bacilo Gram negativo no exigente, anaeróbico facultativo, oxidasa positivo y catalasa negativo, conocido por colonizar normalmente el tracto gastrointestinal humano inmediatamente después del nacimiento (1), siendo su nicho principal la capa mucosa del colon (2). Esta especie fue descubierta en el año 1886 por Theodore von Escherich, describiendo una bacteria denominada *Bacterium coli*, la cual años después fue renombrada como *Escherichia coli*, nombre con el que es conocida hasta el día de hoy (3). Desde entonces, se ha descrito una gran diversidad de cepas a nivel intra-especie, en donde se encuentran *E. coli* comensales residentes en la microbiota gastrointestinal (4) que rara vez causan enfermedad, excepto en hospederos inmunocomprometidos cuando rompen las barreras gastrointestinales normales, como por ejemplo, en la peritonitis (5), y además *E. coli* patogénicas que poseen la capacidad de causar distintas enfermedades. Se postula que dichas cepas patógenas se han originado a partir de cepas comensales (6), mediante la adquisición de distintos elementos genéticos móviles, entre los cuales se encuentran plásmidos, fagos, transposones e islas de patogenicidad, que llevan consigo genes codificantes para factores de virulencia, y que actúan como determinantes de la capacidad de ocasionar enfermedades infecciosas. Dichas adiciones, deleciones y otros cambios genéticos pueden dar lugar a una *E. coli* patógena capaz de causar enfermedad (5). La infección por esta bacteria puede ocurrir a dos niveles: intrainestinal, causando diarrea, o extraintestinal, causando distintas enfermedades al poder colonizar distintos niveles del cuerpo humano (5). En base a la serie de factores de virulencia producidos, y además a los diferentes cuadros clínicos que generan, las *E. coli* patogénicas se han clasificados en distintos “patotipos”. Los principales grupos de *E. coli* se pueden

clasificar en *E. coli* diarreogénicas (DECs) y *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC) (7); dentro del primer grupo es posible encontrar:

***E. coli* enteropatógena (EPEC):** Fue la primera cepa relacionada como causa de brotes de diarrea infantil entre las décadas de 1940 y 1950 (8), y años después fue confirmada con estudios en adultos, en quienes se observaron síntomas evidentes de diarrea en experimentos de infección oral (9), en donde induce la destrucción de las microvellosidades del borde en cepillo intestinal que conduce a la diarrea (10). EPEC es el agente causal de diarrea en niños menores de dos años, y se encuentra asociado a una tasa de mortalidad entre 10% y 40% principalmente en países en vías de desarrollo (11). Los principales brotes por EPEC se han generado a través del consumo de agua y comida contaminada, en donde reportes de vigilancia epidemiológica sobre infecciones transmitidas por alimentos han confirmado infecciones por este patotipo en humanos (12, 13, 14).

***E. coli* productora de Shiga toxina (STEC) / *E. coli* enterohemorrágica (EHEC):** A veces mencionada como STEC y en otras ocasiones como EHEC (aunque en rigor EHEC es un subgrupo de STEC), esta categoría fue reconocida como causa de enfermedad humana en el año 1982, causando principalmente colitis hemorrágica que puede evolucionar a síndrome hemolítico urémico (SHU) y afectando a todo el rango etario, teniendo una dosis infectiva baja (<100 células) (5, 15, 16). Los primeros brotes se asociaron al consumo de carne mal cocida, esto debido a que el principal reservorio de EHEC es el tracto intestinal bovino. Desde entonces, EHEC ha estado asociada al consumo de distintos alimentos como leche no pasteurizada, además de transmisión fecal oral por agua contaminada, transmisión persona a persona, visitas a zoológicos y a granjas (15). Las cepas EHEC serotipo O157:H7 y O26:H11 están entre las cepas más importantes en distintos lugares del mundo, incluyendo Chile (17).

***E. coli* enterotoxigénica (ETEC):** Esta cepa coloniza la mucosa del intestino delgado mediante fimbrias y genera enterotoxinas termorresistentes (STs) o termolábiles (LTs) que dan paso al aumento de secreción intestinal (18). Asociada por primera vez a diarrea en adultos en el año 1971 (19), es considerado un patotipo importante que causa diarrea del viajero en países desarrollados y diarrea en niños en países en vías de desarrollo mediante contaminación fecal de agua y alimentos; esta diarrea de tipo acuosa puede variar de leve y autolimitada a grave (20).

***E. coli* enteroagregativa (EAEC):** El nombre de esta categoría está dado por su forma de adherencia sobre cultivos de células HEP-2, que algunos autores describen como apariencia de “ladrillos apilados” (20). Se encuentra asociada a diarrea acuosa persistente o aguda (con o sin mucosidad) en niños en países en vías de desarrollo (21), adultos en países desarrollados (22) y a diarrea crónica en pacientes infectados por VIH (23). Dicha persistencia ha sido asociada con la capacidad de formación de biopelículas por parte de EAEC (24).

Además, dentro del grupo de las DECes es posible encontrar a *E. coli* de adherencia difusa (DAEC) y *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), que, hasta ahora, tienen menor relevancia en términos epidemiológicos con respecto a los patotipos ya mencionados. Por otro lado, dentro del grupo ExPECs se encuentran:

***E. coli* uropatogénica (UPEC):** UPEC es la causa más frecuente de infecciones del tracto urinario (ITU) (25), con una incidencia particularmente alta en personas de sexo femenino y tercera edad, causando cistitis que puede evolucionar a pielonefritis aguda (26). Se estima que el 40% de las mujeres desarrollan al menos una infección urinaria durante su vida (27) y

que el 11% de las mujeres mayores de 18 años tienen un episodio de infección urinaria al año (28, 29).

***E. coli* asociada a sepsis/meningitis (SEPEC/NMEC):** Puede alcanzar la circulación sistémica, resistiendo la presencia de los factores antimicrobianos de la sangre, ocasionando sepsis. Particularmente en neonatos, puede propagarse desde la sangre al sistema nervioso a través de la barrera hematoencefálica y corresponde a la causa más común de meningitis neonatal por bacterias Gram negativas, con una tasa de mortalidad entre 15% y 40%, dejando defectos neurológicos graves en muchos de los sobrevivientes a la infección (30, 31). El origen de los cuadros de sepsis o meningitis puede ser una infección urinaria, por lo que las cepas de esta categoría pueden ser simultáneamente cepas UPEC.

Factores de virulencia

Anteriormente se mencionó que existe una variedad de elementos genéticos móviles con genes que codifican factores de virulencia, determinantes de la patogenicidad bacteriana y por ende del proceso infeccioso en un organismo hospedero (5). Las estructuras de adherencia o adhesinas forman parte de estos factores y corresponden a elementos superficiales capaces de interactuar y reconocer receptores en la células del hospedero, además de componentes estructurales como mucinas (32) y proteínas de la matriz extracelular (33), entre otros. Así, las estructuras de adherencia promueven la colonización en las etapas iniciales de la infección, al mediar la unión a tejidos del hospedero, evitando defensas inespecíficas como la eliminación mecánica, para lograr la multiplicación bacteriana en el nicho colonizado (34). La interacción patógeno-hospedero es determinante en el tropismo de la bacteria por ciertos tejido, es decir, la afinidad determinada que posee la bacteria para infectar sitios específicos del hospedero, en donde existen patógenos con alto

nivel de tropismo, infectando a todos o a la mayoría de los órganos y otros con un nivel menor, restringidos a un tejido determinado o incluso a ciertos nichos dentro de una mismo tejido, cambiando su distribución a lo largo de la enfermedad (35). En base a esto, se ha descrito el tropismo que poseen distintos microorganismos por órganos o tejidos, tales como, por ejemplo, *Neisseria meningitidis* por el epitelio nasal, endotelios y el sistema nervioso central (36), *Helicobacter pylori* por el epitelio gástrico (37) y UPEC por el tracto urinario (38). Este tropismo superficial que dirige las bacterias hacia un sitio de infección específico depende de tres determinantes claves: la expresión oportuna de las estructuras de adherencia, la especificidad de estas estructuras y la presencia de receptores afines en los diferentes tejidos (39). Dentro de estas estructuras de adherencia, podemos encontrar principalmente a los pili o fimbrias, además de autotransportadores, cápsula, lipopolisacáridos, celulosa bacteriana y flagelos (40).

Fimbrias chaperona-ujier

Los pili o fimbrias son estructuras proteicas filamentosas, heteropoliméricas y con distintas morfologías; se extienden aproximadamente 1 μm desde el exterior de la superficie bacteriana, permitiendo que se dirija a una superficie tisular, es decir, que presente tropismo (38). Fueron descritas en el año 1955, en donde su rol en el proceso de adhesión celular resultó evidente (41). Las fimbrias de bacterias Gram negativo se ensamblan a través de una gama de diferentes sistemas de translocación de proteínas, siendo el más numeroso y diverso el sistema chaperona-ujier (CU), por lo que se denominan “fimbrias CU” (42). Existen múltiples fimbrias CU que han sido reconocidas como factores de virulencia de diversos patógenos bacterianos, dentro de los cuales las más estudiadas son la fimbria tipo 1 y la fimbria P, habiéndose demostrado, por ejemplo, que ambas fimbrias son cruciales para que UPEC genere cuadros de ITU, ya sea bajas (cistitis) o altas (pielonefritis) (43). En la figura 1

es posible observar un esquema de la fimbria P y la fimbria tipo 1, representados por los sistemas Pap y Fim, respectivamente. Ambas estructuras son ensambladas por chaperonas (PapD y FimC), que facilitan el plegamiento de las subunidades de las fimbrias en el periplasma y por ujieres (PapC y FimD), que constituyen poros en la membrana externa, actuando como plataformas de ensamblaje y permitiendo la exposición de la fimbria. Finalmente, se encuentran las subunidades estructurales, que constituyen el filamento fimbrial expuesto al espacio extracelular, en donde es posible encontrar las subunidades principales (PapA y FimA), las más abundantes dentro de la estructura, y las subunidades accesorias, menos abundantes y generalmente localizadas en la porción distal de la estructura (44). Además de la fimbria tipo 1 y la fimbria P, son múltiples las fimbrias CU que se han descrito en cepas de *E. coli*,

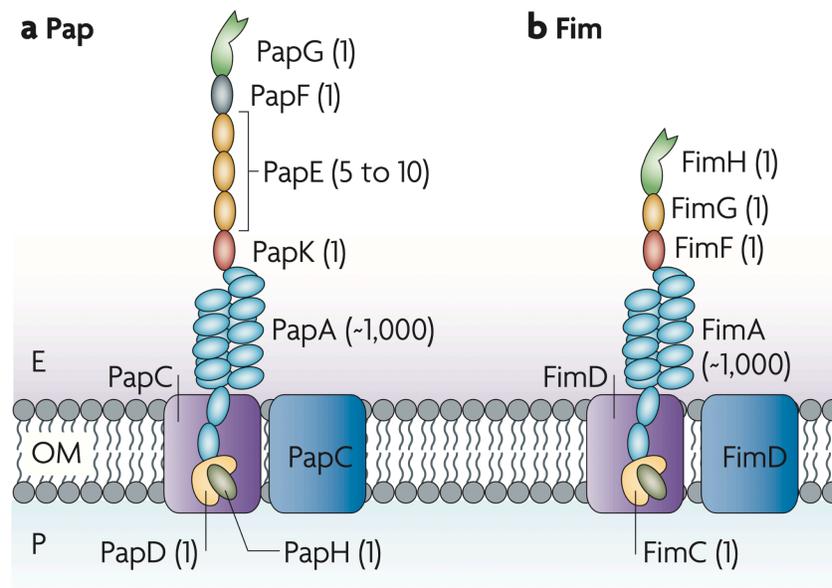


Figura 1: Esquema de la composición de las fimbria P (a) y fimbria tipo 1 (b), representados por los sistemas Pap y Fim, respectivamente (44).

con diversas actividades y distribuciones dentro de los distintos tipos de cepas. Destaca el pilus común de *E. coli* (ECP), encontrado tanto en cepas comensales y patogénicas, y que

contiene la subunidad mayor EcpA (45), cumpliendo el rol de unir superficies hidrofóbicas y mediar la agregación interbacteriana en la formación temprana de biopelículas (46). En el año 2007, Nuccio y Bäumler realizaron un análisis en el cual se clasificaron las fimbrias CU en seis clados principales, de acuerdo con un análisis filogenético de las secuencias aminoacídicas de las proteínas ujier, el único componente del sistema que siempre es codificado por un solo gen. Dichos clados fueron denominados como α , β , γ , κ , π y σ , en donde miembros de cada clado comparten estructuras de operones relacionadas y codifican subunidades fimbriales con dominios proteicos similares, siendo las fimbrias tipo 1 y tipo P del clado γ y π respectivamente (47). Varios grupos de investigación están tomando a las fimbrias CU como blanco potencial para el desarrollo de terapias antiinfecciosas, entre ellas, vacunas, análogos de receptores de estructuras de adherencia y moléculas pequeñas que detengan la interacción entre el patógeno y el hospedero, dando de esta forma una nueva alternativa a las terapias con antimicrobianos tradicionales, con el propósito de enfrentar el aumento de la resistencia a dichos fármacos. Por lo tanto, el estudio del ensamblaje, estructura y función de los sistemas CU y sus interacciones con el hospedero, resultará importante para ayudar al desarrollo y generación de nuevas terapias (48).

Antecedentes de actividad biológica de fimbrias CU con heparina

La capacidad de adherencia bacteriana a factores del hospedero, determinada por los sistemas fimbriales CU, ha sido atribuida exclusivamente a las subunidades estructurales fimbriales. Sin embargo, existe una región superficial en las proteínas ujier (Figura 2), que están insertas en la membrana externa. De acuerdo con el conocimiento actual, el rol de la proteína ujier se da principalmente en la biogénesis de las fimbrias CU, con una actividad crucial de los dominios periplásmicos (47). Hasta la fecha, se desconoce la función o el rol de las regiones superficiales, pero se han encontrado antecedentes sugerentes de actividad

biológica a través de la unión a glicosaminoglicanos, como, por ejemplo, la unión de heparina al ujier fimbrial YcbS de *E. coli* (50). Sin embargo, no se ha demostrado que esta actividad esté efectivamente determinada por las regiones expuestas a la superficie. Por otro lado, existe evidencia de unión de heparina a cepas patogénicas de *E. coli*, específicamente EHEC (51) y también antecedentes de prevención de ITUs recurrentes mediante la administración intravesical de heparina (52); no obstante, hasta el día de hoy no hay determinación a cuáles estructuras superficiales podría unirse heparina.

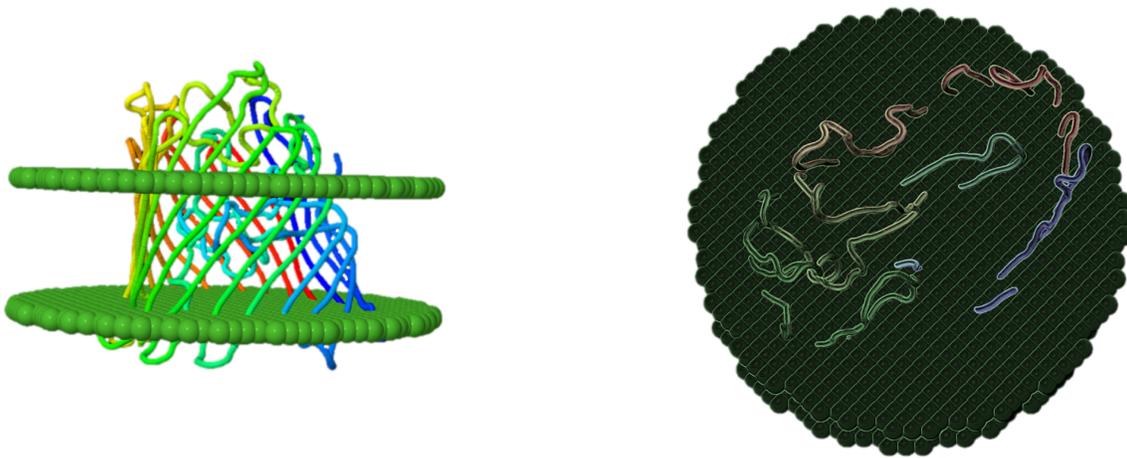


Figura 2: Región superficial de FimD (RCSB Protein DataBank código 3OHN). Izquierda: Perspectiva lateral. Derecha: Perspectiva superior. Elaboración por Dr. Felipe Del Canto Fuentes.

Los glicosaminoglicanos (GAGs) son polisacáridos que forman parte de la matriz extracelular (53), que comprenden repeticiones de disacáridos sulfatados de forma variable, en donde las repeticiones β 4GlcUA- α 4GlcNAc contribuyen a la síntesis de heparina y heparán sulfato (54), moléculas estructuralmente relacionadas y biosintetizadas a través de la misma vía. Heparina y heparán sulfato se han relacionado a distintos procesos fisiológicos, tales como crecimiento y diferenciación celular, coagulación sanguínea, interacciones célula-célula y célula-matriz, metabolismo celular, transporte de lípidos, inflamación y defensa de hospedero

(55). Heparina se localizan principalmente en los gránulos de mastocitos tisulares, que están estrechamente asociados con la respuesta inmune, mientras que el heparán sulfato está más ampliamente distribuido en la superficie de diversos tipos celulares y además en matrices extracelulares (49, 55). Dentro del contexto de interacción con otras moléculas, en donde existe reconocimiento, adhesión y señalización celular (56), heparina y heparán sulfato pueden interactuar con fimbrias bacterianas, donde dicha interacción es sustancial para adhesión de bacterias a las células del hospedero, mediando la patogenicidad bacteriana para producir infección (57). Como ya se mencionó, en el año 2016, Hsiao et al. demostraron que el ujier YcbS une GAGs, incluyendo heparina, evidenciando una interacción y alta afinidad, sin embargo, aún no se sabe si hay unión directamente con moléculas expuestas a la superficie o no (50). Al referirse a la función de defensa en el hospedero, que se ha reportado para algunos GAGs, en el año 2008, Gu et al. demostraron que heparina y heparán sulfato bloquean la adhesión de EHEC (*E. coli* O157:H7) a células epiteliales colónicas humanas (51), un evento clave en la patogénesis de dicha bacteria. Así, los GAGs podrían ser la base de un nuevo tratamiento para prevenir la inflamación aguda del colon inducida por EHEC O157:H7. En línea con estos hallazgos, en el año 2013, Ablove et al. realizaron un estudio piloto en mujeres con historial de ITUs recurrentes frecuentemente causadas por UPEC (25), a quienes administraron instilaciones vesicales con heparina una vez a la semana por seis semanas. Los resultados arrojaron que 78% de las pacientes respondieron a la terapia, es decir, la cantidad de ITUs disminuyeron y, además, el efecto persistió post tratamiento (52), sugiriendo nuevamente, el uso de heparina como opción de tratamiento alternativo a los antibióticos.

En el programa de Microbiología y Micología del Instituto de Ciencias Biomédicas de la Universidad de Chile se busca estudiar la interacción de heparina con proteínas superficiales de sistemas fimbriales CU de *E. coli*, para posteriormente determinar los efectos que tendría

sobre la patogenicidad bacteriana. Por lo tanto, en una primera instancia, es importante dilucidar si la unión a heparina efectivamente ocurre. En este escenario, en este trabajo de investigación se realizó la determinación de la unión de heparina a cepas de distintos patotipos de DEC's, incluyendo EHEC, ETEC, EPEC y EAEC, y UPEC, como representante de ExPEC, junto además de la cepa comensal *E. coli* HS y a una cepa de laboratorio, *E. coli* HB101, para posteriormente seleccionar cepas representativas que hayan unido heparina, y determinar si la unión depende de proteínas de superficie de sistemas fimbriales CU mediante el bloqueo con manosa, un monosacárido que se ha utilizado en la prevención de ITUs recurrentes (61), que se une a la subunidad accesoria FimH (58) presente en la fimbria tipo 1 (Figura 1) y, además, mediante el bloqueo con anticuerpos (anti-FimA, anti-FimD, anti-EcpA, anti-PapA y anti-PapC) a distintas proteínas de superficie representativas de fimbrias P y fimbrias tipo 1. De esta manera, se espera profundizar en el conocimiento de la interacción de heparina con fimbrias CU de *E. coli* y proyectar nuestros hallazgos a respaldar, mejorar y/o implementar nuevas potenciales utilidades de la heparina como base de una terapia anti-adherencia.

HIPÓTESIS

Cepas patogénicas de *Escherichia coli* unen heparina a través de sistemas fimbriales chaperona-ujier.

OBJETIVO GENERAL

Determinar si cepas patogénicas de *Escherichia coli* unen heparina, utilizando sistemas fimbriales chaperona-ujier

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar unión de heparina a cepas patogénicas de *Escherichia coli*
2. Determinar el efecto de manosa sobre la unión de heparina a cepas representativas de cepas patogénicas de *Escherichia coli* que presentaron unión a heparina
3. Determinar el efecto de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD, anti-EcpA, anti-PapA y anti-PapC sobre la unión de heparina a cepas representativas de cepas patogénicas de *Escherichia coli*

MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo de investigación fue realizado bajo protocolos de bioseguridad tipo 2 (BSL-2), aprobados por la Unidad de Prevención de Riesgos (UPR) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, en el contexto del Proyecto FONDECYT 1200979, que enmarca el desarrollo de esta tesis profesional.

1. Transformación por electroporación de *E. coli* BL21ΔABCF con pET-3a vacío, *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD* y *E. coli* BL21ΔABCF/*papC*

Al momento de iniciar este trabajo de tesis, se planteó como uno de los objetivos el evaluar la unión de heparina y además citoquinas proinflamatorias a proteínas ujier de *E. coli* expresadas de forma recombinante en una cepa de laboratorio (no patogénica). Este objetivo no prosperó, pero, a pesar de ello, se describen a continuación los procedimientos básicos realizados. Se utilizó el plásmido pET-3a como vector para los genes de ujier *fimD* y *papC* (pET-3a/*fimD* y pET-3a/*papC*, respectivamente), siendo obtenidos, incluyendo el plásmido vacío, de la empresa especializada Biomatik (Wilmington, Delaware, EEUU). El plásmido pET-3a es un vector que confiere resistencia a ampicilina a la cepa transformada y la expresión de los genes clonados en él es inducible por adición de IPTG 1 mM al medio de cultivo. Se realizó una electroporación a la cepa de *E. coli* BL21ΔABCF, cuádruple *knockout* para los genes de porinas *ompA*, *lamB*, *ompC* y *ompF*, diseñada justamente para la expresión recombinante de otras porinas, siendo hospedero ideal para la expresión de proteínas ujier (59). Se esperaba generar tres cepas recombinantes, dos productoras de FimD y PapC, por separado, respectivamente, y una cepa control con el plásmido pET-3a vacío. Se cultivó la cepa *E. coli* BL21ΔABCF en 3 mL de caldo lisogénico (LB) a 30°C, hasta alcanzar una OD₆₀₀ de 0,400. Luego, se centrifugó el cultivo a 10.000 xg por 2 minutos a 4°C y se eliminó el sobrenadante, se agregó el mismo volumen original de agua grado biología molecular (BM), y se centrifugó repitiendo el proceso 2 veces más. Se resuspendió el

sedimento bacteriano en 150 μL en agua grado BM, para obtener 50 μL de suspensión para la transformación con cada plásmido. Luego, sobre hielo, se agregó 1 μL de los plásmidos, previamente dializados, y se introdujo el volumen total en cubetas de electroporación para electroporar a 1,8 kV. Inmediatamente después, se resuspendieron los volúmenes en 1 mL de caldo LB dentro de las cubetas de electroporación y se recuperó todo el volumen para incubar a 30°C por 1 h en agitación a 200 RPM. Posteriormente, se sembraron 100 μL en agar LB suplementado con ampicilina 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (placa 1X), y los 900 μL restantes se centrifugaron a 3.000 $\times\text{g}$ por 10 min a temperatura ambiente para luego eliminar el sobrenadante, resuspender el pellet en 100 μL de caldo LB y sembrar este volumen en otra placa de agar LB de las mismas características ya mencionadas (placa 9X). Ambas placas se incubaron *overnight* a 30°C. Al día siguiente, se subcultivó una colonia de cada cepa recombinante, y se generaron respaldos para almacenar a -80°C.

2. Extracción total de proteínas, SDS-PAGE e inmunoblot para detección de FimD y PapC

Se cultivaron las cepas recombinantes *E. coli* BL21 Δ ABCF/pET-3a, *E. coli* BL21 Δ ABCF/*fimD* y *E. coli* BL21 Δ ABCF/*papC* en 3 mL de caldo LB suplementado con ampicilina (100 $\mu\text{g}/\text{mL}$), *overnight*, a 30°C, en agitación a 200 RPM. Al día siguiente, se subcultivaron en las mismas condiciones hasta alcanzar una OD_{600} de 0,2. Luego, se inició la inducción agregando IPTG 1 mM e incubando por 3 h a 30°C en agitación a 200 RPM. Una vez finalizada la inducción, se realizó la extracción de proteínas totales, a partir de aproximadamente $1,0 \times 10^8$ unidades formadoras de colonias (UFC) suspendidas en un volumen de 160 μL . A esto se agregó 40 μL de buffer Laemmli 5X y se incubó a 100°C por 10 min. Pasado el tiempo, se centrifugaron los tubos a 12.000 $\times\text{g}$ por 5 min a temperatura ambiente y se traspasaron los sobrenadantes a microtubos nuevos. Se preparó el gel de poliacrilamida para separar los extractos por

electroforesis desnaturalizante (SDS-PAGE), con un grosor de 1,5 mm, con los volúmenes descritos en la Tabla 1.

Tabla 1: Volúmenes de reactivos para la realización del gel de poliacrilamida 1,5 mm

Concentrador (5%)	Separador (10%)
H ₂ O destilada: 3,65 mL	H ₂ O destilada: 3,96 mL
Poliacrilamida (40%): 625 µL	Poliacrilamida (40%): 3,4 mL
Tris 1 M pH 6,8: 625 µL	Tris 1.5 M pH 8,8: 2,5 mL
SDS (10%): 50 µL	SDS (10%): 100 µL
Persulfato de amonio (10%): 100 µL	Persulfato de amonio (10%): 200 µL
TEMED: 20 µL	TEMED: 16 µL

Una vez instalado el gel dentro de la cámara de electroforesis con el buffer de corrida, se distribuyeron los marcadores de peso molecular (PageRuler™ de 10 a 180 kDa, Thermo Scientific™, Vilna, Lituania), proteínas purificadas que funcionaron como control positivo (FimD y PapC) y los extractos totales. La electroforesis transcurrió a 90 V por 1 h y luego a 100 V por 1 h. Una vez finalizado, se realizó la transferencia desde el gel de poliacrilamida a una membrana de nitrocelulosa, a 100 V por 1 h, en buffer de transferencia. Finalizado este proceso, la membrana se incubó en buffer de bloqueo, compuesto por albúmina de suero bovino al 1% en buffer tris salino conteniendo Tween 20 (BSA-TBS-T), *overnight* a 4°C. Al día siguiente, se inició el inmunoblot agregando los anticuerpos primarios anti-FimD ó anti-PapC, anticuerpos policlonales producidos en conejos, ambos en diluciones 1:1000, e incubando por 1 h en agitación a temperatura ambiente. Luego, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en agitación con BSA-TBS-T 1%, para luego incubar con el anticuerpo secundario anti-IgG de conejo conjugado con fosfatasa alcalina, en una dilución 1:1000 (Thermo Fisher Scientific, Eugene, OR, EE.UU) por 1 h en agitación a temperatura ambiente. Terminada la incubación, se realizaron 3 lavados de 10 min cada uno en agitación con BSA-TBS-T 1%, se

lavaron las membranas con agua destilada y se agregó 1 mL de sustrato de fosfatasa alcalina NBT/BCIP (Thermo Scientific, Rockford IL, EE.UU) para revelar la presencia de bandas inmunoreactivas.

3. Detección de FimD y PapC en la superficie de *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD* y *E. coli* BL21ΔABCF/*papC* mediante fluorimetría

Con el objetivo de detectar la presencia de las proteínas ujier FimD y PapC en la superficie de las cepas recombinantes, se realizó la detección en bacterias completas fijadas, sin permeabilizar. Para ello, se incubaron las cepas recombinantes *E. coli* BL21ΔABCF, *E. coli* BL21ΔABCF/pET-3a, *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD* y *E. coli* BL21ΔABCF/*papC* en 3 mL de caldo LB suplementado con ampicilina de 100 µg/mL, *overnight* a 30°C en agitación a 200 RPM. Al día siguiente, se realizó la inducción de la expresión adicionando IPTG , en las mismas condiciones indicadas anteriormente para la detección por inmunoblot. Una vez finalizada la inducción, se extrajo un volumen conteniendo aproximadamente $2,0 \times 10^8$ UFC, para cada caso, y se traspasó a microtubos. Las suspensiones se centrifugaron a 3.000 xg por 10 min a temperatura ambiente, para después eliminar el sobrenadante y dejar el sedimento, el cual se fijó con 100 µL de glutaraldehído al 2% por 10 min a temperatura ambiente. Posterior a la fijación, los tubos se centrifugaron a 10.000 xg por 2 min a temperatura ambiente, se eliminaron los sobrenadantes y se realizaron tres lavados con PBS 1X. A continuación, se agregaron 100 µL de BSA al 1% a cada tubo y se incubó por 1 h a temperatura ambiente. Luego, las suspensiones se centrifugaron a 10.000 xg por 2 min a temperatura ambiente, se eliminaron los sobrenadantes y se realizaron tres lavados con PBS 1X. Seguidamente, se realizó el marcaje de los anticuerpos con ficoeritrina (PE) utilizando el kit Zenon™ (Thermo Fisher Scientific™, Eugene OR, EE.UU) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Inmediatamente, se agregaron las preparaciones de anticuerpos anti-FimD ó anti-PapC, ambos en una dilución final 1:100, y se incubaron por 1 h en oscuridad a temperatura ambiente. Posterior a la incubación con anticuerpos, las cepas se centrifugaron a 10.000 xg por 2 min a temperatura ambiente, se eliminaron los sobrenadantes y se realizaron tres lavados con PBS 1X. Seguidamente, se agregaron 100 µL de DAPI 1:000 (1 µg/mL) y se incubaron por 1 a 2 min en oscuridad para luego realizar 3 lavados con PBS. Este último paso con el objetivo de tener una medida basal, indicativa de la presencia de bacterias en el pocillo, en base a la tinción del ADN. Las suspensiones se traspasaron a una placa de 96 pocillos con fondo óptico en el orden descrito de la Figura 3.

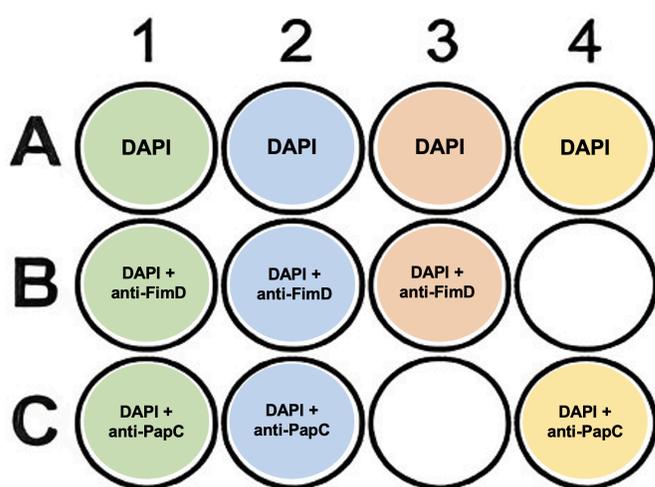


Figura 3: Esquema de organización de pocillos para detección de FimD ó PapC en cepas recombinantes, mediante fluorimetría. **Fila A:** Cepa *E. coli* + DAPI (cepa control). **Fila B:** Cepa *E. coli* + DAPI + anti-FimD. **Fila C:** Cepa *E. coli* + DAPI + anti-PapC. En verde (**Columna 1**): *E. coli* BL21ΔABCF (cepa control).

En azul (**Columna 2**): *E. coli* BL21ΔABCF/pET-3a (cepa control). En naranja (**Columna 3**): *E. coli* BL21ΔABCF/FimD. En amarillo (**Columna 4**): *E. coli* BL21ΔABCF/PapC.

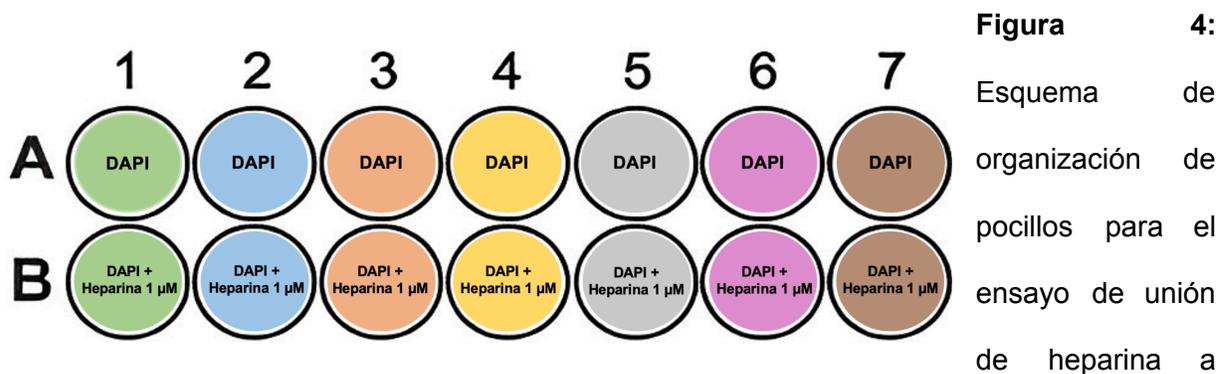
Se realizó lectura de intensidad de fluorescencia de DAPI y PE en el multi lector de placas Synergy™ HT, utilizando el software Gen5 de BioTek. Los datos obtenidos se exportaron a una planilla de Excel y se calculó la relación PE/DAPI para observar si existe un aumento en la unión de anti-FimD a *E. coli* BL21ΔABCF/FimD y de anti-PapC *E. coli* BL21ΔABCF/PapC con respecto a las cepas controles *E. coli* BL21ΔABCF y *E. coli* BL21ΔABCF/pET-3a. Al no

obtener resultados exitosos tanto en la detección por inmunoblot, como por fluorimetría, se decidió no continuar con estos procedimientos y se solicitó la modificación de los objetivos a la Escuela de Tecnología Médica. Por lo tanto, las cepas recombinantes no se utilizaron para los siguientes ensayos.

4. Ensayos de unión de heparina a *E. coli* HB101, *E. coli* HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073

Se determinó la unión de heparina a distintas cepas de *E. coli*, fijadas, sin permeabilización, con el objetivo de detectar unión a estructuras de superficie. Las cepas seleccionadas fueron *E. coli* HB101, correspondiente a una cepa de laboratorio, *E. coli* HS, correspondiente una cepa comensal, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69 y EAEC 042, correspondientes todas a DEC's, y UPEC CFT073, correspondiente a una ExPEC. Se cultivaron las cepas en 3 mL de caldo LB a 37°C, *overnight*, en agitación a 180 RPM. Al día siguiente, se midieron las OD₆₀₀ de cada cultivo y, en base a dicho valor, se calculó el volumen para obtener aproximadamente $2,0 \times 10^8$ UFC. Dichos volúmenes se traspasaron en duplicado a 2 microtubos para cada cepa, uno para incubación en ausencia de heparina y posterior tinción con DAPI (control) y otro para la unión a heparina 1 µM + DAPI. Los tubos se centrifugaron a 3.000 xg por 10 min a temperatura ambiente, para luego eliminar el sobrenadante y obtener un sedimento bacteriano. Cada cepa se fijó agregando glutaraldehído al 2% e incubando por 10 min a temperatura ambiente, pasado el tiempo, se centrifugaron a 3.000 xg por 10 min a temperatura ambiente, se descartó el sobrenadante, se lavaron con PBS 1X y se centrifugaron nuevamente a 3.000 xg por 10 min a temperatura ambiente, repitiendo este proceso 3 veces. Luego, a los tubos que se marcaron con heparina se agregaron 50 µL de heparina 2 µM conjugada con FITC (Creative PEGWorks, Chapel Hill NC, EE.UU) y 50 µL de PBS 1X a cada cepa, para obtener una concentración de trabajo final de heparina 1 µM, la cual se incubó por 1 h en oscuridad, a temperatura ambiente. Finalizada

la incubación, se centrifugaron las suspensiones a 3.000 xg por 10 min, a temperatura ambiente. Se descartó el sobrenadante, se lavaron las bacterias con PBS 1X y se centrifugaron nuevamente a 3.000 xg por 10 minutos a temperatura ambiente, repitiendo este proceso para completar un total de 3 lavados. Seguidamente, se agregaron 100 μ L de DAPI 1:1000 (1 μ g/mL) y se incubaron las suspensiones por 1 a 2 min en oscuridad, para luego realizar 3 lavados con PBS 1X. Finalmente, se resuspendieron los sedimentos en 100 μ L de PBS 1X y se traspasaron a una placa de 96 pocillos de fondo óptico, según el orden descrito en la Figura 4.



cepas *E. coli*. **Fila A:** Cepa *E. coli* + DAPI (cepa control). **Fila B:** Cepa *E. coli* + DAPI + Heparina 1 μ M. En **verde (Columna 1):** *E. coli* HB101. En **azul (Columna 2):** *E. coli* HS. En **naranja (Columna 3):** EHEC EDL933. En **amarillo (Columna 4):** ETEC H10407. En **gris (Columna 5):** EPEC 2348/69. En **rosado (Columna 6)** EAEC 042. En **café (Columna 7):** UPEC CFT073

Se realizó lectura de intensidad de fluorescencia de DAPI y FITC en el multi lector de placas Synergy™ HT, utilizando el software Gen5 de BioTek. Los datos obtenidos se exportaron a una planilla de Excel y se calculó la relación FITC/DAPI para observar si existe un aumento en la unión a heparina (Fila B) con respecto a las cepas controles (Fila A). Finalmente, estos números se transcribieron al software GraphPad Prism para análisis estadístico, el cual se realizó con prueba de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de hipótesis estadística de

Bonferroni para comparaciones múltiples. Se realizaron tres repeticiones interensayo en distintos días (n=3).

5. Ensayos de unión de heparina a *E. coli* HB101 y UPEC CFT073 con bloqueo de Manosa 1%

Desde el experimento anteriormente descrito, se escogieron cepas representativas para los ensayos de bloqueo. Inicialmente se pensaba escoger dos cepas patogénicas, pero dado que, inesperadamente *E. coli* HB101 demostró un nivel más alto de unión a heparina, se seleccionó esta cepa y UPEC CFT073, que produce todos los sistemas fimbriales CU que se podían ensayar. Las cepas mencionadas se cultivaron en 3 mL de caldo LB a 37°C, overnight, en agitación a 180 RPM. Al día siguiente, se midieron las OD₆₀₀ de ambos cultivos, y en base a dicho valor, se calculó el volumen conteniendo aproximadamente 2,0 x 10⁸ UFC. Dichos volúmenes se traspasaron en duplicado a 2 microtubos para cada cepa, uno para la unión a heparina 1 µM + DAPI (cepa control) y otro para la unión a heparina 1 µM + DAPI + manosa 1%, los cuales se centrifugaron a 3.000 xg por 10 min a temperatura ambiente, para luego eliminar el sobrenadante. A cada tubo, se agregaron 100 µL de glutaraldehído al 2% y se incubó por 10 min para fijar las bacterias. Pasado el tiempo, se realizaron tres lavados con PBS 1X, con centrifugaciones en las condiciones recién indicadas. Luego, se realizó el bloqueo, agregando 100 µL de manosa 1% (Sigma-Aldrich, St Louis MO, EE.UU) e incubando por 30 min a temperatura ambiente. Finalizada la incubación, se realizaron tres lavados con PBS y se continuó con el ensayo de unión a heparina, tal como fue descrito en el punto anterior. Se realizó la lectura de intensidad de fluorescencia en el multi lector de placas Synergy™ HT, utilizando el software Gen5 de BioTek, según el orden descrito en la Figura 5.

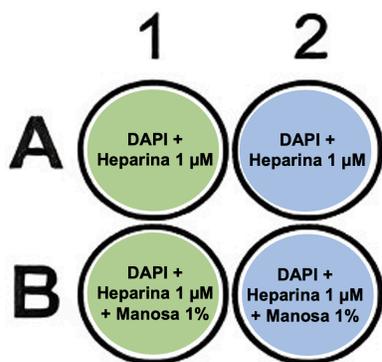


Figura 5: Esquema de organización de pocillos para unión de cepas *E. coli* a heparina con bloqueo de manosa 1%. **Fila A:** Cepa + DAPI + Heparina 1 μ M (cepa control). **Fila B:** Cepa + DAPI + Heparina 1 μ M con bloqueo de manosa 1%. En **verde (Columna 1):** *E. coli* HB101. En **azul (Columna 2):** UPEC CFT073

Los datos obtenidos se exportaron a una planilla de Excel, y se determinó la relación FITC/DAPI para observar si existe efecto de la adición de manosa 1% (Fila B) con respecto a la unión a heparina sin bloqueo (Fila A). Así, se esperaba determinar si la unión a heparina depende, al menos en parte, de FimH, subunidad accesoria de la fimbria tipo 1, que reconoce receptores manosilados (58). Finalmente, estos números se transcribieron al software GraphPad Prism para análisis estadístico, el cual se realizó con prueba de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de hipótesis estadística de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se realizaron tres repeticiones interensayo en distintos días (n=3).

6. Ensayos de unión de heparina a *E. coli* HB101 con bloqueo de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD y anti-EcpA y a UPEC CFT073 con bloqueo de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD, anti-EcpA, anti-PapA y anti-PapC.

Este ensayo se realizó con el objetivo de determinar el potencial efecto de anticuerpos dirigidos contra distintos componentes de sistemas fimbriales CU en la unión de heparina a *E. coli* HB101 o UPEC CFT073. Para el caso de *E. coli* HB101, se utilizaron anticuerpos dirigidos contra FimA (subunidad principal de fimbria tipo 1), FimD (ujier de fimbria tipo 1) y EcpA (subunidad principal de pilus común de *E. coli*). En el caso de UPEC CFT073 se utilizaron anticuerpos dirigidos contra FimA, FimD, EcpA, PapA (subunidad principal de fimbria P) y PapC (ujier de fimbria P). Todos estos anticuerpos son anticuerpos policlonales

desarrollados en conejos y ya se encontraban disponibles en el Programa de Microbiología y Micología al momento de iniciar este trabajo de tesis. Los anticuerpos anti-ujier (anti-FimD y anti-PapC), son los mismos utilizados en las detecciones descritas en los procedimientos anteriores, desarrollados específicamente contra las regiones superficiales. El procedimiento utilizado fue similar al descrito para el ensayo de bloqueo con manosa. La distribución se muestra en la Tabla 2.

Tabla 2: Anticuerpos utilizados en los ensayos con *E. coli* HB101 y UPEC CFT073

<i>E. coli</i> HB101	UPEC CFT073
DAPI + Heparina 1 μ M (cepa control)	DAPI + Heparina 1 μ M (cepa control)
DAPI + Heparina 1 μ M + anti-FimA [Conejo #7330 0,34 mg/mL]	DAPI + Heparina 1 μ M + anti-FimA [Conejo #7330 0,34 mg/mL]
DAPI + Heparina 1 μ M + anti-FimD [Conejo #9963 0,4 mg/mL]	DAPI + Heparina 1 μ M + anti-FimD [Conejo #9963 0,4 mg/mL]
DAPI + Heparina 1 μ M + anti-EcpA	DAPI + Heparina 1 μ M + anti-EcpA
-	DAPI + Heparina 1 μ M + anti-PapA [Conejo #7732 0,5 mg/mL]
-	DAPI + Heparina 1 μ M + anti-PapC [Conejo #9852 0,34 mg/mL]
DAPI + Heparina 1 μ M + anti-MrkA [Conejo #3462 0,34 mg/mL] (control negativo)	DAPI + Heparina 1 μ M + anti-MrkA [Conejo #3462 0,34 mg/mL] (control negativo)

El anticuerpo anti-MrkA se utilizó como control negativo (control de isotipo), ya que reconoce la fimbria tipo 3 de *Klebsiella pneumoniae* (60), una estructura que no está presente en las cepas incluidas en este ensayo. La lectura se realizó según lo descrito en la Figura 6.

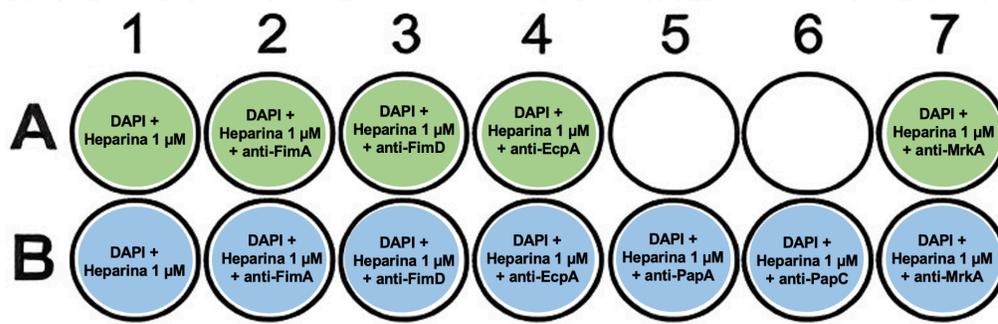


Figura 6:

Esquema de organización de pocillos para unión de cepas *E.*

coli a heparina con bloqueo de anticuerpos: En **verde (Fila A)**: *E. coli* HB101. En **azul (Fila B)**: UPEC CFT073. **Columna 1**: Cepa control. **Columna 7**: Control negativo.

Del mismo modo, se realizó análisis estadístico con prueba de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de hipótesis estadística de Bonferroni para comparaciones múltiples. Se realizaron tres repeticiones interensayo en distintos días (n=3).

RESULTADOS

1. Inmunoblot para detección de FimD y PapC en cepas recombinantes *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD* y *E. coli* BL21ΔABCF/*papC*

Las membranas de nitrocelulosa obtenidas al final del proceso de inmunoblot para la detección de FimD y PapC, en los extractos de las cepas recombinantes, se digitalizaron a través de un scanner y las imágenes se procesaron mediante el software ImageJ para regular el brillo y contraste. En la figura 7, se muestra el inmunoblot realizado con el anticuerpo anti-FimD. Se esperaba identificar una banda inmunoreactiva con un tamaño aproximado de 97 kDa (según secuencia de proteína FimD madura), con mayor intensidad en el extracto de la cepa recombinante *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD*, con respecto al extracto control, de la cepa portando el vector vacío. Se observó reactividad contra el control positivo de reacción, correspondiente a la proteína quimérica representativa de los dominios de superficie de FimD (quimera que se utilizó como inmunógeno para desarrollar el anticuerpo), en el tamaño esperado (15 kDa aproximadamente). Sin embargo, no se observó bandas reactivas en el tamaño de FimD madura (97 kDa) en el extracto de la cepa recombinante. Solo se observaron varias bandas inmunoreactivas en otros tamaños, probablemente reflejando reacciones inespecíficas, en el control negativo correspondiente a *E. coli* BL21ΔABCF/pET-3a, como también en la cepa *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD*. En la figura 8, se muestra el inmunoblot utilizando anti-PapC para detectar la proteína PapC, con un tamaño esperado de 92,06 kDa (según secuencia de proteína PapC madura). Tal como ocurrió con el caso de FimD, se observó reacción en el control positivo correspondiente a la proteína quimérica PapC. Sin embargo, tampoco se observó con claridad una banda inmunoreactiva en el tamaño esperado para PapC madura en la cepa recombinante *E. coli* BL21ΔABCF/*papC*. Se observaron múltiples bandas inespecíficas en el control negativo *E. coli* BL21ΔABCF/pET-3a que posee el vector vacío, así como también en el extracto de la

cepa *E. coli* BL21 Δ ABCF/*papC*. Se detectó claramente una banda inmunoreactiva en la cepa recombinante, la que estuvo ausente en el control negativo, pero demostró un tamaño mucho mayor al esperado (130 kDa, aproximadamente). Con estos resultados, se puede concluir que no se lograron evidenciar incrementos en las formas maduras de las proteínas FimD y PapC en las recombinantes *E. coli* BL21 Δ ABCF/*fimD* y *E. coli* BL21 Δ ABCF/*papC* respectivamente, bajo las condiciones utilizadas.

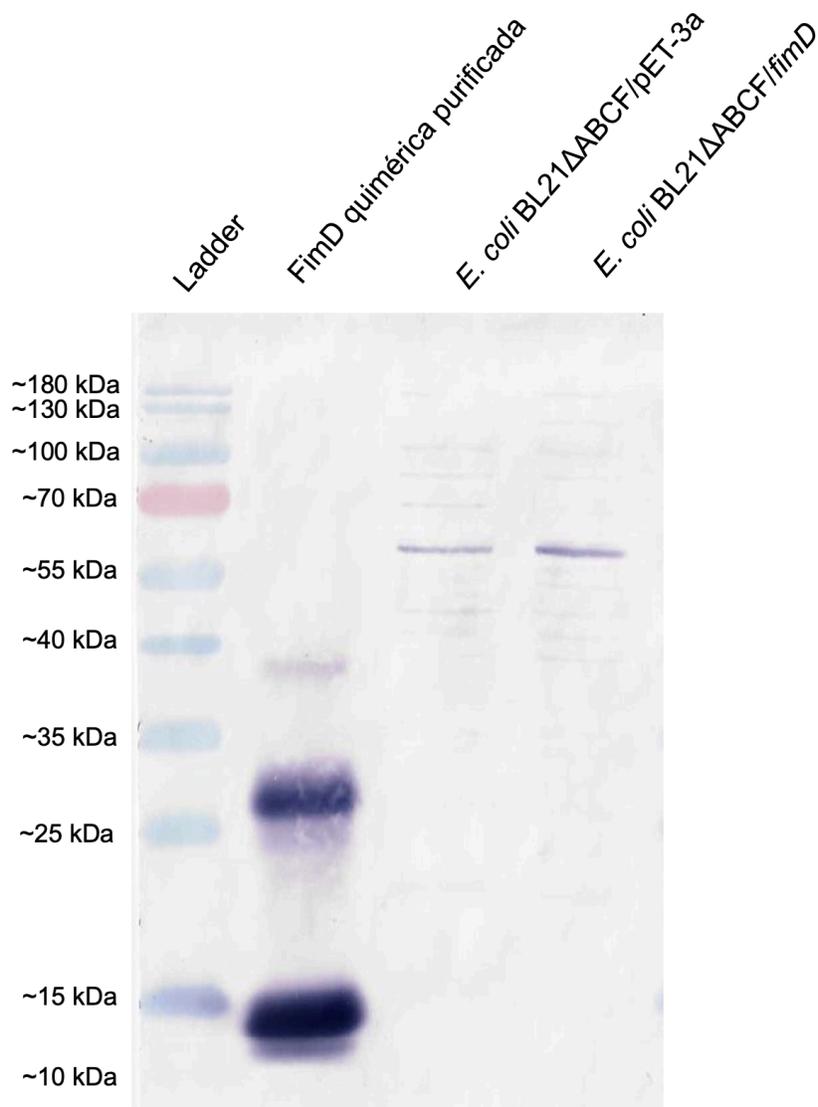


Figura 7: Inmunoblot con anticuerpo anti-FimD sobre extractos totales de cepa recombinante *E. coli* BL21 Δ ABCF/*fimD*. Ladder PageRuler™ de 10 a 180 kDa. Control positivo (+): FimD

quimérica purificada (15 kDa). Control negativo (-): *E. coli* BL21 Δ ABCF/pET-3a. Tamaño proteína FimD madura: 97 kDa.

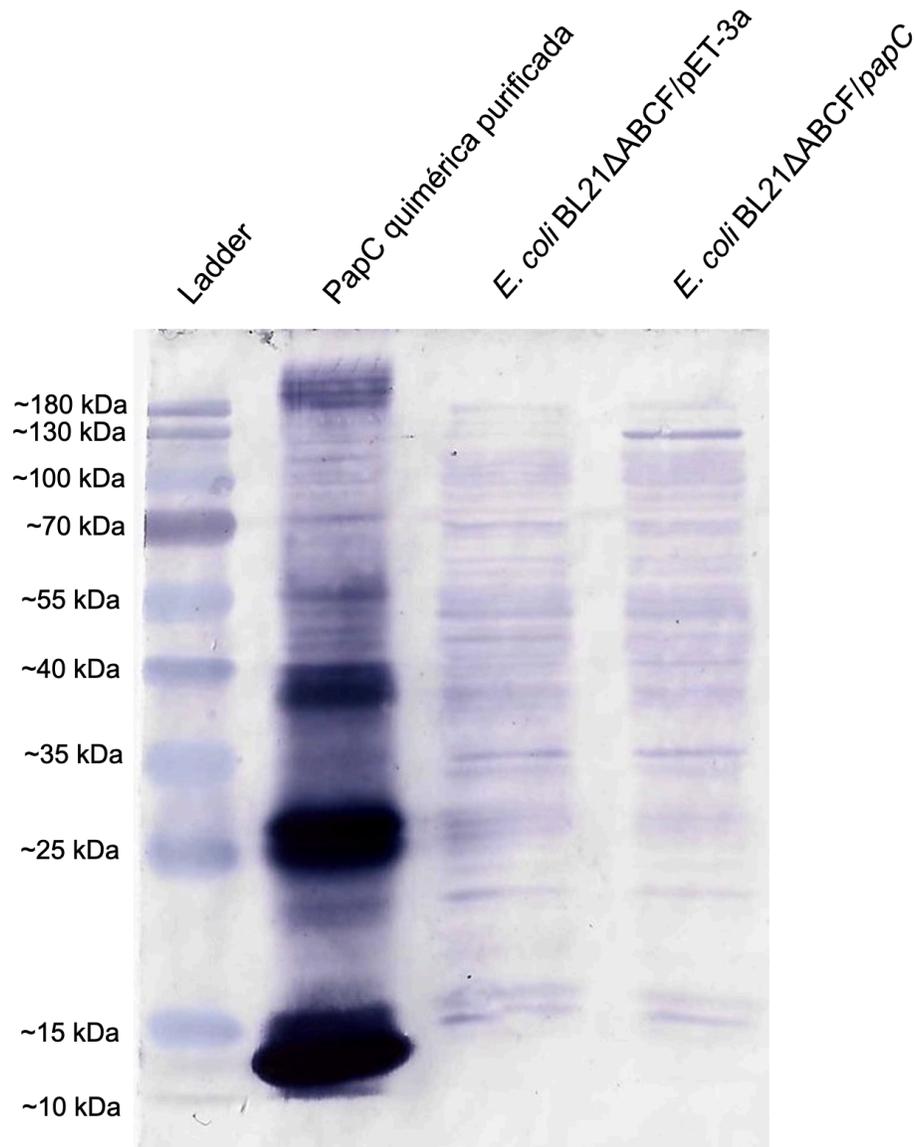


Figura 8: Inmunoblot con anticuerpo anti-PapC de recombinante *E. coli* BL21 Δ ABCF/papC. Ladder PageRuler™ de 10 a 180 kDa. Control positivo (+): PapC quimérica purificada. Control negativo (-): *E. coli* BL21 Δ ABCF/pET-3a. Tamaño proteína PapC: 92,06 kDa.

2. Detección de FimD y PapC *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD* y *E. coli* BL21ΔABCF/*papC* mediante fluorimetría

Si bien los resultados de las detecciones por inmunoblot no arrojaron resultados positivos, indicativos de la expresión recombinante de FimD y PapC en la cepa *E. coli* BL21ΔABCF, se realizó de todos modos la detección de ambas proteínas mediante fluorimetría, sobre bacterias fijadas, no permeabilizadas, con el objetivo de pesquisar su presencia en la superficie bacteriana. La relación PE/DAPI posterior a la lectura en cada caso se transcribió al software GraphPad Prism para graficar los resultados. En línea con los resultados del inmunoblot, los datos revelaron que las cepas recombinantes de *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD* y *E. coli* BL21ΔABCF/*papC* no mostraron señales de unión a anticuerpos más altas con respecto a sus cepas controles, correspondientes a las cepas sin anticuerpos y a las cepas *E. coli* BL21ΔABCF y *E. coli* BL21ΔABCF portando el plásmido pET-3a vacío (Figura 9a y 9b). Con estos resultados, se puede concluir que no existe unión de los anticuerpos anti-FimD y anti-PapC a *E. coli* BL21ΔABCF/*fimD* y *E. coli* BL21ΔABCF/*papC* respectivamente, lo que sugiere ausencia de expresión recombinante en las condiciones ensayadas.

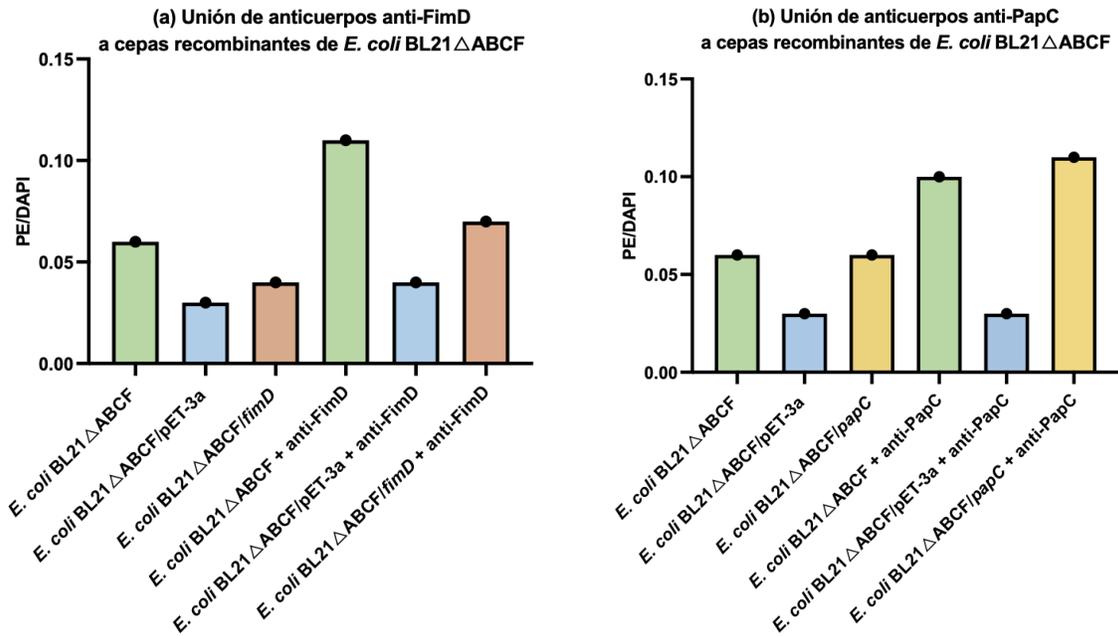


Figura 9: Relación PE/DAPI de unión de anticuerpos anti-FimD (a) y anti-PapC (b) a cepas recombinantes derivadas de *E. coli* BL21ΔABCF. Controles: Cepas recombinantes en ausencia de anticuerpos, cepa *E. coli* BL21ΔABCF y *E. coli* BL21ΔABCF/pET-3a

3. Ensayos de unión de heparina a *E. coli* HB101, *E. coli* HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073

Se determinó la unión de heparina conjugada a FITC, a distintas cepas de *E. coli*, realizando mediciones por fluorimetría. La relación FITC/DAPI de cada cepa se transcribió al software GraphPad Prism para análisis estadístico, el cual se realizó con prueba de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de hipótesis estadística Bonferroni para comparaciones múltiples. Los resultados indicaron que todas las cepas de *E. coli* mostraron unión a heparina con una señal (razón FITC/DAPI) significativamente más alta ($p < 0,05$) (Anexo 1), en comparación con el control al cual no se le incluyó heparina (Figura 10). Los datos se muestran como la media de tres ensayos ($n=3$), realizados en distintos días (Anexo 2). Para los siguientes experimentos, se escogieron dos cepas representativas que hayan unido

heparina. Se escogió *E. coli* HB101, ya que, a pesar de ser una cepa de laboratorio, no patogénica, fue la cepa que presentó la relación FITC/DAPI más alta dentro de todo el grupo de cepas evaluadas (media de 1,097, Anexo 3). Este resultado, sin duda, fue inesperado. Además, para tener una cepa representante del grupo de cepas patogénicas, se escogió UPEC CFT073, la cuál presentó una relación FITC/DAPI media en la unión a heparina de 0,6733. Además, UPEC CFT073 porta múltiples sistemas fimbriales CU, incluyendo la fimbria P, ausente en todo el resto de las cepas (62). Con este resultado, se puede concluir que todas las cepas de *E. coli* evaluadas (*E. coli* HB101, *E. coli* HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073) unen heparina.

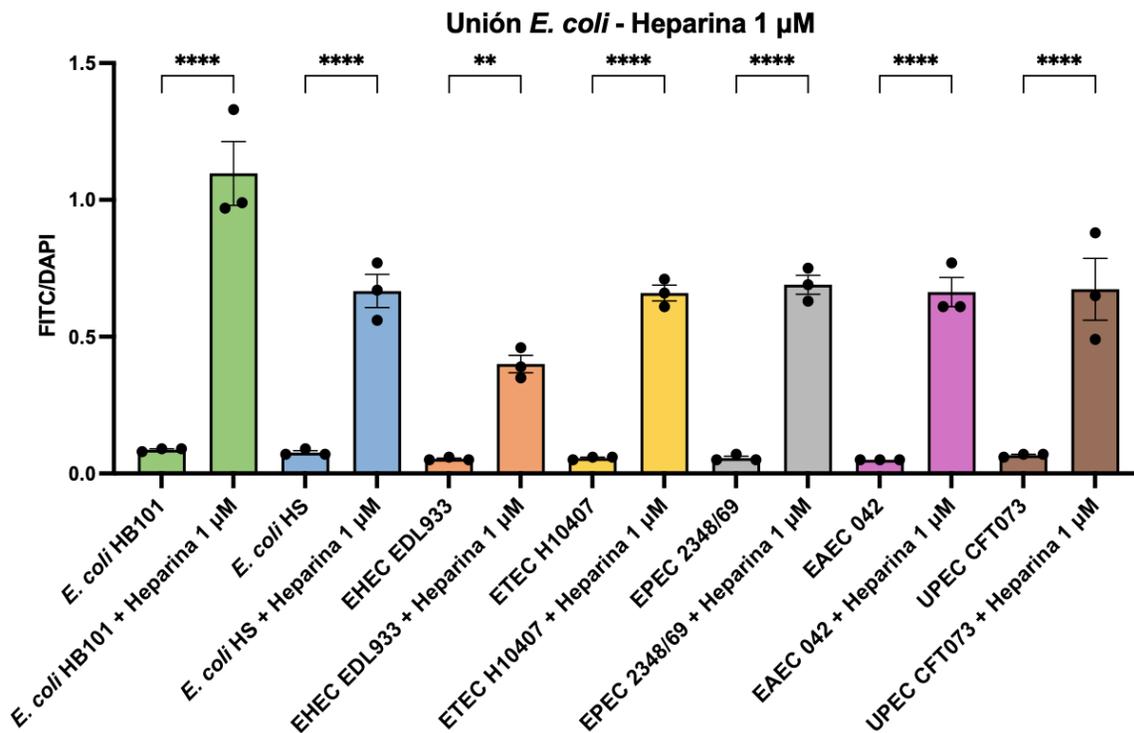


Figura 10: Relación FITC/DAPI de unión de cepas *E. coli* (*E. coli* HB101, *E. coli* HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073) a heparina 1 μ M conjugada con FITC. Se presentan en pares los resultados de la cepa control sin heparina junto a la cepa con heparina 1 μ M. FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol

4. Ensayos de bloqueo de unión de heparina a *E. coli* HB101 y UPEC CFT073 con manosa 1%

Con el objetivo de avanzar en la identificación de potenciales determinantes bacterianos de la unión a heparina, las cepas *E. coli* HB101 y UPEC CFT073 se incubaron con manosa 1% antes de incubarse con heparina conjugada con FITC. De esta manera se esperaba determinar un posible rol de la adhesina FimH, subunidad estructural accesoria de la fimbria tipo 1 (58). Se determinó, tal como se describió para los ensayos anteriores, la relación FITC/DAPI en cada caso, después de realizar lecturas mediante fluorimetría. Los resultados se analizaron con prueba de análisis de varianza (ANOVA) y prueba de hipótesis estadística Bonferroni para comparaciones múltiples. Los resultados indicaron que ambas cepas mantuvieron un nivel de unión a heparina similar, con y sin bloqueo con manosa 1% (Figura 11 y Anexo 4). Los datos se muestran como la media de tres réplicas biológicas realizadas en distintos días (n=3, Anexo 5). Con este resultado, se puede concluir que FimH, que es producida por *E. coli* HB101 y UPEC CFT073, no sería determinante en la unión de heparina a *E. coli* HB101 y UPEC CFT073.

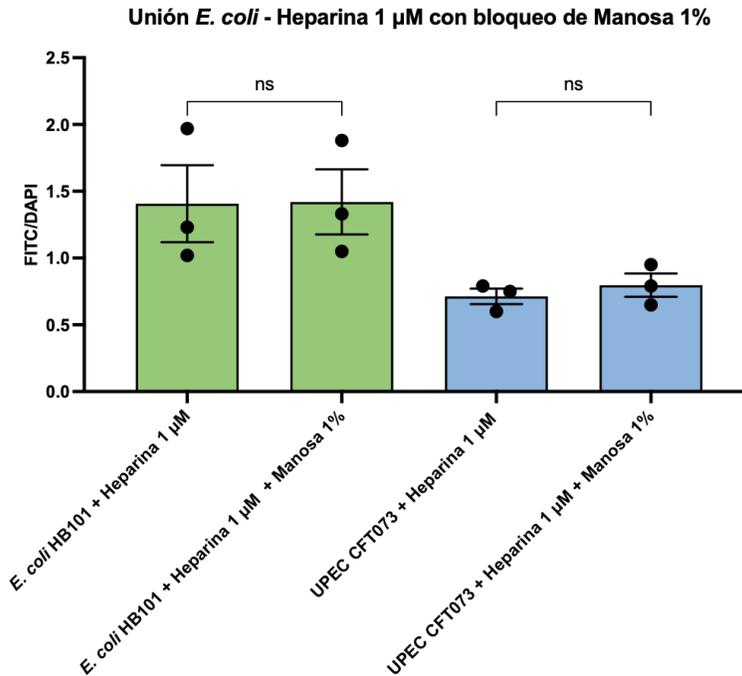


Figura 11: Relación FITC/DAPI de unión de heparina 1 μ M conjugada con FITC a cepas *E. coli* HB101 y UPEC CFT073, con y sin bloqueo con manosa 1%. FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol.

5. Ensayos de unión de heparina a *E. coli* HB101 con bloqueo de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD y anti-EcpA y UPEC CFT073 con bloqueo de anticuerpos anti-FimA, anti-FimD, anti-EcpA, anti-PapA y anti-PapC

Con el objetivo de determinar si las fimbrias CU, fimbria tipo 1, pilus común de *E. coli* y fimbria P, participan como potenciales determinantes de la unión de heparina, se utilizaron anticuerpos anti-FimA (subunidad principal de fimbria tipo 1), anti-FimD (ujier de fimbria tipo 1) y anti-EcpA (subunidad principal de pilus común de *E. coli*) en un ensayo de bloqueo con la cepa *E. coli* HB101 y los anticuerpos anti-FimA, anti-FimD, anti-EcpA, anti-PapA (subunidad principal de fimbria P) y anti-PapC (ujier de fimbria P), en un ensayo de bloqueo con la cepa UPEC CFT073. Tal como en las ocasiones anteriores, los resultados se analizaron con prueba de ANOVA y prueba de hipótesis estadística Bonferroni para

comparaciones múltiples. En el caso de *E. coli* HB101, la unión a heparina disminuyó significativamente ($p < 0,05$, Anexo 6) solamente con el bloqueo con el anticuerpo anti-FimD, con respecto a la cepa sin bloqueo (Figura 12). El bloqueo con los anticuerpos anti-FimA y anti-EcpA no generó cambios significativos. Los datos en detalle, correspondientes a tres réplicas biológicas ($n=3$), se muestran en el Anexo 7. Por otro lado, el análisis de UPEC CFT073, reveló que la unión a heparina disminuyó significativamente ($p < 0,05$, Anexo 8) solo en el caso del bloqueo con el anticuerpo anti-PapC, con respecto a la cepa sin bloqueo (Figura 13). El bloqueo con los anticuerpos anti-FimD, anti-EcpA y anti-FimA no generó cambios significativos. Los datos mostrados también corresponden a tres ensayos independientes, realizados en días distintos y detallados en el Anexo 9. Como se esperaba, para ambos casos, *E. coli* HB101 y UPEC CFT073, con el anticuerpo control de isotipo anti-MrkA, no ocasionó efectos significativos (Anexo 7 y 9). Con estos resultados, se puede concluir que la unión de *E. coli* HB101 a heparina es, en parte, dependiente de la proteína ujier superficial FimD y la unión a UPEC CFT073 es, en parte, dependiente de la proteína ujier superficial PapC.

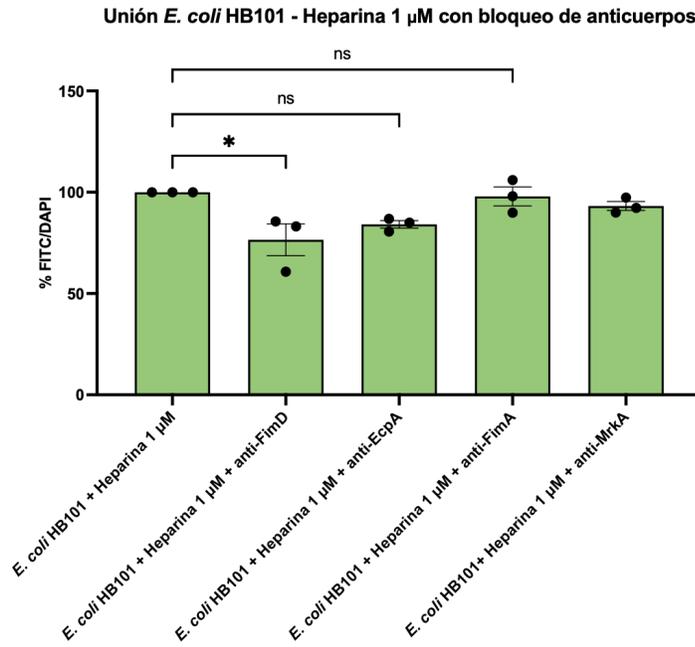


Figura 12: Relación FITC/DAPI de unión de cepas *E. coli* HB101 a heparina 1 μ M conjugada con FITC con bloqueo de anticuerpos anti-FimD, anti-EcpA y anti-FimA (1:1000). Control positivo (+) anti-MrKA. FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol.

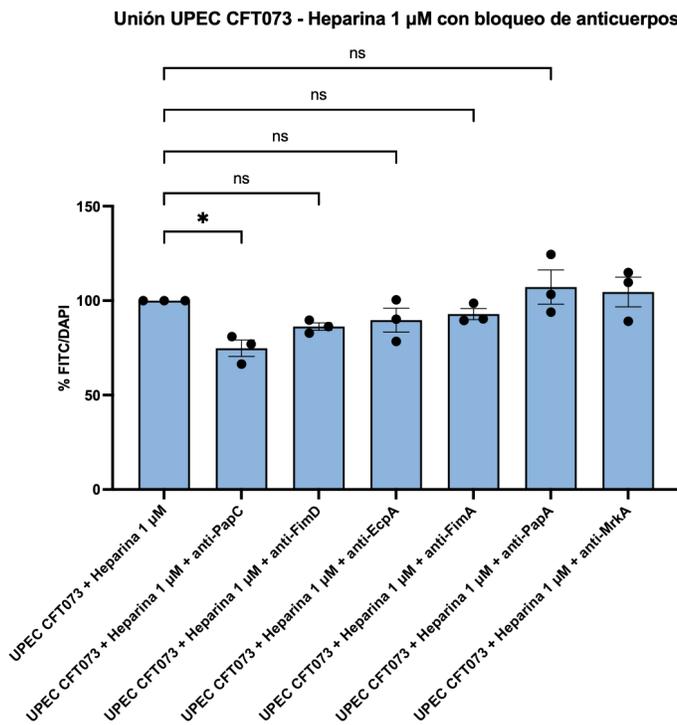


Figura 13: Relación FITC/DAPI de unión de cepas *E. coli* HB101 a heparina 1 μ M conjugada con FITC con bloqueo de anticuerpos anti-PapC, anti-FimD y anti-EcpA, anti-FimA y anti-PapA (1:1000). Control positivo (+) anti-MrKA. FITC: Fluoresceína-5-isotiocianato. DAPI: 4,6-diamidino-2-fenilindol.

DISCUSIÓN

En este trabajo de investigación se determinó la unión de heparina a cepas patogénicas de *Escherichia coli*, y el potencial rol de sistemas fimbriales CU en esta interacción. Ya existía el antecedente de que el ujier YcbS de *E. coli* era capaz de unir heparina y otros glicosaminoglicanos (50), el único hallazgo que se encontró reportando un determinante bacteriano de dicha interacción. Derivado de ese precedente, en una primera instancia, en este trabajo se intentó determinar si otros ujieres de *E. coli*, particularmente FimD y PapC, parte de los sistemas CU mejor caracterizados, eran también capaces de unir heparina. Para ello, se realizó la transformación de *E. coli* BL21ΔABCF para expresar las proteínas ujier FimD y PapC utilizando el plásmido pET-3a. Sin embargo, no se tuvo éxito en la expresión de dichas proteínas, en base a los resultados del inmunoblot, en extractos totales, y de la detección por fluorimetría de las proteínas en la superficie bacteriana. En el laboratorio es la primera vez que se trabaja con el plásmido pET-3a, por lo que se desconocen las condiciones óptimas de cultivo, transformación e inducción de las cepas. Una de las hipótesis planteadas por la que no se habrían expresado los ujieres, es que la bacteria pierda viabilidad al expresar proteínas ujier, las que, en rigor, constituyen porinas. Sin embargo, esta opción resulta poco probable, ya que se utilizó una cepa cuádruple mutante de porinas (*E. coli* BL21ΔABCF), que había sido probada para estos efectos (59). Una opción que resulta más probable es la posible la formación de cuerpos de inclusión, por mal plegamiento de las proteínas, generado por una incorrecta concentración de inductores y temperatura de incubación. Esto podría tener como consecuencia que las proteínas no se exporten ni se inserten correctamente en la membrana externa, ni tampoco queden en la fase soluble posterior a la extracción total de proteínas . Por esto mismo, en el futuro será necesario

estandarizar las condiciones de inducción para obtener resultados que demuestren la correcta expresión de las proteínas anteriormente mencionadas.

Por otro lado, se encontró que existe unión de heparina, en menor o mayor medida, a todas las cepas de *E. coli* evaluadas en este trabajo, correspondientes a *E. coli* HB101, *E. coli* HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073. Se mencionó en la introducción que anteriormente se ha descrito que heparina puede bloquear la adherencia de EHEC a células epiteliales intestinales (51). Los resultados obtenidos en este trabajo son coherentes con dicho hallazgo y, además, la unión no se encuentra restringida a esta cepa, ni tampoco solo a cepas patogénicas, ya que además se detectó unión de heparina a la cepa comensal *E. coli* HS y también a la cepa de laboratorio *E. coli* HB101. Lo esperable en este experimento era la ausencia o un nivel de unión significativamente menor de heparina a *E. coli* HB101 y *E. coli* HS, en comparación a la unión a cepas patogénicas presentes en el ensayo. Con estos resultados, es posible decir que los determinantes de la unión a heparina pueden ser muy diversos, los cuales se pueden encontrar transversalmente presentes en la superficie de todas las cepas de *E. coli*. Para resolver esta incógnita, es de suma importancia en un futuro el estudio de determinantes de unión a heparina transversales y exclusivos a cada cepa de *E. coli*.

También, los resultados permitieron concluir que no existe efecto de manosa en la unión de heparina a *E. coli* HB101 ni a UPEC CFT073, la cual se une a la proteína superficial FimH presente en la fimbria tipo 1 de la cepa. Esta información da cuenta de que la unión a heparina no depende de FimH, y que por ende, existen otras proteínas de superficie en la bacteria que participan en la unión a dicho glicosaminoglicano. FimH es reconocido como la

adhesina primordialmente responsable de la capacidad adherente de la fimbria tipo 1 y es sabido que reconoce receptores manosilados en distintas superficies del hospedero (63). Por otro lado, se testaron anticuerpos contra distintas proteínas de superficie de *E. coli* que componen sistemas fimbriales CU, para observar si afectaban la unión a heparina. Se encontró que la unión a *E. coli* HB101 se redujo significativamente al bloquear el ujier FimD con anticuerpos anti-FimD, dirigidos contra los dominios de superficie, y que la unión de UPEC CFT073 se redujo significativamente al bloquear el ujier PapC con los anticuerpos anti-PapC, dirigidos también contra los dominios de superficie. En ambos casos la disminución de la unión no fue completa, lo que sugiere que la unión a heparina depende de más de un determinante de superficie. Si bien UPEC posee la fimbria tipo 1, en donde se encuentra el ujier FimD (44), los resultados indican que dicha proteína no sería determinante de la unión en este caso. A su vez, esto sugiere que, a pesar de existir moléculas de superficie transversales a todas o a subgrupos de cepas de *E. coli*, los determinantes de unión a heparina podrían ser variados y dependientes de cada caso. Esto puede ciertamente depender de la abundancia de las distintas moléculas en la superficie de cada cepa, que puede ser dispar entre ellas, y de los mecanismos de regulación de su expresión/producción, que también puede ser variable. La identificación de FimD y de PapC como determinantes de la unión a heparina es coherente con el hallazgo previo de la unión de heparina al ujier YcbS y destaca el sentido que tenía la actividad inicialmente propuesta, de evaluar la unión de heparina y citoquinas proinflamatorias a las proteínas ujier expresadas de forma recombinante en *E. coli* BL21 Δ ABCF. A pesar de no haber podido concretar dicha actividad, al menos en el caso de la unión a heparina, se llegó a conclusiones equivalentes con los ensayos de bloqueo realizados. Desde este punto de vista, la contribución de este trabajo radica en haber establecido el rol de otras dos proteínas ujier como determinantes de la

unión a heparina, pero además en asignar este rol a dominios de superficie, ya que se trabajó con bacterias fijadas, no permeabilizadas. Esto es algo que no se había propuesto en el artículo que describió la unión de glicosaminoglicanos a YcbS (50). La relevancia de la unión de ligandos, como la heparina, a una proteína con una región superficial como lo es el ujier, puede tener varias aristas. Por un lado, las proteínas ujier podrían ejercer un rol tipo-adhesina, determinado por sus dominios superficiales. Sin embargo, podría haber una relevancia adicional, ya que las proteínas ujier son claves en la biogénesis de las fimbrias CU. Por lo tanto, la unión de ligandos a dominios superficiales, podría interferir con el ensamblaje o con la exposición o emergencia de la fimbria hacia la superficie bacteriana, impidiendo el reconocimiento de receptores y unión por parte de la misma, lo que impactaría en la capacidad de adherencia y colonización bacteriana sobre tejidos del organismo hospedero. La interacción de estos mediadores y el impacto que puede tener es un campo poco explorado y es ahí donde recae la importancia de este estudio. Como ya se mencionó, existen estudios realizados utilizando la administración heparina vía intravesical como tratamiento para enfrentar cuadros de ITUs recurrentes en mujeres, con resultados prometedores (52), lo que sugiere que en un futuro sería posible evitar la interacción bacteriana con el hospedero, y por ende, evitar la colonización de este en el organismo mediante tratamientos alternativos a los antibióticos que involucren heparina en su formulación, o directamente utilizar terapias preventivas que impliquen anticuerpos en grupos con mayor riesgo a generar enfermedad, a través de vacunas con formulaciones de proteínas superficiales que median la unión de la bacteria al organismo hospedero. Por lo tanto, es de suma importancia continuar investigando la interacción de ligandos, como lo es la heparina, con distintas proteínas presentes en sistemas fimbriales y, oportunamente, estudiar los efectos que esto tendría sobre la patogenicidad bacteriana, con el objetivo de

generar nuevas opciones terapéuticas que obstaculicen etapas tempranas como la colonización.

CONCLUSIONES

Escherichia coli es conocida por ser una especie bacteriana que, mediante la adquisición de elementos genéticos móviles portando genes que codifican factores de virulencia, ha evolucionado generando diversos patotipos que generan distintas enfermedades en el humano. Entre estos factores de virulencia se encuentran los pili o fimbrias, estructuras determinantes en la adhesión del patógeno a los tejidos del hospedero. En este trabajo, se determinó la unión de heparina a cepas de *E. coli* junto con la evaluación del rol de sistemas fimbriales chaperona-ujier. La primera conclusión de este trabajo es que cepas de *E. coli*, tanto patogénicas como no patogénicas, unen heparina. La segunda conclusión es que los ujieres fimbriales FimD y PapC, para *E. coli* HB101 y UPEC CFT073 respectivamente, son determinantes, al menos en parte, de la capacidad de unión a heparina. El estudio del proceso de adherencia mediante fimbrias chaperona-ujier resulta idóneo para el desarrollo de nuevas alternativas terapéuticas ante infecciones bacterianas, destinadas a interferir en el proceso de colonización microbiana. El uso de heparina como tratamiento en el contexto de infecciones bacterianas ha sido muy poco explorado y a la luz de los resultados obtenidos en este trabajo, resulta pertinente seguir abordando su interacción con estructuras adhesivas bacterianas.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Reyman M, van Houten M, van Baarle D, Bosch A, Man W, Chu M, et al. Impact of delivery mode-associated gut microbiota dynamics on health in the first year of life. *Nat Commun*. 2019; 10:4997. doi: 10.1038/s41467-019-13014-7.
2. Croxen M, Finlay B. Molecular mechanisms of *Escherichia coli* pathogenicity. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8:26-38. doi: 10.1038/nrmicro2265.
3. Shulman S, Friedmann H, Sims R. Theodor Escherich: the first pediatric infectious diseases physician?. *Clin Infect Dis*. 2007; 45(8):1025-1029. doi: 10.1086/521946.
4. Tenaillon O, Skurnik D, Picard B, Denamur E. The population genetics of commensal *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2010; 8(3):207-217. doi: 10.1038/nrmicro2298.
5. Kaper J, Nataro J, Mobley H. Pathogenic *Escherichia coli*. *Nat Rev Microbiol*. 2004; 2:123-40. doi: 10.1038/nrmicro818.
6. Köhler C, Dobrindt U. What defines extraintestinal pathogenic *Escherichia coli*?. *Int J of Med Microb*. 2011; 301:642-647. doi: 10.1016/j.ijmm.2011.09.006.
7. Russo T, Johnson J. Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *J Infect Dis*. 2000; 181(5):1753-1754. doi: 10.1086/315418
8. Bray J. Isolation of antigenically homogeneous strains of *Bact. coli* neopolitanum from summer diarrhoea of infants. *J Pathol Bacteriol*. 1945; 57:239-247. doi: 10.1002/path.1700570210.
9. Levine M, Bergquist E, Nalin D, Waterman D, Hornick R, Young C, et al. *Escherichia coli* strains that cause diarrhoea but do not produce heat-labile or heat-stable enterotoxins and are non-invasive. *Lancet*. 1978; 1(8074):1119-1122. doi: 10.1016/s0140-6736(78)90299-4.
10. Pizarro-Cerdá J, Cossart P. Bacterial adhesion and entry into host cells. *Cell*. 2006; 124(4):715-727. doi: 10.1016/j.cell.2006.02.012.
11. Farfán-García A, Ariza-Rojas S, Vargas-Cárdenas F, Vargas-Remolina L. Virulence mechanisms of enteropathogenic *Escherichia coli*. *Rev Chilena Infectol*. 2016 ;33(4):438-450. doi: 10.4067/S0716-10182016000400009.
12. Møller-Stray J, Eriksen HM, Bruheim T, Kapperud G, Lindstedt BA, Skeie Å, et al. Two outbreaks of diarrhoea in nurseries in Norway after farm visits, April to May 2009. *Euro Surveill*. 2012; 17(47):20321. doi: 10.2807/ese.17.47.20321-en.

13. Kinnula S, Hemminki K, Kotilainen H, Ruotsalainen E, Tarkka E, Salmenlinna S, et al. Outbreak of multiple strains of non-O157 Shiga toxin-producing and enteropathogenic *Escherichia coli* associated with rocket salad, Finland, autumn 2016. *Euro Surveill.* 2018; 23(35):23. doi: 10.2807/1560-7917.ES.2018.23.35.1700666.
14. Lim MA, Kim JY, Acharya D, Bajgain BB, Park JH, Yoo SJ, et al. A diarrhoeagenic Enteropathogenic *Escherichia coli* (EPEC) infection outbreak that occurred among elementary school children in Gyeongsangbuk-Do province of South Korea was associated with consumption of water-contaminated food items. *Int J Environ Res Public Health.* 2020; 17(9):3149. doi: 10.3390/ijerph17093149.
15. Organización Mundial de la Salud. *E. coli* [Internet]. WHO. 2016 [Citado el 10 de Mayo del 2023]. Disponible en: <https://www.who.int/es/news-room/fact-sheets/detail/e-coli>.
16. Public Health Agency of Canada. *Escherichia coli*, enterohemorrhagic [Internet]. Health Canada. 2015 [Citado el 11 de Mayo del 2023]. Disponible en: <http://www.phac-aspc.gc.ca/lab-bio/res/psds-ftss/msds63e-eng.php>.
17. Instituto de Salud Pública, Ministerio de Salud, Gobierno de Chile. Vigilancia de laboratorio de *E. coli* productora de toxina Shiga. Chile 2010-2016 [Internet]. ISP. 2017; 7(6)3-14 [Citado el 11 de Mayo del 2023]. Disponible en: <https://www.ispch.cl/sites/default/files/BoletinSTEC-14082017B.pdf>.
18. Zhang Y, Tan P, Zhao Y, Ma X. Enterotoxigenic *Escherichia coli*: intestinal pathogenesis mechanisms and colonization resistance by gut microbiota. *Gut Microbes.* 2022; 14(1):2055943. doi: 10.1080/19490976.2022.2055943.
19. Sack R, Gorbach S, Banwell J, Jacobs B, Chatterjee B, Mitra R. Enterotoxigenic *Escherichia coli* isolated from patients with severe cholera-like disease. *J Infect Dis.* 1971; 123:378-385. doi: 10.1093/infdis/123.4.378.
20. Nataro J, Kaper J. Diarrheagenic *Escherichia coli*. *Clin Microbiol Rev.* 1998; 11: 142–201. doi: 10.1128/CMR.11.1.142.
21. Okeke I, Nataro J. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Lancet Infect Dis.* 2001; 1(5):304-313. doi: 10.1016/S1473-3099(01)00144-X.
22. Wilson A, Evans J, Chart H, Cheasty T, Wheeler J, Tompkins D, et al. (2001) Characterisation of strains of enteroaggregative *Escherichia coli* isolated during the infectious intestinal disease study in England. *Eur J Epidemiol.* 2001; 17:1125-1130. doi: 10.1023/a:1021224915322.

23. Samie A, Obi C, Dillingham R, Pinkerton R, Guerrant R. Enteroaggregative *Escherichia coli* in Venda, South Africa: distribution of virulence-related genes by multiplex polymerase chain reaction in stool samples of human immunodeficiency virus (HIV)-positive and HIV-negative individuals and primary school children. *Am J Trop Med Hyg.* 2007; 77:142-150. doi: 10.4269/ajtmh.2007.77.142.
24. Jenkins C. Enteroaggregative *Escherichia coli*. *Curr Top Microbiol Immunol.* 2018; 416:27-50. doi: 10.1007/82_2018_105.
25. Klein R, Hultgren S. Urinary Tract Infections: Microbial pathogenesis, host-pathogen interactions and new treatment strategies. *Nat Rev Microbiol.* 2020; 18:211-226. doi: 10.1038/s41579-020-0324-0.
26. Zarnowski D, Salazar A, Zarnowski A. Infección del tracto urinario adquirida en la comunidad. *Rev Med Sinerg.* 2021; 6:e710. doi: 10.31434/rms.v6i9.710.
27. Flores-Mireles A., Walker J, Caparon M, Hultgren S. Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015; 13:269-284. doi: 10.1038/nrmicro3432.
28. Foxman B. Urinary tract infection syndromes occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infect Dis Clin North Am.* 2014; 28:1-13. doi: 10.1016/j.idc.2013.09.003.
29. Foxman B, Brown P. Epidemiology of urinary tract infections - transmission and risk factors, incidence, and costs. *Infect Dis Clin North Am.* 2003; 17:227–241. doi: 10.1016/S0891-5520(03)00005-9.
30. Unhanand M, Mustafa M, McCracken Jr G, Nelson J. Gram-negative enteric bacillary meningitis: a twenty-one-year experience. *J Pediatr.* 1993; 122:15–21. doi: 10.1016/s0022-3476(05)83480-8.
31. Dawson K, Emerson J, Burns J. Fifteen years of experience with bacterial meningitis. *Pediatr Infect Dis J.* 1999; 18:816-822. doi: 10.1097/00006454-199909000-00014.
32. Ramphal R, Arora S, Ritchings B. Recognition of mucin by the adhesin-flagellar system of *Pseudomonas aeruginosa*. *Am J Respir Crit Care Med.* 1996; 154(4 Pt 2):S170-4. doi: 10.1164/ajrccm/154.4_Pt_2.S170.
33. Hammerschmidt S, Rohde M, Preissner K. Extracellular matrix interactions with gram-positive pathogens. *Microbiol Spectr.* 2019; 7(2). doi: 10.1128/microbiolspec.GPP3-0041-2018.

34. Beachey E. Bacterial adherence: adhesin-receptor interactions mediating the attachment of bacteria to mucosal surfaces. *J Infect Dis.* 1981; 143:325-345. doi: 10.1093/infdis/143.3.325.
35. McCall L, Siqueira-Neto J, McKerrow J. Location, Location, Location: Five facts about tissue tropism and pathogenesis. *PLoS Pathog.* 2016; 12:e1005519. doi: 10.1371/journal.ppat.1005519.
36. Weller R, Sharp M, Christodoulides M, Carare R, Møllgård K. The meninges as barriers and facilitators for the movement of fluid, cells and pathogens related to the rodent and human CNS. *Acta Neuropathol.* 2018; 135:363-385. doi: 10.1007/s00401-018-1809-z.
37. Su B, Hellström P, Rubio C, Çelik J, Granström M, Normark S. Type I *Helicobacter pylori* shows Lewisb-Independent adherence to gastric cells requiring de novo protein synthesis in both host and bacteria. *J Infect Dis.* 1998; 178:1379-1390. doi: 10.1086/314429.
38. Klemm P, Hancock V, Schembri M. Fimbrial adhesins from extraintestinal *Escherichia coli*. *Env Microbiol Rep.* 2010; 2:628-640. doi: 10.1111/j.1758-2229.2010.00166.x.
39. Korea C, Ghigo J, Beloin C. The sweet connection: Solving the riddle of multiple sugar-binding fimbrial adhesins in *Escherichia coli*. *BioEssays.* 2011; 33:300-311. doi: 10.1002/bies.201000121.
40. Klemm P, Vejborg R, Hancock V. Prevention of bacterial adhesion. *Appl Microbiol Biotechnol.* 2010; 88:451-459. doi: 10.1007/s00253-010-2805-y.
41. Duguid J, Smith I, Dempster G, Edmunds P. Non-flagellar filamentous appendages (fimbriae) and haemagglutinating activity in *Bacterium coli*. *J Pathol Bacteriol.* 1955; 70:335-348 doi:10.1002/path1700700210.
42. Hung D, Hultgren S. Pilus biogenesis via the chaperone/usher pathway: an integration of structure and function. *J Struct Biol.* 1998; 124:201-220. doi: 10.1006/jsbi.1998.4049.
43. Mulvey M, Lopez-Boado Y, Wilson C, Roth R, Parks W, Heuser J, et al. Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science.* 1998; 282:1494-1497. doi: 10.1126/science.282.5393.1494.
44. Waksman G, Hultgren S. Structural biology of the chaperone-usher pathway of pilus biogenesis. *Nat Rev Microbiol.* 2009; 7:765-774. doi: 10.1038/nrmicro2220.
45. Rendón M, Saldaña Z, Erdem A, Monteiro-Neto V, Vázquez A, Kaper J, et al. Commensal and pathogenic *Escherichia coli* use a common pilus adherence factor for

- epithelial cell colonization. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2007; 104(25):10637-10642. doi: 10.1073/pnas.0704104104.
46. Garnett J, Martínez-Santos V, Saldaña Z, Pape T, Hawthorne W, Chan J, et al. Structural insights into the biogenesis and biofilm formation by the *Escherichia coli* common pilus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2012;109(10):3950-3955. doi: 10.1073/pnas.1106733109.
 47. Nuccio S, Bäumler A. Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes greek. *Microbiol Mol Biol Rev*. 2007; 71:551-575. doi: 10.1128/MMBR.00014-07.
 48. Psonis J, Thanassi D. Therapeutic approaches targeting the assembly and function of chaperone-usher pili. *EcoSal Plus*. 2019; 8. doi: 10.1128/ecosalplus.ESP-0033-2018.
 49. Simon Davis D, Parish C. Heparan sulfate: a ubiquitous glycosaminoglycan with multiple roles in immunity. *Front Immunol*. 2013; 4:470. doi: 10.3389/fimmu.2013.00470.
 50. Hsiao F, Sutandy F, Syu G, Chen Y, Lin J, Chen C. Systematic protein interactome analysis of glycosaminoglycans revealed YcbS as a novel bacterial virulence factor. *Sci Rep*. 2016; 6:28425. doi: 10.1038/srep28425.
 51. Gu L, Wang H, Guo Y, Zen K. Heparin blocks the adhesion of *E. coli* O157:H7 to human colonic epithelial cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2008; 369(4):1061-1064. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.02.160.
 52. Ablove T, Patankar M, Seo S. Prevention of recurrent urinary tract infections by intravesical administration of heparin: a pilot study. *Ther Adv Urol*. 2013; 5(6):303-309. doi: 10.1177/1756287213504804.
 53. Mouw J, Ou G, Weaver V. Extracellular matrix assembly: a multiscale deconstruction. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2014; 15:771-785. doi: 10.1038/nrm3902
 54. Imberty A, Lortat-Jacob H, Perez S. Structural view of glycosaminoglycan-protein interactions. *Carbohydr Res*. 2007; 342:430-439. doi: 10.1016/j.carres.2006.12.019
 55. Capila I, Linhardt R. Heparin-protein interactions. *Angew Chem Int Ed Engl*. 2002; 41(3):391-412. doi: 10.1002/1521-3773(20020201)41:3<390::aid-anie390>3.0.co;2-b.
 56. Matthey D, Garrod D. Role of glycosaminoglycans and collagen in the development of a fibronectin-rich extracellular matrix in cultured embryonic corneal epithelial cells. *J Cell Sci*. 1984; 67:189-202. doi: 10.1242/jcs.67.1.189.
 57. Klemm P, Schembri M. Bacterial adhesins: function and structure. *Int J Med Microbiol*. 2000; 290:27-35. doi: 10.1016/S1438-4221(00)80102-2.

58. Krogfelt K, Bergmans H, Klemm P. Direct evidence that the FimH protein is the mannose-specific adhesin of *Escherichia coli* type 1 fimbriae. *Infect Immun.* 1990; 58(6):1995-1998. doi: 10.1128/iai.58.6.1995-1998.1990.
59. Meuskens I, Michalik M, Chauhan N, Linke D. A new strain collection for improved expression of outer membrane proteins. *Front Cell Infect Microbiol.* 2017; 7:464. doi: 10.3389/fcimb.2017.00464
60. Sebghati T, Korhonen T, Hornick D, Clegg S. Characterization of the type 3 fimbrial adhesins of *Klebsiella* strains. *Infect Immun.* 1998; 66(6):2887-2894. doi: 10.1128/IAI.66.6.2887-2894.1998.
61. Kyriakides R, Jones P, Somani B. Role of D-mannose in the prevention of recurrent urinary tract infections: evidence from a systematic review of the literature. *Eur Urol Focus.* 2021 ;7(5):1166-1169. doi: 10.1016/j.euf.2020.09.004.
62. Wurple D, Beatson S, Totsika M, Petty N, Schembri M. Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PLoS One.* 2013 ;8(1):e52835. doi: 10.1371/journal.pone.0052835.
63. Krammer E, Bridot C, Serna S, Echeverria B, Semwal S, Roubinet B, et al. Structural insights into a cooperative switch between one and two FimH bacterial adhesins binding pauci- and high-mannose type N-glycan receptors. *J Biol Chem.* 2023; 299(5):104627. doi: 10.1016/j.jbc.2023.104627.

ANEXOS

Anexo 1: Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de unión de heparina a *E. coli* HB101, *E. coli* HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073 y cepas control sin heparina.

Prueba de comparación múltiple de Bonferroni	Diferencia en los promedios	Intervalo de confianza (95,00%) de las diferencias	¿Bajo el umbral?	Resumen	Valor P ajustado
<i>E. coli</i> HB101 vs. <i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 μ M	-1,01	-1,290 to -0,7296	Sí	****	<0,0001
<i>E. coli</i> HS vs. <i>E. coli</i> HS + Heparina 1 μ M	-0,59	-0,8704 to -0,3096	Sí	****	<0,0001
EHEC EDL933 vs. EHEC EDL933 + Heparina 1 μ M	-0,3467	-0,6270 to -0,06631	Sí	**	0,0041
ETEC H10407 vs. ETEC H10407 + Heparina 1 μ M	-0,6033	-0,8837 to -0,3230	Sí	****	<0,0001
EPEC 2348/69 vs. EPEC 2348/69 + Heparina 1 μ M	-0,6333	-0,9137 to -0,3530	Sí	****	<0,0001
EAEC 042 vs. EAEC 042 + Heparina 1 μ M	-0,6133	-0,8937 to -0,3330	Sí	****	<0,0001
UPEC CFT073 vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 μ M	-0,6067	-0,8870 to -0,3263	Sí	****	<0,0001

Anexo 2: Estadística descriptiva de unión de heparina a *E. coli* HB101, *E. coli* HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073 y cepas control sin heparina.

	<i>E. coli</i> HB101	<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM	<i>E. coli</i> HS	<i>E. coli</i> HS + Heparina 1 µM	EHEC EDL933	EHEC EDL933 + Heparina 1 µM	ETEC H10407	ETEC H10407 + Heparina 1 µM	EPEC 2348/69	EPEC 2348/69 + Heparina 1 µM	EAEC 042	EAEC 042 + Heparina 1 µM	UPEC CFT073	UPEC CFT073 + Heparina 1 µM
N° de valores	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3	3
Mínimo	0,08000	0,9700	0,07000	0,5600	0,05000	0,3500	0,6100	0,05000	0,6300	0,05000	0,6100	0,06000	0,4900	
Máximo	0,09000	1,330	0,09000	0,7700	0,06000	0,4600	0,7100	0,07000	0,7500	0,05000	0,7700	0,07000	0,8800	
Rango	0,01000	0,3600	0,02000	0,2100	0,01000	0,1100	0,1000	0,02000	0,1200	0,000	0,1600	0,01000	0,3900	
Promedio	0,08667	1,097	0,07667	0,6667	0,05333	0,4000	0,6600	0,05667	0,6900	0,05000	0,6633	0,06667	0,6733	
Desviación estándar	0,005774	0,2023	0,01155	0,1050	0,005774	0,05568	0,05000	0,01155	0,06000	0,000	0,09238	0,005774	0,1960	
Error estándar	0,003333	0,1168	0,006667	0,06064	0,003333	0,03215	0,02887	0,006667	0,03464	0,000	0,05333	0,003333	0,1132	

Anexo 3: Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de unión de heparina a *E. coli* HB101 con respecto a la unión de heparina a *E. coli* HS, EHEC EDL933, ETEC H10407, EPEC 2348/69, EAEC 042 y UPEC CFT073

Prueba de comparación múltiple de Bonferroni	Diferencia en los promedios	Intervalo de confianza (95,00%) de las diferencias	¿Bajo el umbral?	Resumen	Valor P ajustado
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. <i>E. coli</i> HS + Heparina 1 µM	0,43	0,1496 to 0,7104	Sí	***	0,0002
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. EHEC EDL933 + Heparina 1 µM	0,6967	0,4163 to 0,9770	Sí	****	<0,0001
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. ETEC H10407 + Heparina 1 µM	0,4367	0,1563 to 0,7170	Sí	***	0,0001
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. EPEC 2348/69 + Heparina 1 µM	0,4067	0,1263 to 0,6870	Sí	***	0,0004
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. EAEC 042 + Heparina 1 µM	0,4333	0,1530 to 0,7137	Sí	***	0,0002
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 µM	0,4233	0,1430 to 0,7037	Sí	***	0,0002

Anexo 4: Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de unión de heparina a *E. coli* HB101 y UPEC CFT073 con bloqueo de manosa 1% con respecto cepas control sin bloqueo de manosa 1%.

Prueba de comparación múltiple de Bonferroni	Diferencia en los promedios	Intervalo de confianza (95,00%) de las diferencias	¿Bajo el umbral?	Resumen	Valor P ajustado
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. <i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM + Manosa 1%	-0,01333	-0,9765 to 0,9498	No	ns	>0,9999
UPEC CFT073 + Heparina 1 µM vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 µM + Manosa 1%	-0,08333	-1,046 to 0,8798	No	ns	0,9898

Anexo 5: Estadística descriptiva de unión de heparina a *E. coli* HB101 y UPEC CFT073 con bloqueo de manosa 1% y cepas control sin bloqueo de manosa 1%.

	<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 μ M	<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 μ M + Manosa 1%	UPEC CFT073 + Heparina 1 μ M	UPEC CFT073 + Heparina 1 μ M + Manosa 1%
N° de valores	3	3	3	3
Mínimo	1,020	1,050	0,6000	0,6500
Máximo	1,970	1,880	0,7900	0,9500
Rango	0,9500	0,8300	0,1900	0,3000
Promedio	1,407	1,420	0,7133	0,7967
Desviación estándar	0,4990	0,4223	0,1002	0,1501
Error estándar	0,2881	0,2438	0,05783	0,08667

Anexo 6: Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de unión de heparina a *E. coli* HB101 con bloqueo de anticuerpos anti-FimD, anti-EcpA, anti-FimA y anti-MrkA con respecto cepa control sin bloqueo de anticuerpo.

Prueba de comparación múltiple de Bonferroni	Diferencia en los promedios	Intervalo de confianza (95,00%) de las diferencias	¿Bajo el umbral?	Resumen	Valor P ajustado
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. <i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM + anti-FimD	23,5	5,068 to 41,93	Sí	*	0,0124
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. <i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM + anti-EcpA	15,83	-2,598 to 34,26	No	ns	0,1042
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. <i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM + anti-FimA	2,033	-16,40 to 20,46	No	ns	>0,9999
<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 µM vs. <i>E. coli</i> HB101+ Heparina 1 µM + anti-MrkA	6,767	-11,66 to 25,20	No	ns	>0,9999

Anexo 7: Estadística descriptiva de unión de heparina a *E. coli* HB101 con bloqueo de anticuerpos anti-FimD, anti-EcpA, anti-FimA y anti-MrkA y cepa control sin bloqueo de anticuerpo.

	<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 μ M	<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 μ M + anti-FimD	<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 μ M + anti-EcpA	<i>E. coli</i> HB101 + Heparina 1 μ M + anti-FimA	<i>E. coli</i> HB101+ Heparina 1 μ M + anti-MrkA
N° de valores	3	3	3	3	3
Mínimo	100,0	60,80	80,60	89,90	90,00
Máximo	100,0	85,60	86,90	106,0	97,40
Rango	0,000	24,80	6,300	16,10	7,400
Promedio	100,0	76,50	84,17	97,97	93,23
Desviación estándar	0,000	13,65	3,232	8,050	3,787
Error estándar	0,000	7,883	1,866	4,648	2,187

Anexo 8: Prueba de Bonferroni para comparaciones múltiples de unión de heparina a UPEC CFT073 con bloqueo de anticuerpos anti-PapC, anti-FimD, anti-EcpA y anti-FimA, anti-PapA y anti-MrkA con respecto a cepa control sin bloqueo de anticuerpo.

Prueba de comparación múltiple de Bonferroni	Diferencia en los promedios	Intervalo de confianza (95,00%) de las diferencias	¿Bajo el umbral?	Resumen	Valor P ajustado
UPEC CFT073 + Heparina 1 µM vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 µM + anti-PapC	25,2	1,099 to 49,30	Sí	*	0,0379
UPEC CFT073 + Heparina 1 µM vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 µM + anti-FimD	13,73	-10,37 to 37,83	No	ns	0,6134
UPEC CFT073 + Heparina 1 µM vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 µM + anti-EcpA	10,33	-13,77 to 34,43	No	ns	>0,9999
UPEC CFT073 + Heparina 1 µM vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 µM + anti-FimA	7,133	-16,97 to 31,23	No	ns	>0,9999
UPEC CFT073 + Heparina 1 µM vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 µM + anti-PapA	-7,233	-31,33 to 16,87	No	ns	>0,9999
UPEC CFT073 + Heparina 1 µM vs. UPEC CFT073 + Heparina 1 µM + anti-MrkA	-4,567	-28,67 to 19,53	No	ns	>0,9999

Anexo 9: Estadística descriptiva de unión de heparina a UPEC CFT073 con bloqueo de anticuerpos anti-PapC, anti-FimD, anti-EcpA y anti-FimA, anti-PapA y cepa control sin bloqueo de anticuerpo.

	UPEC CFT073 + Heparina 1 μM	UPEC CFT073 + Heparina 1 μM + anti-PapC	UPEC CFT073 + Heparina 1 μM + anti-FimD	UPEC CFT073 + Heparina 1 μM + anti-EcpA	UPEC CFT073 + Heparina 1 μM + anti-FimA	UPEC CFT073 + Heparina 1 μM + anti-PapA	UPEC CFT073 + Heparina 1 μM + anti-MrkA
N° de valores	3	3	3	3	3	3	3
Mínimo	100,0	66,40	82,80	78,40	89,50	93,90	89,10
Máximo	100,0	81,00	89,70	100,4	98,70	124,5	114,9
Rango	0,000	14,60	6,900	22,00	9,200	30,60	25,80
Promedio	100,0	74,80	86,27	89,67	92,87	107,2	104,6
Desviación estándar	0,000	7,545	3,450	11,01	5,072	15,67	13,64
Error estándar	0,000	4,356	1,992	6,356	2,928	9,050	7,878