



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MORELOS

FACULTAD DE MEDICINA

SECRETARIA DE DOCENCIA

JEFATURA DE POSGRADO

**ESPECTRO DE ACTIVIDAD DEL NaHCO_3 COMO
POTENCIADOR DE ANTIBIÓTICOS EN
Escherichia coli UROPATOGÉNICA UPEC.**

“T E S I S”

**PARA OBTENER EL GRADO DE
MAESTRO EN MEDICINA MOLECULAR**

QUE PRESENTA:

BIOL. AUSENCIO GUADALUPE MORALES ORTEGA.

DIRECTOR DE TESIS:

DR. JOAQUÍN SÁNCHEZ CASTILLO

Cuernavaca, Morelos, México, Junio del 2018.



El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Microbiología Molecular, de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma del Estado de Morelos, durante los años 2016 – 2017, bajo la dirección del Doctor Joaquín Sánchez Castillo.

MIEMBROS DEL COMITÉ TUTORAL:

Tutor Principal: Dr. Joaquín Sánchez Castillo.

Tutor Personal: Dra. Vera Lucia Petricevich.

Dr. David Martínez-Duncker Ramírez.

Dra. María Eugenia Núñez Valdez.

Dr. F. Rodolfo Gatica Marquina.

MIEMBROS DEL JURADO DE EXAMEN:

Presidente: Dr. David Martínez-Duncker Ramírez.

Secretario: Dra. María Eugenia Núñez Valdez.

Primer vocal: Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez.

Segundo vocal: Dra. Guadalupe Ayala.

Tercer vocal: Dr. Joaquín Sánchez Castillo.

AGRADECIMIENTOS.

A Dios por lo bello de la vida, lo hermoso de la naturaleza, la felicidad que me brinda, la fuerza, vitalidad y por haberme permitido terminar una etapa más en mi vida profesional.

“Gracias a Dios”

**Por la hermosa Familia que me regalaste y
la vida que me das para seguirlos amando.**

Al Doctor Joaquín Sánchez Castillo, por sus consejos, enseñanzas y haberme permitido realizar este trabajo de investigación en su laboratorio y por todas las facilidades de su realización.

Al comité revisor por sus enseñanzas, profesionalismo y dedicación para conmigo: Dr. David Martínez-Duncker Ramírez, Dr. Joaquín Sánchez Castillo, Dra. María Eugenia Núñez Valdez, Dra. María Luisa del Carmen Garduño Ramírez, Dra. Guadalupe Ayala y Dra. Vera Lucia Petricevich.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por otorgar la beca 598817, para la realización de los estudios de Maestría.

DEDICATORIA

A mi hermosa mamá Zeferina Ortega Guzmán, por ser una guerrera toda la vida, por vencer tus enfermedades y hacer de lo imposible lo posible. Gracias por estar conmigo en todos momentos y por creer en mí.

Isaura mi gran amor eterno!!!

Muchos momentos sin ti no tendrían razón. Tantos siglos, tantos mundos, tanto espacio y estamos aquí... Me haces feliz y sentir tan bien, que al verte puedo percibir el amor. Por ti, con todo mi respeto y amor . . .

Gracias mi hermosa esposa

Mi niña, huesos, tesoro, amor, chiquita, mi princesa . . . A ti con todas mis fuerzas te digo que te amo con todo mi corazón, agradezco tu comprensión, todos los momentos que llenas de dulzura y amor mi vida. Gracias por amarme mi amor. Por ti existo, vivo a la expectativa de tus palabras, besos y tus caricias.

Te amo mi hermosa hija Camila Morales Quintana.

Hijo, mi fuerza y debilidad. Con todo mi amor y toda la fuerza que de mi emana te digo que te amo con todo mi corazón y que esto es por ti. Gracias por hacerme tan feliz, por ser mi amiguito, por ser como eres, por amarme con todo tu corazón, por todo lo que me das y demuestras. Por ti vivo y soy inmensamente feliz.

Te amo mi hermosos hijo Misael Mateo Morales Quintana.

Aunque ya no están conmigo también esto es por ustedes, tienen que saber todos, que aun los recuerdo y que los amo. Gasto todos los momentos y en repetidas ocasiones para hablar de ti Ernestina † y de ti Cornelio † los llevo en mi corazón. Por todas sus enseñanzas. . . Gracias abuelitos.

Desde que nos fuimos haciendo fuertes y consolidadamente amigos, la evolución de este “amigazmo” ha trascendido. Gracias por coincidir en esta vida conmigo y enseñarme en todo su esplendor lo hermoso de tantas cosas. Te agradezco tu apoyo y por confiar en mí. . . Víctor H. Bermúdez Morales.

También a todos mis familiares que respeto, amo y que

“Viven en mi corazón”, por todo su apoyo gracias.

Gracias totales

¡Soy muy feliz. . .!!!

ÍNDICE.

CONTENIDO	PAGINA
RESUMEN	1
1. INTRODUCCIÓN	2
1.1. Antecedentes generales cepas de <i>Escherichia coli</i> patógenas.....	6
1.1.1. <i>Escherichia coli</i> enteropatógena E2348/69.....	7
1.1.2. Infección de vías urinarias (IVU's).....	9
1.1.3. <i>Escherichia coli</i> uropatógena CFT073.....	13
2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA	16
JUSTIFICACIÓN	17
3. OBJETIVOS	18
3.1. Objetivo general.....	18
3.2. Objetivos específicos.....	18
4. HIPÓTESIS	18
5. MATERIAL Y MÉTODOS	19
5.1. Cultivos.....	19
5.2. Cultivos con NaHCO ₃	19
5.3. Cultivos con antibióticos.....	20
5.4. Medio tipo orina (Mto).....	20
5.5. Detección de unidades formadoras de colonias (CFU).....	20
5.6. Análisis de inhibición del crecimiento por difusión en disco (técnica tipo Kirby Bauer)	21
6. RESULTADOS	22
6.1. Experimentos con la cepa modelo <i>E. coli</i> UPEC CFT073.....	22
6.2. Medio de cultivo de composición semejante a la orina humana.....	23

6.3. Modificación en la fórmula del medio tipo orina.....	25
6.4. NaHCO ₃ esparcido sobre medios solidos LB y tipo orina.....	26
6.5. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad de kanamicina y ciprofloxacino en Mto con E2348/69.....	27
6.6. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad de trimetoprima-sulfametoxazol en Mto con CFT073.....	28
6.7. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad de la nitrofurantoina (Macrofantina) en medio LB y Mto con CFT073.....	29
6.8. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad de la ceftriaxona en medio LB con CFT073.....	30
6.9. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad de la ampicilina en medio LB con CFT073.....	32
6.10. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad de la cefotaxima en medio LB con CFT073.....	33
6.11. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad de la bencilpenicilina en Mto con CFT073.....	34
6.12. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad del ciprofloxacino en cultivos líquidos medio LB con CFT073.....	35
6.13. Detección de unidades formadoras de colonias (CFU) CFT073.....	36
6.14. Efecto del NaHCO ₃ sobre la actividad del ciprofloxacino en cultivos líquidos Mto con CFT073.....	37
7. DISCUSIÓN.....	39
8. CONCLUSIÓN.....	45
PERSPECTIVAS.....	46
9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47
10. ANEXOS	52

LISTA DE ABREVIATURAS.

ABREVIATURA.	SIGNIFICADO.
A/E.	Adherencia y esfacelamiento del inglés Attaching and Effacing.
BFP.	Bundle-foming pilus.
CFTR.	Cystic fibrosis transmembrane regulator.
CFU.	Unidades formadoras de colonias.
CNF1	Factor necrotizante citotóxico.
CO ₂ .	Dióxido de carbono.
DAEC.	<i>Escherichia coli</i> adherente difusa.
DO ₆₀₀ .	Densidad óptica a 600 nm.
<i>E. coli</i> .	<i>Escherichia coli</i> .
EAEC.	<i>Escherichia coli</i> enteroagregativa.
EHEC.	<i>Escherichia coli</i> enterohemorrágica.
EIEC.	<i>Escherichia coli</i> enteroinvasiva.
EPEC.	<i>Escherichia coli</i> enteropatogénica.
ETEC.	<i>Escherichia coli</i> enterotoxigénica.
ExPEC.	<i>Escherichia coli</i> patogénica extraintestinal.
GBS	<i>Streptococcus</i> grupo B
HCO ₃ ⁻ .	Bicarbonato.
HlyA.	A-hemolisina.
IPEC.	<i>Escherichia coli</i> patogénica intestinal.
IVUs.	Infección de vías urinarias.
LB.	Medio Luria-Bertani.

LB-A1 %.	Agar LB con agarosa 1 %.
LEE.	Locus of enterocyte effacement.
Mto.	Medio tipo orina.
Mto-A1 %.	Medio tipo orina con agarosa 1 %.
NaHCO ₃ .	Carbonato ácido de sodio.
NMEC.	<i>Escherichia coli</i> causal de Meningitis Neonatal.
OMS.	Organización mundial de la salud.
PAI.	Islas de patogenicidad.
PBP.	Proteínas de unión a penicilina.
SEPEC.	<i>Escherichia coli</i> causante de sepsis.
T3SS.	Sistema de secreción tipo III.
Tir.	Translocated intimin receptor.
UPEC.	<i>Escherichia coli</i> uropatogénica.

LISTA DE FIGURAS.

FIGURA.	TITULO.	PAGINA.
Fig. 1.	Cromosoma de EPEC E2348/69.....	7
Fig. 2.	Formación de pedestales por EPEC y EHEC.....	8
Fig. 3.	Micrografía Electrónica de Barrido (SEM) e imagen pseudocoloreada.....	9
Fig. 4.	Epidemiología de las IVUs.....	10
Fig. 5.	Patogénesis de las Infecciones Urinarias.....	12
Fig. 6.	Mapa genómico de la cepa CFT073.....	13
Fig. 7.	Ciclo patogénico de EPEC.....	15
Fig. 8.	Modificaciones en el medio tipo orina.....	24
Fig. 9.	Crecimiento microbiano en la fórmula modificada de Mto....	25
Fig. 10.	NaHCO ₃ esparcido en medio LB y Mto.....	26
Fig. 11.	Kanamicina y Ciprofloxacino.....	28
Fig. 12.	Trimetoprima-Sulfametoxazol.....	29
Fig. 13.	Nitrofurantoina (Macrofantina) y Kanamicina.....	30
Fig. 14.	Ceftriaxona.....	31
Fig. 15.	Ampicilina.....	32
Fig. 16.	Cefotaxima.....	34
Fig. 17.	Bencilpenicilina.....	35
Fig. 18.	Efecto del NaHCO ₃ -ciprofloxacino sobre el crecimiento de UPEC en medio LB.....	36
Fig. 19.	Efecto del NaHCO ₃ -ciprofloxacino en CFU.....	37
Fig. 20.	Efecto del NaHCO ₃ -ciprofloxacino sobre el crecimiento de UPEC en Mto.....	38

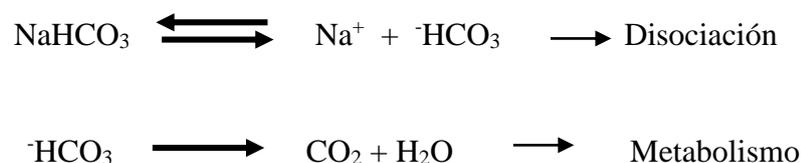
RESUMEN.

El carbonato ácido de sodio (NaHCO_3) por sí mismo tiene un efecto inhibitorio del crecimiento de *E. coli* y otras bacterias. Aunque se desconoce su mecanismo de acción, probablemente directa o indirectamente el NaHCO_3 es un efector celular que funciona como un regulador de la expresión génica y que puede estar afectando o modificando algún proceso vital microbiano. En el grupo del Dr. Sánchez se publicó, que el NaHCO_3 a bajas concentraciones y en combinación con los aminoglucósidos kanamicina o gentamicina (antibióticos de amplio espectro y de uso restringido por sus efectos secundarios dañinos) potencializa *in vitro* el efecto antibiótico que inhibe el crecimiento de *E. coli* enteropatogénica (EPEC) E2348/69. Así mismo, un estudio precedente usando una técnica variante de la difusión en disco mostró que el NaHCO_3 , también potencializa la actividad del ciprofloxacino contra EPEC E2348/69 aunque no tuvo el mismo efecto con ampicilina y ceftriaxona. La propuesta de este proyecto es investigar *in vitro* el espectro (rango) de acción del NaHCO_3 como potenciador de antibióticos utilizados en el diagnóstico de las infecciones de vías urinarias, empleando como modelo a la cepa bacteriana comúnmente causante de infecciones urinarias, *E. coli* uropatogénica (UPEC) CFT073. De tal manera, que *in vitro* la cepa CFT073 se retó bajo diferentes condiciones experimentales en medios LB, medios tipo orina y cultivos líquidos a diferentes concentraciones de NaHCO_3 , lo que permitió definir la variabilidad en su espectro de actividad potenciadora con los antibióticos ciprofloxacino y algunos β -lactámicos, así como los efectos inversos. Los resultados de la actividad NaHCO_3 -ciprofloxacino en medio líquido y por la técnica de CFU fortalecen la hipótesis de la actividad potenciadora sobre el ciprofloxacino por el NaHCO_3 a diferentes concentraciones. Por ello, una vez comprendido este efecto podrá permitir la consideración de su empleo como un coadyuvante potenciador de antibióticos en la práctica clínica para el tratamiento de infecciones de las vías urinarias o en otros padecimientos. Las condiciones experimentales *in vitro* evidenciaron el efecto potenciador del NaHCO_3 .

1. INTRODUCCIÓN.

Potenciar el efecto de los antibióticos podría ayudar a resolver el problema de resistencia antimicrobiana, podría contribuir a reducir el tiempo de tratamiento en la práctica clínica además de minimizar los efectos adversos propios de los antibióticos. Durante un análisis de regulación genética en *Escherichia coli* (*E. coli*) enteropatógena, se descubrió que el carbonato ácido de sodio (NaHCO_3) potencia el efecto de kanamicina. Un artículo que describe este hallazgo fue publicado por el grupo del Dr. Sánchez donde, se demostró que el NaHCO_3 potenciaba *in vitro*, en medio de cultivo líquido Luria-Bertani (LB), la actividad antibiótica de kanamicina y gentamicina¹. Resultados semejantes se obtuvieron para *Salmonella enterica* ser., *typhimurium* y *Staphylococcus* sp (datos del mismo grupo). El efecto potenciador del NaHCO_3 está parcialmente asociado al pH, no obstante, los experimentos han demostrado que el NaHCO_3 tiene un efecto adicional propio cuyo mecanismo de acción es aún desconocido. Independiente de las bases moleculares de su efecto desde hace tiempo se sabe que el NaHCO_3 es inhibidor del crecimiento de *E. coli* y otros microorganismos, incluyendo hongos patógenos^{2 y 3}.

Investigadores de China⁴ observaron inhibición de crecimiento de *E. coli* por NaHCO_3 y han sugerido que la secreción de HCO_3^- por el CFTR (*Cystic fibrosis transmembrane regulator*) constituye una forma de protección innata contra infecciones en la próstata. Aun cuando a primera vista parece poco probable que el NaHCO_3 fuese un efector celular, es de hacer notar que el NaHCO_3 es un regulador de expresión genética en *Citrobacter rodentium*⁵, *E. coli*⁶ y *V. cholerae*^{7 y 8}. Adicionalmente, en células eucariotas el NaHCO_3 incrementa la actividad de la enzima adenilato ciclasa soluble, la cual forma parte de la cascada de señalización de proteínas G⁹. Pudiera ser que, a altas concentraciones principalmente directa o indirectamente, el NaHCO_3 afecte algún proceso metabólico vital de la bacteria. Los resultados obtenidos en el grupo del Dr. Sánchez sugieren que el mecanismo de acción del NaHCO_3 implica su ingreso a la bacteria en forma de NaHCO_3 y no como CO_2 , el cual sería un producto natural de disociación del NaHCO_3 .



Aunque el ya descrito efecto de potenciación del NaHCO₃ con kanamicina y gentamicina contra *E. coli* enteropatógena (EPEC) E2348/69 parecería suficiente para justificar la progresión hacia su aplicación clínica, cabe recordar que este tipo de antibióticos son de uso restringido debido a sus efectos secundarios dañinos¹⁰. Por lo tanto, contemplando un posible uso clínico se consideró apropiado investigar el efecto del NaHCO₃ sobre antibióticos de uso común. De hecho, un estudio precedente ha indicado que el NaHCO₃ también potencializa el efecto del ciprofloxacino, aunque tal no fue el caso para ampicilina y ceftriaxona¹¹.

En vista de estos resultados, será conveniente definir si existe o no un efecto diferencial del NaHCO₃ con varios antibióticos y si las condiciones de ensayo modifican el efecto potenciador. Entonces, definir el alcance y la posible variabilidad del efecto potenciador del NaHCO₃ es claramente esencial para proponer su uso en combinación con antibióticos para el tratamiento de infecciones. Probablemente, la potenciación con el NaHCO₃ podría ayudar a disminuir los efectos secundarios de los antibióticos por la disminución de su dosis y la utilización menos prolongada en su administración.

Se cree que el uso del NaHCO₃ en la práctica clínica se podría explorar de manera prioritaria en ciertas infecciones. Particularmente, el NaHCO₃ podría ser efectivo en el tratamiento de infecciones de vías urinarias (IVUs) ya que actuaría en el tracto urinario debido a su excreción natural en la orina. Por su efecto propio inhibitorio del NaHCO₃, también podría usarse en soluciones de lavado vesical, administrándolo sólo o en combinación con antibióticos. El NaHCO₃ podría brindar beneficios en la práctica clínica debido a que las IVUs son las infecciones bacterianas más comunes que afectan a 150 millones de personas cada año en el mundo^{12 y 13}, por lo tanto, es una de las causas más frecuentes de consulta en atención primaria en México. En el año 2007 hubo en México un total de 3, 076,468 casos de IVUs, de las cuales 2, 294,451 (74.5 %) ocurrieron en mujeres y 749,755 (23 %) en hombres¹⁴. Para el tratamiento de las IVUs la OMS reporta que las quinolonas son los antibacterianos más utilizados y que la *E. coli* es el agente causal más común. La OMS también informó que la resistencia a las quinolonas pudo ser indicativo de resistencia a una de las últimas opciones disponibles de tratamiento por vía oral (*World Health Organization. Antimicrobial resistance: global report on surveillance, World Health Organization, 2014*). Por tal razón, el NaHCO₃ podría combinarse con ciprofloxacino para aumentar su potencia en el tratamiento de IVUs.

En este proyecto se realizó la investigación *in vitro* del efecto potenciador del NaHCO₃, buscando aproximar los resultados para considerar su eventual empleo en el tratamiento de IVUs. Para este fin se utilizó como modelo la cepa de referencia *E. coli* uropatogénica (UPEC) CFT073, que se hizo crecer *in vitro* en medio LB y en medio tipo orina (Mto). La cepa de colección UPEC CFT073 originalmente fue aislada de una paciente con IVU cuya complicación dio lugar a un cuadro séptico. Ha sido ampliamente caracterizada e incluso su genoma ha sido secuenciado¹⁵. Cabe destacar que la cepa UPEC es el mayor agente causal de infecciones del tracto urinario con una incidencia entre un 80 – 95 %¹⁶. UPEC también se encuentra asociada hasta en un 50 % a infecciones nosocomiales; más aún, por su amplia plasticidad genómica, otras variantes de *E. coli* pueden extender su nicho biológico. Tal es el caso de las cepas patógenas intestinales de *E. coli*, como EPEC, que también pueden causar infecciones del tracto urinario¹⁷.

Se considera que los resultados de este proyecto preparan el camino para el estudio expedito en otros patógenos y particularmente, aunque no exclusivamente aquellos filogenéticamente relacionados con *E. coli*. Desde luego la utilidad del NaHCO₃ podría limitarse no solo a potenciar la actividad antibiótica de kanamicina y gentamicina. Por ello es necesario investigar su amplitud de acción, además de sus posibles limitaciones. Se espera también que los resultados obtenidos sienten sólidas bases para estudios subsecuentes y que incluso podría explotarse más aún el uso del NaHCO₃ con otras bacterias patógenas Gram negativas y Gram positivas.

El uso de antibióticos en la terapia de enfermedades infecciosas está dirigido a limitar la colonización y/o eliminar a los microorganismos patógenos. La mayoría de los microorganismos infecciosos no logran ingresar al individuo, gracias a las barreras físicas y químicas naturales que éste presenta. Además, la existencia de poblaciones microbianas comensales residentes de la flora normal juegan un papel importante impiden la colonización por agentes infecciosos. La mayoría de los microorganismos que logran evadir las estas barreras naturales y producir infección pueden ser eliminados por mecanismos de la respuesta inmune innata¹⁸. Sin embargo, cuando un agente infeccioso superar las primeras líneas de defensa, la respuesta inmune adaptativa específica entra en acción logrando en la mayoría de los casos controlar la infección hasta suprimir la enfermedad¹⁹.

Los antibióticos muestran diferentes mecanismos de acción, propiedades físicas, químicas, farmacológicas y su espectro antimicrobiano tienen diferentes sitios blancos. Los antibióticos ocasionalmente pueden producir reacciones adversas tóxicas como fiebre, náuseas, reacciones alérgicas, diarrea etcétera, que dependen tanto del antibiótico utilizado, así como del paciente. Existe una amplia variedad de antibióticos utilizados en diversos tipos de tratamientos y con diferentes mecanismos de acción, como los que interfieren con la síntesis de RNA, inhibidores de la síntesis de la pared celular, inhiben la replicación del DNA, inhibidores de la síntesis de proteínas. También existen antibióticos que interfieren con la síntesis de precursores metabólicos²⁰.

Un ejemplo de antibióticos que interfieren con la síntesis de RNA es la rifampicina, uno de los más potentes antibióticos de amplio espectro contra bacterias patógenas Gram positivas y Gram negativas. La rifampicina se une a una región pequeña y conservada de la subunidad β de la RNA polimerasa dentro del canal DNA/RNA bloqueando la transcripción lo cual da lugar a la síntesis de cadenas muy cortas de unos cuantos nucleótidos^{21 y 22}. La rifampicina se considera óptima para el tratamiento de la tuberculosis²³.

La ampicilina, cefotaxima y ceftriaxona son antibióticos del tipo β -lactámicos que inhiben la formación del enlace (D-Ala-D-Ala) catalizado por las proteínas de unión a penicilina (PBP) para la síntesis de peptidoglicano. El peptidoglicano recubre a las células bacterianas y es esencial para preservar la integridad celular al proporcionar resistencia y rigidez a las paredes de bacterias Gram positivas y Gram negativas²⁴. Los β -lactámicos son antibióticos muy utilizados para el tratamiento de diversas infecciones.

La síntesis de DNA, la transcripción del mRNA y la división celular requieren de la modulación del enrollamiento del cromosoma a través de ruptura reversible de la doble cadena de DNA por la acción de las Topoisomerasas II y IV. Los complejos DNA-topoisomerasa son el blanco del ácido nalidíxico y sus derivados las fluoroquinolonas, norfloxacin, ciprofloxacina y levofloxacina, que se unen a las Topoisomerasas²⁵. Con la ruptura del DNA la maquinaria en la horquilla de replicación se detiene lo que conduce a la inhibición de la síntesis de DNA y eventualmente a la muerte celular²⁶. Las fluoroquinolonas son antibióticos de amplio espectro también muy utilizados en la práctica clínica contra una gran variedad de infecciones.

Los aminoglucósidos como la estreptomina, kanamicina y gentamicina se unen al componente 16S del rRNA en la subunidad 30S. La unión de los aminoglucósidos cambia la conformación del complejo entre el codón en el mRNA y el aminoacil tRNA generando proteínas incompletas y con secuencia alterada²⁷. La kanamicina puede provocar pérdida de la audición, daño renal, náuseas, vómito, diarrea y reacciones alérgicas, así también su uso prolongado provoca síndrome de mala absorción. Por sus efectos secundarios los aminoglucósidos son de uso restringido en la práctica clínica.

Escherichia coli es un huésped natural en el intestino humano, pero existen algunas cepas de esta bacteria que poseen información genética adicional que les confiere la capacidad de causar enfermedad. Las *E. coli* patógenas producen principalmente infecciones gastrointestinales, pero también existen variantes que causan infecciones en las vías urinarias, a continuación, se describen las principales características de *E. coli* patógenas.

1.1 Antecedentes generales cepas de *Escherichia coli* patógenas.

E. coli es una bacteria comensal de la flora bacteriana humana asociada a la capa mucosa del colon que tiene una relación simbiótica con el huésped. *E. coli* pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, es un anaerobio facultativo, bacilar y Gram negativo. Aunque los tipos de *E. coli* patógena comparten mucho del genoma de la *E. coli* comensal, se distinguen de ella porque llevan en su cromosoma información genética que les permite infectar a algunos animales y al hombre²⁸. Particularmente, *E. coli* enteropatógena en el humano se encuentra implicada como uno de los agentes causales de diarrea infantil. La colonización del intestino por bacterias EPEC puede ser limitada a la mucosa intestinal pero eventualmente puede diseminarse a través del organismo ingresando al torrente circulatorio. De acuerdo al nicho de infección, las *E. coli* patógenas se clasifican en *E. coli* patógena intestinal (IPEC) o *E. coli* patógena extraintestinal (ExPEC). Dentro del grupo de IPEC existen seis tipos de *E. coli* ampliamente estudiados. La *E. coli* enteropatógena (EPEC), la *E. coli* enterohemorrágica (EHEC), la *E. coli* enterotoxigénica (ETEC), la *E. coli* enteroinvasiva (EIEC), la *E. coli* enteroagregativa (EAEC) y la *E. coli* adherente difusa (DAEC). Dentro del grupo de las ExPEC están la *E. coli* uropatógena (UPEC), la *E. coli* causal de meningitis neonatal (NMEC) y la *E. coli* causante de sepsis (SEPEC)²⁹. Recientemente, se ha reportado que, si bien UPEC es el

principal patógeno aislado de infecciones del tracto urinario, interesantemente cepas de *E. coli* de los grupos EPEC e IPEC se han encontrado en pacientes con IVUs¹⁷.

1.1.1 *Escherichia coli*, enteropatógena E2348/69.

El principal mecanismo de transmisión de EPEC es por la vía fecal-oral y causante de diarrea infantil aguda o persistente principalmente en países en vías de desarrollo. La cepa E2348/69 (serotipo O127:H6) ha sido ampliamente usada como una cepa prototipo en el estudio biológico, genético y de virulencia y se utilizara como modelo experimental para la realización de este proyecto.

La EPEC E2348/69 fue aislada en Taunton, Reino Unido en 1969 durante un brote de diarrea infantil. El estudio de esta cepa llevó al descubrimiento del locus del sistema de secreción tipo III (T3SS). El genoma de la E2348/69 comprende un cromosoma circular de 4,965,553 pb, el plásmido pMAR2 de 97,978 pb, que codifica un factor de adherencia y el plásmido pequeño pE2348-2 de 6,147 pb que le confiere resistencia a estreptomicina³⁰ (Fig. 1).

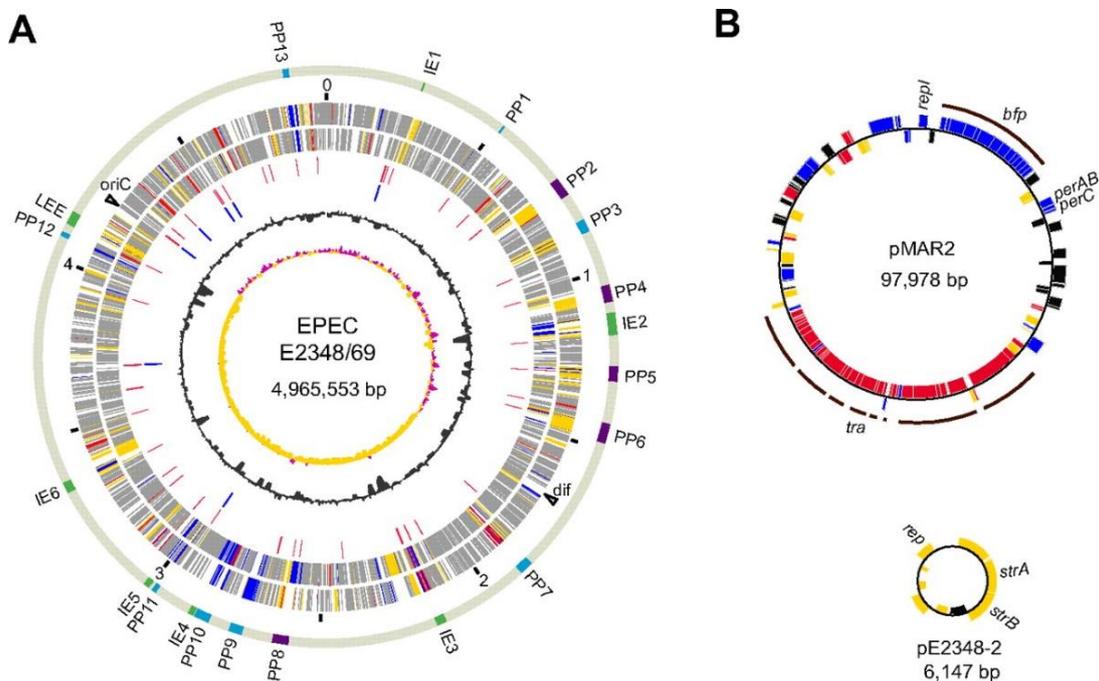


Figura 1. Cromosoma de EPEC E2348/69. Contiene 4,703 genes que codifican proteínas (incluidos 145 pseudogenes), 92 genes tRNA (incluidos 2 pseudogenes) y 7 operones rRNA. El plásmido pMAR2 es esencial para la virulencia. El plásmido pE2348-2 lleva el operón *strAB* que codifica resistencia a estreptomicina. Tomado de (Iguchi *et al*, 2009).

Los genes necesarios para el establecimiento de las lesiones de adherencia y esfecelamiento (borrado) ó *Attaching and Effacing* (A/E), están localizados en la isla de patogenicidad (PAI) designada como región *Locus of Enterocyte Effacement* (LEE) y codifican para los componentes del Sistema de Secreción Tipo 3, o T3SS, como lo son: reguladores, translocadores, chaperonas y moléculas efectoras que alteran los diversos procesos de señalización en la célula blanco. El mecanismo de infección de EPEC inicia con la adherencia a las microvellosidades del intestino a través de fimbrias llamadas *Bundle-forming pilus* (BFP), que controlan la adherencia bacteriana con los enterocitos del huésped. Posteriormente, la formación de lesiones A/E en los enterocitos se lleva a cabo por el T3SS que conecta el citoplasma bacteriano con la célula huésped a través de los componentes EscF, EspA, EspB and EspD. EscF forma la punta de la aguja del T3SS, monómeros de EspA polimerizados forman un filamento hueco que conecta a EscF con la membrana de la célula huésped. Posteriormente, EspB y EspD se translocan a través del filamento formado por EspA y se integran al interior de la membrana plasmática del huésped, formando así un poro continuo entre la bacteria y la célula huésped. Adicionalmente, el Translocated intimin receptor (Tir) entra a la célula huésped a través del portal, Tir se inserta en la membrana plasmática de la célula blanco, exponiendo un segmento medio en la superficie celular que funciona como receptor para intimina que es una proteína de membrana en EPEC³¹. (Fig. 2).

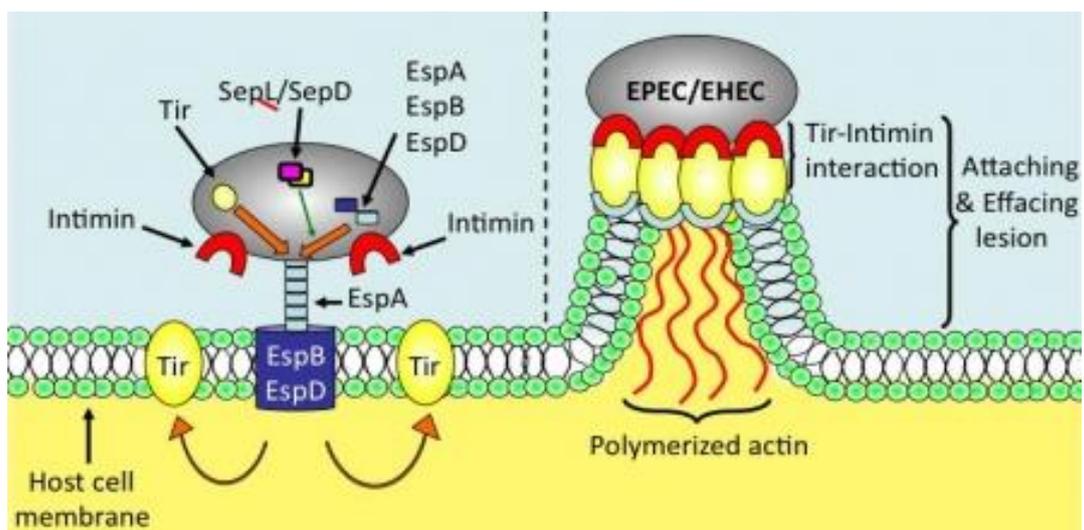


Figura 2. Formación de pedestales por EPEC y EHEC. EPEC regula la expresión de T3SS que une el citoplasma de la bacteria con el de la célula huésped. Posteriormente efectores como Tir circulan a través del filamento. Tir se inserta en la membrana del huésped e interactúa con su ligando intimin localizado al exterior de la membrana bacteriana. Tir-intimin, interactúan e inician una cascada de transducción de señales que culmina con el reclutamiento y remodelación de actina para formar protrusiones o pedestales llamadas Attaching and Effacing. Tomado de (Bhatt & Kalman 2011).

Las porciones amino y carboxilo de Tir permanecen expuestas hacia el citosol para interactuar con proteínas de la célula blanco y proteínas bacterianas, produciendo una adherencia bacteriana íntima, lo cual conduce al borrado de las microvellosidades por la acumulación de actina polimerizada y elementos del citoesqueleto que forman estructuras de pedestal y que también pueden ser formadas por EHEC. La destrucción de las microvellosidades reduce la habilidad de las células para absorber agua y nutrientes lo que conduce a la diarrea^{32 y 33} (Fig. 3).

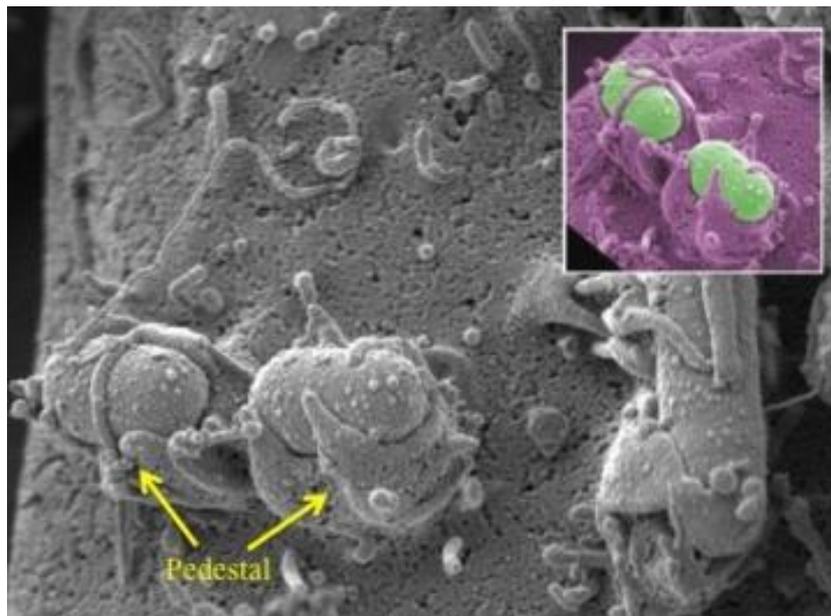


Figura 3. Micrografía Electrónica de Barrido (SEM) e imagen pseudocoloreada. A la derecha se muestran los pedestales formados en células HeLa (morado) infectadas por dos EPEC (verde). EM Image courtesy of Jorge Giron (University of Florida). Tomado de (Bhatt & Kalman 2011).

1.1.2 Infección de vías urinarias (IVUs).

Las IVUs, son de las infecciones bacterianas más comunes causantes de altas tasas de morbilidad en personas de todas las edades. La frecuencia recurrente de IVUs puede provocar serias secuelas como pielonefritis con sepsis, daño renal, nacimiento prematuro y complicaciones causadas por uso frecuente de antibióticos. Las IVUs son clasificadas como no complicadas y complicadas. Las IVUs no complicadas afectan típicamente a individuos saludables y sin anomalías estructurales del tracto urinario^{13 y 34}. Estas infecciones se encuentran diferenciadas en IVUs bajas (cistitis) e IVUs altas (pielonefritis). El desarrollo de cistitis incluye varios factores de riesgo asociados incluido

el género femenino, actividad sexual, infección vaginal, diabetes, obesidad y susceptibilidad genética. Las IVUs complicadas se encuentran asociadas con factores que comprometen el tracto urinario incluida la obstrucción urinaria, retención urinaria causada por enfermedad neurológica, inmunosupresión, fallo renal, trasplante renal, embarazo y la presencia de cuerpos extraños, tales como cálculos, catéteres permanentes u otros dispositivos de drenaje¹³.

Las IVUs son causadas por un amplio rango de patógenos, incluidos Gram negativos y Gram positivos, también ciertos tipos de hongos. UPEC es el agente causal más común de las IVUs no complicadas y complicadas. De los agentes prevalentes involucrados en IVUs no complicada seguido de UPEC son *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus* grupo B (GBS), *Proteus mirabilis*, *Pseudomona aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Candida spp.* Por otra parte, para las IVUs complicadas el orden de prevalencia más común seguido de UPEC como agente causal son *Enterococcus spp.*, *K. pneumoniae*, *Candida spp.*, *S. aureus*, *P. mirabilis*, *P. aeruginosa* y GBS^{13 y 35} (Fig. 4).

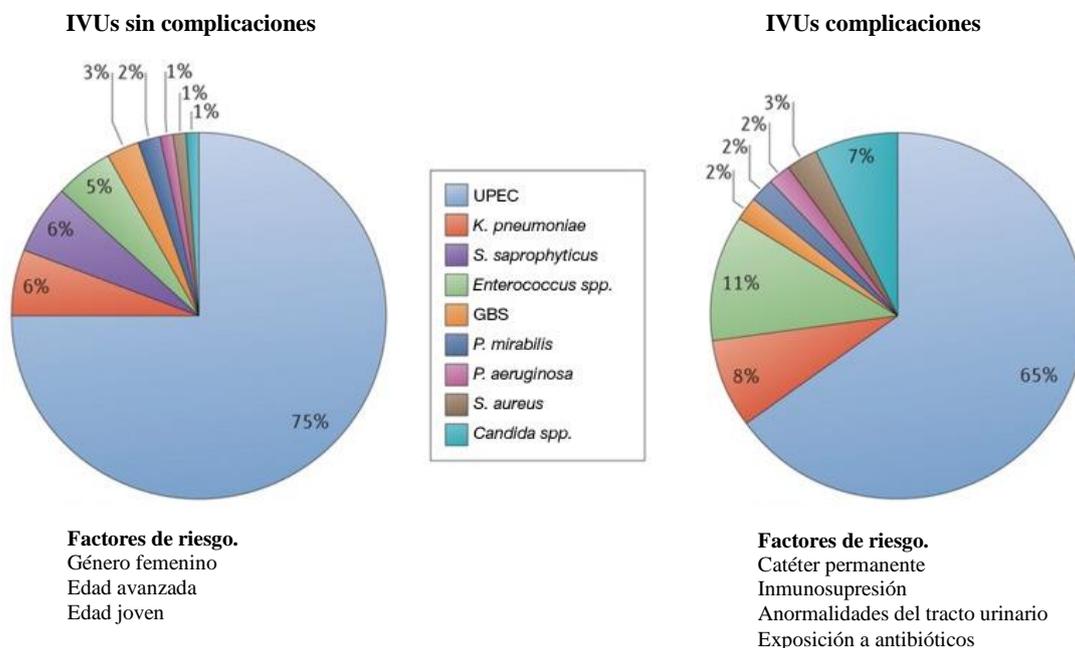
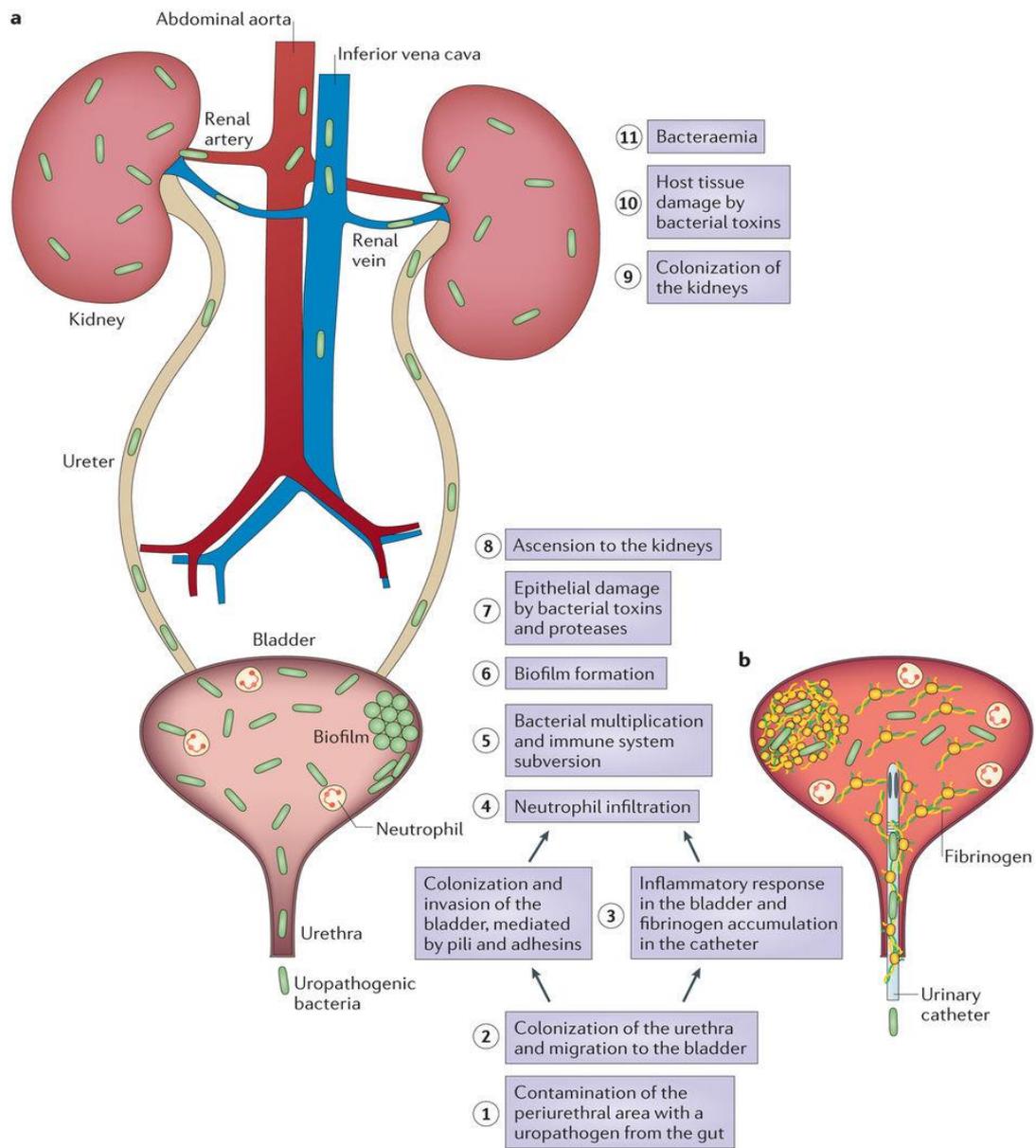


Figura 4. Epidemiología de las IVUs. Las IVUs son causadas por un amplio rango de patógenos Gram negativos y Gram positivos al igual que hongos. Las infecciones no complicadas afectan a mujeres, niños y pacientes de edad avanzada que por lo general están sanos. Las infecciones complicadas usualmente son asociadas con catéter permanente, anormalidades del tracto urinario, inmunosupresión o exposición a antibióticos. El agente causal más común de IVUs complicadas y no complicadas es UPEC. Tomado de (Flores-Mireles *et al*, 2015).

Las IVUs no complicadas comienzan cuando los patógenos que residen en el intestino contaminan el área periuretral donde estos pueden ser capaces de colonizar la uretra y ascender hacia la vejiga. La infección en la vejiga por UPEC comienza con la expresión de los pilis y adhesinas lo que resulta en colonización e invasión de la vejiga. La respuesta inflamatoria del huésped desencadena infiltración de neutrófilos que comienzan a eliminar a las bacterias. Algunas bacterias evaden el sistema inmune, ya sea mediante invasión celular al huésped o mediante cambios morfológicos que resultan en resistencia a neutrófilos, estas bacterias experimentan multiplicación y formación de biofilm. UPEC producen toxinas y proteasas que inducen daño celular al huésped, liberando nutrientes esenciales que promueven la supervivencia bacteriana y ascensión hacia los riñones. Una vez la colonización de los riñones la producción de toxinas bacterianas resulta en daño al tejido renal del huésped. Si no se tratan, las IVUs en última instancia pueden progresar a bacteriemia que se logra cuando el patógeno cruza la barrera del epitelio tubular de los riñones y avanza hacia el torrente sanguíneo³⁶.

Las IVUs complicadas siguen los mismos pasos iniciales como están descritos por una infección no complicada, incluyendo colonización periuretral, progresión hacia la uretra y migración hacia la vejiga. Sin embargo, para que los patógenos causen infección la vejiga debe estar comprometida. La causa más común de una vejiga comprometida es la cateterización. La actividad de la respuesta inmune durante el proceso inflamatorio y lesiones inducidas por el cateterismo promueven la acumulación de fibrinógeno en el catéter generando un medioambiente ideal para la unión de bacterias uropatógenas que expresan proteínas de unión a fibrinógeno. La infección induce infiltración de neutrófilos, pero después de su unión inicial a los catéteres recubiertos de fibrinógeno las bacterias se multiplican, forman biofilm de esta manera promueven el daño epitelial y pueden iniciar la infección en los riñones, donde la producción de toxinas induce daño al tejido³⁷. Si no se tratan las infecciones uropatógenas estas también pueden progresar a bacteriemia cruzando la barrera de células epiteliales tubulares (Fig. 5).



Nature Reviews | Microbiology

Figura 5. Patogénesis de las Infecciones Urinarias. Las IVU's generalmente comienzan con la contaminación periuretral por UPEC que reside en el intestino, seguida de la colonización de la uretra y la posterior migración del patógeno a la vejiga, iniciando la colonización e invasión mediante pilis y adhesinas. En la vejiga las complejas interacciones huésped-patógeno determinan su eliminación o el éxito en la colonización. Tomado de (Flores-Mireles *et al*, 2015).

1.1.3 *Escherichia coli*, uropatógena CFT073.

Las cepas UPEC son la causa más común de IVUs. La cepa UPEC CFT073 (Serotipo O6:K2:H1) fue aislada de la sangre de una paciente con diagnóstico de pielonefritis aguda en el Hospital de la Universidad de Maryland^{38 y 39}. La secuencia del genoma de CFT073

El mecanismo de infección de CFT073 se debe primeramente a adherencia mediada por adhesinas fimbriales ensambladas por el sistema chaperone-usher que son expresadas en la superficie de la bacteria y son consideradas un factor crítico de virulencia. Las fimbrias más ampliamente caracterizadas de UPEC son la fimbria tipo 1 y la fimbria P. La fimbria tipo 1 es requerida junto con la adhesina FimH, que se sitúa en el extremo distal de la línea de la fimbria, para reconocer específicamente proteínas α -D-manosiladas tales como uroplaquinas Ia e Ib en la superficie de células uroepiteliales. La fimbria tipo 1 promueve la colonización e invasión y la formación de biofilm, adicionalmente participan factores de adherencia de UPEC, tales como otras fimbrias (e. g. P, F1C, S and Afa), factores curli, proteínas autotransportadoras (e.g. Ag43, UpaH), TosA y flagelos que contribuyen a la colonización del tracto urinario⁴⁰. Las fimbrias P, se encuentran asociadas a pielonefritis aguda y contribuyen al establecimiento de las IVUs por unión a globósidos presentes en el epitelio renal⁴¹. La UPEC invade a las células superficiales de la vejiga donde rápidamente se replica para formar un biofilm. Las UPEC pueden persistir durante meses, evaden la respuesta inmune y resisten la terapia antimicrobiana convencional. En consecuencia, las bacterias quiescentes pueden resurgir de su nicho para infectar células aledañas y ser una fuente recurrente de infección del tracto urinario⁴² (Fig. 7).

Las UPEC secretan toxinas que dañan y eliminan células epiteliales del huésped, una de las toxinas más activa es la α -hemolisina (HlyA) que media la lisis celular ocasionando liberación de nutrientes como hierro que pueden ser utilizados por la UPEC para su crecimiento y supervivencia. En un modelo de en ratón, HlyA se encuentra asociada a septicemia y daño renal⁴³. Otra toxina de UPEC es el Factor necrotizante citotóxico 1 (CNF1) que es una Rho GTPasa, que promueve la invasión de UPEC a las células huésped⁴⁴.

Es evidente entonces que la patología de las cepas UPEC se conoce con detalle, y es claro que se han identificado los principales factores de virulencia y su mecanismo de acción. Con el amplio conocimiento a nivel molecular, es posible comprender el porqué de las graves consecuencias de una infección por UPEC, especialmente en casos de infección prolongada. El conocimiento actual también nos permite entender por qué las infecciones por UPEC pueden durar hasta años, lo cual compromete la calidad de vida del paciente. Dado que en la actualidad las infecciones causadas por UPEC, prácticamente sin excepción, deben ser tratadas con antibióticos, el potenciar su actividad podría tener

efectos benéficos en la clínica. Este proyecto propone investigar *in vitro* el espectro (rango) de acción del NaHCO_3 como potenciador de antibióticos utilizados en el diagnóstico de las infecciones de vías urinarias, empleando como modelo a la cepa bacteriana comúnmente causante de infecciones urinarias, *E. coli* uropatogénica (UPEC) CFT073.

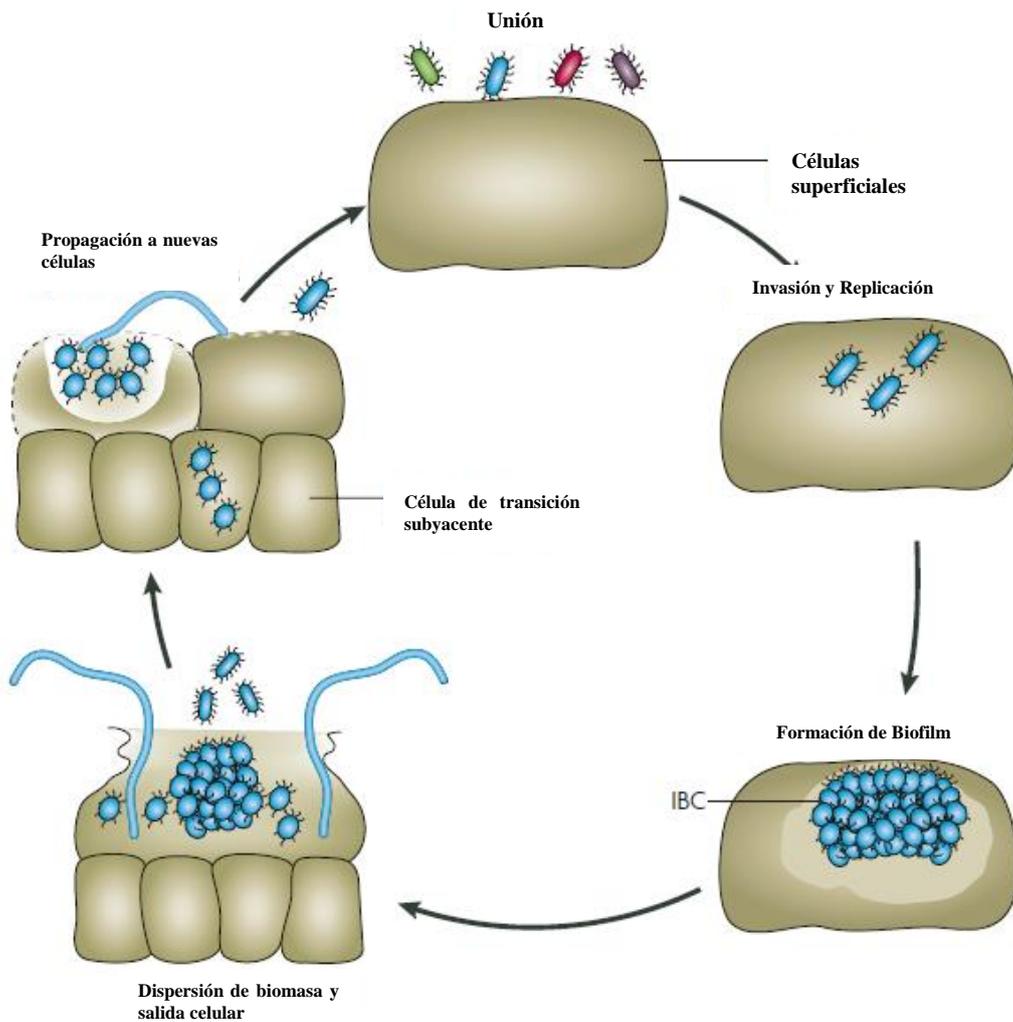


Figura 7. Ciclo patogénico de EPEC. Las fimbrias tipo 1 promueven la invasión de la célula huésped, posterior a la invasión las UPEC comienzan a replicarse rápidamente hasta formar un biofilm intracelular, que puede resurgir de su nicho para infectar células aledañas y generar una nueva infección. Tomado de (Cegelski *et al*, 2008).

2. PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.

Experimentos realizados en el grupo del Dr. Sánchez sobre *E. coli* enteropatógena (EPEC) E2348/69 han demostrado un efecto potenciador del NaHCO₃ en la actividad de kanamicina y gentamicina al inhibir el crecimiento *in vitro* de EPEC; sin embargo, se consideró que este efecto podría no ser exclusivo para estos antibióticos y contra EPEC en particular. Por tal motivo se propuso utilizar la cepa de referencia *E. coli* uropatógena (UPEC) CFT073, exponiéndole a antibióticos de uso común en la práctica clínica contra IVUs y contribuir a la certidumbre del empleo del NaHCO₃ en tratamientos clínicos a través de los resultados obtenidos. Con este objetivo en mente se plantea desafiar a la cepa de referencia bajo diferentes condiciones experimentales *in vitro* para definir el espectro de acción y limitaciones del NaHCO₃ como potenciador de antibióticos.

JUSTIFICACIÓN.

Las infecciones del tracto urinario afectan a 150 millones de personas cada año en el mundo. En el año 2007 hubo en México un total de 3, 076,468 casos de IVUs, de los cuales 2,294,451 (74.5 %) ocurrieron en mujeres y 749,755 (23 %) en hombres. Los antimicrobianos son el tratamiento de elección para estas infecciones, pero una creciente ineficacia de los antibióticos es un problema asociado a dicha terapia. Aumentar la potencia de los antibióticos podría ayudar a resolver este problema. El NaHCO_3 ha demostrado capacidad para potenciar algunos antibióticos, por lo tanto, podría ser un compuesto ideal para aumentar la actividad de antibióticos de utilización en IVUs. De acuerdo con los estudios realizados al trabajar con *E. coli* uropatogénica (UPEC) CFT073 bajo cambios de concentración de NaHCO_3 , permitirá evidenciar que NaHCO_3 tiene un efecto potenciador en antibióticos e influencia el comportamiento bacteriano en infecciones del tracto urinario por ello, una vez comprendido este efecto podrá permitir la consideración de la implementación del NaHCO_3 como un coadyuvante del tratamiento con antibióticos en pacientes afectados por *E. coli* CFT073 e incluso a otro tipo de infecciones causados por otros microorganismos.

3. OBJETIVOS.

3.1 Objetivo general.

Investigar *in vitro* la amplitud del efecto potenciador del NaHCO_3 con diferentes antibióticos utilizando como modelo a *E. coli* uropatogénica CFT073.

3.2 Objetivo específico.

Investigar *in vitro* el efecto potenciador del NaHCO_3 sobre ciprofloxacino, β -lactámicos (ceftriaxona, ampicilina, cefotaxima y bencilpenicilina), sobre *E. coli* uropatogénica CFT073 en medio nutritivo LB y medio tipo orina.

4. HIPOTESIS.

Será posible definir la amplitud del NaHCO_3 como potenciador de ciprofloxacino y β -lactámicos, en *E. coli* uropatogénica CFT073.

5. MATERIAL Y MÉTODOS

5.1 Cultivos.

Todos los cultivos se iniciaron a partir de una suspensión bacteriana congelada en Glicerol 20 % de UPEC CFT073 dicha suspensión se atempero a 24 °C y se determinó su viabilidad, las cuales se sembraron en cajas de agar LB con agarosa 1 % (LB-A1 %) y medio tipo orina con agarosa 1 % (Mto-A1 %) que se incubaron a 37 °C de 18 a 24 h.

24 h., después se resuspendieron varias colonias en solución salina al 0.9 %, hasta lograr una suspensión con densidad óptica de 1.0 a 600 nm (DO_{600}), llamada suspensión bacteriana con DO_{600} ajustada. De la suspensión bacteriana con DO_{600} ajustada se tomaron 20 μ l por cada 100 ml de medio de cultivo líquido. Para los cultivos se utilizaron dos tipos de medio: **a)** Medio clásico LB, con Bacto triptona (Difco o BD) al 1 %, Extracto de Levadura (DIFCO-BD) al 0.5 %, NaCl al 1 % y **b)** medio tipo orina cuyas concentraciones están dentro de los intervalos fisiológicos de la orina humana normal (concentraciones y componentes son mostrados más adelante en la sección *medio tipo orina*). Los cultivos líquidos se prepararon y colocaron en microplacas de 24 pozos (Marca Costar No. Cat. 3526) ajustando los volúmenes para que los cultivos tuvieran una relación volumen-superficie constante⁴⁵.

5.2 Cultivos con $NaHCO_3$.

Para estudiar el efecto del $NaHCO_3$ se preparan tubos Falcon con la suspensión bacteriana DO_{600} ajustada y con diferentes concentraciones de $NaHCO_3$ (0, 5, 10, 20, 40 y 80 mM) en medio de cultivo LB. Posteriormente, se colocó 1 mL de esta suspensión de diferentes concentraciones de $NaHCO_3$ en cada pozo de una microplaca de cultivo de 24 pozos. Cada condición se probó por cuadruplicado. La microplaca se incubó a 37 °C durante 18 h sin agitación y en una cámara húmeda. Al final de la incubación se registraron las densidades ópticas a 600 nm en un lector automático de microplacas (Absorbance Reader Biotek modelo ELx800).

5.3 Cultivos con antibióticos.

La suspensión bacteriana con DO₆₀₀ ajustada se diluyó en medio de cultivo inoculado, el cual se dispensó en tubos Falcon con concentraciones variables de los antibióticos. Posteriormente, se colocaron 500 µl de medio inoculado conteniendo NaHCO₃, o sin NaHCO₃, en cada pozo de una microplaca de cultivo y luego se agregan 500 µl de medio inoculado con antibiótico o 1 ml de medio inoculado, pero sin antibiótico ni NaHCO₃ para los controles, siguiendo un esquema propuesto para llevar el registro en bitácora de las posiciones por pozo de cada concentración final. Cada condición se probó por triplicado. El mismo procedimiento se empleó para probar el efecto de NaHCO₃ y antibióticos en medio llamado “tipo orina” cuya composición se detalla enseguida.

5.4 Medio tipo Orina (Mto).

Se preparó medio tipo orina, o Mto, cuyos componentes y concentraciones están dentro de los intervalos fisiológicos de la orina humana normal⁴⁶. Para la preparación del Mto se disolvieron en 1000 ml de agua desionizada para obtener las concentraciones de: NaCl 100 mM, Na₂SO₄ 17.0 mM, Urea 280 mM, KCl 38.0 mM, CaCl₂ 4.0 mM, Creatinina 9.0 mM, Na₃C₆H₅O₇ 3.4 mM, NH₄Cl 20.0 mM, MgSO₄ 3.2 mM, Na₂C₂O₄ 0.18 mM, NaH₂PO₄ 3.6 mM, Na₂HPO₄ 6.5 mM, KH₂PO₄ 16.0 mM, MgCl₂.6H₂O 3.2 mM, C₃H₆O₃ 1.1 mM, FeSO₄.7H₂O 0.005 mM, Casaminoácidos 0.1 %, el pH del Mto se ajustó a un valor de 6.0 con ácido clorhídrico concentrado.

5.5 Detección de unidades formadoras de colonias (CFU).

La técnica se basa en contar las unidades formadoras de colonias (*colony forming units*, o *CFU*) presentes por 1 ml de cultivo. De un cultivo líquido en medio LB crecido durante 18 h en microplacas de 24 pozos se transfirieron alícuotas de 20 µl, a microplacas de 96 pozos las cuales ya contenían 180 µl de medio LB en cada pozo. Esto constituyó una primera dilución 1:10. Seguidamente se mezcló la suspensión bacteriana por aspiración repetida y se transfirieron 20 µl al pozo siguiente repitiendo el procedimiento hasta llegar al pozo 00 de 00 de la columna de la microplaca de 96 pozos. Esta dilución en serie dió como factor de dilución final 1×10^{-8} . De cada una de las diluciones 10^{-5} , 10^{-6} , 10^{-7} y 10^{-8} se tomaron 10 µl que se extendieron sobre la superficie del medio LB-A1 %. Después de incubación de 18 a 24 h a 37 °C, se analizaron las cajas y se contó el número de colonias

individuales en donde el factor de dilución permitió la diferenciación de colonias individuales.

5.6 Análisis de inhibición del crecimiento por difusión en disco (técnica tipo-Kirby Bauer).

Para evaluar la sensibilidad microbiana por el método de difusión en disco, se prepararon cajas Petri con 25 ml de medio LB-A1 % o Mto-A1 % con NaHCO₃ disuelto o sin el en las cajas control, lo cual aseguró una profundidad constante de 4 mm. Se preparó una suspensión bacteriana estándar equivalente a 0.5 U de McFarland, que a 600 nm tiene un valor densidad óptica cercana a 0.1. Para la preparación del inóculo se siguió el procedimiento descrito en la sección *Cultivos* antes descrito. Las cajas Petri se inocularon de inmediato con un hisopo empapado en la suspensión bacteriana, recorriendo el hisopo sobre la superficie del medio en tres direcciones en ángulos de 60° de tal manera que la distribución de las bacterias fuese homogénea permitiendo el crecimiento “en césped”. Enseguida, los discos de papel filtro se colocaron sobre la superficie inoculada y se humedecieron con 5-10 µl de la solución de antibióticos. Las cajas se incubaron bocarriba a 37 °C por 18 a 24 h, cubriendo el contorno de la caja con Parafilm para evitar la evaporación durante la incubación.

6. RESULTADOS.

6.1 Experimentos con la cepa modelo *E. coli* UPEC CFT073.

El propósito final del presente proyecto es aportar elementos científicos de estudios *in vitro* para dar indicios sobre los posibles tratamientos de las infecciones del tracto urinario por el efecto potenciador del NaHCO₃ sobre antibióticos. Durante la caracterización inicial del efecto del NaHCO₃ se empleó la cepa enteropatógena de referencia *E. coli* (EPEC) E2348/69, en la cual se demostró el efecto de potenciación de kanamicina por NaHCO₃. Para la aproximación al objetivo propuesto, se eligió a la cepa uropatógena *E. coli* (UPEC) CFT073, para exponerla a antibióticos de uso común contra IVUs. Con este objetivo se planteó desafiar a la cepa CFT073 en similares condiciones experimentales a las aplicadas a la cepa E2348/69¹, y más adelante aplicar un modelo *in vitro* similar a la situación proyectada del uso del NaHCO₃ *in vivo*; concretamente, cultivar a la bacteria en un medio de cultivo de composición semejante a la orina humana que hemos llamado medio tipo orina o Mto. Con dicho Mto se procuró definir el espectro de acción y limitaciones del NaHCO₃ empleando como modelo a la cepa uropatógena *E. coli* UPEC CFT073. Esta cepa de referencia se solicitó al *Dr. Ygnacio Martínez Laguna*, jefe del Laboratorio de Biología Molecular de Enteropatógenos del Centro de Investigaciones en Ciencias Microbiológicas y a la *Dra. Margarita Ma. De la Paz Arenas H*, jefa del Laboratorio de Bioquímica y Genética Microbiana del Centro de Investigaciones Microbiológicas. Instituto de Ciencias de la Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, quienes amablemente nos realizaron la donación de un vial con la cepa solicitada.

6.2 Medio de cultivo de composición semejante a la orina humana.

Con la finalidad de determinar si el NaHCO_3 bajo condiciones experimentales más cercanas al sistema *in vivo* tiene las mismas propiedades sobre la actividad de los antibióticos y considerando que se vislumbra una aplicación en el tratamiento de IVUs, se decidió emplear Mto. La opción de utilizar orina humana y no un medio sustituto ha sido contemplado por otros autores; sin embargo, la gran heterogeneidad natural de composición de la orina humana ha llevado a la propuesta del uso de sustitutos. Un medio como el Mto tiene la ventaja de una constancia en su composición y de sus características físicas y bioquímicas, por ejemplo, el pH. De entre las múltiples fórmulas para el reemplazo experimental de la orina humana, se eligió la formulación publicada por Ipe *et al*, 2016. Dicha formulación cumple con la composición promedio de una orina normal debido a los componentes y concentraciones establecidos. Sin embargo, al realizar la preparación del medio se encontró en repetidas ocasiones la formación de precipitados que además de secuestrar parte de los componentes del medio podían interferir con la medición de crecimiento bacteriano por densidad óptica (OD) a 600 nm. Para evitar la formación de precipitados, se evaluaron cada uno de los 18 componentes de la fórmula original para identificar el reactivo(s) que podrían estar causando este efecto y se observó que, al agregar sulfato de hierro, cloruro de calcio y ácido úrico se formaban precipitaciones. Una vez identificados estos componentes realizamos modificaciones en el orden de disolución de los reactivos, así como la preparación de soluciones concentradas. Con la estrategia adoptada evitamos la formación de precipitado al agregar sulfato de fierro y cloruro de calcio, pero no así para el ácido úrico. Más adelante se indica que este componente se suprimió del Mto. Para tener el Mto libre de algún microorganismo se probó la esterilización por calor húmedo mediante Autoclave Geo-Lab modelo: GL311 a 121.5 °C, presión de 15 lb/in² durante 15 minutos, se obtuvo un Mto estéril con precipitación y de aspecto lechoso, por lo que en lugar de ello se realizó la esterilización por filtración con Millex-GS Syringe Filter Unit, 0.22 μm . (Fig. 8A - D).

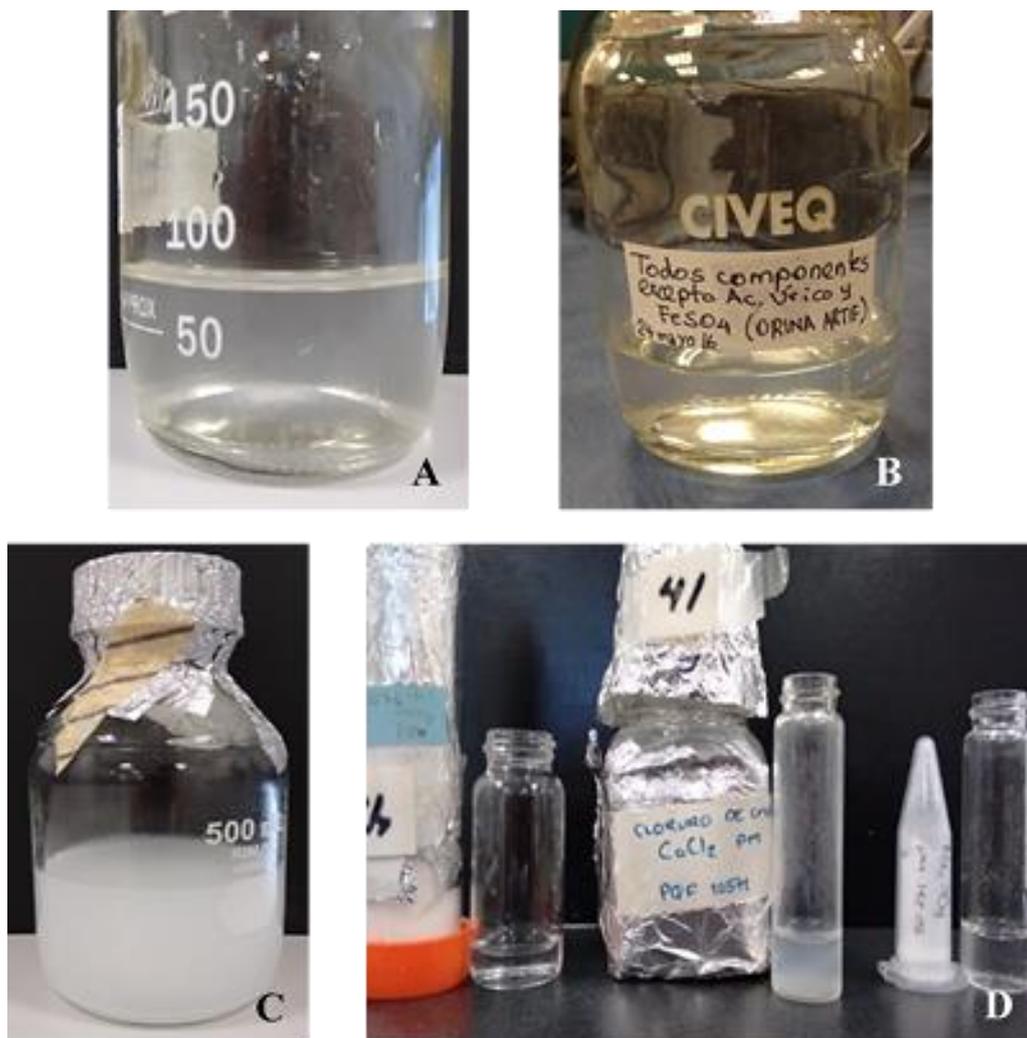


Figura 8. Modificaciones en el medio tipo orina. A) formación de precipitaciones en la preparación del Mto con los 18 componentes originales. B) al modificar el orden de los componentes obtenemos el Mto en mejores condiciones. C) la esterilización para este Mto mediante calor húmedo no es óptimo. D) discriminación e identificación de los componentes que forman precipitaciones.

6.3 Modificación en la fórmula del medio tipo orina.

Debido a que no se logró evitar que el ácido úrico causara precipitación, se decidió omitirlo de la formulación y quedar únicamente con 17 de los 18 componentes originales. Enseguida se investigó si la falta de ácido úrico afectaba de alguna manera el crecimiento bacteriano en Mto-A1 %. De tal manera que se prepararon 100 ml de Mto sin ácido úrico, se filtró la solución mediante Millex-GS Syringe Filter Unit 0.22 μm y se prepararon cajas Petri con Mto-A1 %. Posteriormente, se realizó el procedimiento de acuerdo a Materiales y Métodos de la primera sección de *cultivos* para crecimiento bacteriano en cajas Petri con medio Mto-A1 %. Importantemente los resultados demostraron que la modificación a la composición del Mto no tuvo efecto visible sobre el crecimiento y tampoco sobre la respuesta a NaHCO_3 y/o el efecto de los antibióticos. El pre-crecimiento en estriado de la cepa CFT073 en Mto, se consideró como una manera de adaptación de la cepa previo a su crecimiento en medio sólido o en Mto líquido (Fig. 9).

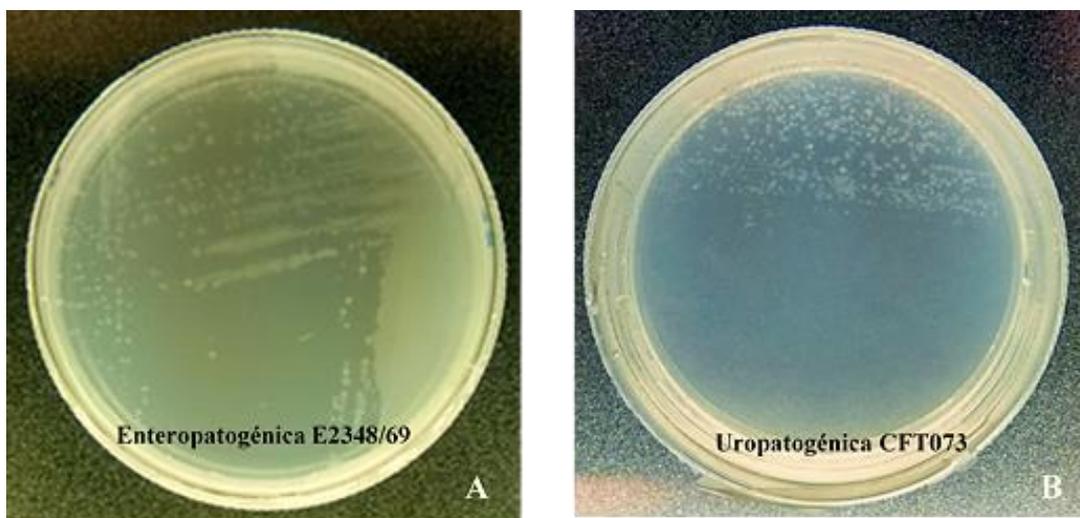


Figura 9. Crecimiento microbiano en la fórmula modificada de Mto. Crecimiento de *E. coli* enteropatogénica (EPEC) E2348/69 y *E. coli* uropatogénica (UPEC) CFT073 como se muestra en A y B respectivamente. El crecimiento previo de las cepas en la composición del Mto es considerado como una adaptación experimental al medio.

6.4 NaHCO₃ esparcido sobre medios solidos LB y tipo orina.

Para las pruebas en medio sólido y a fin de evitar precipitación de los componentes del Mto, inicialmente se preparó agarosa estéril concentrada al 3 %, la cual se agregó en forma fundida al Mto esterilizado por filtración. Este procedimiento fue difícil y aún riesgoso, por lo que para un método más asequible y que evitase posible descomposición del NaHCO₃ a la temperatura de fusión de la agarosa, se optimizó el uso del NaHCO₃ disuelto al esparcirlo con una varilla de vidrio estéril sobre cajas Petri Mto-A1 % y Petri LB-A1 % (solidificados). Se agregó entonces 5, 10, 20, 30 y 40 mM del NaHCO₃ estéril concentrado y disuelto según el caso, sobre la superficie de los medios sólidos, de tal manera que se demostró equivalencia de la técnica con la disolución en el medio fundido. Se preparó una solución de NaCl de concentración equivalente a la solución de NaHCO₃ que fue utilizada como control y se aplicó de la misma manera que la solución de NaHCO₃. Este avance técnico fue importante debido a que pudo ser aplicado para las diferentes concentraciones (5, 10, 20, 30 y 40 mM) de NaHCO₃ y NaCl según las condiciones experimentales requeridas (Fig. 10).



Figura 10. NaHCO₃ esparcido en medio LB y Mto. Se utilizó una varilla de vidrio estéril para esparcir el NaHCO₃ y el NaCl disuelto sobre el Mto-A1 % y LB-A1 % según las concentraciones experimentales requeridas (5, 10 20, 30 y 40 mM) y dejándose absorber.

Debe destacarse que la disponibilidad del medio Mto fue limitada y por ello se notará que en el desarrollo de este proyecto se alterna el uso de medio LB y medio Mto. El medio LB fue útil para explorar alguna ruta experimental adicional, o para desarrollar los controles y una vez logrado esto, se procedió a hacer uso del medio Mto. En otras palabras, se economizó el medio Mto y se utilizó medio LB como primera alternativa para guiar la vía experimental y luego confirmar los resultados, en los casos que se consideró y se utilizó el medio Mto. En general la respuesta en los dos medios fue semejante.

6.5 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de kanamicina y ciprofloxacino en Mto con E2348/69.

Para determinar el efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de ciprofloxacino y kanamicina, se distribuyeron las bacterias de la cepa E2348/69 sobre la superficie del medio sólido para tener crecimiento “en césped” en el Mto-A1 %. Cabe mencionar que para el sembrado en Mto sólido se implementó una modificación del procedimiento en este proyecto. Habitualmente el pre-crecimiento bacteriano se realiza en medio nutritivo LB. Considerando que la utilización del medio LB podría interferir, tanto por posible arrastre de componentes como porque las bacterias serían crecidas después en un medio con composición diferente. Se decidió pre-adaptar a las bacterias al Mto tanto a la cepa E2348/69 como a la cepa CFT073. Se consideró que esta pre-adaptación ayudaría a controlar posible interferencia, especialmente en lo referente a la sensibilidad a antibióticos. En la Fig. 11, se muestran resultados de sensibilidad a antibióticos en la cepa E2348/69 aplicando la técnica: A) 0 mM NaHCO_3 , B) con 5 mM NaHCO_3 y C) con 10 mM NaHCO_3 disuelto en el medio solidificado; se observaron halos de inhibición de crecimiento con 12.5 μg de kanamicina, en B y C, se observa el efecto potenciador de 5 y 10 mM de NaHCO_3 , respectivamente con kanamicina (control positivo para todas las evaluaciones experimentales). No así para 0.02 μg de ciprofloxacino a concentración 0 y 5 mM de NaHCO_3 ; sin embargo, a 10 mM de NaHCO_3 con ciprofloxacino (3 y 4) se observó un halo mayor con inhibición de crecimiento y mejor definido. Estos resultados revelaron un efecto de potenciación más efectivo a la concentración 10 mM de NaHCO_3 con ciprofloxacino (Fig. 11).

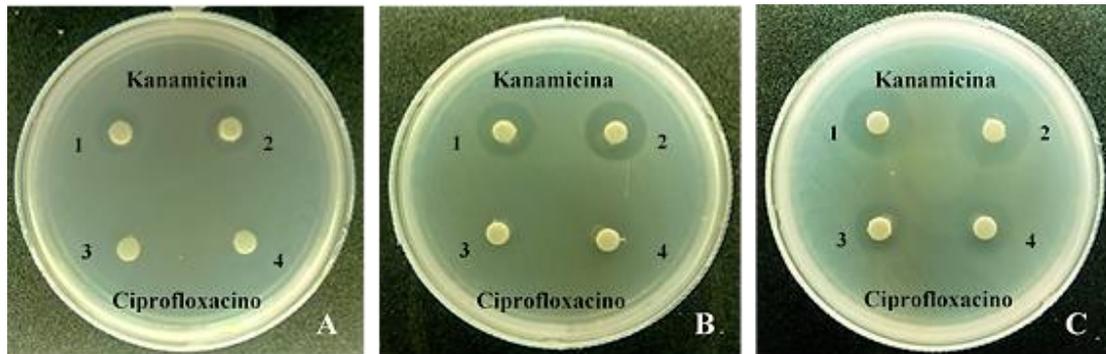


Figura 11. Kanamicina y Ciprofloxacino. Las figuras A, B y C muestra crecimiento de E2348/69 en el Mto-A1 % con NaHCO_3 disuelto en el medio sólido para lograr las concentraciones 0, 5 y 10 mM NaHCO_3 respectivamente. A: con 0 mM NaHCO_3 en el Mto-A1 % + 1 y 2 con 12.5 μg kanamicina, 3 y 4 con 0.02 μg ciprofloxacino. B: con 5 mM de NaHCO_3 en el Mto-A1 % + 1 y 2 con 12.5 μg kanamicina, 3 y 4 con 0.02 μg ciprofloxacino y C: con 10 mM de NaHCO_3 en el Mto-A1 % + 1 y 2 con 12.5 μg kanamicina, 3 y 4 con 0.02 μg ciprofloxacino. Se utilizó a la kanamicina como control positivo para todas las evaluaciones experimentales.

6.6 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de trimetoprima-sulfametoxazol en Mto con CFT073.

Se realizaron crecimientos en césped de la cepa CFT073 sobre Mto-A1 % para determinar el efecto del NaHCO_3 disuelto en el medio sólido sobre trimetoprima-sulfametoxazol, como se muestra en la Fig. 12: A y B a la concentración 0 mM y 5 mM de NaHCO_3 , respectivamente y se colocaron sensidiscos de los antibióticos con: 1) 0.10 μg , 2) 0.15 μg y 3) 0.21 μg . Se observaron halos de inhibición sin mostrar claramente un efecto potenciador con 5 mM de NaHCO_3 . También se realizó el crecimiento de la cepa E2348/69 sobre Mto-A1 % con 0 y 5 mM de NaHCO_3 y se colocaron sensidiscos con los antibióticos trimetoprima-sulfametoxazol con 1) 0.05 μg y 2) 0.26 μg . No se observaron halos de inhibición de la cepa E2348/69 (datos no mostrados), lo que indica que podría ser resistente a esta concentración o al antibiótico además de no mostrar efecto potenciador de su efecto por NaHCO_3 en las dos cepas (Figura 12).

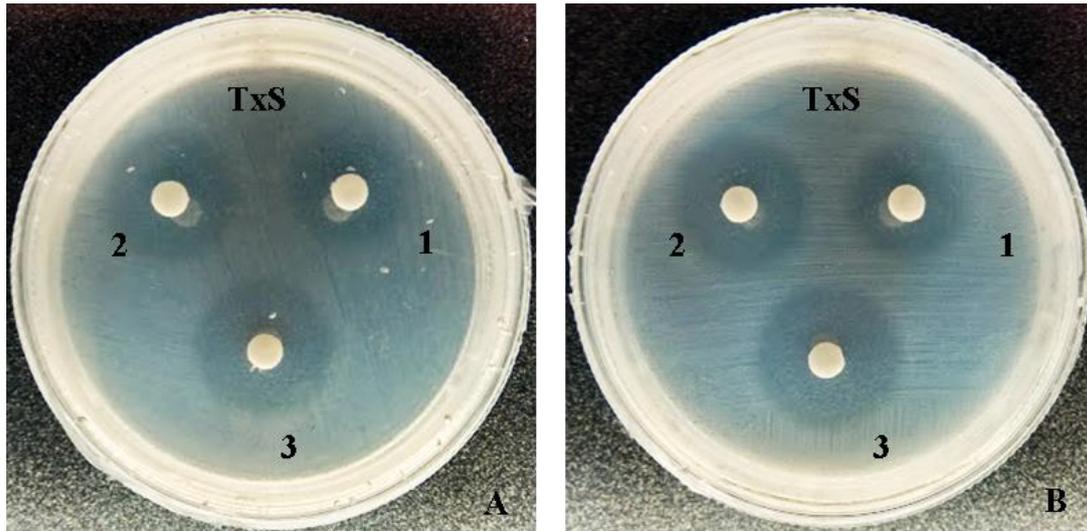


Figura 12. Trimetoprima-Sulfametoxazol. Las figuras A y B muestran crecimiento de la cepa CFT073 en Mto-A1 % con 0 y 5 mM NaHCO_3 disueltos en el medio sólido respectivamente. A: con 0 mM NaHCO_3 en el Mto-A1 % + 1) 0.10 μg , 2) 0.15 μg y 3) 0.21 μg de trimetoprima – sulfametoxazol y B) con 5 mM NaHCO_3 en el Mto-A1 % + 1) 0.10 μg , 2) 0.15 μg y 3) 0.21 μg de trimetoprima – sulfametoxazol.

6.7 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de la nitrofurantoina (Macrofantina) en medio LB y Mto con CFT073.

Para determinar el efecto NaHCO_3 sobre la actividad de la nitrofurantoina se realizaron crecimientos en césped de la cepa CFT073 como se muestran en la Fig. 13: A en medio LB-A1 % y B en Mto-A1 % ambos con 10 mM de NaHCO_3 , C en medio LB-A1 % y D en Mto-A1 % ambos con 10 mM de NaCl (control) disueltos en los medios sólidos. En todos los crecimientos se colocaron sensidiscos con: 1) 5 μg y 2) 50 μg de nitrofurantoina, así también, 3) 12.5 μg y 4) 25 μg de kanamicina. A diferencia de los crecimientos que fueron tratadas con NaCl (control), los crecimientos A y B muestran un efecto potenciador por 10 mM de NaHCO_3 con kanamicina, no así para nitrofurantoina que se comporta similar al grupo control en medio LB-A1 % y habría quizás hasta un efecto opuesto en Mto-A1 % como lo sugieren el tamaño de los halos de los sensidiscos 1 y 2 de la Fig. 13-B en comparación con los halos de los sensidiscos 1 y 2 en la Fig. 13-D. Cabe destacar que la nitrofurantoina que se empleó en estos ensayos es la suspensión Macrofantina infantil 25 mg/5 mL de uso comercial dado que no se tenía acceso a la nitrofurantoina pura.

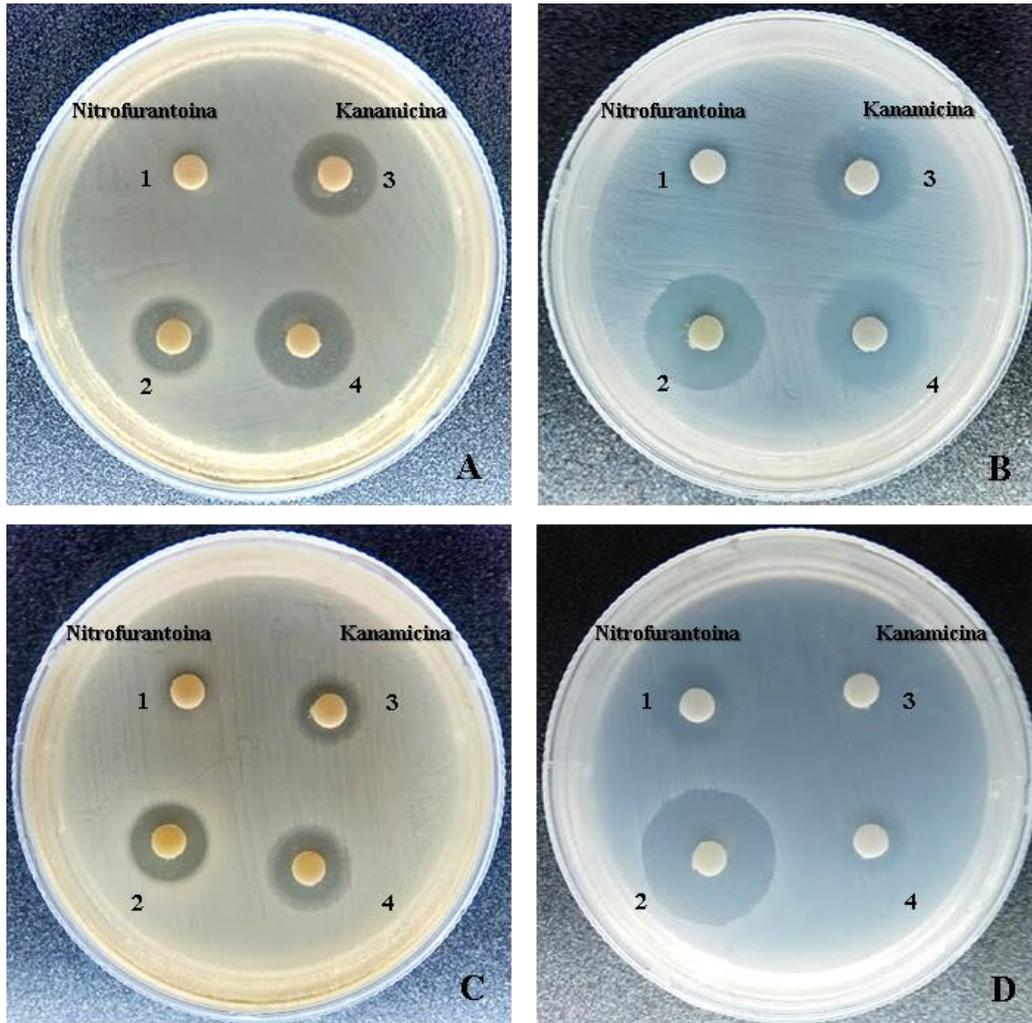


Figura 13. Nitrofurantoina (Macrofantina) y kanamicina. Las figuras A, B, C y D muestran crecimiento de la cepa CFT073. A y C: con 10 mM NaHCO_3 y 10 mM NaCl disueltos en el medio sólido respectivamente en medios LB-A1 %, presentan halos de inhibición con 1) 5 μg y 2) 50 μg por nitrofurantoina, 3) 12.5 μg , 4) 25 μg por kanamicina. B y D: con 10 mM NaHCO_3 y 10 mM NaCl disueltos en el medio sólido respectivamente en Mto-A1 %, presentan halos de inhibición con 1) 5 μg y 2) 50 μg por nitrofurantoina, 3) 12.5 μg , 4) 25 μg por kanamicina.

6.8 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de la ceftriaxona en medio LB con CFT073.

Para determinar el efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de la ceftriaxona, se realizaron crecimientos en césped con la cepa CFT073 como se muestran en la Fig. 14: A) con 20 mM de NaHCO_3 y B) con 20 mM de NaCl (control), C) con 40 mM de NaHCO_3 y D) con 40 mM de NaCl (control). En cada uno de los crecimientos experimentales se les colocaron sensibilizadores con: 1) 0.02 μg , 2) 0.05 μg , 3) 0.1 μg , 4) 0.2 μg y 5) 0.4 μg de

ceftriaxona para todas las posiciones de las figuras. La actividad potenciadora de 20 y 40 mM de NaHCO_3 con ceftriaxona en medio LB-A1 %, reveló una reducción con menor definición en los halos de inhibición en respuesta al sensidisco con 0.05 μg de ceftriaxona en comparación con el control, especialmente a 40 mM NaHCO_3 (disco 2, Fig. 14-C). En cambio, a concentraciones más altas, i.e. discos 3, 4 y 5 el efecto de reducción del halo de inhibición aparentemente no ocurre, o al menos es mucho menos claro que a 0.05 μg de ceftriaxona, comparado con sus controles B y D, respectivamente (Fig. 14).

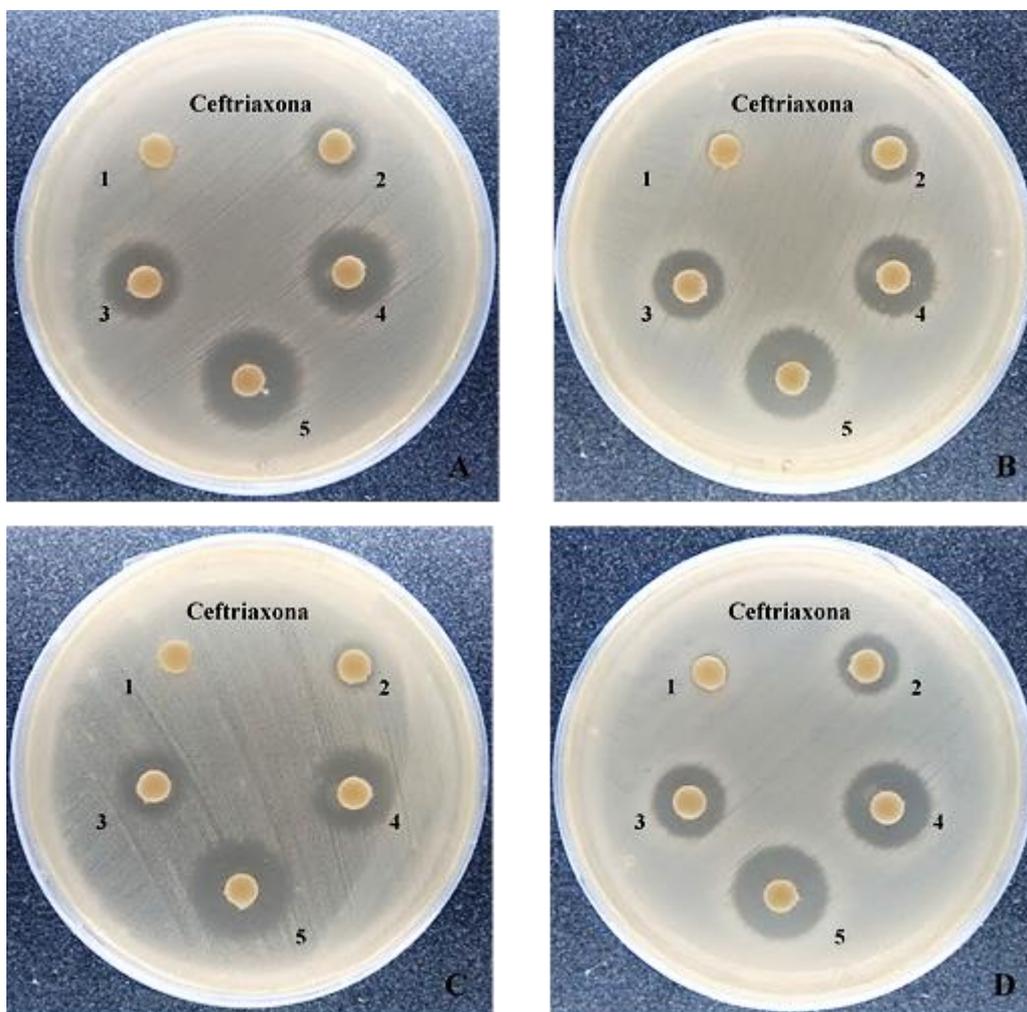


Figura 14. Ceftriaxona. Las figuras A, B, C, y D muestran crecimiento de la cepa CFT073 en medios LB-A1 %. A y C: con 20 y 40 mM de NaHCO_3 disuelto en el medio solido respectivamente, presenta halos de inhibición 1) 0.02 μg , 2) 0.05 μg , 3) 0.1 μg , 4) 0.2 μg y 5) 0.4 μg por ceftriaxona. Los controles B y D: con 20 y 40 mM de NaCl disuelto en el medio solido respectivamente, presenta halos de inhibición 1) 0.02 μg , 2) 0.05 μg , 3) 0.1 μg , 4) 0.2 μg y 5) 0.4 μg por ceftriaxona.

6.9 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de la ampicilina en medio LB con CFT073.

Con la finalidad de averiguar si la respuesta podría depender del tipo de antibiótico β -lactámico se probó el efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de ampicilina, de tal manera que se realizaron crecimientos en césped con la cepa CFT073 en medios LB-A1 % como se muestra en la Fig. 15: A con 20 mM de NaHCO_3 , B con 20 mM NaCl (control), C con 40 mM de NaHCO_3 y D con 40 mM de NaCl (control). En cada uno de los crecimientos experimentales se colocaron sensidiscos con: 1) 2 μg , 2) 4 μg , 3) 5 μg , 4) 8 μg y 5) 10 μg de ampicilina. Las figuras A y C muestran que en presencia de 20 y 40 mM de NaHCO_3 respectivamente; se observa claramente un efecto inverso con una reducción en la inhibición en lugar de un efecto potenciador sobre la ampicilina en presencia de NaHCO_3 , comparado con sus controles B y D (Fig. 15).

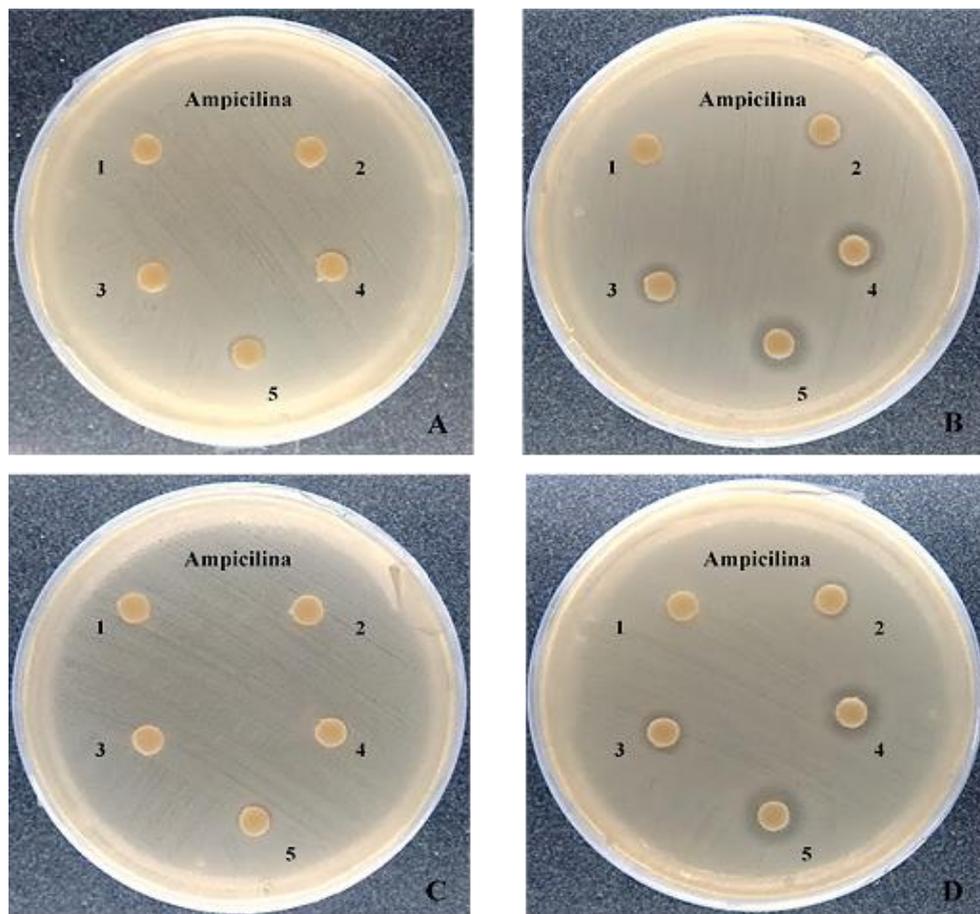
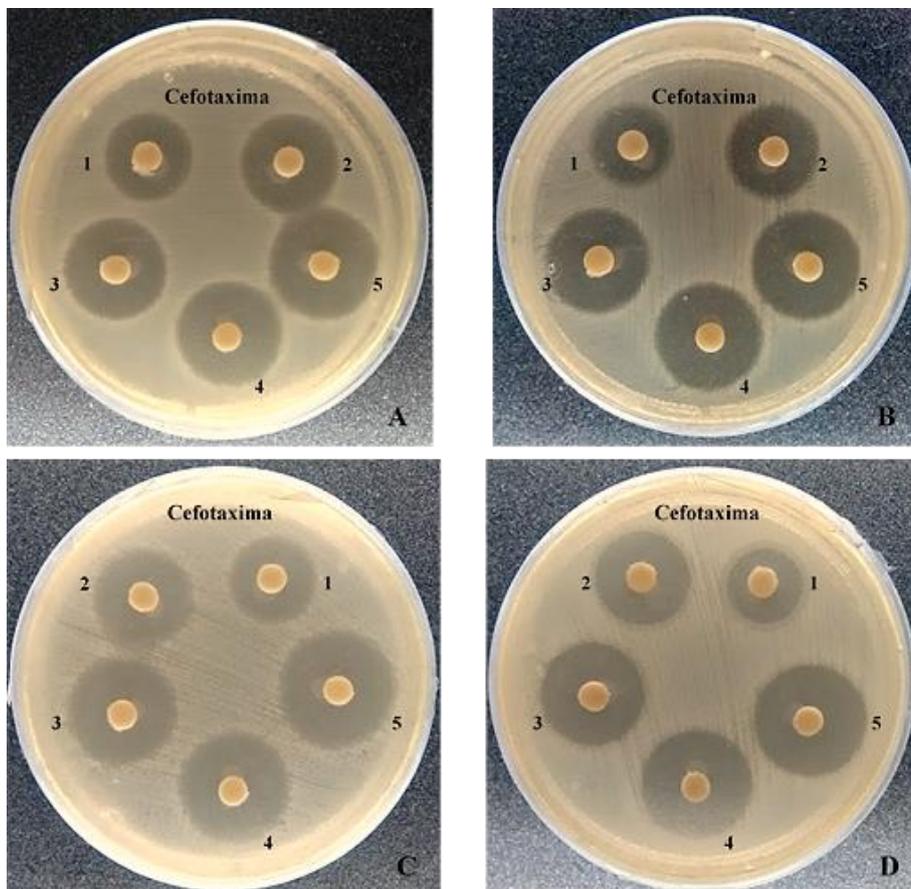


Figura 15. Ampicilina. Las figuras A, B, C, y D muestran crecimiento de la cepa CFT073 en medios LB-A1 %. A y C con 20 y 40 mM de NaHCO_3 disueltos en el medio sólido respectivamente, presentan halos de inhibición 1) 2 μg , 2) 4 μg , 3) 5 μg , 4) 8 μg y 5) 10 μg por ampicilina. Los controles B y D: con 20 y 40 mM de NaCl disueltos en el medio sólido respectivamente, presentan halos de inhibición 1) 2 μg , 2) 4 μg , 3) 5 μg , 4) 8 μg y 5) 10 μg por ampicilina. Cabe destacar que en presencia de NaHCO_3 A y B, se observa claramente un efecto inverso en presencia de ampicilina.

6.10 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de la cefotaxima en medio LB con CFT073.

Para determinar el efecto del NaHCO_3 sobre otro β -lactámico, se ensayó la actividad del NaHCO_3 sobre la cefotaxima. Se realizaron crecimientos en césped con la cepa CFT073 en medios LB-A1 %, como se muestran en la Fig. 16: A con 10 mM de NaHCO_3 , B con 10 mM de NaCl (control), C con 20 mM de NaHCO_3 , D con 20 mM de NaCl (control), E con 30 mM de NaHCO_3 , F con 30 mM de NaCl (control), G con 40 mM de NaHCO_3 y H con 40 mM de NaCl (control). En cada uno de los crecimientos experimentales se colocaron sensidiscos con: 1) 0.1 μg , 2) 0.2 μg , 3) 0.3 μg , 4) 0.4 μg y 5) 0.5 μg de cefotaxima. Las figuras A, C, E y G presentaron crecimiento microbiano con concentración creciente de NaHCO_3 ; en este análisis de inhibición de crecimiento por difusión en disco aparentemente se apreció que no existió un efecto inhibitorio de la actividad de la cefotaxima como el observado para ampicilina (Fig. 15). No obstante, las características de los halos de inhibición en presencia de NaHCO_3 indicaron tal vez un ligero efecto inhibitorio ya que la zona de inhibición en ausencia de NaHCO_3 tuvo en general bordes mejor definidos (Fig. 16).



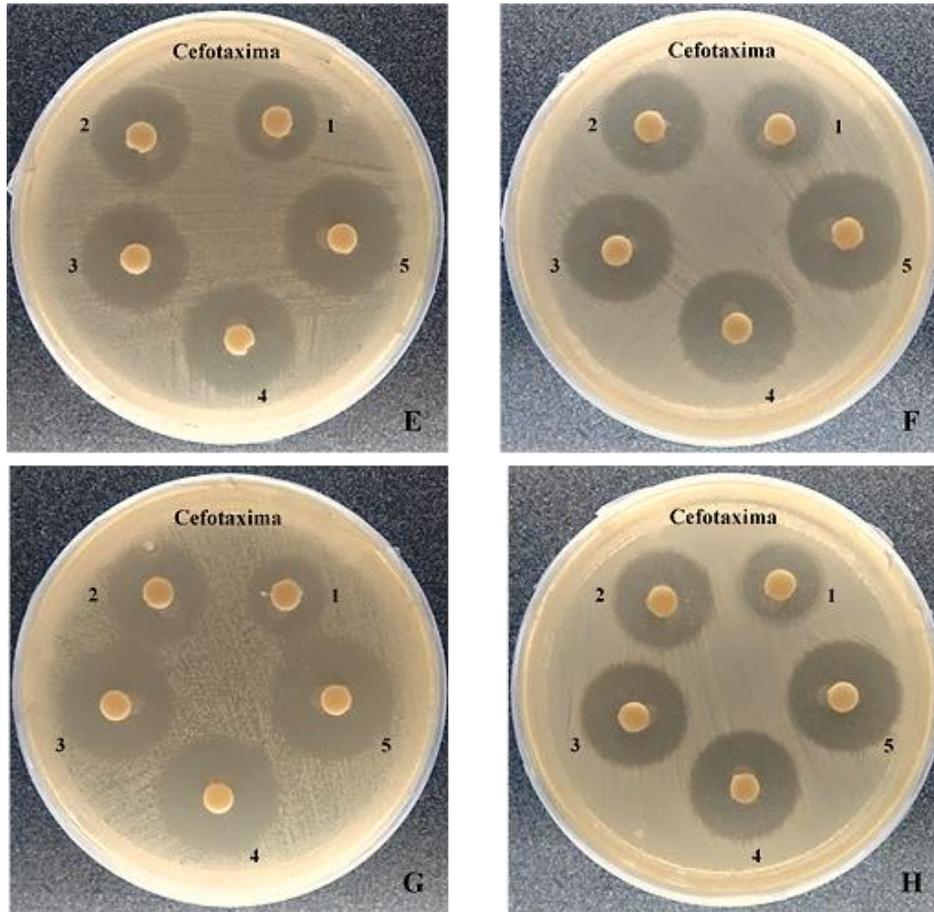


Figura 16. Cefotaxima. Las figuras A, B, C, D, E, F, G y H muestra crecimiento de la cepa CFT073 en medios LB-A1 %. A, C, E y G con 10, 20 30 y 40 mM de NaHCO_3 disuelto en el medio solido respectivamente, presentan halos de inhibición 1) 0.1 μg , 2) 0.2 μg , 3) 0.3 μg , 4) 0.4 μg y 5) 0.5 μg por cefotaxima. Los controles B, D, F y H con 10, 20 30 y 40 mM de NaCl disuelto en el medio solido respectivamente, presentan halos de inhibición 1) 0.1 μg , 2) 0.2 μg , 3) 0.3 μg , 4) 0.4 μg y 5) 0.5 μg por cefotaxima. En presencia del NaHCO_3 no se observa efecto potenciador con cefotaxima.

6.11 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de la bencilpenicilina en Mto con CFT073.

También se determinó el efecto del NaHCO_3 sobre la actividad del β -lactámico bencilpenicilina y se realizaron crecimientos en césped sobre Mto-A1 % como se muestran en las Fig. 17: A con 10 mM de NaHCO_3 y B con 10 mM de NaCl (control). En cada uno de los crecimientos experimentales se colocaron sensidiscos con: 1) 20.6 μg , 2) 31.0 μg , 3) 41.3 μg , 4) 51.7 μg y 5) 103.4 μg de bencilpenicilina. En presencia de 10 mM NaHCO_3 ; aparentemente no se observa efecto potenciador sobre la bencilpenicilina y quizá incluso podría haber una ligera potenciación del efecto de inhibición del

crecimiento a una sola de las concentraciones (disco 5, Fig. 15). Dejando ese sólo resultado aparte, lo fundamental del experimento es que demuestra que no hay inhibición del efecto del antibiótico por el NaHCO_3 (Fig. 17).

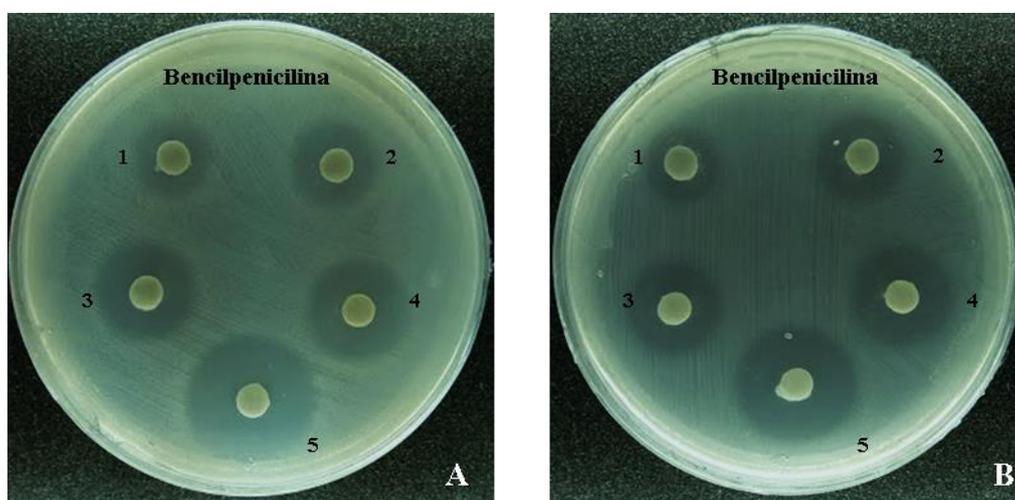


Figura 17. Bencilpenicilina. Las imágenes A y B muestran crecimiento de la cepa CFT073 en Mto-A1 %. A: con 10 mM de NaHCO_3 disuelto en el medio sólido, presentan halos de inhibición 1) 20.6 μg , 2) 31.0 μg , 3) 41.3 μg , 4) 51.7 μg y 5) 103.4 μg por bencilpenicilina. Control B: con 10 mM de NaCl disuelto en el medio sólido, presentan halos de inhibición 1) 20.6 μg , 2) 31.0 μg , 3) 41.3 μg , 4) 51.7 μg y 5) 103.4 μg por bencilpenicilina.

6.12 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad del ciprofloxacino en cultivos líquidos medio LB con CFT073.

Para evaluar el efecto potenciador del NaHCO_3 sobre la ciprofloxacino con una técnica más precisa, se crecieron cultivos líquidos en medio LB y se evaluaron los crecimientos por densidad óptica (DO_{600}). La implementación del método también fue un necesario antecedente experimental para aplicar la técnica de conteo de CFU. Inicialmente en esta vía experimental se caracterizó el efecto del NaHCO_3 sobre la actividad de la ciprofloxacino mediante el análisis de inhibición de crecimiento por difusión en disco (Fig. 11-C). Se realizaron crecimientos por cuadruplicado de la cepa CFT073 en 1 mL de medio LB a concentraciones 0, 5, 10, 20, 40 y 80 mM de NaHCO_3 con 0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de la ciprofloxacino y sin ciprofloxacino (placa control). Las medias de las DO_{600} que se obtuvieron de los crecimientos experimentales se muestran en el eje de las ordenadas (Fig. 18). El efecto propio inhibitorio del NaHCO_3 (línea azul) muestra inhibición gradual

en el crecimiento de la cepa CFT073 conforme incrementan las concentraciones, hasta alcanzar aproximadamente el 29 % de inhibición a 80 mM de NaHCO₃. Se determinó también el efecto potenciador del NaHCO₃ con 0.004 µg/mL de ciprofloxacino mostrando su efectividad a 5, 10 y 20 mM (línea roja), hasta alcanzar aproximadamente el 26 % de inhibición a 20 mM de NaHCO₃. No así para las concentraciones 40 y 80 mM de NaHCO₃-ciprofloxacino.

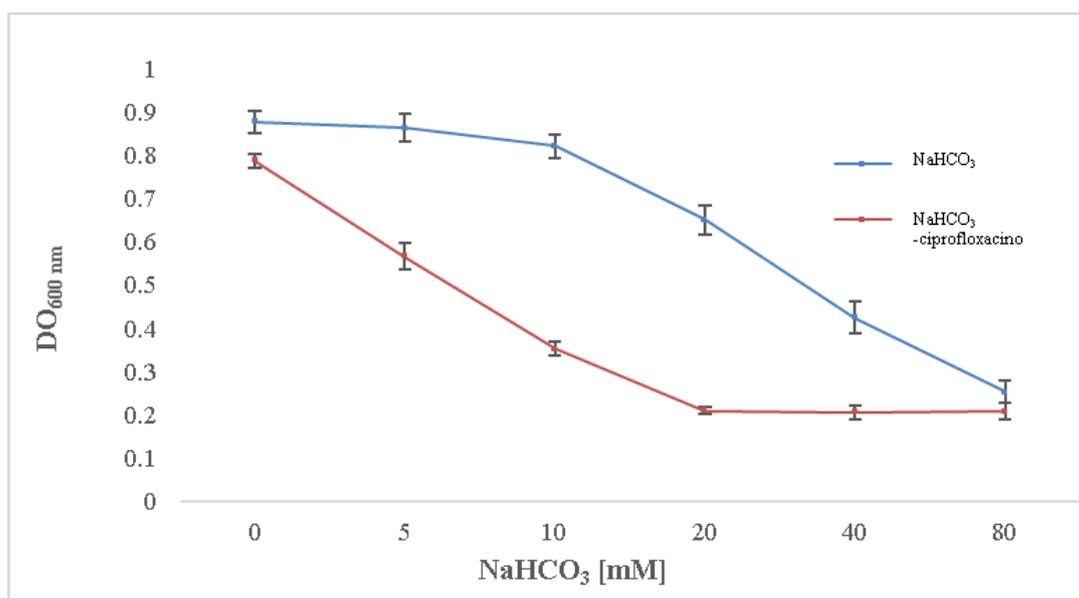


Figura 18. Efecto del NaHCO₃-Ciprofloxacino sobre el crecimiento de UPEC en medio LB. Se muestra crecimiento de 18 a 24 h de la cepa CFT073 NaHCO₃ solo (-----) y NaHCO₃ + 0.004 µg/mL de ciprofloxacino (-----) en medio LB. En el eje de las ordenadas se muestran las medias de seis determinaciones derivadas de dos experimentos independientes llevados a cabo simultáneamente con tetraplicado de cada condición ($n = 4$, promedio + desviación estándar de cada uno), también se muestran en las abscisas las concentraciones variables de NaHCO₃. La significancia estadística (two-tailed t test) muestra valor de $p \leq 0.001$.

6.13 Detección de unidades formadoras de colonias (CFU) CFT073.

La determinación del efecto de NaHCO₃ sobre la actividad de la ciprofloxacino en cultivos líquidos (DO₆₀₀) con medio LB es paso previo para la realización de la detección de CFU. Se realizó el CFU del efecto potenciador del NaHCO₃ a las concentraciones mejor efectivas 5, 10 y 20 mM con 0.004 µg/mL ciprofloxacino en medio líquido LB (Fig. 19). Los resultados revelaron claramente un efecto inhibitorio en el crecimiento de

la cepa CFT073 por la acción propia del NaHCO_3 conforme se incrementó la concentración y mejor aún su efecto potenciador mostro inhibición en el número de colonias en actividad potenciadora NaHCO_3 -ciprofloxacino. Este efecto potenciador inhibitorio reveló reproducibilidad de acción eficiente a la concentración 20 mM de NaHCO_3 sobre el crecimiento de la cepa CFT073 con la evaluación de la DO_{600} y cultivos en medio sólido. Cabe destacar que para ser mejor visible y realizar un conteo claro de las CFU, se optimizo la técnica de deposición de la muestra, es decir, que en lugar de depositar la muestra se dispersó linealmente 2.5 cm sobre el medio LB-A1 % lo que corresponden al volumen de superficie que cubren 10 μL correspondientes a cada una de las muestras analizar para el conteo de CFU.

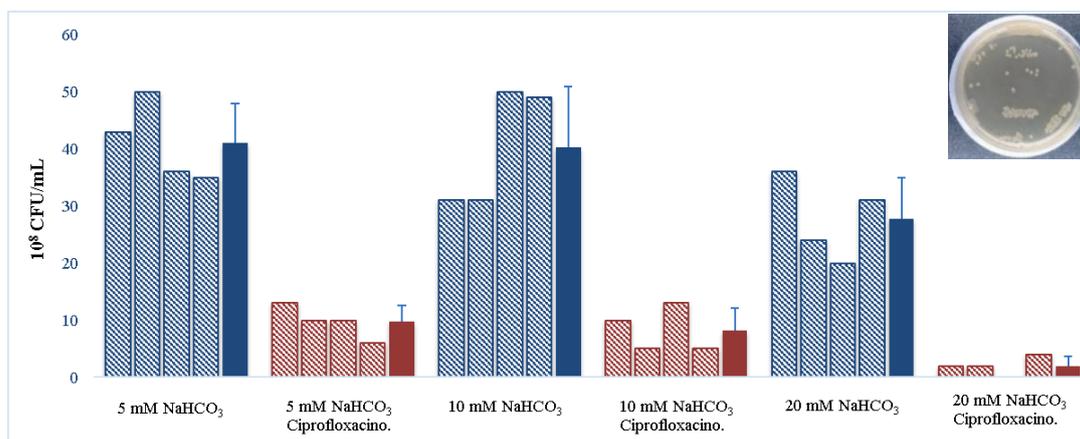


Figura 19. Efecto del NaHCO_3 -ciprofloxacino en CFU. Se muestra el conteo de CFU en medio líquido LB, en el eje de las ordenadas las CFU/mL y en el eje de las abscisas los diferentes grupos experimentales con 5, 10 y 20 mM NaHCO_3 , así como, NaHCO_3 -ciprofloxacino 0.004 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Los resultados reflejan experimentos por cuadruplicado con los valores obtenidos mostrados como barras sin relleno y el promedio de ellos mostrados en las barras con relleno y las desviaciones estándar sobre estas, de los valores promedio (prueba t Student, dos colas) valor de $p \leq 0.001$.

6.14 Efecto del NaHCO_3 sobre la actividad del ciprofloxacino en cultivos líquidos Mto con CFT073.

Se evaluó por DO_{600} el efecto potenciador inhibitorio del NaHCO_3 en actividad sinérgica con la ciprofloxacino mediante cultivos en Mto con la cepa CFT073. Se realizaron crecimientos por cuadruplicado de la cepa CFT073 en 1 mL de Mto a concentraciones 0,

5, 10, 20, 40 y 80 mM de NaHCO₃ con 0.004 µg/mL de ciprofloxacino y sin ciprofloxacino (placa control). Las medias de las DO₆₀₀ de los crecimientos experimentales se muestran en el eje de las ordenadas (Fig. 20). Los resultados del efecto del NaHCO₃ (línea azul) y del efecto sinérgico NaHCO₃-ciprofloxacino (línea roja) en cultivos con Mto mostraron comportamientos semejantes hasta 20 mM de NaHCO₃ sin evidencia de efecto potenciador, sin embargo, al incrementar a 40 y 80 mM de NaHCO₃ mostraron comportamientos semejantes que más pareció ser un efecto inverso inhibitorio. Estos resultados no concuerdan con lo encontrado ni en medio LB por CFU o por difusión en disco en medio LB y en medio sólido Mto. Se considera necesario realizar de nueva cuenta estos experimentos, con el uso de controles, particularmente tratando de detectar alguna interferencia con la determinación de la densidad óptica. Eso último por la observación de que en ausencia de NaHCO₃ todos los cultivos debieron un valor cercano de DO₆₀₀ y ello no fue así (0 mM, Fig. 20). Igualmente, para estos experimentos es posible que en lugar de mediciones de densidad óptica se confirme el resultado por CFU, que es una técnica más robusta y confiable.

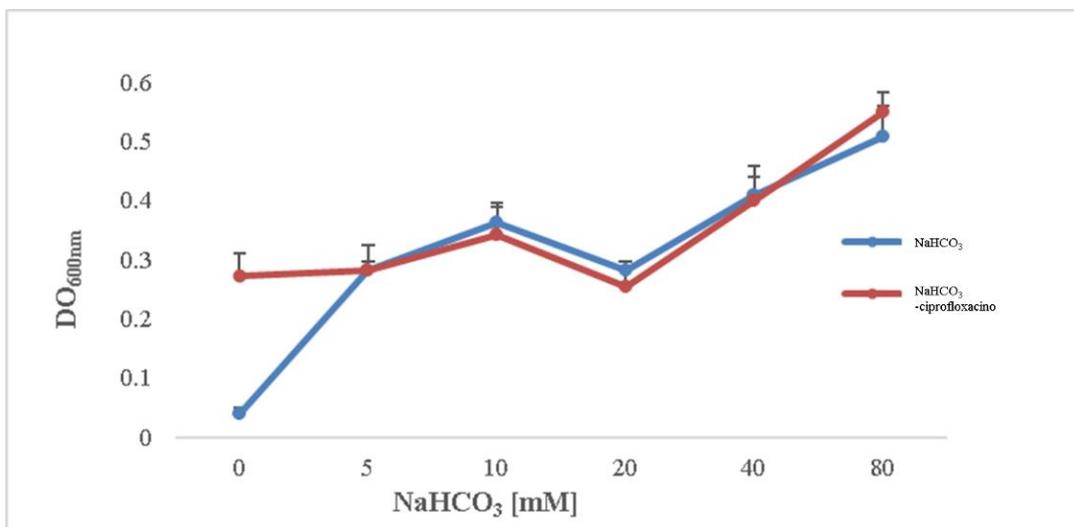


Figura 20. Efecto del NaHCO₃-Ciprofloxacino sobre el crecimiento de UPEC en medio Mto. Se muestra crecimiento de 18 a 24 h de la cepa CFT073 NaHCO₃ solo (-----) y NaHCO₃ + 0.004 µg/mL de ciprofloxacino (-----) en medio Mto. En el eje de las ordenadas se muestran las medias de seis determinaciones derivadas de dos experimentos independientes llevados a cabo simultáneamente con tetraplicado de cada condición ($n = 4$, promedio + desviación estándar de cada uno), también se muestran en las abscisas las concentraciones variables de NaHCO₃. La significancia estadística (two-tailed t test) muestra valor de $p \leq 0.001$.

7. DISCUSIÓN.

Los experimentos con la cepa modelo *E. coli* uropatógena CFT073 fueron conducentes al objetivo final bajo condiciones experimentales previas a un sistema *in vivo*. Se simuló una IVUs en medio estándar LB y en medio Mto^{46 y 47}, el cual cumple las condiciones fisiológicas de la orina humana normal. De tal manera, que *in vitro* permita el uso del NaHCO₃ para vislumbrar su acción en actividad potenciadora con antibióticos de la disposición y condiciones experimentales que permiten evidenciar que *in vitro* se tiene resultados adecuados permitiendo considerar a futuro la posible implementación en clínica como tratamiento de IVUs.

El Mto es un medio de laboratorio que ofrece ventajas importantes en la consistencia de sus componentes, fácil preparación y estabilidad química en comparación con otros medios de orina alternativos que involucran métodos previos de normalización, como lo es el uso de orina humana fresca o pool de muestras. De tal manera que el Mto resultó ser un método adecuado de experimentación que evita la variación y ajuste de la composición química como es dilución/concentración acorde para algunos constituyentes importantes como de la creatinina, densidad específica, pH y alta osmolaridad, esta debido a la presencia de sales y urea⁴⁶. La orina es un flujo dinámico con cambios de composición subjetivos por la dieta, edad, sexo, estado de salud y enfermedades. La propuesta del uso experimental de la composición del Mto fue omitir componentes químicamente indefinidos que pudieran afectar la reproducibilidad de los resultados, el crecimiento microbiano, una probable interacción de algunos componentes químicos con el NaHCO₃, los antibióticos en evaluación o incluso que interfieran con la actividad potenciadora entre el NaHCO₃-antibiótico. Se implementó una modificación a la composición del Mto, suprimiendo el ácido úrico de la fórmula original, esta modificación no provocó efecto adverso sobre el crecimiento de la cepa CFT073, respuesta a los antibióticos o la actividad del NaHCO₃ en cultivos sólidos y líquidos que requieran la formulación Mto. De tal manera que la falta del ácido úrico para fines de las evaluaciones experimentales no representó mayor problema o limitación alguna. Los resultados de la formulación Mto revelaron equivalencias y validez en las respuestas al someterlos a diferentes condiciones experimentales con la cepa CFT073, incluso en comparación con otra cepa modelo enteropatógena *E. coli* E2348/69 y los experimentos comparando en medio estándar LB con el Mto de respuesta de la cepa CFT073, lo que denota la utilidad de la composición

del Mto para el proyecto de investigación e importancia para aplicaciones experimentales posteriores y consecutivas con otras cepas Gram negativas, e incluso para crecimiento de cepas Gram positivas, que para estas se suplementa al Mto con 0.2 % (v/v) de extracto de levadura⁴⁷. También se implementó la exposición esparcida del NaHCO₃ sobre los medios estándar LB y Mto, a fin de evitar la posible descomposición del NaHCO₃ por la temperatura alta de fusión en el momento de la gelificación. La exposición esparcida del NaHCO₃ mostró reproducibilidad, facilidad para la utilización del NaHCO₃, incluso una versatilidad en la utilización de concentraciones experimentales según las requeridas (Fig. 10). Se consideró que todas las modificaciones mostraron ser un método asequible experimental que permitió evaluar desde los efectos propios del NaHCO₃, hasta su efecto en diferentes concentraciones como potenciador de antibióticos. Así mismo, el NaHCO₃ permitirá ampliar expeditamente el estudio del efecto sobre otros antibióticos y otras cepas patógenas Gram positivas y Gram negativas que típicamente causan infecciones del tracto urinario, por ejemplo, *Pseudomonas sp* y *Streptococcus agalactiae*.

Respecto a la respuesta de los antibióticos probados en esta etapa, en contraste con la potenciación de kanamicina y ciprofloxacino (Fig. 11) en Mto se encontró una clara actividad potenciadora con estos antibióticos que al aumentar las concentraciones del NaHCO₃, los halos inhibitorios aumentan y se observan mejor definidos. Cabe destacar que en medios sólidos LB y Mto utilizando la técnica de difusión en disco a 10 y 20 mM de NaHCO₃ proporcionó mejores resultados del efecto potenciador. Se encontró que en la cepa UPEC CFT073 y utilizando Mto por difusión en disco el NaHCO₃ no favoreció el efecto potenciador sobre trimetoprim-sulfametoxazol en Mto (Fig. 12) y LB (datos no mostrados) o de la nitrofurantoina en medio LB y Mto (Fig. 13), esta última habiendo sido probada en forma de suspensión. Aquí cabe señalar que, al no tener acceso al antibiótico nitrofurantoina de forma pura para estos experimentos, se utilizó una suspensión de jarabe comercial pediátrico (Macrofantina infantil 25 mg/5 mL). De tal manera que se evaluaría entonces la formulación precisa que recibe el paciente y el efecto del NaHCO₃ reflejará la condición real durante el tratamiento. La opción inicial del uso de la Macrofantina no representó una desventaja en este ensayo por lo que el abordaje se podría aplicar incluso en otros casos. La realización de ensayos de inhibición de crecimiento por difusión en disco probó el efecto de la Macrofantina en medio LB y Mto, la comparación a una concentración 10 mM de NaHCO₃ demostró una falta de efecto potenciador y quizá aún un efecto de reducción de halo de inhibición, especialmente en

Mto a una concentración de 50 μg (disco 2, panel C, Fig. 13). Independientemente de este efecto no potenciador del NaHCO_3 los halos de inhibición de la Macrodantina en Mto fueron notoriamente más extensos que en medio LB, sugiriendo que el antibiótico tiene menor efecto sobre la bacteria cuando se crece en medio nutritivo rico.

La inhibición de crecimiento por difusión en disco fue un paso importante para la decisión de experimentos subsecuentes, debido a que nos refleja o no la actividad potenciadora del NaHCO_3 , incluso la utilidad de una concentración diferente de NaHCO_3 o del antibiótico en estudio más adecuada a nuestros ensayos. En vista de la falta de un efecto potenciador del NaHCO_3 sobre trimetoprim-sulfametoxazol y la nitrofurantoína en Mto sobre la cepa UPEC CFT073, se determinó no explorar más la utilidad del NaHCO_3 en combinación con esos antibióticos.

NaHCO_3 ha mostrado actividad potenciadora en medio LB y Mto con la cepa UPEC CFT073. Estudios precedentes mediante el uso de β -lactámicos en actividad potenciadora del efecto antibiótico con NaHCO_3 han mostrado una actividad inversa en los halos donde debería existir inhibición en el crecimiento microbiano. De tal manera que es importante profundizar el estudio del uso del NaHCO_3 para determinar el efecto diferencial y los posibles alcances del NaHCO_3 como potenciador de antibióticos o el efecto contrario inhibitorio, donde particularmente la actividad con los β -lactámicos como la ceftriaxona (Fig. 14) en medio nutritivo LB con la cepa UPEC CFT073 a 20 y 40 mM de NaHCO_3 pareciera mostrar que no existe una fuerte reducción en los halos de inhibición especialmente a 40 mM de NaHCO_3 , donde se observó que el halo de inhibición es menos claro y que concuerdan con lo obtenido previamente con la cepa EPEC E2348/69 en medio LB donde se estudió el efecto de los β -lactámicos ceftriaxona y ampicilina así como kanamicina y ciprofloxacino¹¹. La importancia de esta investigación fue determinar el efecto diferencial del NaHCO_3 con los antibióticos a disposición y más aún en vista de posibles efectos inversos del NaHCO_3 con antibióticos de uso en el tratamiento de IVUs. Será particularmente importante evaluar posteriormente la respuesta de cepas uropatógenicas en Mto, por ejemplo, comprobar si hay un efecto inverso por el NaHCO_3 sobre la ceftriaxona con la cepa UPEC CFT073. En este sentido, llamó la atención el efecto del NaHCO_3 sobre la actividad del antibiótico relacionado, la ampicilina, en medio LB con la cepa UPEC CFT073 que mostró un efecto inverso al reducir la actividad de diferentes concentraciones de la ampicilina a 20 y 40 mM de

NaHCO₃ (Fig. 15). Estos resultados con la cepa UPEC CFT073 de efecto inverso concuerdan con lo previamente reportado del efecto con la cepa EPEC E2348/69, lo que indica que probablemente el efecto no es propio al tipo de microorganismo, sino más bien corresponde al efecto inverso que provoca el NaHCO₃ sobre la actividad del β-lactámico, en este caso de la ampicilina. Será interesante e importante evaluar en estudios posteriores si existe este mismo fenómeno con Mto a diferentes concentraciones de NaHCO₃, incluso con otros tipos de microorganismos, preferentemente confirmando los resultados por conteo de unidades formadoras de colonias (CFU).

Para probar el efecto del NaHCO₃ sobre otros β-lactámicos, se realizaron experimentos equivalentes en medio LB con cefotaxima (Fig. 16). En el análisis de inhibición de crecimiento por difusión en disco en estos primeros experimentos no se observó efecto potenciador de cefotaxima y difícilmente se pudo establecer una clara diferencia, aún en dirección de un efecto inhibitorio del NaHCO₃ en medio LB. Al considerar que para otros antibióticos como la ampicilina las mejores respuestas se observaron cuando los halos de inhibición eran pequeños y hacer más visible el efecto, es probable que se deba explorar el efecto del NaHCO₃ a concentraciones menores de la cefotaxima. Entonces parece que podría ser útil investigar una posible potenciación, o un efecto inverso, del NaHCO₃ sobre la cefotaxima en un rango más bajo de concentraciones y tanto en medio LB como en Mto, por difusión en disco y por medio la técnica de CFU.

La bencilpenicilina es otro β-lactámico del que se evaluó su efecto en presencia de 10 mM de NaHCO₃ en Mto (Fig. 17). El análisis de inhibición de crecimiento por difusión en disco en Mto con la cepa UPEC CFT073, aparentemente no mostró diferencia o efecto potenciador de la bencilpenicilina a una sola concentración de NaHCO₃. Sin embargo, al igual que para la cefotaxima, pudiera valer la pena explorar si existe un efecto potenciador o inverso del NaHCO₃ a otras concentraciones y en medio Mto. No obstante, dado que la bencilpenicilina es probablemente uno de los antibióticos menos utilizados en la clínica, su análisis fue diferido, al considerar la utilidad práctica de los resultados.

Por otro lado, los datos en la evaluación del efecto NaHCO₃-ciprofloxacino por medición de la DO₆₀₀ en medio líquido LB y por medio de la técnica de CFU fortalecen la hipótesis del efecto potenciador del NaHCO₃ sobre el crecimiento de la cepa CFT073. En medio líquido LB, el efecto propio del NaHCO₃ inhibe gradualmente el crecimiento de la cepa

CFT073 causando aproximadamente el 29 % de inhibición a 80 mM de NaHCO₃. Además, el efecto potenciador del NaHCO₃ con la concentración sub-inhibitoria de 0.004 µg/mL de ciprofloxacino efectivamente mostro su actividad potenciadora a concentraciones 5, 10 y hasta alcanzar aproximadamente el 26 % de inhibición con 20 mM de NaHCO₃ (Fig. 18). Cabe mencionar que a las concentraciones 40 y 80 mM de NaHCO₃ en cultivos líquidos con medio LB el efecto potenciador por el NaHCO₃ sobre la ciprofloxacino esencialmente se fue perdiendo. Este comportamiento paradójico pareciera ser un Eagle-like effect, que obedece a la perdida efectiva de un antibiótico por un alta o baja concentración⁴⁸. El Eagle-like effect previamente fue reportado^{1 y 49} en cultivos líquidos con la cepa enteropatogénica *E. coli* E2348/69 con kanamicina y gentamicina y la potenciación del NaHCO₃. Estos resultados fueron equivalentes con lo obtenido en ensayos del efecto que causa el NaHCO₃-ciprofloxacino a concentraciones mayores sobre la cepa UPEC CFT073 (datos no mostrados).

El conteo de unidades formadoras de colonias, un método elegante que se utilizó para la determinación cuantitativa del efecto de la actividad potenciadora del NaHCO₃ en cultivos líquidos con medio LB, mostro actividad potenciadora en presencia del NaHCO₃ con 0.004 µg/mL ciprofloxacino (Fig. 19). La evidencia de los resultados del efecto NaHCO₃-ciprofloxacino estadísticamente significativos ($p \leq 0.001$.) avala la efectividad y fortalece la hipótesis del efecto potenciador del NaHCO₃ que incluso puede ser gradual en el momento que se modifica la concentración (5, 10 y 20 mM) sobre la actividad del ciprofloxacino y es útil contra el crecimiento de *E. coli* uropatógena CFT073. Así también, su actividad es efectiva para estas concentraciones hasta alcanzar un efecto sinérgico potenciador máximo, de tal manera que los resultados ofrecen concentraciones adecuadas de actividad potenciadora del NaHCO₃-ciprofloxacino *in vitro* contra IVU's inhibiendo el crecimiento de *E. coli* CFT073.

Los resultados en la evaluación del efecto NaHCO₃-ciprofloxacino por medición de la DO₆₀₀ en Mto mostraron comportamientos semejantes sin evidencia de efecto potenciador hasta 20 mM de NaHCO₃; sin embargo, al incrementar la concentración 40 y 80 mM de NaHCO₃ solo y NaHCO₃-ciprofloxacino ambos muestran un efecto inverso inhibitorio lo que pareciera ser un comportamiento paradójico Eagle-like effect (Fig. 20). Será interesante en estudios posteriores investigar un posible efecto potenciador del NaHCO₃ con un rango de concentración sub-inhibitoria menor de la ciprofloxacino que permita

determinar el comportamiento sinérgico, así como determinar si existe un comportamiento paradójico a concentraciones mayores 40 y 80 mM de NaHCO_3 y confirmando los resultados mediante el método de CFU.

A pesar de que el mecanismo de acción del NaHCO_3 es desconocido valdrá la pena explorar su posible uso en la práctica clínica. Tomando en cuenta que el NaHCO_3 por sí mismo inhibe crecimiento microbiano² la implementación de su uso no está restringido a IVUs, además de ser potenciador de antibióticos¹, será también posible explorar su implementación y evaluar los alcances en otro tipo de infecciones incluso en resistencia microbiana, es aquí donde el NaHCO_3 puede jugar un papel importante en contrarrestar para disminuir la infección o potenciar el efecto antibiótico del tratamiento. El uso del NaHCO_3 podría ayudar a reducir la dosis del antibiótico y también al mismo tiempo que podría ayudar a disminuir los efectos adversos secundarios del fármaco en cuestión, por mencionar algunos, los aminoglucósidos: gentamicina y kanamicina o las fluoroquinolonas como la ciprofloxacino.

8. CONCLUSIÓN.

- En este trabajo de investigación se definió que el NaHCO_3 fue capaz de potenciar el efecto del ciprofloxacino por la técnica de difusión en disco, en medio nutritivo estándar LB y en Mto, contra la cepa de *E. coli* uropatogénica CFT073.
- En el presente trabajo se observó que el NaHCO_3 tiene un efecto potenciador sobre el ciprofloxacino y no así para los β -lactámicos ceftriaxona, ampicilina, cefotaxima y bencilpenicilina, dichas evaluaciones realizadas sobre la cepa de *E. coli* uropatogénica CFT073.
- Por otra parte, no se observó efecto potenciador del NaHCO_3 con los antibióticos trimetoprim-sulfametoxazol y nitrofurantoína.
- El NaHCO_3 mostró un efecto inverso de la actividad antibiótica de la ampicilina y generalmente en la misma dirección con los otros β -lactámicos probados. Aunque los resultados sugieren que en algunos casos la respuesta podría depender parcialmente de la concentración probada de los antibióticos, se consideró que los resultados globales no indican una potenciación de β -lactámicos por el NaHCO_3 .
- El uso del Mto modificado y de una cepa propia de IVUs, demostró un efecto potenciador del NaHCO_3 sobre ciprofloxacino en estas condiciones cercanas a las naturales permite sugerir un potencial del NaHCO_3 para su posible uso en la clínica en el tratamiento IVUs.

PERSPECTIVAS

- Será interesante investigar si concentraciones inferiores a las evaluadas con los β -lactámicos generan un efecto inverso inhibitorio en combinación con el NaHCO_3 incluso en medios líquidos LB y Mto.
- En investigaciones posteriores será interesante seguir explorando *in vitro* el efecto potenciador del NaHCO_3 con otros antibióticos, así mismo con otros microorganismos patógenos que afectan las vías urinarias, tales como, *Klebsiella pneumoniae*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Candida spp*
- También será importante realizar evaluaciones *in vivo* en un modelo murino de infección de vías urinarias evaluando al NaHCO_3 en combinación con antibióticos que muestren actividad potenciadora.

9. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.

1. Gutiérrez-Huante M, Martínez H, Bustamante VH, Puente JL & Sánchez J (2015). Bicarbonate enhances the *in vitro* antibiotic activity of kanamycin in *Escherichia coli*. *Letters in Applied Microbiology* 60:440-446.
2. Corral LG, Post LS & Montville TJ. (1988) Antimicrobial activity of sodium bicarbonate. *Journal of Food Science*, 53: 981–982.
3. Letscher-Bru V, Obszynsk, CM, Samsoen M, Sabou M, Waller J, & Candolfi E. (2013). Antifungal activity of sodium bicarbonate against fungal agents causing superficial infections. *Mycopathologia*, 175: 153-158.
4. Xie C, Tang X, Xu W, Diao R, Cai Z & Chan HC (2010) A host defense mechanism involving CFTR-mediated bicarbonate secretion in bacterial prostatitis. *PloS one* 5 (12), e15255.
5. Yang, J., Dogovski, C., Hocking, D., Tauschek, M., Perugini, M., & Robins-Browne, R. M. (2009). Bicarbonate-mediated stimulation of RegA, the global virulence regulator from *Citrobacter rodentium*. *Journal of Molecular Biology* 394: 591-599.
6. Abe H., Tatsuno, I., Tobe T., Okutani A., & Sasakawa C. (2002). Bicarbonate ion stimulates the expression of locus of enterocyte effacement-encoded genes in enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *Infection and immunity*, 70: 3500-3509.
7. Cobaxin, M., Martínez, H., Ayala, G., Holmgren, J., Sjöling, Å., & Sánchez, J. (2014). Cholera toxin expression by El Tor *Vibrio cholerae* in shallow culture growth conditions. *Microbial Pathogenesis* 66: 5-13.
8. Thomson, J. J. & Withey, J. H. (2014). Bicarbonate increases binding affinity of *Vibrio cholerae* ToxT to virulence gene promoters. *Journal of Bacteriology*, 196: 3872-3880.
9. Levin, L. R., & Buck, J. (2015). Physiological Roles of Acid-Base Sensors. *Annual Review of Physiology* 77: 347-362.
10. Chow, J. W. (2000). Aminoglycoside resistance in enterococci. *Clinical Infectious Diseases*, 31(2), 586-589.
11. Martínez-Duncker ME, Gutiérrez-Huante M & Sánchez J. (2015) Bicarbonate has varied effect on the *in vitro* activity of antibiotics in *Escherichia coli*. **Poster** presented at: 55th Interscience Conference on Antimicrobial Agents and Chemotherapy, September 17-21, 2015, San Diego, California, USA.
12. Stamm, W. E., & Norrby, S. R. (2001). Urinary tract infections: disease panorama and challenges. *Journal of infectious diseases*, 183 (Supplement 1), S1-S4.

13. Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature Reviews Microbiology*, *13*(5), 269-284.
14. Molina LJ & Manjarrez HA (2015) Infección de vías urinarias-*Escherichia coli*. Departamento de Salud Pública, Facultad de Medicina, UNAM. (<http://www.facmed.unam.mx/deptos/microbiologia/bacteriologia/enfermedades-vias-urinarias.html>).
15. Luo, C., Hu, G. Q., & Zhu, H. (2009). Genome reannotation of *Escherichia coli* CFT073 with new insights into virulence. *BMC genomics*, *10* (1), 1.
16. Floyd, R. V., Upton, M., Hultgren, S. J., Wray, S., Burdyga, T. V., & Winstanley, C. (2012). *Escherichia coli*–Mediated Impairment of Ureteric Contractility Is Uropathogenic *E. coli* Specific. *Journal of Infectious Diseases*, *206*(10), 1589-1596.
17. Toval, F., Köhler, C.D., Vogel, U., Wagenlehner, F., Mellmann, A., Fruth, A., Schmidt, M.A., Karch, H., Bielaszewska, M. & Dobrindt, U. (2014). Characterization of *Escherichia coli* isolates from hospital inpatients or outpatients with urinary tract infection. *Journal of Clinical Microbiology*, *52*: 407-418.
18. Ragnarsdóttir, B., Lutay, N., Grönberg-Hernandez, J., Köves, B., & Svanborg, C. (2011). Genetics of innate immunity and UTI susceptibility. *Nature Reviews Urology*, *8*(8), 449.
19. Hayashi, F., Smith, K. D., Ozinsky, A., Hawn, T. R., Eugene, C. Y., Goodlett, D. R., ... & Aderem, A. (2001). The innate immune response to bacterial flagellin is mediated by Toll-like receptor 5. *Nature*, *410*(6832), 1099.
20. Weber, T., Charusanti, P., Musiol-Kroll, E. M., Jiang, X., Tong, Y., Kim, H. U., & Lee, S. Y. (2015). Metabolic engineering of antibiotic factories: new tools for antibiotic production in actinomycetes. *Trends in biotechnology*, *33*(1), 15-26.
21. Campbell, E. A., Korzheva, N., Mustaev, A., Murakami, K., Nair, S., Goldfarb, A., & Darst, S. A. (2001). Structural mechanism for rifampicin inhibition of bacterial RNA polymerase. *Cell*, *104*(6), 901-912.
22. Qi, Q., Preston, G. M., & MacLean, R. C. (2014). Linking system-wide impacts of RNA polymerase mutations to the fitness cost of rifampin resistance in *Pseudomonas aeruginosa*. *Mbio*, *5*(6), e01562-14.
23. Shah, N. S., Lin, S. G., Barry, P. M., Cheng, Y. N., Schecter, G., & Desmond, E. (2016, May). Clinical Impact on Tuberculosis Treatment Outcomes of Discordance Between Molecular and Growth-Based Assays for Rifampin Resistance, California 2003–2013. In *Open Forum Infectious Diseases* (Vol. 3, No. 3, p. ofw150). Oxford University Press.

24. Van Heijenoort, J. (2001). Formation of the glycan chains in the synthesis of bacterial peptidoglycan. *Glycobiology*, 11(3), 25R-36R.
25. Mustaev, A., Malik, M., Zhao, X., Kurepina, N., Luan, G., Oppedard, L. M., & Drlica, K. (2014). Fluoroquinolone-Gyrase-DNA complexes two modes of drug binding. *Journal of Biological Chemistry*, 289(18), 12300-12312.
26. Drlica, K., Malik, M., Kerns, R. J., & Zhao, X. (2008). Quinolone-mediated bacterial death. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 52(2), 385-392.
27. Pape, T., Wintermeyer, W., & Rodnina, M. V. (2000). Conformational switch in the decoding region of 16S rRNA during aminoacyl-tRNA selection on the ribosome. *Nature Structural & Molecular Biology*, 7(2), 104-107.
28. Croxen, M. A., & Finlay, B. B. (2010). Molecular mechanisms of Escherichia coli pathogenicity. *Nature Reviews Microbiology*, 8(1), 26.
29. Tenaillon, O., Skurnik, D., Picard, B., & Denamur, E. (2010). The population genetics of commensal Escherichia coli. *Nature Reviews Microbiology*, 8(3), 207.
30. Iguchi, A., Thomson, N. R., Ogura, Y., Saunders, D., Ooka, T., Henderson, I. R., ... & Kenny, B. (2009). Complete genome sequence and comparative genome analysis of enteropathogenic *Escherichia coli* O127: H6 strain E2348/69. *Journal of bacteriology*, 191(1), 347-354.
31. Bhatt, S., Romeo, T., & Kalman, D. (2011). Honing the message: post-transcriptional and post-translational control in attaching and effacing pathogens. *Trends in microbiology*, 19(5), 217-224.
32. Hobson, N., Price, N. L., Ward, J. D., & Raivio, T. L. (2008). Generation of a restriction minus enteropathogenic *Escherichia coli* E2348/69 strain that is efficiently transformed with large, low copy plasmids. *BMC microbiology*, 8 (1), 1.
33. Hernandez, R. T., Elias, W. P., Vieira, M. A., & Gomes, T. A. (2009). An overview of atypical enteropathogenic *Escherichia coli*. *FEMS microbiology letters*, 297(2), 137-149.
34. Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Disease-a-month*, 49(2), 53-70.
35. Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics*, 28(1), 1-13.
36. Wagenlehner, F. M., Tandogdu, Z., & Johansen, T. E. B. (2017). An update on classification and management of urosepsis. *Current opinion in urology*, 27(2), 133-137.

37. Ronald, A. (2003). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *Disease-a-month*, 49(2), 71-82.
38. Mobley, H. L., Green, D. M., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., Chippendale, G. R., Lockatell, C. V., ... & Warren, J. W. (1990). Pyelonephritogenic *Escherichia coli* and killing of cultured human renal proximal tubular epithelial cells: role of hemolysin in some strains. *Infection and immunity*, 58(5), 1281-1289.
39. Manges, A. R., Johnson, J. R., Foxman, B., O'Bryan, T. T., Fullerton, K. E., & Riley, L. W. (2001). Widespread distribution of urinary tract infections caused by a multidrug-resistant *Escherichia coli* clonal group. *New England journal of medicine*, 345(14), 1007-1013.
40. Ulett, G. C., Totsika, M., Schaale, K., Carey, A. J., Sweet, M. J., & Schembri, M. A. (2013). Uropathogenic *Escherichia coli* virulence and innate immune responses during urinary tract infection. *Current opinion in microbiology*, 16(1), 100-107.
41. Nielubowicz, G. R., & Mobley, H. L. (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(8), 430.
42. Cegelski, L., Marshall, G. R., Eldridge, G. R., & Hultgren, S. J. (2008). The biology and future prospects of antivirulence therapies. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 17-27.
43. Marrs, C. F., Zhang, L., & Foxman, B. (2005). *Escherichia coli* mediated urinary tract infections: are there distinct uropathogenic *E. coli* (UPEC) pathotypes?. *FEMS microbiology letters*, 252(2), 183-190.
44. Welch, R. A., Burland, V., Plunkett, G. I. I. I., Redford, P., Roesch, P., Rasko, D., & Stroud, D. (2002). Extensive mosaic structure revealed by the complete genome sequence of uropathogenic *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 99(26), 17020-17024.
45. Martínez, H., Buhse, T., Rivera, M., Parmananda, P., Ayala, G., & Sánchez, J. (2012). Endogenous CO₂ may inhibit bacterial growth and induce virulence gene expression in enteropathogenic *Escherichia coli*. *Microbial pathogenesis*, 53(1), 49-55.
46. Ipe, D. S., Horton, E., & Ulett, G. C. (2016). The basics of bacteriuria: Strategies of microbes for persistence in urine. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 6.
47. Ipe, D. S., & Ulett, G. C. (2016). Evaluation of the in vitro growth of urinary tract infection-causing gram-negative and gram-positive bacteria in a proposed synthetic human urine (SHU) medium. *Journal of microbiological methods*, 127, 164-171.

48. Eagle, H., & Musselman, A. D. (1948). The rate of bactericidal action of penicillin in vitro as a function of its concentration, and its paradoxically reduced activity at high concentrations against certain organisms. *Journal of Experimental Medicine*, 88(1), 99-131.
49. Gutiérrez-Huante M, (2015). Tesis de Maestría. Efecto de NaHCO₃ sobre la actividad de algunos aminoglucósidos. Maestría en Medicina Molecular. Coordinación de Posgrado e Investigación. Facultad de Medicina, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, México.

10. ANEXOS.

Fórmulas químicas de los antibióticos ensayados.

