

TESIS DE MAESTRÍA, PEDECIBA- Biología

Evaluación del papel de distintos factores bacterianos en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis* uropatogénicos

Lic. Victoria Iribarnegaray

Tutor: Dra. Paola Scavone

Co-tutor: Dr. Pablo Zunino



iibce

INSTITUTO DE INVESTIGACIONES BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

AGRADECIMIENTOS

A Paola, no solo por ser mi directora de tesis sino porque encontré una persona maravillosa que siempre me ha apoyado en todo, tanto en la investigación como en la vida!!! Por su dedicación incondicional durante todos estos años, por hacer todo mas divertido y principalmente por contagiarme de esas ganas de hacer esto que tanto me gusta.

A Pablo, en primer lugar por haberme dado la oportunidad de estar en el Laboratorio, por ser mi orientador y por todos sus consejos.

A mis padres, que sin ellos nada de esto seria posible.. por su apoyo incondicional y por confiar siempre en mí...

A Florentina, mi hermanita, por compartir todo esto conmigo por estar ahí siempre y escucharme en mis momentos de locura!!!

A todos mis compañeros del laboratorio, cada uno de ellos colaboro para que esta tesis se hiciera posible. Principalmente a Majo, Anita y Dani por los mates compartidos y todas esas charlas de oficina.

A Paula una gran amiga que me soporto todo este tiempos con mis momentos tristes y alegres!!

A mis todas mis grandes amigas Silv, Naty, Vane, Pame, Bea, Yuli, Vale, Flaca y Flo, por estar siempre y apoyarme en todo. Las quiero mucho!!!

A Gii y Nia, grandes amigas que me ha dado la vida...

*A Maty, por estar a mi lado durante todo este tiempo, por alentarme todos los días y confiar en mí.
Gracias!*

AGRADECIMENTOS	2
RESUMEN	5
INTRODUCCIÓN	6
Los biofilms microbianos	6
Estructura y desarrollo de los biofilms	7
(i) aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie	8
(ii) adhesión irreversible y comienzo de producción de exopolisacáridos	8
(iii) formación de microcolonias	9
(iv) maduración del biofilm	10
v) dispersión celular	11
Regulación en la formación del biofilm	11
Biofilms: una estrategia de supervivencia	12
Relevancia médica de los biofilms	13
Infecciones en el Tracto Urinario asociadas a catéteres	13
Agente etiológico de ITU-C: Proteus mirabilis	14
Factores de virulencia	15
Técnicas para el estudio de biofilms	20
Hipótesis	21
Objetivo General	21
Objetivos Específicos	21
MATERIALES Y MÉTODOS	22
Colección de cepas mutantes	22
Condiciones de cultivo	27
Caracterización fenotípica	28
Evaluación del crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes	28
Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana	28
Determinación de la movilidad swarming	29
Determinación de la movilidad swimming	30
Análisis de correlación entre las características fenotípicas	31
Análisis comparativo de la expresión de los genes implicados en la formación de biofilms en la cepa salvaje P. mirabilis en forma planctónica y formando biofilm	32
Cultivo de la cepa salvaje P. mirabilis (Pr2921) en condiciones de biofilm y planctónicas	32
Extracción de ARN y obtención de ADN complementario (ADNc)	32
Diseño de cebadores	34
Con el objetivo de corroborar si los cebadores estaban correctamente diseñados, en primer lugar se realizó un PCR en tiempo real con una muestra ADNc de la cepa salvaje Pr2921 y se corroboró que la temperatura de melting de cada producto coincidiera con lo esperado (ANEXO).	34
PCR en tiempo real	34
Caracterización de la formación y la bioarquitectura del biofilm en la colección de mutantes	36

Formación de biofilms in vitro	36
Inmunofluorescencia in situ de los biofilms	36
Adquisición de imágenes en el Microscopio Laser Confocal	37
Procesamiento de imágenes	37
Deconvolución	37
Segmentación	38
Cálculo de parámetros y generación de modelos 3D de biofilms	38
Caracterización fenotípica	40
Curva de crecimiento en medio líquido LB	40
Determinación de la movilidad swarming	40
Determinación de la movilidad swimming	42
Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana	44
Evaluación de la capacidad de migración sobre secciones de catéteres	45
Correlación entre las variables fenotípicas	47
Análisis comparativo de la expresión de los genes de adhesión, metabolismo del hierro y transporte, en la cepa salvaje de P. mirabilis en el biofilm comparado con su contraparte planctónica.	50
Genes potencialmente vinculados a la adhesión	50
Genes del grupo transportador	51
Genes del grupo metabolismo del hierro	52
Caracterización de la formación y la bioarquitectura del biofilm en la colección de mutantes	53
Procesamiento de imágenes obtenidas por MLC	55
Análisis de la arquitectura de los biofilms de las cepas mutantes	55
Metabolismo del hierro	56
Transportadores	62
Adhesión	66
DISCUSIÓN	72
Genes fimbriales y el desarrollo del biofilm	72
Migración sobre catéteres de uso comercial	75
Transportadores y el desarrollo del biofilm	76
Metabolismo del hierro y el desarrollo del biofilm	78
Conclusiones y Perspectivas	80
BIBLIOGRAFÍA	82
ANEXO I	92

RESUMEN

Los microorganismos se encuentran en el ambiente formando comunidades sésiles rodeadas de una matriz extracelular de producción propia, denominadas biofilms. Los biofilms son abundantes en la naturaleza y de gran importancia desde el punto de vista clínico, ambiental así como también en la industria. En la clínica, la formación de biofilms conlleva al desarrollo de varias infecciones, incluyendo las infecciones en el tracto urinario asociadas a cateterización (ITU-C). Uno de los problemas y complicaciones de las ITU-C es el bloqueo e incrustación de los catéteres, experimentados por más del 50 % de los pacientes cateterizados por largos períodos. El agente etiológico en la mayoría de las ITU-C es *Proteus mirabilis*, bacteria Gram negativa móvil asociada comúnmente a ITU complicadas. El bloqueo de los catéteres se da por la habilidad de *P. mirabilis* de formar densos biofilms cristalinos sobre superficies abióticas. El biofilm generado sobre la superficie del catéter es más resistente a agentes antimicrobianos, defensas del hospedero y a condiciones de estrés ambiental favoreciendo el desarrollo de una infección persistente y de difícil tratamiento. Diversos factores están involucrados en las distintas etapas de formación del biofilm, tales como moléculas de *quorum sensing*, adhesinas y fimbrias entre otros. Se asume que el proceso de formación de biofilms involucra la participación de numerosos factores bacterianos. Es por esto, que el objetivo del presente trabajo, consistió en la caracterización de la formación de biofilms de *P. mirabilis* uropatógeno. Para ello se empleó una colección de cepas mutantes con alteraciones en la formación de biofilm y se caracterizó su importancia en el desarrollo del biofilm de *P. mirabilis*. Los genes identificados fueron categorizados en grupos según su función. De esta forma se identificó un primer grupo de cepas mutantes relacionadas con los sistemas de adquisición de hierro un segundo grupo vinculado a adhesión, y un tercer grupo vinculado al transporte. La colección de cepas fue caracterizada fenotípicamente, genotípicamente y morfológicamente con el fin de establecer el papel de los distintos genes identificados durante el desarrollo del biofilm en *P. mirabilis*.

INTRODUCCIÓN

Los biofilms microbianos

Los microorganismos a lo largo de la historia se han descrito y observado como una forma de vida unicelular. Tradicionalmente han sido estudiados mediante el cultivo en medios líquidos, empleados para el estudio de muchas actividades bacterianas como la patogénesis y la fisiología microbiana entre otras. Pero la realidad es que el crecimiento planctónico puro es poco común, ya que las bacterias frecuentemente se desarrollan en complejas comunidades. Estas complejas comunidades han sido denominadas, biofilms microbianos y son por excelencia el estilo de vida adoptado por la mayoría de los microorganismos. Aunque es un término empleado recientemente sabemos por parte de la literatura científica que el fenotipo se ha observado y descrito durante varios cientos de años. El primer ejemplo clásico fue la observación de las bacterias agregadas en la "capa de los dientes" por Anthony van Leeuwenhoek, publicado en 1684, a las cuales llamo "*animalículos*".

Actualmente, los biofilms se definen como el agregado de una o más especies microbianas, las cuales se encuentran adheridas a una superficie biótica o abiótica pero también entre ellas. Estas comunidades microbianas están incluidas e interconectadas con una sustancia orgánica denominada matriz extracelular polimérica (EPS), compuesta por agua, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros biopolímeros (Costerton et al., 1999; Shunmugaperumal, 2010; Rabin et al., 2015). A través de las interacciones intercelulares, tanto sociales como físicas, junto con las propiedades de la matriz extracelular hacen que el estilo de vida de los biofilms sea claramente distinto al de las células bacterianas de vida libre o planctónicas.

Los biofilms constituyen el estilo de vida más ampliamente distribuido y exitoso en la tierra (Hall-Stoodley et al., 2009) dado que, participan en procesos del ciclo biogeoquímico de la mayoría de los elementos como el agua, el suelo, sedimentos (Ehrlich & Newman, 1996) y el subsuelo (Meckenstock et al., 2015). Dentro de las aplicaciones en las cuales se han empleado biofilms se encuentran la filtración de agua potable, degradación de agua residuales y residuos sólidos, como también la producción de biocombustible (Halan et al., 2012). También se ha observado que los biofilms son capaces de cre-

cer en ambientes en condiciones extremas, como en los drenajes de minas ácidas, en los que se ha demostrado que los biofilms pueden conducir una variedad de procesos como fotosíntesis, fijación de nitrógeno y fermentación (O'Toole et al., 2000).

Los biofilms también tienen manifestaciones patogénicas que son de gran relevancia en el contexto médico y clínico. Con frecuencia se han descrito como perjudiciales para la salud dado que se han observado asociados a dispositivos médicos e implantes incluyendo catéteres, así como asociados a enfermedades crónicas (Costerton et al., 1999; Marić & Vraneš, 2007; Vasudevan et al., 2014; Shirtliff & Leid, 2009). La importancia que revisitan los biofilms a nivel clínico es principalmente por las poblaciones que conforman el biofilm, ya que presentan resistencia a antibióticos (Vasudevan et al., 2014), reducción de la tasa de crecimiento, secreción de diferentes moléculas superficiales y factores de virulencia (Hall- Stoodley & Stoodley, 2009). A su vez facilitan la transferencia de genes entre las bacterias que conforman el biofilm lo que puede conducir a un aumento en el número de cepas virulentas (Lewis, 2001).

Estructura y desarrollo de los biofilms

El desarrollo de los biofilms en la mayoría de los microorganismos ocurre en diferentes etapas donde los microorganismos unicelulares se unen a una superficie sólida para formar una comunidad embebida por una matriz extracelular. Los microorganismos representan menos del 10% de la masa seca, mientras que la matriz puede representar más del 90% del biofilm. Hay una variedad de mecanismos por los cuales diferentes especies microbianas pueden entrar en contacto más cercano con una superficie, unirse firmemente a ella, promover las interacciones célula-célula y crecer como una estructura compleja (Breyers & Ratner, 2004; Verstraeten et al., 2008). Actualmente se describen cinco etapas generales para la formación de un biofilm; (i) aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie, (ii) adhesión irreversible y comienzo de producción de exopolisacáridos (EPS) (iii) formación de microcolonias, (iv) maduración del biofilm; (v) dispersión celular (Costerton et al., 2003; O'Toole et al., 2000) (Fig. 1).

Varios autores han descrito que tanto los factores genéticos como los ambientales contribuyen a la formación del biofilm microbiano (Maric & Vranes, 2007).



Figura 1: Etapas de la formación de biofilms; (i) adhesión; (ii) adhesión irreversible; (iii) formación de microcolonias; (iv) maduración y (v) dispersión del biofilm. Adaptado de Monroe, 2007

(i) aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie

La primer etapa en la formación de los biofilms comienza con la aproximación y sentido por parte de las bacterias a la superficie y/o ambiente donde se van a establecer. Esta aproximación es diferente en cada tipo de microorganismos, el cual es capaz de reconocer diferentes señales específicas para su establecimiento siendo de esta forma un proceso muy complejo que depende de muchas variables, como el tipo de sustrato y las propiedades de la superficie de las células bacterianas (O' Toole et al., 2000).

La transición entre las células planctónicas y las células sésiles es un proceso en el cual están implicados varios factores, en 1997 Palmer & White determinaron que el primer contacto entre las superficies y las bacterias incluía interacciones entre las células- superficie y célula-célula. La adhesión de las bacterias a las superficies esta mediada por factores no específicos como tensión superficial, hidrofobicidad y fuerzas electrostáticas (Darouiche, 2001), y factores específicos que incluyen varias estructuras de la superficie celular bacteriana como fimbrias, flagelos, proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos y EPS (Donlan & Costerton, 2002).

El proceso de adhesión inicial suele ser reversible, permitiendo de esta forma que las células puedan desprenderse de la superficie en caso de que cambien las condiciones (Nadell et al., 2008).

(ii) adhesión irreversible y comienzo de producción de exopolisacáridos

Luego del primer contacto de las células a la superficie, algunas de ellas comienzan a adherirse de forma irreversible a la superficie.

Una de las características distintivas de los biofilms, es la producción de una matriz extracelular, la cual comienza a producirse a mayor escala en esta segunda etapa de adhesión. La función de la matriz es proporcionar adhesión entre células bacterianas, permitiendo así la formación de un biofilm de varias capas. A través de pruebas *in vitro* se ha observado que la matriz del biofilm está constituida de una multitud de componentes de diferente naturaleza química, incluyendo exopolisacáridos (EPS), proteínas, ADN, y otros polímeros (Joo & Otto, 2012). La mayor parte de la biomasa del biofilm comprende EPS hidratado en lugar de células microbianas (Flemming & Wingender, 2010). Los EPS están altamente hidratados ya que pueden incorporar moléculas de agua en su estructura por medio de puentes de hidrógeno, y pueden estar asociados a iones metálicos, cationes divalentes y macromoléculas como ADN, proteínas y lípidos, constituyendo en conjunto la matriz extracelular del biofilm (Donlan, 2002). La auto-organización de las moléculas de EPS en la matriz se basa en interacciones inter-moleculares entre los componentes del EPS, lo cual determina las propiedades mecánicas de la matriz y la actividad fisiológica de los organismos en el biofilm (Flemming & Wingender, 2010). La composición de la matriz extracelular dentro del biofilm es diversa y consistente con esto tiene una función que puede ser variable en las diversas especies microbianas (Flemming & Wingender, 2010). Los componentes de la matriz cumplen además, una función protectora para los microorganismos que conforman el biofilm. Por ejemplo, la hidrofobina bacteriana BslA forma una “*capa impermeable*” resistente al agua sobre el biofilm de *Bacillus subtilis*, y la celulosa producida por los biofilms de *Escherichia coli* aumenta la resistencia de la comunidad a la desecación (Gualdi et al., 2008; Kobayashi & Iwano, 2012; Hopley et al., 2013). Otros componentes de la matriz facilitan las interacciones entre las bacterias y las células huésped: por ejemplo, las fibras *curli* producidas por *E. coli* forman un componente estructural del biofilm (Chapman et al., 2002; Serra et al., 2013), que también son necesarias para la adhesión de las células de *E. coli* a una variedad de proteínas de las células del hospedero, relevante para el inicio de la infección (Olsen et al., 1989; Sjobring et al., 1994; Nasr et al., 1996).

(iii) formación de microcolonias

La etapa final del establecimiento del biofilm es la colonización de la superficie. Las bacterias unidas se multiplican formando microcolonias las cuales son consideradas como la unidad básica organizacional de un biofilm (Costerton et al., 1994). La colonización primaria de una bacteria a la superficie generalmente sirve como influencia para reclu-

tar y atraer más bacterias para continuar colonizando esa misma superficie (Lindsay & Holy, 2006). Además de una interacción estable con la superficie, se requiere un crecimiento clonal de los microorganismos e interacciones bacteria-bacteria para formar y mantener las microcolonias (Reisner et al., 2003). A medida que aumentan en número, se incrementa la producción de EPS de tal modo que las bacterias unidas formando microcolonias representan el 10 % del volumen total mientras que el restante 90 % corresponde a la matriz de EPS (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

En trabajos previos se ha observado que las fimbrias tipo IV en *Pseudomonas aeruginosa*, las cuales son responsables de la motilidad tipo *twitching*, tienen múltiples efectos sobre la formación de biofilm, uno de los cuales es permitir la formación de microcolonias en algunas condiciones (O'Toole & Kolter, 1998; Heydorn et al., 2002).

En *Bacillus subtilis*, el factor de transcripción Spo0A regula la transición de las células adheridas a la superficie en microcolonias (Hamon & Lazizzera, 2001). El factor Spo0A es activo en condiciones de baja concentración de nutrientes y alta densidad celular (Sonenshein, 2000), lo que sugiere que la formación de biofilm por *B. subtilis* se produce bajo estas condiciones.

(iv) maduración del biofilm

El contacto superficial desencadena respuestas que conducen a cambios en la expresión génica, factores reguladores que favorecen el estado sésil, como los implicados en la formación de la matriz extracelular (Prigent-Combaret & Lejeune, 1999; Inagaki et al., 2005; Beloin et al., 2008; Bhomkar et al., 2010).

En la etapa de maduración del biofilm, la producción de EPS es mayor y esto hace que el biofilm pueda formar diferentes arquitecturas. La producción de EPS conlleva a que los biofilms maduros no se presenten como monocapas homogéneas de células microbianas sobre una superficie (Donlan & Costerton, 2002), sino que por el contrario, son capaces de desarrollar una arquitectura compleja, que comúnmente incluye microcolonias en forma de "hongo", rodeadas de matriz extracelular y separadas entre sí por canales que permiten la circulación de fluidos (O'Toole et al., 2000).

Uno de los principales contribuyentes de la matriz bacteriana son los polisacáridos (Wingender et al., 2001). Se ha observado que mutantes que no pueden sintetizar exopolisacáridos tampoco son capaces de formar biofilms maduros (Danese et al., 2000; Cormen et al., 2009).

Las células que conforman el biofilm maduro presentan características fisiológicas totalmente diferentes al de su contraparte planctónica. Esto está dado principalmente por las interacciones bacteria-bacteria dentro del biofilm lo cual genera un ambiente heterogéneo tanto físico como químico.

v) *dispersión celular*

Finalmente, algunas bacterias de la matriz del biofilm se liberan del mismo para poder colonizar nuevas superficies, cerrando el proceso de desarrollo de formación del biofilm. Esto se debe a que las células residentes del biofilm comienzan a tener poco acceso a los nutrientes y además comienzan a acumularse desechos tóxicos, su microambiente se hace cada vez más desfavorable (Karatan & Watnick, 2009). La etapa de dispersión del biofilm es la menos conocida, pero varios estudios han sugerido que la dispersión es un proceso activo, el cual está altamente regulado por las poblaciones de células unidas (Parsek & Fuqua, 2004). Sí está claro que hay por lo menos tres elementos necesarios para una dispersión eficiente. El primero de ellos es la capacidad de las bacterias de poder censar la acumulación de señales de estrés en el biofilm y a su vez cambiar el perfil de expresión de sus genes para la dispersión. Segundo, la señal debe traspasar el medio ambiente limitado por la difusión. Por último, el complejo extracelular de la matriz debe permitir el pasaje de las bacterias al ambiente (Hall-Stoodley et al., 2004). El conjunto de señales de censado como alta concentración celular así como una serie de mecanismos celulares de señalización (*quorum sensing*) estarían involucrados en la dispersión del biofilm.

Regulación en la formación del biofilm

Numerosas evidencias experimentales sugieren que el proceso de formación del biofilm está regulado por una compleja cascada de reguladores. Varios estudios han revelado un tipo de regulador implicado en la transición entre las células móviles y el biofilm: una pequeña molécula citoplasmática reguladora *guanosín-monofosfato-cíclico* (di-GMPc) (Römling et al., 2005; Römling & Amikam, 2006; Wolfe & Visick, 2008; Hengge, 2009). Los niveles elevados en di-GMPc están asociados a la inhibición de la movilidad y activación de la formación del biofilm.

Por otra parte, el sistema de *quorum sensing* (QS) ha sido relacionado con los procesos que están involucrados en la formación y desarrollo del biofilm. El *quorum sensing* es un mecanismo de regulación dependiente de la acumulación en el medio ambiente de una molécula señal, autoinductor, que permite a la bacteria medir la densidad de población existente. En bacterias gram-negativas el autoinductor es principalmente acil homoseri-na lactona, mientras que en bacterias gram-positivas el autoinductor es de naturaleza peptídica. Cuando se acumula en el medio una suficiente cantidad del autoinductor este induce la expresión de un receptor específico, el cual modifica la expresión de genes, produciendo distintos fenotipos. Un trabajo con *P. aeruginosa* demostró que el proceso de formación del biofilm está regulado por un proceso de “*quorum sensing*” o autoinducción. Davies y colaboradores (1998), encontraron que el sistema de *Las QS* era esencial para la creación de biofilms maduros y diferenciados.

Por otra parte, la inhibición de la motilidad es un acontecimiento esencial en la formación del biofilm quizás porque la motilidad se requiere en etapas tempranas del desarrollo del biofilm y en etapas más tardías en biofilms maduros se requiere inhibida (Tart et al., 2005; Guttenplan et al., 2010).

Biofilms: una estrategia de supervivencia

Dado que los biofilms son el estilo de vida bacteriano dominante, tiene que haber ventajas significativas al vivir en comunidades sésiles en comparación con las células planctónicas flotantes. Una de las ventajas de vivir en una comunidad es la obtención de nutrientes. Bajo condiciones de limitación de nutrientes, aquellos microorganismos que se encuentren en la superficie del biofilm tendrán mejor acceso a él, porque las células del biofilm están metabólicamente más activas en la superficie del biofilm y además tienen más acceso a los nutrientes del medio. Esto ocasiona que las bacterias que se encuentran en la superficie puedan utilizar esta ventaja (Webb et al., 2003). Además, también puede existir una relación comensal entre los miembros de comunidades mixtas en un biofilm en relación con la utilización de nutrientes (Parsek & Fuqua, 2004; Jefferson, 2004).

Por otra parte, la naturaleza de la estructura del biofilm y los atributos fisiológicos de los organismos del biofilm confieren una resistencia inherente a los agentes antimicrobianos, ya sean antibióticos, desinfectantes o germicidas. Varios estudios han revelado las dramáticas diferencias en la susceptibilidad de los organismos planctónicos respecto

a los biofilms frente a los agentes antimicrobianos (Ceri et al., 1999; Billings et al., 2013; Van Acker et al., 2014). Los mecanismos responsables de la resistencia pueden ser uno o más de los siguientes: (i) la penetración tardía del agente antimicrobiano a través de la matriz del biofilm, (ii) la tasa de crecimiento diferencial de las células del biofilm, y (iii) otros cambios fisiológicos debidos al modo de crecimiento de los biofilm.

Relevancia médica de los biofilms

Los biofilms son responsables de muchas infecciones humanas persistentes, incluyendo placa dental, caries, infección periodontal, neumonía por *Pseudomonas* en fibrosis quística, cistitis crónica, endocarditis bacteriana, osteomielitis, y prostatitis crónica. Constituyen un problema serio en válvulas cardíacas artificiales, marcapasos, catéteres urinarios y prótesis ortopédicas las cuales, una vez infectadas, generan infecciones excepcionalmente difíciles de resolver mediante antibióticos (Donlan, 2002; Sanclement et al., 2005; Manning, 2003; Costerton et al., 1999; Costerton, 2001).

Una de las consecuencias más alarmantes de las interacciones sinérgicas entre los microorganismos está asociada con la resistencia a los agentes antimicrobianos (Bennett, 2008). Dentro de los biofilms mixtos, tal resistencia no implica necesariamente la adquisición directa o la transferencia de genes que codifican la resistencia a los antibióticos, sino que se basa en la capacidad de la comunidad para cooperar de tal manera que pueda sobrevivir a la exposición al agente antimicrobiano. Varios estudios han evaluado la susceptibilidad a antibióticos en biofilms de multiespecies contra los biofilms conformados por una única especie, en la mayoría de los casos, el biofilm de especies mixtas fue significativamente más resistente al tratamiento antimicrobiano o desinfección (Whiteley et al., 2001; Leriche et al., 2003; Al-Bakri et al., 2004; Burmolle et al., 2006; Kara et al., 2006).

Infecciones en el Tracto Urinario asociadas a catéteres

El número de infecciones urinarias asociadas al uso de catéteres (ITU-C) aumenta cada año, lo que refleja el hecho de que los catéteres urinarios se encuentran entre los principales implantes más utilizados en el cuerpo humano (Trautner & Darouiche, 2004). Las infecciones del tracto urinario representan más del 40% de las infecciones nosocomiales, encontradas especialmente en pacientes cateterizados (Bryers, 2008). A pesar

del buen manejo aséptico, aproximadamente la mitad de todos los pacientes experimentan bacteriuria en los primeros 10-14 días de cateterización (Stickler & Morris, 1998). El riesgo de infecciones del tracto urinario es significativamente mayor en pacientes con inserciones a largo plazo (de 28 días o más); el porcentaje de catéteres infectados en estos pacientes se aproxima al 100% (Stickler & Morris, 1998).

Agente etiológico de ITU-C: Proteus mirabilis

P. mirabilis es una bacteria Gram negativa de la familia Enterobacteriaceae generalmente encontrado en el tracto gastrointestinal (Jacobsen et al., 2008b). Infecta oportunamente la tracto urinario de grupos de pacientes vulnerables, tales como individuos con tracto urinario anomalías y pacientes con cateterismo a largo plazo (Mobley y Warren, 1987). *P. mirabilis* es capaz de causar infecciones sintomáticas del tracto urinario incluyendo cistitis y pielonefritis y está presente en casos de bacteriuria asintomática, así como también en variedad de infecciones nosocomiales oportunistas, incluyendo las del tracto respiratorio, ojos, oído, nariz, piel, quemaduras, garganta y heridas; también pueden causar gastroenteritis (Rózalski et al., 1997; Matthews et al., 2011; Papazafiro-poulou et al., 2010). Estas infecciones también pueden causar bacteriemia y sepsis. Además, las infecciones por *P. mirabilis* pueden causar la formación de cálculos urinarios (urolitiasis).

P. mirabilis es el principal agente causal de las infecciones urinarias asociadas al catéter (ITU-C). La capacidad de crecer en forma de biofilm parece ser uno de los factores de virulencia más importantes de *P. mirabilis* (Jacobsen et al., 2008). Además es el principal agente de pielonefritis, urolitiasis, prostatitis e ITU-C, causando aproximadamente el 3% de todas las infecciones nosocomiales y hasta el 44% de los ITU-C en Estados Unidos (Jacobsen et al., 2008; O'Hara et al., 2000). En 2006, las ITU en los Estados Unidos fueron la causa de 11 millones de consultas médicas y costaron \$ 3.500 millones de dólares (Nielubowicz & Mobley, 2010). Las ITU-C son las infecciones más frecuentes asociadas con el cuidado de la salud en todo el mundo, representando hasta un 40% de las infecciones adquiridas en los hospitales (Hooton et al., 2010). *P. mirabilis* generalmente no es el primer organismo encontrado en la superficie del catéter, pero es común en la cateterización a largo plazo (Wazait et al., 2003; Stickler et al., 2010). Cuando *P. mirabilis* coloniza un catéter, las células bacterianas se desarrollan en comunidades protegidas conocidas como biofilms. Los biofilms que se forman inicialmente en los catéteres tienden

a ser monomicrobianos, pero rápidamente se vuelven polimicrobianos durante la cateterización a largo plazo, con hasta el 72% de los catéteres siendo colonizados por dos o más especies (Macleod et al., 2007).

Factores de virulencia

Producción de ureasa por *P. mirabilis*

El grupo de genes de ureasa de *P. mirabilis*, que comprende ureRDABCEFG, produce una metaloenzima níquel citoplasmática que está regulada positivamente por el promotor UreR y reprimidos por una proteína asociada a nucleótidos H-NS45-52 (H-NS) (Dattelbaum et al., 2003, Poore y Mobley, 2003, Coker et al. 2000, Mobley et al. 1995, Nicholson et al. 1993, Jones y Mobley, 1988, Jones y Mobley, 1987). La producción de ureasa está estrictamente regulada, como UreR y H-NS, los cuales compiten por la misma región reguladora de ureD. Bajo condiciones como las encontradas en la ITU-C, es decir a temperatura corporal y concentraciones de urea aumentadas, hacen que se reprima H-NS, permitiendo que UreR active la expresión de ureasa (Poore & Mobley, 2003).

La enzima ureasa de *P. mirabilis* está significativamente regulada positivamente (~ 25 veces) sobre la exposición a urea (Stickler et al., 1998, Mobley y Warren, 1987, Mobley 1996). Estudios han demostrado que la ureasa de *P. mirabilis* es altamente activa y capaz de hidrolizar la urea de 6 a 10 veces más rápido que la de la mayoría de las otras especies de bacterias (Mobley & Warren, 1987) Fig. 2.

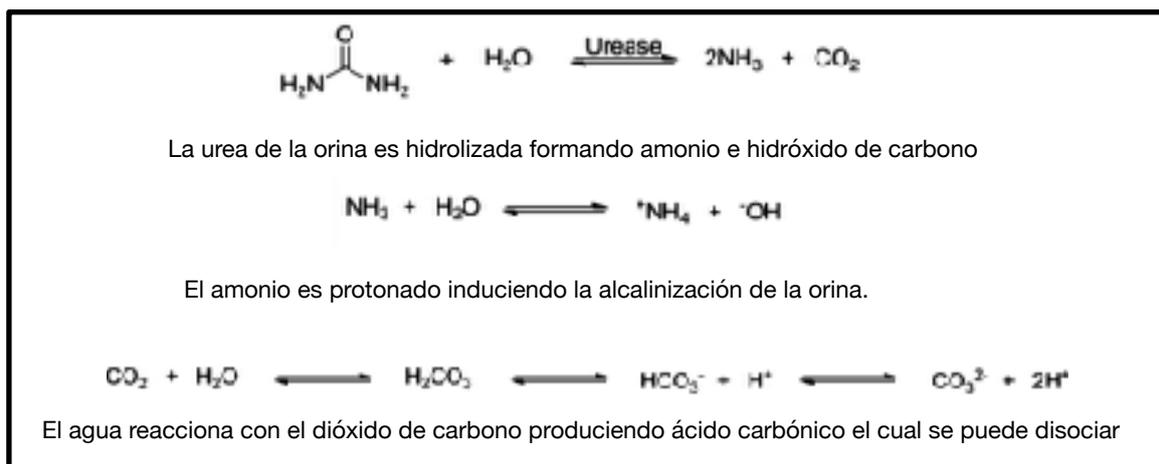


Figura 2: Hidrólisis de la urea: La urea difunde a través de la membrana celular bacteriana y es hidrolizada por la ureasa generando iones de amonio que a su vez aumentan el pH urinario. El dióxido de carbono puede producir ácido carbónico, sin embargo, este ácido débil no contrarresta suficientemente el aumento del pH causado por la liberación de amoníaco.

Una de las principales consecuencias de la hidrólisis de la urea es la producción de cálculos urinarios. Estas piedras pueden bloquear el flujo urinario y causar daño tisular, el tamaño puede llegar a ser bastante grandes, mayor a $> 1 \text{ cm}^2$ (Munns et al., 2010; Chew et al., 2012). Los minerales precipitados pueden mezclarse con bacterias adheridas a un catéter urinario, formando un biofilm cristalino y eventualmente bloqueando el flujo de orina a través del catéter (Stickler, 2008) (Fig. 3).

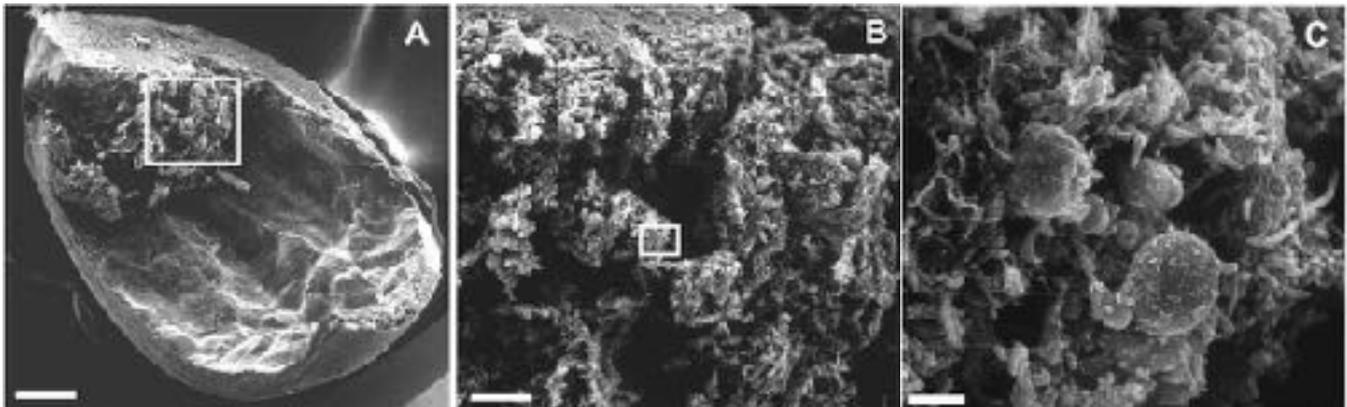


Figura 3: Formación de cálculos por *P. mirabilis* (A) Vejiga experimentalmente infectada de ratón (barra, 500 μm). (B) mayor aumento del área indicada en el panel A (barra: 100 μm). (C) Ampliación del área indicada en el panel B con bacterias individuales visibles (barra: 5 μm). Imagen Schaffer & Pearson, 2015.

Movilidad en *P. mirabilis*

P. mirabilis expresa dos tipos distintos de células móviles, células *swimming* y *swarmer*. En medios líquidos, las células planctónicas de *P. mirabilis* se encuentran en el estado de las células *swimming* y son móviles e independientes entre sí (Belas, 1996).

Una de sus principales características es que presenta un comportamiento multicelular durante la migración denominada *swarming*, observada en medios sólidos, donde se produce una diferenciación desde una forma unicelular vegetativa (1-2 μm), típica de medios líquidos, a una forma multicelular elongada hiperflagelada ($> 80 \mu\text{m}$) denominada *swarmer* (Belas, 1996) (Fig. 4). La movilidad *swarming* es un comportamiento multicelular que se puede separar en al menos 3 etapas distintas, diferenciación, migración y consolidación (Belas, 1996). La migración de la población es un proceso ordenado, y es controlada por los mecanismos de regulación intracelular, provocadas por condiciones

ambientales como el contacto superficial y la inhibición del flagelo, la densidad celular y, potencialmente, la comunicación célula-célula (Rather, 2005).

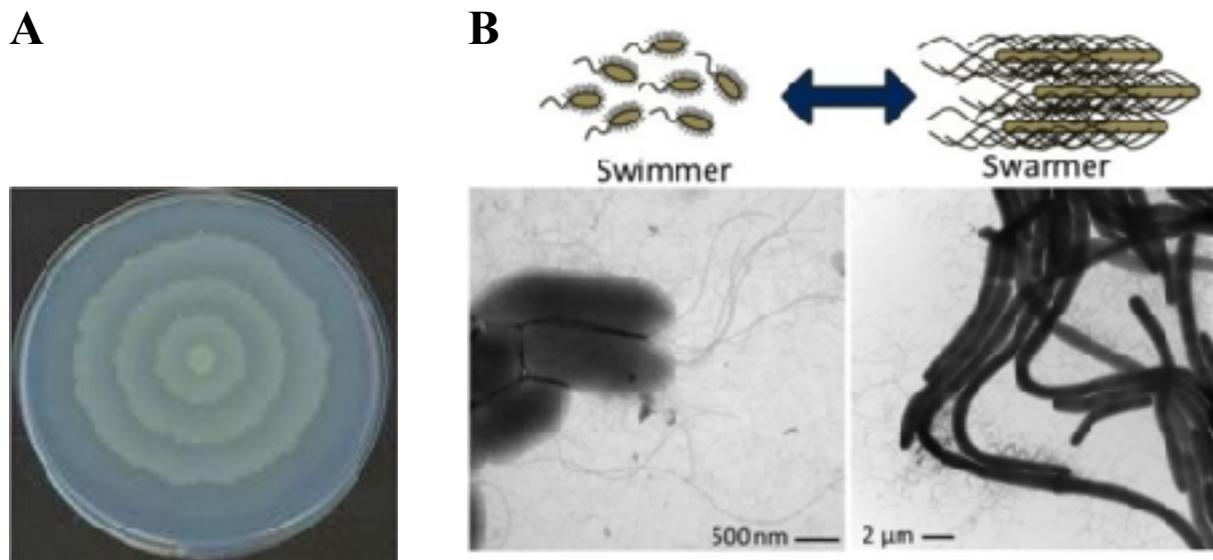


Figura 4: (A) Foto representativa de movilidad *swarming*. (B) Imagen obtenida de Jessica, et al 2015 donde se observa el cambio entre formas de *swimmer* a *swarmer* de *P. mirabilis*. A la izquierda se encuentra una micrografía electrónica de transmisión (MET) de células cultivadas en caldo que muestran flagelos peritricos. A la derecha hay un MET de células de *swarmers* diferenciadas.

La movilidad *swarming* esta controlada por la expresión de diversos genes, Pearson et al. 2010 identificó que 584 genes se expresaban diferencialmente en células *swarmer* cuando se compara con las células *swimming*. Los genes regulados se asociaron con la biosíntesis flagelar, transporte de oligopéptidos y la importación de aminoácidos (Pearson et al. 2010). Otros estudios identificaron genes implicados en la síntesis de la pared celular como el gen *surA* que facilita el plegamiento adecuado de proteínas, y mutantes con una interrupción en este gen fueron incapaces de diferenciarse en células *swarmer*.

Algunos autores han relacionado la movilidad *swarmer* con la capacidad de colonizar el tracto urinario (Allison et al., 1994; Mobley et al., 1996), mientras que otros reportes sugieren que la misma no sería crítica para producir infección (Legnani-Fajardo, 1996; Zunino et al., 1994). Por otro lado, la motilidad *swarming* se ha vinculado con la habilidad del patógeno para colonizar las superficies de los catéteres (Sabbuba et al., 2002; Stickler et al., 1993).

Adhesión mediada por fimbrias

Las fimbrias, o pili, son apéndices bacteriano que cubren el exterior de bacterias gram-negativas como gram-positivas, tienen diversos tamaños y consisten de subunidades repetidas de polipeptidos con una adhesina en el extremo (Proft et al., 2009). *P. mirabilis* es capaz de producir varias clases de fimbrias, la secuenciación del genoma de *P. mirabilis* HI4320 reveló que contiene 17 operones diferentes que codifica para diferentes fimbrias (Pearson et al., 2008). Entre estas se incluyen las fimbrias MR/P (del inglés *mannose-resistant Proteus-like*) (Old et al., 1982), UCA (*uroepithelial cell adhesin*) (Wray et al., 1986), PMF (*P. mirabilis fimbriae*) (Baharani et al., 1993) y ATF (*ambient temperature fimbriae*) (Massad et al., 1996).

Las fimbrias mejor estudiadas son las fimbrias MR/P; este tipo de fimbrias son sintetizadas *in vivo*, son inmunogénicas y han sido vinculadas tanto a la autoagregación como a la formación de biofilms. Así mismo, contribuyen a la virulencia de *P. mirabilis*, estando implicada en la patogénesis y contribuiría con la infección renal por facilitamiento de la colonización del TU (Baharani et al., 1994; Zunino et al 2001)

Un trabajo publicado recientemente por nuestro grupo de investigación observó que tanto las fimbrias (MR/P, UCA, ATF y PMF) son necesarias para el desarrollo y establecimiento del biofilms en *P. mirabilis* (Scavone et al., 2016). Además, Jansen et al 2004 y Rocha et al 2007 vieron que las fimbrias MR/P eran claves para la formación de biofilm, presumiblemente por la mediación de la adherencia a las superficies y autoagregación.

Sistemas de adquisición de hierro

El hierro es un elemento esencial para la función de muchas proteínas y enzimas, y el tracto urinario es un ambiente limitado de hierro. Es por ello que los uropatógenos han desarrollado una gran variedad de mecanismos de adquisición y almacenamiento de hierro. Se conoce que *P. mirabilis* codifica al menos para 21 sistemas putativos de adquisición de hierro (Pearson et al., 2008). Entre ellos se encuentran sistemas basados en sideróforos, transporte de hierro ferroso y transportadores tipo ABC, además puede crecer en hemoglobina, hemina y citrato férrico como única fuente de hierro (Piccini et al ., 1998).

P. mirabilis codifica para dos sistemas de sideróforos, el sistema de sideróforo sin proteasa ribosomal (proteobactina), y el sistema sideróforo no ribosómico (Nrp) Himpst et al., 2010. El locus de proteobactina implica tres transcripciones: una codifica para un transportador ABC (PMI0229-030); la segunda transcripción incluye un único gen *pbtI* (PMI0231), que codifica para una enzima capaz de catalizar la síntesis de un precursor de proteobactina; y la tercera transcripción abarca *pbtABCDEFGH* (PMI0232-0239), que codifica los componentes restantes necesarios para la síntesis y utilización de sideróforos (Himpst et al., 2010).

Además, *P. mirabilis* codifica para genes putativos que están implicados en la captación de hierro ferroso, hierro férrico y citrato férrico y varios receptores dependientes de TonB y sistemas de transporte ABC relacionados con hierro (Pearson et al., 2008; Himpst et al., 2010). Varios de estos genes han sido identificados como regulados por hierro in vitro y se ha observado que son importantes para la colonización completa del tracto urinario (Pearson et al., 2011; Nielubowicz et al., 2008; Burall et al 2004; Himpst et al., 2008 & Himpst et al., 2010). En Fig. 5 se esquematiza un modelo propuesto por Himpst et al., 2010 de los sistemas de adquisición de hierro por *P. mirabilis*.

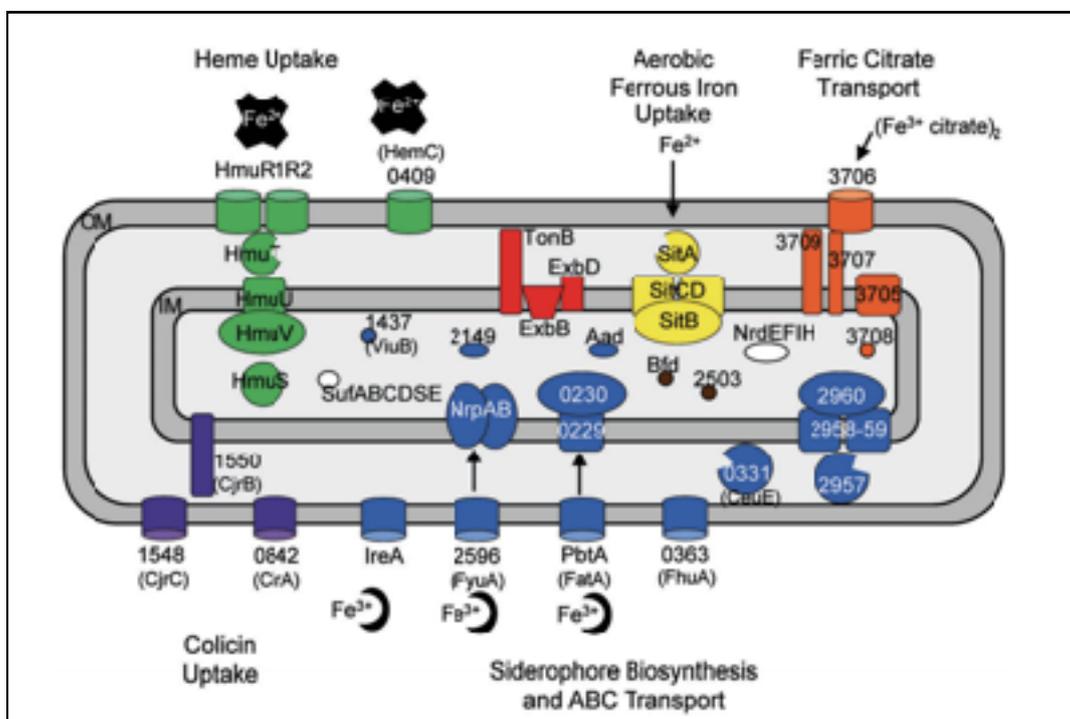


Figura 5: Modelo propuesto para sistemas de adquisición de hierro en *P. mirabilis*. Las funciones hipotéticas de las proteínas enumeradas se basan en la regulación positiva de sus genes bajo limitación de hierro, homología con genes de otras especies bacterianas y estudios funcionales. Tomado de Himpst et al., 2010.

Técnicas para el estudio de biofilms

Uno de los avances más importantes en el estudio de la estructura, función y dinámica del biofilm ha sido la capacidad de visualizar biofilms vivos hidratados en tres dimensiones, con el tiempo, utilizando Microscopía Laser Confocal (MLC). Las primeras imágenes 3D de biofilms fueron obtenidas por MLC hace aproximadamente 25 años (Lawrence et al., 1991). Los avances más importantes en MLC en el análisis de biofilms microbianos han sido la óptica, los láseres, software de análisis de imágenes y el desarrollo computacional de alta velocidad que permite el análisis de imágenes de grandes archivos de datos (Big Data). Los avances químicos y biológicos moleculares también han mejorado la capacidad de imagen de biofilms en tres dimensiones (Azeredo et al., 2017). Estos avances han permitido la observación no invasiva de la estructura y dinámica del biofilm a escala celular (Neu et al., 2010; Bridier et al., 2011). Ahora es posible monitorear *in situ* el crecimiento simultáneo de diferentes especies durante el desarrollo del biofilm mediante microscopía confocal.

A su vez, las herramientas moleculares y los avances tecnológicos nos permiten hoy en día llevar a cabo la reprogramación de los microorganismos para mejorar sus funciones ya existentes y/o llevar a cabo nuevas funciones. Dichas herramientas nos permiten revelar las funciones de una red reguladora o incluso la de un solo gen. Estos esfuerzos se basan en la disponibilidad de herramientas genéticas para modificar correctamente el cromosoma de las bacterias. Los aspectos clave a este fin incluyen la eliminación de segmentos en el genoma, ya sea mediante los sistemas para la producción de mutantes dirigidos y sustituciones alélicas o la interrupción de genes mediante la generación de bibliotecas de mutantes al azar, permitiéndonos de esta forma conocer nuevas funciones de los genes (Martínez García et al., 2011).

Hipótesis

Se propone que diversos genes vinculados a la adhesión, transporte y metabolismo del hierro son relevantes en las distintas etapas de formación y desarrollo de biofilms de *P. mirabilis*.

Objetivo General

El objetivo general del presente proyecto consiste en caracterizar el papel de este grupo de genes en las distintas etapas de formación de biofilms de *P. mirabilis* uropatógeno.

Objetivos Específicos

1. Evaluar las propiedades de crecimiento, movilidad y superficie bacteriana en una colección de cepas mutantes con alteraciones en la formación de biofilm.
2. Analizar la expresión de los genes de adhesión, metabolismo del hierro y transporte, en la cepa salvaje de *P. mirabilis* en el biofilm comparado con su contraparte planctónica.
3. Caracterizar la formación y la bioarquitectura de los biofilms de la colección de mutantes mediante Microscopía Laser Confocal (MLC).

biofilm alterado (de baja o alta formación de biofilm) respecto a la cepa parental. La técnica de tinción con cristal violeta es un método semicuantitativo que permite evaluar de forma rápida la capacidad de formación de biofilms en superficies abióticas. El criterio de clasificación se basó en el propuesto por Villegas et al., 2013, donde las mutantes con capacidad incrementada para formar biofilms, fueron aquellas cuyo valor de densidad óptica (DO) DO_{595nm} fue superior a 1,2 unidades, y con capacidad disminuida a aquellas cuyo valor promedio fue inferior a 0,25 unidades, el valor de DO_{595nm} para la cepa Pr2921 es de 0,9 unidades.

Las cepas mutantes con fenotipos alterados en la formación de biofilm se les corroboró la presencia de una única inserción del transposón en el genoma mediante la técnica de *Southern Blot* (Fig.7). Partimos de 5952 cepas mutantes y luego de realizar el ensayo de *Southern blot* solo 97 cepas presentaron una única inserción del transposón.

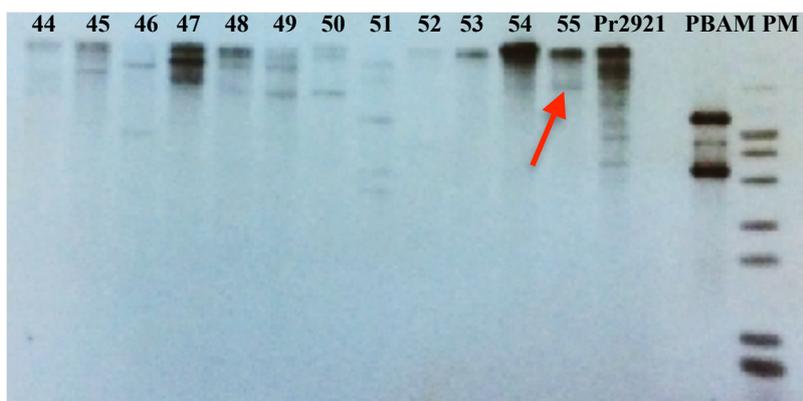


Figura 7: *Southern Blot*. La presencia de una única banda en el clon 55 (flecha), indica una única inserción del transposón en el genoma de esta cepa mutante. Orden de sembrado (de izquierda a derecha): clon 44, 45, 46, 47, 48, 49, 50, 51, 52, 53, 54, 55, 56, Pr2921, pBAM, marcador de peso molecular.

Una vez determinado el fenotipo de las cepas mutantes se identificaron los genes interrumpidos por el transposón mediante PCR arbitrario y posterior secuenciación. En la PCR se amplificaron las regiones contiguas al sitio de inserción del transposón en las cepas mutantes seleccionados. La PCR arbitraria consta de dos rondas de amplificación, donde el ADN molde utilizado en la segunda corresponde al producto de la primera. Se emplearon cebadores diseñados de forma arbitraria, (ARB6 y ARB2), los cuales hibridan con secuencias arbitrarias del genoma, y cebadores interno y externo (ME-I-intR y ME-I-extR),

donde ME son secuencias en mosaicos de 19 pares de bases que flanquean al transposón insertado (Martínez-García et al. 2011).

Como resultados generales, obtuvimos 38 cepas con capacidad incrementada de formar biofilm a las cuales denominamos alta formación de biofilm (AFB) y 59 cepas con capacidad de formación de biofilm disminuida, baja formación de biofilm (BFB). Dentro de esta colección se seleccionaron para el presente trabajo, tres grandes grupos funcionales denominados adhesión, metabolismo del hierro y transporte. En la Tabla 1 se detallan cada uno de las cepas empleadas en el presente trabajo, el gen interrumpido y su fenotipo vinculado a la formación de biofilm.

Tabla 1: Colección de cepas mutantes. Se describe el grupo funcional a cual corresponden las cepas mutantes, el gen interrumpido y su fenotipo de formación de biofilm. Bajo hace referencia a formación de biofilm disminuida $DO_{595nm} < 0,25$. Alto, hacer referencia a niveles incrementados de biofilm superiores a la cepa Pr2921 con una $DO_{595nm} > 1,2$.

Función	Clon	Gen	Locus <i>P. mirabilis</i> HI4320	Formación de biofilm
Adhesión (fimbrias y adhesinas)	m41	<i>Proteína fimbrial SteB</i>	PMI_RS10945	Bajo
	m94	<i>Proteína fimbrial</i>	PMI_RS05020	Bajo
	m106	<i>Subunidad mayor fimbrial</i>	PMI_RS02650	Bajo
	m39	<i>serin proteasa intermembrana de la familia romboide</i>	PMI_RS15315	Alto
Metabolismo del hierro	m50	<i>ferritina</i>	PMI_RS04890	Alto
	m110	<i>receptor TonB-dependente</i>	PMI_RS18440	Bajo
Transportadores	m40	<i>Transportador de la familia MFS</i>	PMI_RS14645	Bajo

Principales características de las mutantes seleccionadas

Grupo adhesión

Para facilitar la unión a TU como a diferentes superficies, las bacterias deben ser capaces de producir una variedad de factores de adhesión, como fimbrias y hemaglutininas (Sareneva et al., 1990). Como mencionamos anteriormente *P. mirabilis* posee en su genoma 17 operones fimbriales (Pearson et al., 2008), de los cuales nuestro grupo ya ha visto que 4 de ellos (MR/P, PMF, UCA, ATF) tienen un papel importante en el desarrollo del biofilm (Scavone et al., 2016)

Mutante m41, presenta interrumpido el gen que codifica para la *proteína fimbrial SteB* (PMI_RS10945), específicamente para la proteína acomodadora de la fimbrial (family outer membrane usher protein) de la fimbria SteB.

Mutante m94, presenta interrumpido el gen que codifica para la *proteína fimbrial* (PMI_RS05020). La proteína fimbrial presenta homología con FimH, la cual es la adhesina fimbrial específica de manosa de *E. coli*, mediando adhesión bacteriana. FimH es una proteína de 30 kDa posicionada en el extremo de los filamentos superficiales de las fimbrias tipo 1 que median la unión específica de manosa y son las estructuras adhesivas más comunes en *E. coli* y otras enterobacterias (Bouckaert et al., 2005).

En fig.8 se representa el ensamblaje de la fimbria tipo I en *E. coli* donde podemos ver las proteínas involucradas en este proceso.

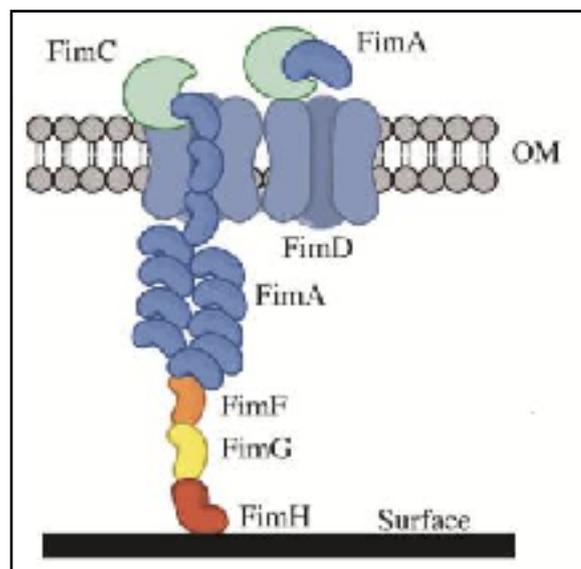


Figura 8: Ensamblaje y secreción de adhesinas fimbriales. (OM) membrana externa. Esquema representando a la fimbria tipo I de *E. coli*. FimC (luna verde) es una chaperona. FimD (gris azul) es el acomodador de la membrana externa mostrado como un canal dimérico. FimA (azules) es la principal subunidad de la fimbria. FimF (naranja), FimG (amarillo) es la punta fimbria. FimH (rojo) es la adhesina fimbrial de unión específica a manosa. Extraído de Berne et al., 2015

Mutante m106, presenta interrumpido el gen que codifica para la Subunidad Mayor Fimbrial (PMI_RS02650) de la proteína fimbrial UCA (uroepithelial cell adhesin). Cabe destacar que en nuestro grupo de trabajo contamos con una mutante isogénica obtenida por sustitución alélica con un casete *ucaA:Km*, Sin embargo esta mutación no está en el mismo gen fimbrial, esto es consecuencia de que *P. mirabilis* posee genes fimbriales repetidos en su genoma.

Mutante m39, presenta interrumpido el gen que codifica para la serin proteasa intermembrana de la familia romboide (PMI_RS15315). La primera proteasa romboide se descubrió en *Drosophila* (Bier et al., 1990) y trabajos posteriores revelaron la existencia de homólogos en todas las ramas de la vida (Urban & Dickey, 2011). Las proteasas participan en una variedad de eventos de señalización celular. El procesamiento proteolítico, los cambios en la membrana generados para liberar ligandos solubles que pueden interactuar con otros receptores representa un mecanismo involucrado en eventos de señalización (Freeman et al., 2009; Urban & Dickey, 2011).

Dado las características que presentan las proteasas de la familia romboide, capaces de remodelar la superficie celular, proponemos incluirlas en el grupo de adhesión.

Metabolismo del hierro

P. mirabilis como el resto de los uropatógenos ha desarrollado varias estrategias para la adquisición, transporte y almacenamiento del hierro, dado que en el interior de TU este metal se encuentra poco disponible.

Mutante m50: presenta interrumpido el gen que codifica para la ferritina (PMI_RS04890). La ferritina son proteínas de almacenamiento de hierro, las cuales son capaces de secuestrar reversiblemente el hierro. El hierro es potencialmente tóxico debido a su habilidad de catalizar la generación del radical hidroxilo, a través de las ferritinas, puede ser movilizado al metabolismo intracelular cuando su disponibilidad se vuelve limitante (Velayudhan et al. 2007).

Mutante m110: presenta interrumpido el gen que codifica para el *receptor TonB dependiente* (PMI_RS18440). En bacterias Gram negativas, la captación de hierro de alta afinidad, requiere proteínas localizadas en la membrana externa que unan quelatos de hierro a la superficie celular y promuevan su incorporación (Moeck & Coulton 1998). El transporte a la célula es impulsado por el potencial de membrana citosólica mediado por el

sistema TonB-ExbB-ExbD que transduce la energía y requiere el contacto directo del receptor TonB de membrana externa (Braun, 1995, Tuckman & Osburne, 1992).

Grupo transportador

Mutante m40: presenta interrumpido el gen que codifica para una bomba de eflujo perteneciente a la superfamilia de transportadores MFS. Uno de los fenómenos más estudiados es el de la resistencia a antibióticos de los microorganismos y esta se debe en su mayor parte a la sobreexpresión de los transportadores los cuales reconocen un amplio rango de compuestos y los secretan eficientemente de las células (Zgurskaya & Nikaido, 2000). El bloqueo de estas bombas hace que las bacterias se vuelvan hipersusceptibles a varias drogas.

Condiciones de cultivo

Las cepas se cultivaron aeróbicamente en caldo Luria-Bertani (LB) (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, pH 6.8). El medio se suplemento con agar 1.5% cuando se requirió medio sólido, y con los antibióticos kanamicina (concentración final 40 µg/ml), y tetraciclina (concentración final 15 µg/ml). Además todas las cepas fueron cultivadas en medio sólido LB suplementado con ampicilina (100 ug/ml) para confirmar que solo el transposón está inserto en el genoma de *P. mirabilis*, dado que el gen que otorga resistencia a este antibiótico se localiza fuera del transposón.

La temperatura de incubación empleada fue 37°C y el tiempo varió de acuerdo al ensayo, lo cual se especifica en cada caso. Todas las cepas se conservaron en LB glicerol (20%) a -80°C con el fin de preservarlas a largo plazo.

Caracterización fenotípica

Las 7 cepas mutantes fueron caracterizadas fenotípicamente, con el objetivo de evaluar si la mutación afectó algunas de sus propiedades como el crecimiento en medio LB, la hidrofobicidad celular, movilidad swarming y swimming y la capacidad de migración sobre catéteres de silicona o látex.

Evaluación del crecimiento en medio líquido de las cepas mutantes

Con el objetivo de corroborar que la mutación en la colección de mutantes no afecta su crecimiento se llevo a cabo una curva de crecimiento en medio líquido LB.

Para ello se realizó un pre-cultivo de la colección de mutantes y de la cepa parental Pr2921 en placa de 96 pocillos en medio LB (200 µl/ pocillo), la misma se incubó en forma estática durante 24 hs a 37 °C. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se tomaron medidas de la DO 600nm. A partir del pre-cultivo se colocó 20 µl en una nueva placa de 96 pocillos que contenía 180 µl de medio LB por pocillo. Las placas se incubaron estáticamente durante 24 hs en el espectrofotómetro de placas (Varioskan, Flash Multimode Reader, Thermo Fisher ScientificInc™). Previamente se configuró el espectrofotómetro para que tomara medidas de absorbancia cada dos horas a 600nm y que mantuviera una temperatura constante de 37 °C durante todo el proceso de medición (24 hs). El ensayo se realizó por duplicado en la misma placa, y los datos se analizaron empleando el test estadístico One-Way ANOVA ($p < 0,05$).

Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana

Las propiedades físicas de la superficie bacteriana en la colección de mutantes fue evaluada a través de la hidrofobicidad. La hidrofobicidad celular potencia la afinidad bacteriana por sustratos no polares como lo son superficies plásticas, lo que influye en la adhesión bacteriana y por lo tanto la formación de biofilms.

Para ello se empleó el método de partición por xileno, descrito por Biblioni *et al.*, 2001. En primer lugar se recuperaron las cepas del stock de -80 °C, las cuales fueron cultivadas en placas de LB agar km/tet durante 24 hs. Luego se subcultivaron en 5 ml de caldo LB durante 48 hs y se prepararon suspensiones en PBS con igual densidad óptica (DO_{600nm}). Estas suspensiones bacterianas fueron mezcladas con xileno empleando el vórtex para

que la mezcla fuera homogénea. La mezcla se incubó durante 20 minutos a temperatura ambiente, lo que condujo a la formación de una fase acuosa y otra orgánica. De esta forma se separaron por decantación las fases y la fase acuosa fue removida para medir la DO_{540nm} . La turbidez de esta fase es una medida de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana, la cual se emplea para el cálculo del índice de hidrofobicidad como se describe a continuación:

$$H\% = [(A0 - A)/A0] \times 100$$

donde $A0$ y A corresponden a la DO_{540nm} medida antes y después de la extracción con el hidrocarburo.

El índice de hidrofobicidad se puede clasificar siguiendo el criterio que establece que las poblaciones con un índice de hidrofobicidad menor al 20 % se consideran hidrofílicas, entre 20-50 % moderadamente hidrofílicas y mayores a 50% se consideran como hidrofóbicas (Pompilio et al., 2008).

Cada ensayo se realizó por triplicado, y se empleó el test de student para analizar los datos.

Determinación de la movilidad *swarming*

La movilidad *swarming* de las distintas cepas mutantes se caracterizó según Jones *et al* 2004 con algunas modificaciones. Las distintas cepas se cultivaron en 15 ml de medio LB durante 4 horas, luego se inoculó 10 μ l en el centro de placas de LB agar (1,5%). Las gotas se dejaron secar a temperatura ambiente y luego las placas se incubaron 24 hs a 37°C. Para determinar la movilidad se midió el radio de migración en la placa (Fig.9), que es la distancia desde el centro de la placa hasta el frente de migración para cada cepa. Este ensayo se realizó por cuadruplicado y se determinó el área de la elipse (πr^2) para cada cepa, los datos se analizaron empezando el test de Student ($p < 0,05$).

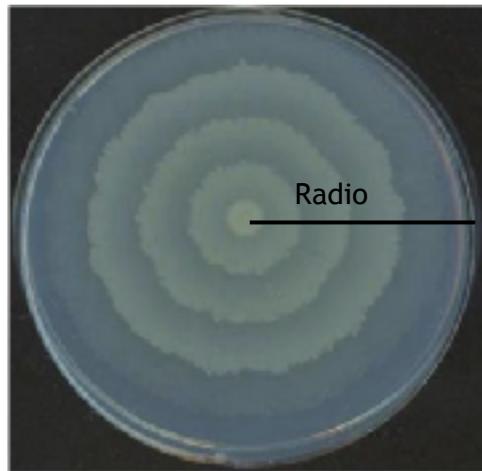


Figura 9: Representación esquemática de la movilidad *swarming* y representación del radio de desplazamiento.

Determinación de la movilidad *swimming*

La movilidad *swimming* de las distintas cepas mutantes se caracterizó de acuerdo a la técnica propuesta por Holling y colaboradores (Holling et al., 2014). Las cepas fueron cultivadas en 15 ml de medio líquido LB a 37°C, ON. Luego se inocularon 2 µl en el centro de placas de LB *soft agar* (0,3%). Las placas se incubaron por 6 hs a 37 °C y luego se midió la distancia de migración, desde el centro de la placa hasta el frente de migración para cada cepa. El ensayo se realizó 9 veces para todas las cepas y los resultados se analizaron empleando el test de Student ($p < 0,05$).

Evaluación de la capacidad de migración sobre catéteres de uso comercial

La capacidad de las cepas mutantes para migrar sobre superficies de catéteres de uso comercial (látex y silicona) fue evaluada según lo descrito por Stickler & Hughes (1999). Para ello se prepararon placas de Petri conteniendo 15 ml LB agar (1,5%) donde se cortaron dos secciones de 1 cm retirándose el agar. Los catéteres tanto de látex como de silicona fueron cortados en esterilidad, en secciones de 1 cm de largo y 0,5 cm de ancho. Para llevar a cabo el ensayo, cada cepa fue cultivada en 15 ml de caldo LB los cuales se incubaron 4 hs en agitación a 37°C. A partir de estos cultivos se sembraron 10 µl en un borde del canal en tres lugares de la placa. Las gotas se dejaron secar a temperatura ambiente y luego se colocaron dos secciones de catéteres (látex o silicona) como puentes entre los canales. Como control al tercer inóculo no se le colocó la sección de catéter (Fig.10).

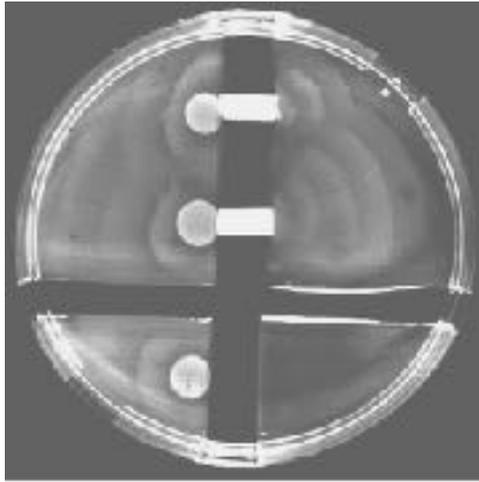


Figura 10: Representación esquemática de la migración sobre puentes de catéteres.

Las placas fueron incubadas 24 horas a 37°C y se determinó la migración hacia los lados opuestos del inóculo. Cada cepa se ensayó en 15 réplicas de secciones de catéteres y el índice de migración se calculó en base al porcentaje de puentes que fueron cruzados por las distintas cepas. Se empleó el test de chi-cuadrado para determinar diferencias significativas respecto a la cepa salvaje ($p < 0,05$).

Análisis de correlación entre las características fenotípicas

Se realizaron estudios de correlación (Pearson r) para establecer relaciones entre las características fenotípicas, formación de biofilm, índice de hidrofobicidad, movilidad *swarming* y *swimming* y migración sobre catéteres de látex y silicona.

Para ello, los valores de biofilm así como los valores de movilidad *swarming* y *swimming* se transformaron en un índice, donde los valores de *P. mirabilis* Pr2921 fueron tomados como el 100%.

Análisis comparativo de la expresión de los genes implicados en la formación de biofilms en la cepa salvaje *P. mirabilis* en forma planctónica y formando biofilm

Cultivo de la cepa salvaje *P. mirabilis* (Pr2921) en condiciones de biofilm y planctónicas

Para evaluar la expresión de los genes relevantes en la formación de biofilm correspondientes a las cepas mutantes, se realizaron cultivos de 5 ml de caldo LB de la cepa salvaje Pr2921 en placas de 6 pocillos de alta adherencia (Greiner Bio-One). Los cultivos se incubaron durante 48 horas en forma estática a 37°C. Transcurrido el tiempo de incubación se midió la DO_{600nm} en espectrofotómetro de placas, luego se removieron las células planctónicas y se conservaron en ARN later (Ambion® -Thermo Fisher Scientific). Las células adheridas (biofilm) en la superficie de la placa fueron lavadas con PBS para eliminar las células planctónicas no adheridas. Luego, mediante el uso de un *scraper* se procedió a remover de forma mecánica el biofilm el cual se conservó en un 1 ml de ARN later. El ensayo se realizó por triplicado.

Extracción de ARN y obtención de ADN complementario (ADNc)

A partir de los cultivos descritos anteriormente se realizó la extracción del ARN total en la condición biofilm y en las células planctónicas de la cepa salvaje Pr2921, empleando un kit comercial (AMBION PureLink RNA mini kit) siguiendo las instrucciones del fabricante. Se determinó la concentración y calidad del ARN mediante lecturas de absorbancia a 260nm (A_{260}) y la relación de A_{260}/A_{280} respectivamente con un espectrofotómetro Nanodrop, dicha relación brinda una idea de la contaminación de los ácidos nucleicos con proteínas.

Tratamiento con DNAsa

Previo al paso de retrotranscripción se procedió a la remoción de ADN contaminante, en el ARN extraído. Se realizaron las diluciones correspondientes del ARN con el objetivo de partir de la misma concentración en todas las muestras ($[ARN] = 1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$). De cada dilu-

ción se tomo 5 µl de ARN y se realizó el tratamiento con DNAsal (Invitrogen™) para eliminar posibles contaminaciones de ADN. A los 5 µl de ARN se le incorporó la siguiente mezcla: 3µl H₂O, 1 µl de buffer DNAsal y 0,4 µl de DNAsal. La mezcla se incubó durante 15 minutos a temperatura ambiente y transcurrido el tiempo de incubación se agregó 1µl EDTA 25mM y se calentó durante 10 minutos a 65°C con el objetivo de inactivar la DNAsal.

Retrotranscripción (RT)

La retrotranscripción (RT) se realizó para obtener el ADNc, empleando la enzima M-MLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) de Invitrogen. La reacción consistió en incorporar la siguiente mezcla a los tubos tratados con DNAsal; 1,6 µl de random hexámeros, 1,0 µl de dNTPs (100mM), 4,0 µl de 5X *First-Strand Buffer*, 2,0 µl de DTT (0,1M), 1,0 µl de RNasa OUT (Inhibidor de RNasa Recombinante) (400un/µl) y por último se incorporó 1,0 µl de la enzima M-MLV-RT (*Moloney Murine Leukemia Virus Reverse Transcriptase*) (200un).

El ADNc obtenido se cuantificó mediante el espectrofotómetro Nanodrop, se realizaron diluciones 1:4 y se conservó a -20°C hasta su uso en las reacciones de PCR en tiempo real.

Diseño de cebadores

Los cebadores de los genes a evaluar fueron diseñados empleando la herramienta Primer-Blast (Ye et al., 2012) y sintetizados por la empresa Macrogen, Corea (Tabla 2).

Tabla 2: Secuencias de los distintos cebadores diseñados para los genes de las cepas mutantes empleados para RT-PCR y el gen de referencia (*rpoA*).

secuencias 5´-3´			
Gen	primer <i>f</i>	primer <i>r</i>	Referencia
<i>Proteína fimbrial SteB</i>	GAACCTCTGGTGATGCGGAA	GACCTGCGGGTACTGTTGAA	Este trabajo
<i>Proteína fimbrial</i>	GATGCGACGTTAGTAGCCGA	GTTGCGCGCAGTGGATATTT	Este trabajo
<i>Subunidad mayor fimbrial</i>	TGCTGGCTCATCTATGGCG	TGGAGTTAAGCCTGCTGTTGT	Este trabajo
<i>serin proteasa intermembrana de la familia romboide</i>	CGCTCCCTGCTGTCGATAAT	CGATGCGCTGGTGTATTGG	Este trabajo
<i>ferritina</i>	GCGCTTGGTGCGATGATAAA	TCAGCAGGTGGTGCTTCAAT	Este trabajo
<i>receptor TonB-dependente</i>	GCTTGCTAAAGCCGATCACG	GGTTAGCTCAGCGGTCACTT	Este trabajo
<i>Transportador de la familia MFS</i>	TACCACCGCATCGACCTCTA	GCCTGTGCGATTAAGAGGGT	Este trabajo
<i>rpoA</i>	CGCGAAAAGAGCGTTGAAGA	TGCCTGCATACGCAGATTGA	

Con el objetivo de corroborar si los cebadores estaban correctamente diseñados, en primer lugar se realizó un PCR en tiempo real con una muestra ADNc de la cepa salvaje Pr2921 y se corroboró que la temperatura de melting de cada producto coincidiera con lo esperado (ANEXO).

PCR en tiempo real

A partir del ADNc se evaluó la expresión de los genes vinculados a la formación de biofilms mediante PCR en tiempo real. Las amplificaciones se realizaron en placas de 96 pocillos (Bio-Rad Laboratories™, EU) utilizando el kit comercial SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems™) y los cebadores especificados en la Tabla 2.

La mezcla de reacción consistió en 2 µL de ADNc (diluido previamente 1/4), 1,8 µl de cada cebador 10 mM, 4,4 µl de H₂O libre de ARNAsas y 10 µl del Mix SYBR Green PCR Master. En todas las corridas se incluyeron controles negativos y un estándar para cada gen a evaluar y el gen de referencia. El estándar se realizó mediante diluciones seriadas de

1/4 a partir del ADNc de una muestra escogida al azar. La inclusión de esta curva es necesaria para que el software (Bio-Rad CFX Manager 2.1; Bio-Rad Laboratories™) pueda calcular el threshold o umbral y la eficiencia de reacción.

Para normalizar las variaciones en los niveles de ADNc se utilizó *rpoA* como gen de referencia, que codifica para la proteína ribosomal 50S L29. Las reacciones de PCR se realizaron en un termociclador en tiempo real BIO-Rad CFX96 (Bio-Rad Laboratories™) y el programa de ciclado consistió en una activación inicial a 50°C durante 2min, 95°C durante 15min, 40 ciclos de 94°C durante 15seg, 60°C durante 30seg y 72°C durante 30seg.

Cuantificación de la expresión de los genes involucrados en la formación de biofilm

Los datos obtenidos del termociclador fueron analizados empleando el software del equipo (Bio-Rad CFX Manager 2.1; Bio-Rad Laboratories™). Los resultados se expresaron como el aumento relativo de los niveles de ARNm empleando la formula 2-AACt (Livak et al., 2001) normalizados en base a la expresión del gen de referencia.

Caracterización de la formación y la bioarquitectura del biofilm en la colección de mutantes

Con el objetivo de caracterizar la importancia de los genes en las distintas etapas de la formación del biofilm se realizó una caracterización morfo-topológica de los biofilms en las mutantes mediante el uso de la Microscopía Laser Confocal (MLC) y análisis de imágenes. A continuación se describen los procedimientos realizados para cumplir con el presente objetivo.

Formación de biofilms *in vitro*

Para la formación de biofilms se prepararon pre-cultivos de todas las cepas en caldo LB las cuales se incubaron a 37°C durante 24 hs. Luego se transfirieron 300 µl a tubos de plástico conteniendo cubreobjetos de vidrio estériles los cuales fueron utilizados como soporte para la formación de biofilms y 30 ml de medio LB. Los cultivos se incubaron a 37°C en forma estática y los cubreobjetos se retiraron a los días 1, 3, 5 y 7 de incubación. Luego se realizaron lavados con PBS con el fin de eliminar las bacterias planctónicas y los biofilms fueron fijados con paraformaldehído 4% en PBS durante 20 minutos y se sometieron a la inmunofluorescencia *in situ*.

Inmunofluorescencia *in situ* de los biofilms

Con el fin de observar los biofilms formados sobre el cubreobjeto se realizó inmunofluorescencia *in situ* según el método descrito por Schalpp *et al.*, 2011. Se empleó un anticuerpo primario anti-*P. mirabilis* policlonal previamente obtenido en el Departamento de Microbiología del IIBCE (Schalpp *et al.*, 2011) y un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a isotiocianato de fluoresceína (FIT-C). Los biofilms fueron marcados además con el fluróforo Hoechst 33342 con el objetivo de teñir el ADN bacteriano.

Los cubreobjetos fijados en paraformaldehído se lavaron 3 veces con PBS y se incubaron con un *buffer* permeabilizante (BP: albúmina bovina 2%, NH₄Cl 50 mM y saponina 0,1% o Tritón 100 0,3% en PBS) durante 15 minutos. Se realizaron 3 lavados con PBS y se incubó por una hora con una dilución 1/50 de suero policlonal anti-*P. mirabilis*, preparada en *buffer* no permeabilizante (NP) (BNP, albúmina bovina 2% y NH₄Cl 50 mM en PBS). Luego se lavó 3 veces con PBS y finalmente los cubreobjetos fueron expuestos a 1 µL de FIT-C anti-ratón y 0,5 µL de Hoescht 33342, ambos diluidos en 100 µL de *buffer* NP, durante 30 minutos. Por último se realizó un lavado y se montó sobre un portaobjetos empleando 10

μL de citifluor AF1 (agente antidecolorante en solución de glicerol y PBS) como solución de montante y los cubreobjetos se conservaron a 4°C en cámaras húmedas hasta su visualización, con el fin de evitar su deshidratación.

Adquisición de imágenes en el Microscopio Laser Confocal

Los biofilms fueron examinados mediante un microscopio láser confocal directo Olympus BX-61 FV300, empleando el *software* Olympus Fluoview Versión 4.3 ambos disponibles en el IIBCE. El uso del microscopio laser confocal presenta varias ventanas respecto a los microscopios de fluorescencia; por un lado permite obtener secciones ópticas de la muestra lo cual posibilita la reconstrucción tridimensional del objeto en estudio. Además elimina la fluorescencia que esta fuera de foco obtiene sólo la información de la región enfocada, denominada "plano focal". La visualización se llevó a cabo con un objetivo de inmersión en aceite 100x, apertura numérica 1.35 y empleando láseres de excitación/emisión 488/520 nm (KrAr) y 405/460 nm. Se seleccionaron entre 3 y 5 campos al azar en cada cubreobjetos y se obtuvieron *stacks* en el eje z (secciones ópticas) empleando un *step size* de $0,3 \mu\text{m}$ entre una imagen y la siguiente. Se utilizó un tamaño de imagen de 1024×1024 pixeles y un tamaño de pixel de $0.070 \mu\text{m}$.

Procesamiento de imágenes

Con el objetivo de analizar las imágenes obtenidas mediante el MLC y obtener los parámetros descriptores y reconstrucciones tridimensionales de los mismos se emplearon varios software que se detallan a continuación.

Deconvolución

La deconvolución es una operación matemática basada en algoritmos usada para restauración de señales para recuperar datos que han sido degradados por cualquier proceso físico que pueda describirse matemáticamente mediante la operación inversa, una convolución. La convolución modeliza matemáticamente el proceso de formación de una imagen degradada a causa de desenfoque y ruido. El desenfoque, aparece inevitablemente en el límite de resolución del dispositivo, debido a la difracción en las lentes. El proceso de deconvolución consiste en aplicar un proceso matemático inverso a la imagen generada para obtener una mejor representación del objeto real (<https://svi.nl/Huygens>).

Las imágenes de los stacks se deconvolucionaron usando el software Huygens Scripting (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands- www.svi.vl).

Segmentación

La segmentación es un proceso que permite distinguir objetos de interés (ROI) que contienen información biológica relevante de aquellos que representan el "fondo" o *background* en una imagen (Parton & Davis, 2004).

Las imágenes deconvolucionadas se segmentaron en forma manual empleado el software ScianSoft IDL 7.1 (Interactive Data Language, ITT, Co, USA) desarrollado en el Laboratorio de Análisis de Imágenes Científicas (ScianLab) de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile. El programa cuenta con diversas herramientas de segmentación de diferentes regiones de interés para la visualización, reconstrucción 3D y determinación de descriptores matemáticos morfotopológicos.

La segmentación se llevó a cabo aplicando técnicas de *thresholding* (umbral), destaque de bordes y diversos filtros. Durante el proceso de *thresholding* se determinó un valor umbral a partir de histogramas creados con las intensidades de los píxeles, y se etiquetaron píxeles individuales como objetos cuando sus valores fueron mayores al umbral (asumiendo que un objeto es más brillante que el fondo) mientras que los otros objetos se etiquetaron como fondo. En este caso la convención es "por encima del umbral". De esta forma se generó una imagen binaria donde cada píxel se coloreó de color blanco o negro, dependiendo de la etiqueta del mismo (valor 1 para un objeto, valor 0 para fondo).

Además se emplearon diversos filtros como, *deviation kernel*, la cual consiste en resaltar los bordes de los objetos de interés, *median*, que suaviza imágenes preservando los contornos, *fill remove*, que rellena huecos y remueve objetos pequeños, entre otros.

Cálculo de parámetros y generación de modelos 3D de biofilms

Para poder caracterizar los biofilms de las diferentes cepas mutantes y compararlos con el desarrollo del biofilms de la cepa salvaje se seleccionaron parámetros disponibles en la herramienta informática sTimeCalc.

A partir de las imágenes segmentadas y de los modelos 3D se calculó el número de bacterias para cada stack, volumen total de bacterias (sumatoria de los volúmenes individuales de todas las bacterias de un stack) y el de biomasa.

Mediante modelos 2D se cuantificó la formación de *lattice* hexagonal según Härtel *et al.* (2005), modelo mediante el cual se determinó la compactación y complejidad de las aglomeraciones bacterianas. Para generar el modelo 2D de *lattice* hexagonal, se eligió el stack de la imagen que presentaba el mayor número de bacterias.

RESULTADOS

Caracterización fenotípica

Curva de crecimiento en medio líquido LB

El crecimiento de la colección de cepas se evaluó mediante curvas de crecimiento en caldo LB. De esta manera se observó que la colección de cepas presentaba un comportamiento de crecimiento similar al de la cepa salvaje (Fig. 11). Para corroborar esto, se realizó el test estadístico One-way ANOVA, donde se observó que las cepas en las primeras 18 horas de crecimiento no presentan diferencias significativas respecto a la cepa Pr2921.

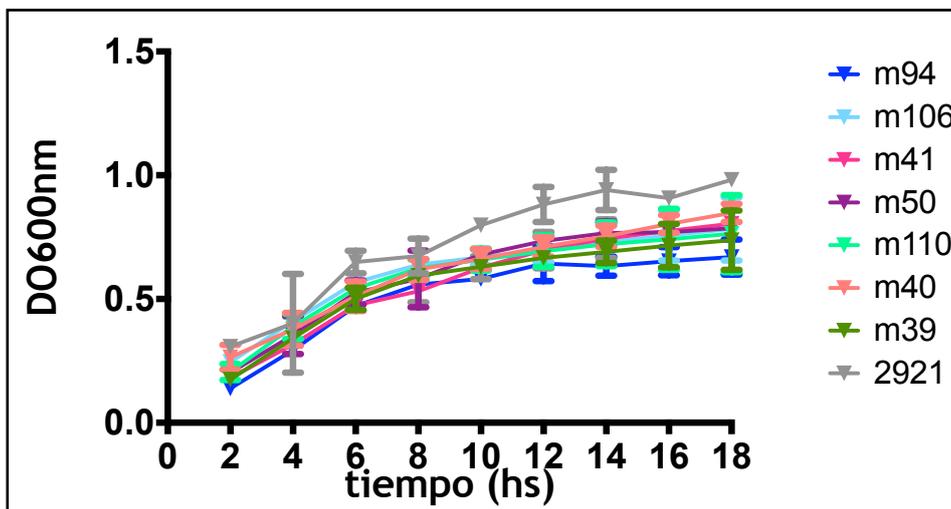


Figura 11: Curva de crecimiento en medio líquido (LB) de la colección de mutantes y la cepa parental Pr2921. Los cultivos se incubaron durante 18 hs a 37°C y se tomaron medidas cada dos horas.

Determinación de la movilidad *swarming*

La movilidad *swarming* se calculó a partir de las áreas de las elipses generadas por los frentes de migración (Fig. 12).

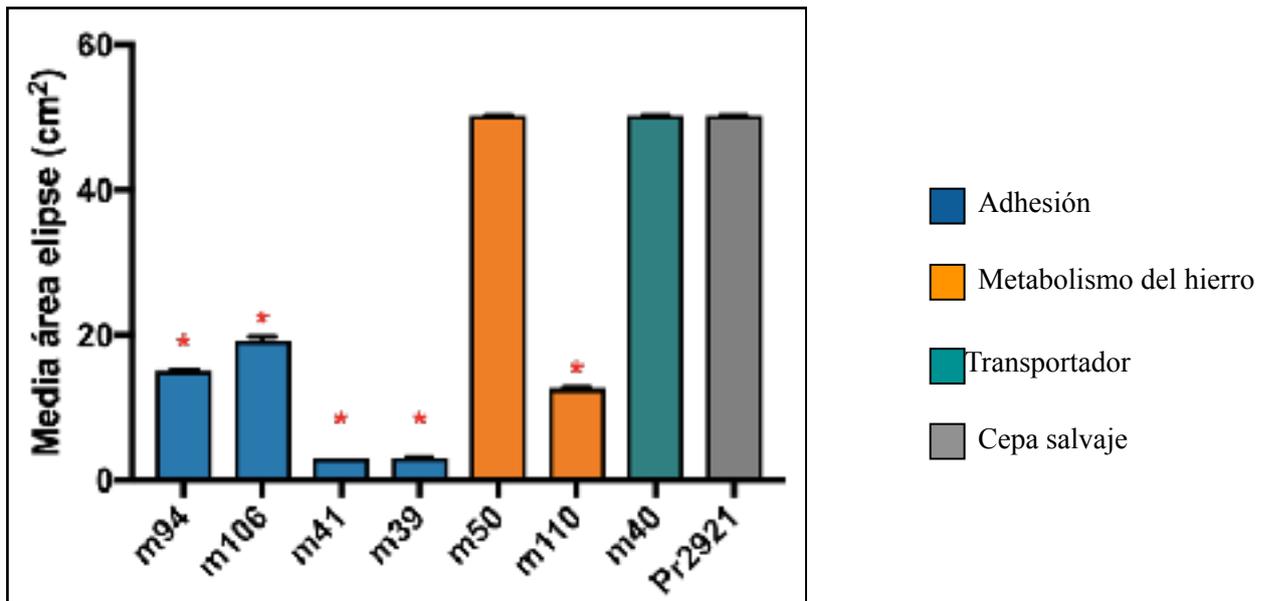


Figura 12: Gráfico de frentes de *swarming*. Se indica la media (barras) y la desviación estándar. *Indica valores significativos (Student, $p < 0,05$) respecto a Pr2921

Las cepas (m94, m106, m41, m39) con mutaciones en los genes de fimbrias (grupo adhesión) presentaron una disminución significativa en la movilidad *swarming* (Student, $p < 0,05$). La mutante m110 perteneciente al grupo de metabolismo del hierro no presentó movilidad, mientras que la m50 (ferritina) su movilidad fue similar a la cepa salvaje. En cuanto a la m40 perteneciente al grupo transportador no mostró tener afectada la movilidad presentando un comportamiento similar a la cepa salvaje.

Los resultados del ensayo nos permitieron no solo medir el desplazamiento de la colección de mutantes sino también observar los distintos patrones generados por las mismas. De esta forma observamos cepas donde su patrón de movilidad era similar a la cepa salvaje presentado periodicidad similar en los anillos de migración mientras que en otras cepas mostraron patrones de migración con periodos más cortos y/o anillos irregulares con bordes salientes. En la figura 13 se muestran las fotografías de las diferentes cepas mutantes y de la cepa salvaje, donde se pueden apreciar las diferencias en los frentes de migración.

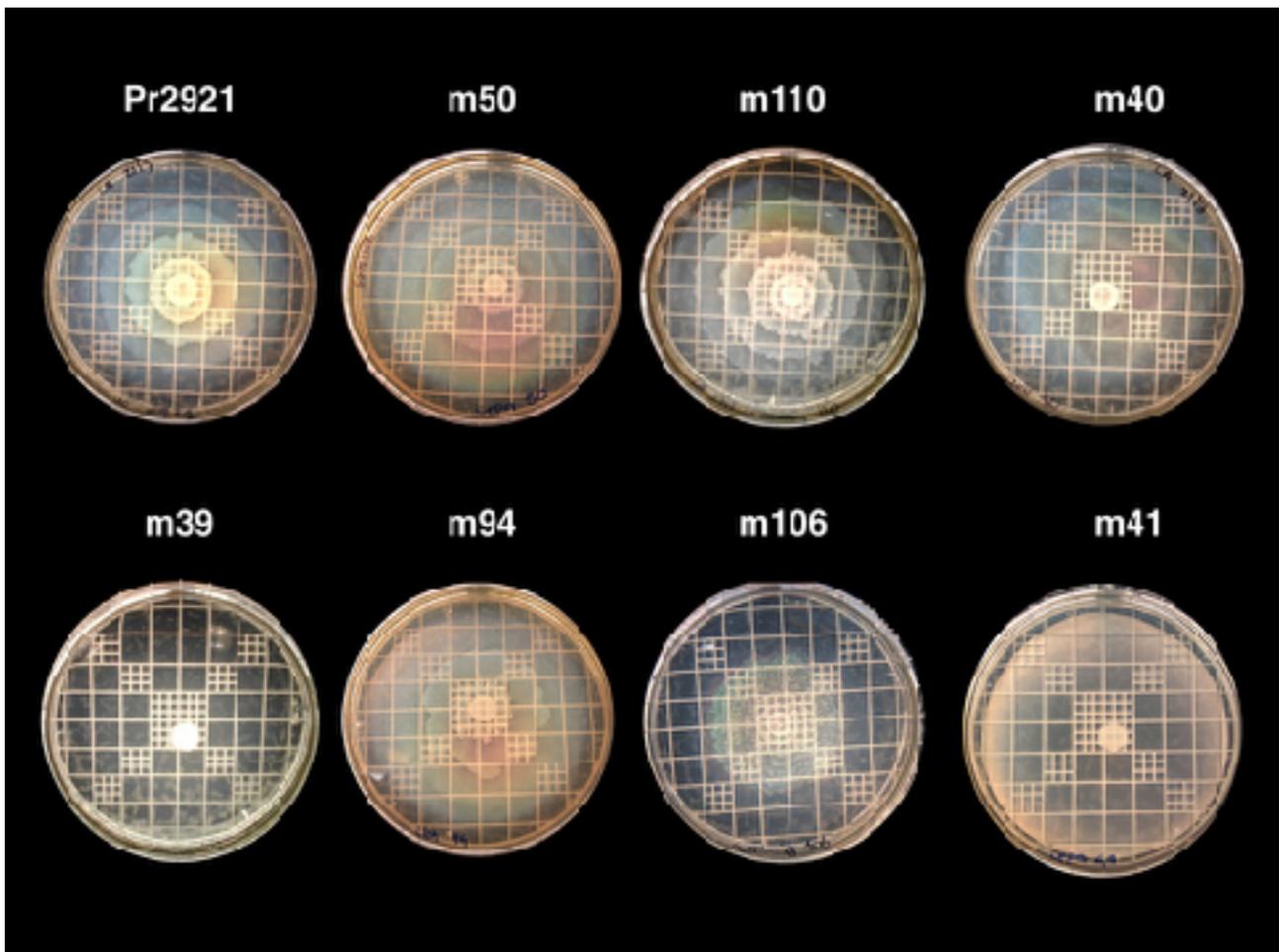


Figura 13: Fotos representativas de placas de petri donde se observan los diferentes patrones de movilidad *swarming* generados por las cepas mutantes (a-h) y Pr2921 (i).

Determinación de la movilidad *swimming*

La movilidad *swimming* se calculó como la distancia migrada desde el inoculó inicial sobre placas de agar soft (0,3%). Los resultados se calcularon a partir del ensayo de nueve replicas de cada una de las cepas. Como se observa en la figura 14, las cepas m106, m50 y m110 presentan una movilidad similar a la de la cepa salvaje. Por otra parte, la movilidad *swimming* de las cepas m41, m94, m39 y m40 fue significativamente menor que la cepa salvaje ($p < 0,05$).

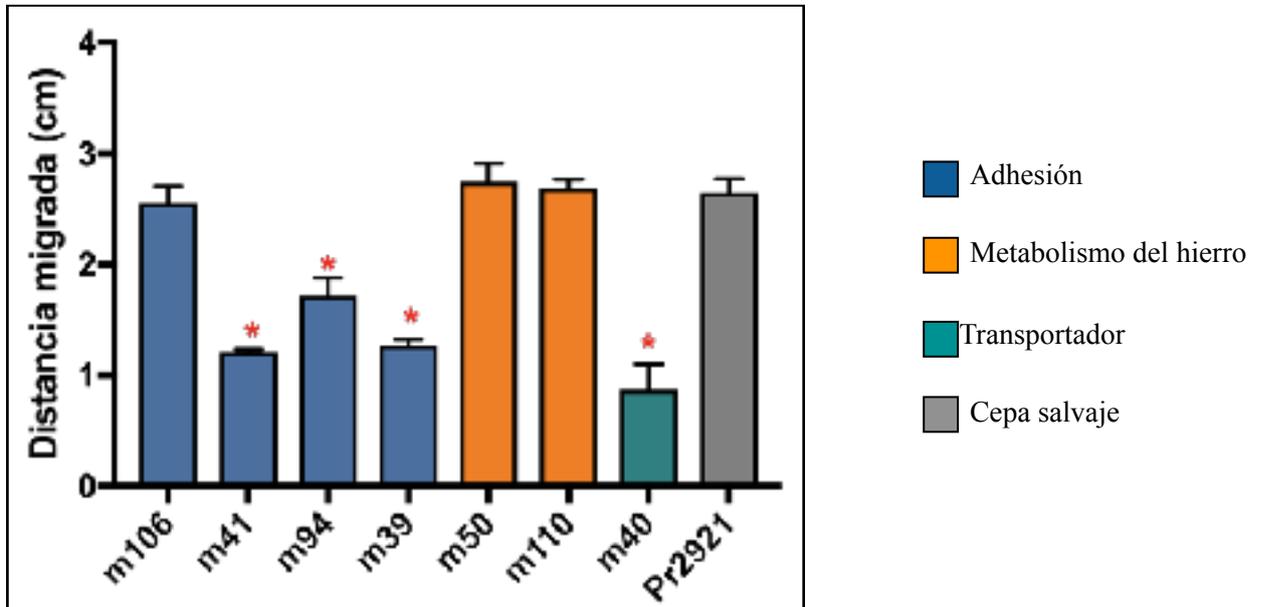


Figura 14: Gráfico de distancia migrada (*swimming*). Se indica la media (barras) y la desviación estándar. *Indica valores significativos (Student, $p < 0,05$) respecto a Pr2921

A continuación se muestran los patrones de movilidad *swimming* de las diferentes cepas mutantes y de la cepa salvaje Pr2921 (Fig. 15).

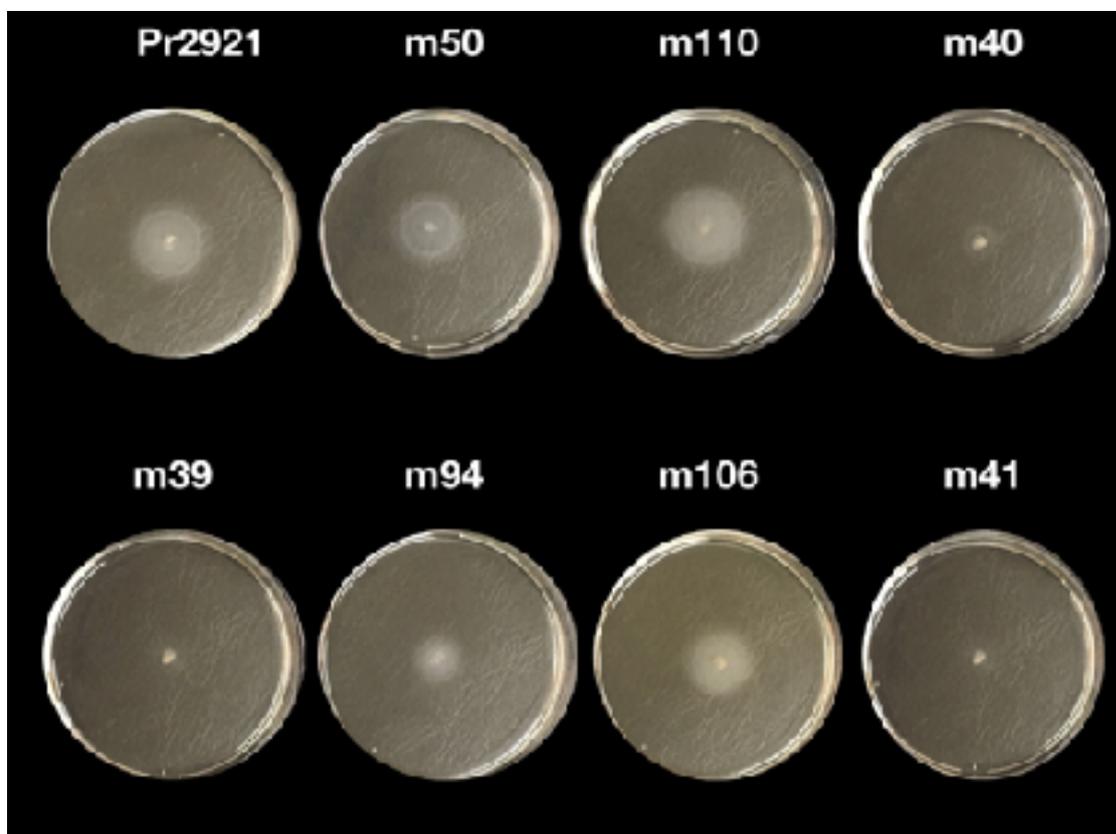


Figura 15: Imágenes representativas de la movilidad *swimming* en las cepas mutantes y la cepa salvaje Pr2921 sobre placas de agar soft (0,3%).

Evaluación de la hidrofobicidad de la superficie bacteriana

El índice de hidrofobicidad fue calculado para cada cepa a partir de los resultados del ensayo de partición por xileno. En la figura 16 se muestran los resultados del índice de hidrofobicidad para la colección de mutantes y la cepa salvaje, donde se representan los puntos de corte de clasificación de la hidrofobicidad (Pompilio et al., 2008). Cepas con valores por debajo de índice 20 se consideraron hidrofílicas. Aquellas con valores entre 20 y 50 fueron moderadamente hidrofílicas. Cepas con valores superiores a 50 fueron altamente hidrofóbicas.

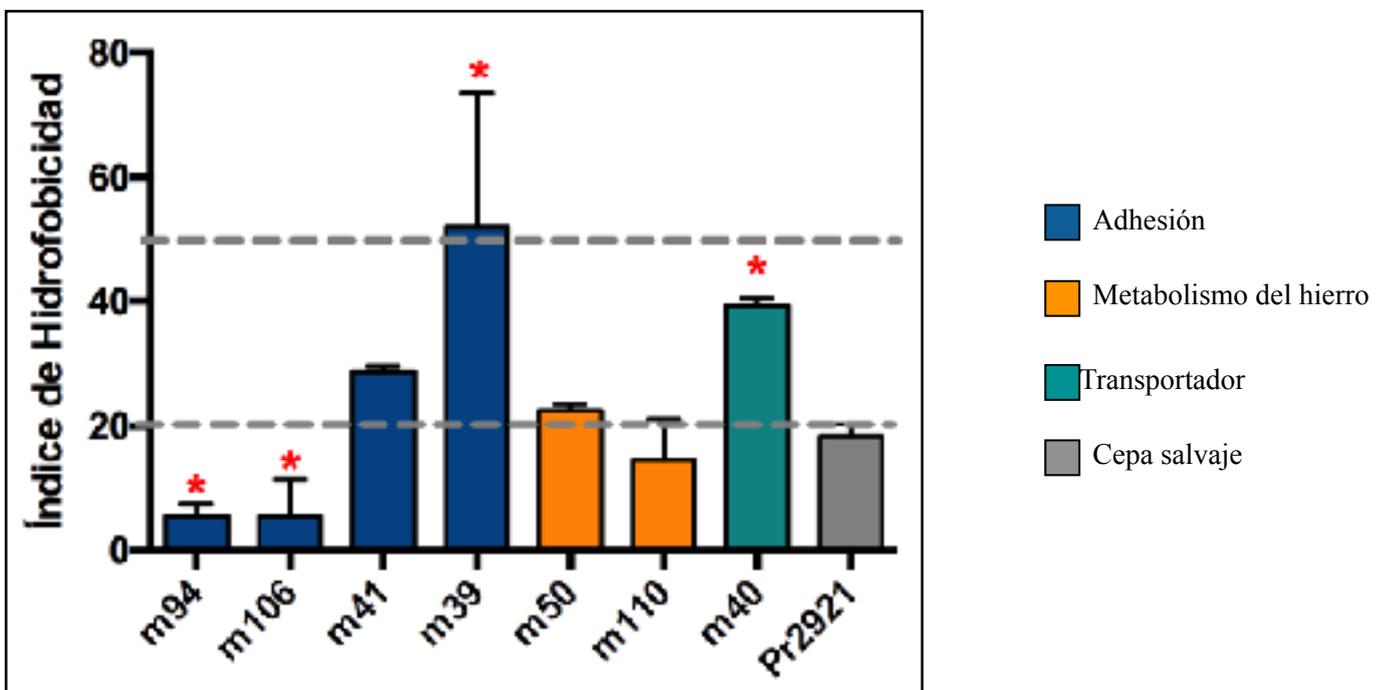


Figura 16: Gráfico de índice de hidrofobicidad. Se indica la media (barras) y la desviación estándar. *Indica medias significativamente diferentes respecto a la cepa salvaje (Student, $p < 0,05$).

Los resultados muestran que no hay una asociación entre el grupo de mutantes y su índice de hidrofobicidad. De esta forma se observa que las cepas m39 y la cepa m40 tienen un índice de hidrofobicidad significativamente mayor al de Pr2921. La cepa m40 se clasificó como moderadamente hidrofílica y la cepa m39 como hidrofóbica. El comportamiento del resto de las cepas fue similar al de Pr2921 siendo clasificadas como hidrofíli-

cas. Dentro del grupo de las cepas hidrofílicas observamos que las cepas m94 y m106 son significativamente más hidrofílicas que la Pr2921.

Evaluación de la capacidad de migración sobre secciones de catéteres

En este ensayo se evaluó la capacidad de migración de la colección de mutantes. En primer lugar se observó que las zonas de agar enfrentadas a los inóculos desprovistos de puentes de catéteres (controles negativos) no presentaron crecimiento bacteriano en ninguno de los casos.

En tabla 3 y 4 se describen los números de cruces en látex y silicona respectivamente para cada cepa. De forma general se observó que la migración ocurrió con mayor frecuencia en los catéteres de látex que en los de silicona.

En los catéteres de látex se observó que 3 de las cepas lograron cruzar de forma similar a la cepa salvaje y 4 de las cepas presentaron reducida de forma significativa su capacidad de migración a través del catéter ($p < 0,05$).

Tabla 3: Ensayo de migración sobre puentes de catéteres de látex. Se detallan los números de los puentes cruzados y no cruzados, el total de réplicas, el porcentaje de puentes cruzados por cada cepa y los valores de Chi².

Catéter Látex				
	Cepas	N° de puentes cruzados	% de puentes cruzados	Valores Chi ² p<0,05
Adhesión	m94	6	40	6/15(P=0,0019)
	m106	13	87	13/15(P=0,5428)
	m41	4	27	4/15(P=0,009)
	m39	9	60	9/15(P=0,0309)
Metabolismo del hierro	m50	15	100	15/15(P=0,1432)
	m110	8	53	8/15(P=0,0464)
Transportador	m40	14	93	14/15(P=0,5428)
Pr2921	Pr2921	13	87	13/15(P=0,5428)

Por otra parte la migración evaluada en los catéteres de silicona mostró que el 60% de las cepas tiene reducida de forma significativa su capacidad de migrar sobre este material. Las cepas pertenecientes al grupo de adhesión (m94, m106, m39 y m41) así como también el transportador m40 y la cepa m110 (adquisición de hierro) no fueron capaces de migrar sobre el catéter de silicona.

Tabla 4: Ensayo de migración sobre puentes de catéteres de silicona. Se detallan los números de los puentes cruzados y no cruzados, el total de réplicas, el porcentaje de puentes cruzados por cada cepa y los valores de Chi².

Catéter Silicona				
	Cepas	N° de puentes cruzados	% de puentes cruzados	Valores Chi ² p<0,05
Adhesión	m94	3	20	3/15(P=0,0001)
	m106	7	47	7/15(P=0,0053)
	m41	5	33	5/15(P=0,0007)
	m39	6	40	6/15(P=0,0019)
Metabolismo del hierro	m50	10	67	10/15(P=0,0679)
	m110	6	40	6/15(P=0,0019)
Transportadores	m40	9	60	9/15(P=0,0309)
Pr2921	Pr2921	14	93	14/15(P=0,5428)

A continuación se muestra de forma representativa las imágenes de cruces sobre catéteres de silicona y látex la cepa salvaje Pr2921 y las mutantes m40 y m106 (Fig.17).

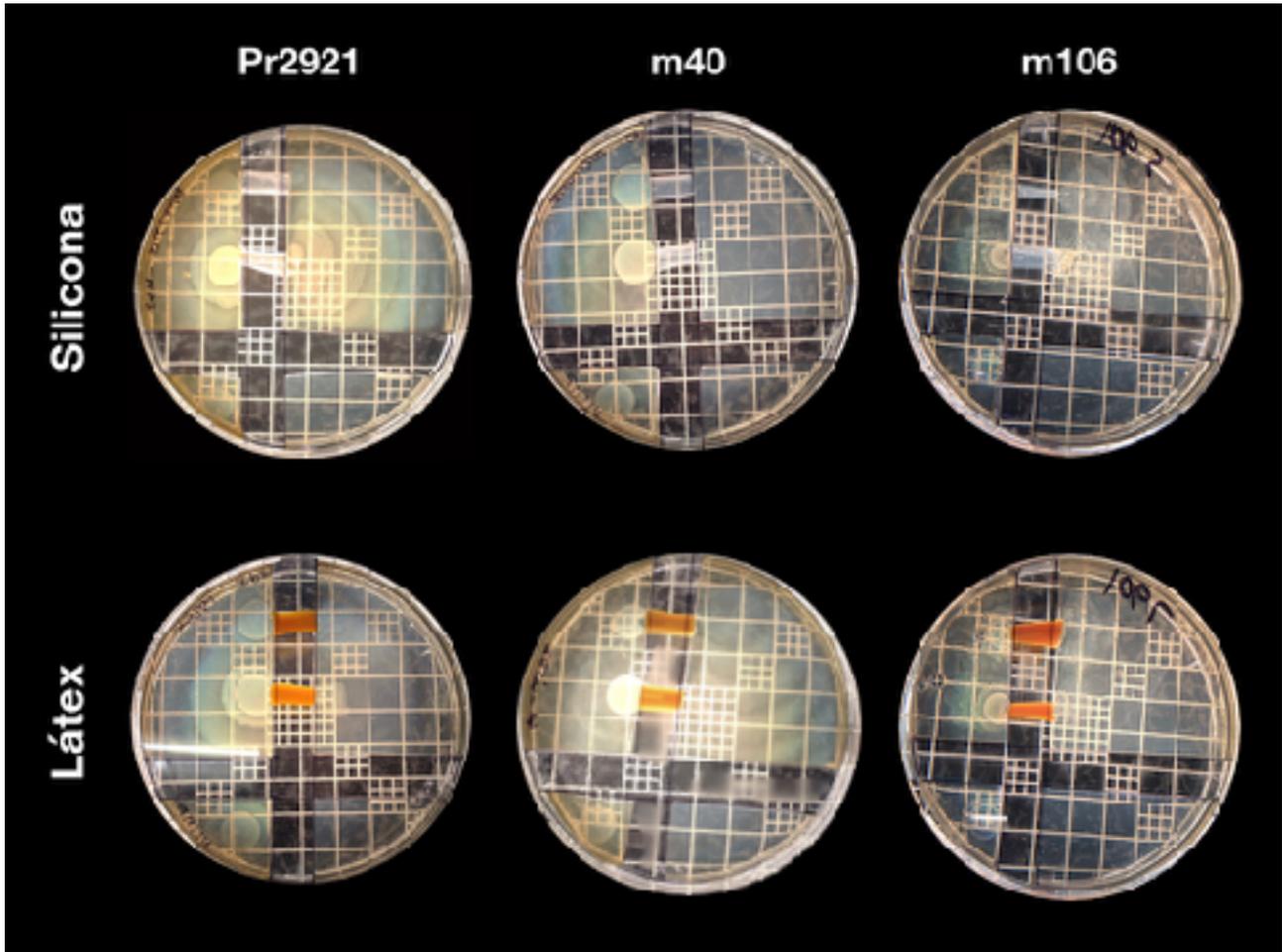


Figura 17: Fotos representativas del ensayo de migración sobre catéteres de las cepas Pr2921, m106 y m40 en silicona y látex. En todos los casos se encuentra el control negativo (sin puente).

Correlación entre las variables fenotípicas

Con el objetivo de determinar si había alguna asociación entre los atributos fenotípicos se realizó un estudio de correlación. En el estudio de correlación se estudiaron las variables de movilidad *swarming* y *swimming*, índice de hidrofobicidad y migración sobre catéteres de látex y silicona. Para ello todas las variables fueron transformadas en relación a su porcentaje, y tomando en todos los casos como 100% los resultados de la cepa salvaje, para poder compararlas por igual. En la figura 18 se muestra los gráficos de las correlaciones evaluadas.

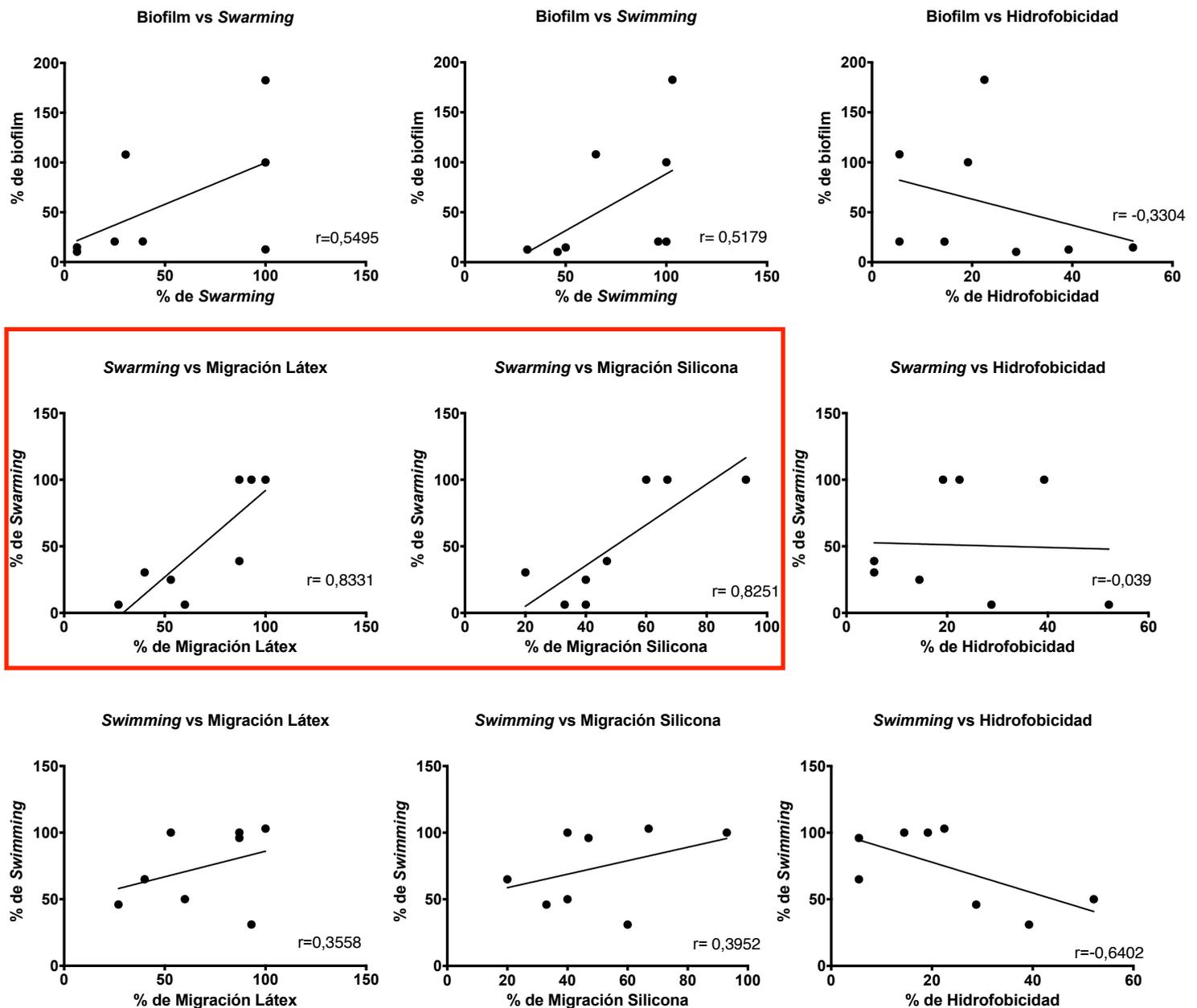


Figura 18: Análisis de correlación entre las características fenotípicas. Correlación de Pearson para las variables fenotípicas biofilms, índice de hidrofobicidad, movilidad swarming y swimming y migración en catéteres de látex y silicona. En recuadro rojo se muestra las variables que presentaron correlación significativa con $p < 0,0102$ (movilidad *swarming* vs migración en látex) y $p < 0,0117$ (movilidad *swarming* vs migración en silicona). La movilidad *swarming* se correlaciona con la capacidad de migración en la colección de mutantes.

A partir de este estudio pudimos determinar que la movilidad *swarming* tiene correlación con la migración sobre catéteres (látex y silicona), de forma que cuando la movilidad *swarming* disminuye también disminuye la capacidad de cruzar sobre las superficies de

los catéteres ($p= 0,0102$ (látex) y $p= 0,0117$ (silicona)). Para el resto de las variables no se obtuvo una correlación significativa.

Análisis comparativo de la expresión de los genes de adhesión, metabolismo del hierro y transporte, en la cepa salvaje de *P. mirabilis* en el biofilm comparado con su contraparte planctónica.

Los niveles de expresión relativa de los genes involucrados en la formación de biofilm fue evaluada mediante RT-qPCR. Luego de realizar el ensayo para obtener las células planctónicas y en el biofilm de la cepa salvaje se llevo a cabo la extracción del ARNm y su retrotranscripción. En el ensayo de PCR en tiempo real se amplificaron los distintos genes vinculados a la formación de biofilm (Tabla 2) así como el gen de referencia *rpoA*. Los resultados obtenidos se procesaron según lo descripto en materiales y métodos permitiendo la obtención de valores de expresión relativa de los ARNm que codifican para las diferentes proteínas.

En todos los casos se evaluó si existían diferencias significativas en los niveles de expresión de los diferentes genes entre la condición biofilm respecto a la condición planctónica utilizando el test de Student ($p < 0,05$).

Los genes vinculados a la formación de biofilm, son los genes que se evaluará su expresión. Cabe aclarar que a lo largo del capítulo se nombra el gen y la cepa mutante donde se identificó el gen.

Genes potencialmente vinculados a la adhesión

Los genes del grupo de adhesión son; *Proteína fimbrial SteB* (m41), *Proteína fimbrial* (FimH) (m94), *Subunidad mayor fimbrial* (Proteína fimbrial) (m106) y *serin proteasa intermembrana de la familia romboide* (m39). Los genes fimbriales de las cepas m41 y m94 evaluados en las condiciones de biofilm y planctónicas en Pr2921 mostraron una expresión significativamente menor en el biofilm que en la forma planctónica, mientras que el gen de la mutante m106 también presentó menor expresión en el biofilm pero no de forma significativa. El gen *serin proteasa intermembrana de la familia romboide* (m39) se expresó en forma similar en las dos condiciones (Fig.19).

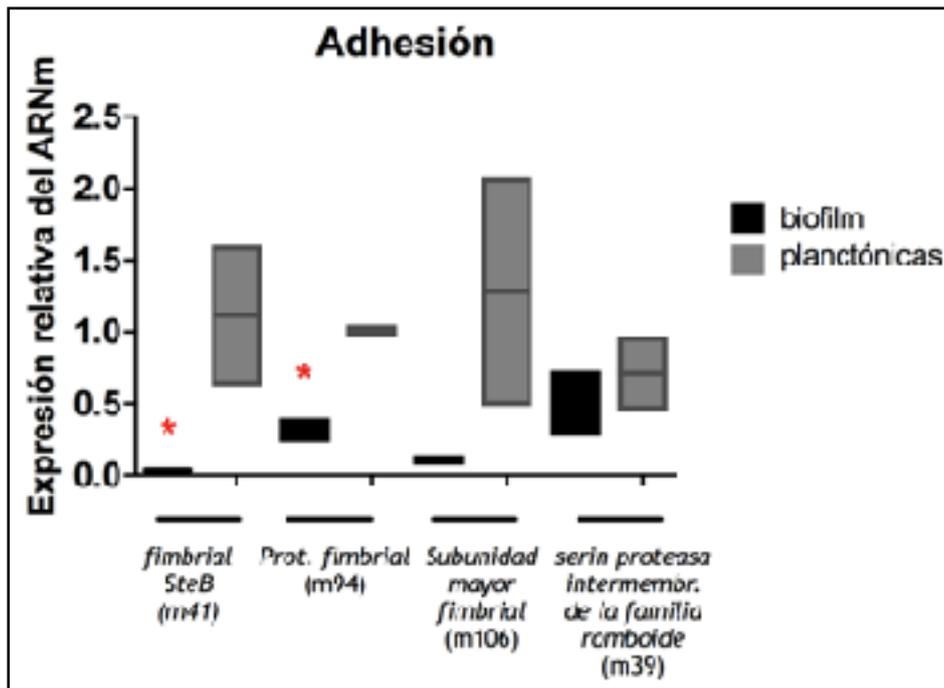


Figura 19: Expresión relativa del ARN mensajero de los genes del grupo adhesión, evaluados en la condición de biofilm y planctónica de cultivos de Pr2921, en cultivos de 48 hs. El (*) representa disminución significativa en los niveles de expresión respecto a la condición planctónica (t-Student-p<0,05).

Genes del grupo transportador

El gen Msf-Transportador (gen identificado en la cepa m40), mostró un aumento de su expresión en la condición biofilm de forma significativa mostrando la importancia de este gen en el biofilm (Fig. 20).

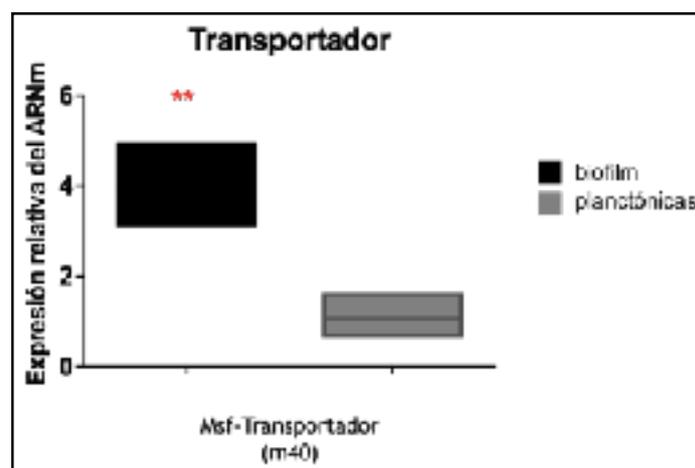


Figura 20: Expresión relativa del ARN mensajero del gen del grupo transportador, evaluado en la condición de biofilm y planctónica de cultivos de Pr2921. El (**) representa aumento significativa en los niveles de expresión respecto a la condición planctónica (t-Student-p<0.05).

Genes del grupo metabolismo del hierro

Los genes del grupo metabolismo del hierro, compuesto por *ferritina* (m50) y *receptor TonB-dependiente* (m110) mostraron la misma tendencia que la mayoría de los genes estudiados. En los dos genes se observó que la expresión fue significativamente menor en el biofilm respecto a la condición planctónica (Fig. 21).

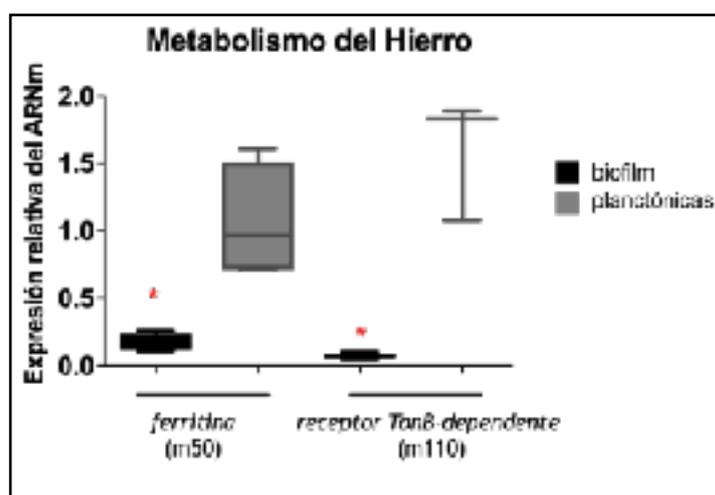


Figura 21: Expresión relativa del ARN mensajero de los genes del grupo metabolismo del hierro, evaluado en la condición de biofilm y planctónica de cultivos de Pr2921. El (*) representa disminución significativa en los niveles de expresión respecto a la condición planctónica (t-Student- $p < 0,05$).

Caracterización de la formación y la bioarquitectura del biofilm en la colección de mutantes

Con el fin de evaluar el papel de los diferentes genes identificados y su importancia en el desarrollo del biofilm se empleó la técnica de inmunofluorescencia *in situ*, adquisición de imágenes mediante MLC y posterior análisis de imágenes.

Todas las cepas mutantes fueron cultivadas en tubos cónicos el cual contenía en su interior un cubreobjetos, en medio LB a diferentes tiempos de incubación (1, 3, 5 y 7 días) con el objetivo de evaluar el desarrollo del biofilm en el tiempo. Luego de la incubación los preparados se fijaron y se realizó la inmunofluorescencia *in situ* empleando un suero anti-*P. mirabilis* policlonal como anticuerpo primario y un anticuerpo anti-ratón acoplado a FITC, como anticuerpo secundario. Estudios previos realizados en nuestro laboratorio (Schlapp et al 2011) demostraron que la inmunofluorescencia *in situ* era un método eficaz para marcar biofilms desarrollados en vidrio.

El uso del anticuerpo primario marca diversos antígenos de la superficie bacteriana y cuando se acopla con el anticuerpo secundario acoplado a FITC, nos permite observar estructuras como flagelos y/o fimbrias entre otras. Además, como control de la tinción se empleó un marcador de ADN celular *Hoechst*. En la figura 22 se muestra de forma representativa el marcado por el anticuerpo policlonal seguido del anticuerpo secundario acoplado a FITC y *Hoechst* de una de las cepas analizadas.

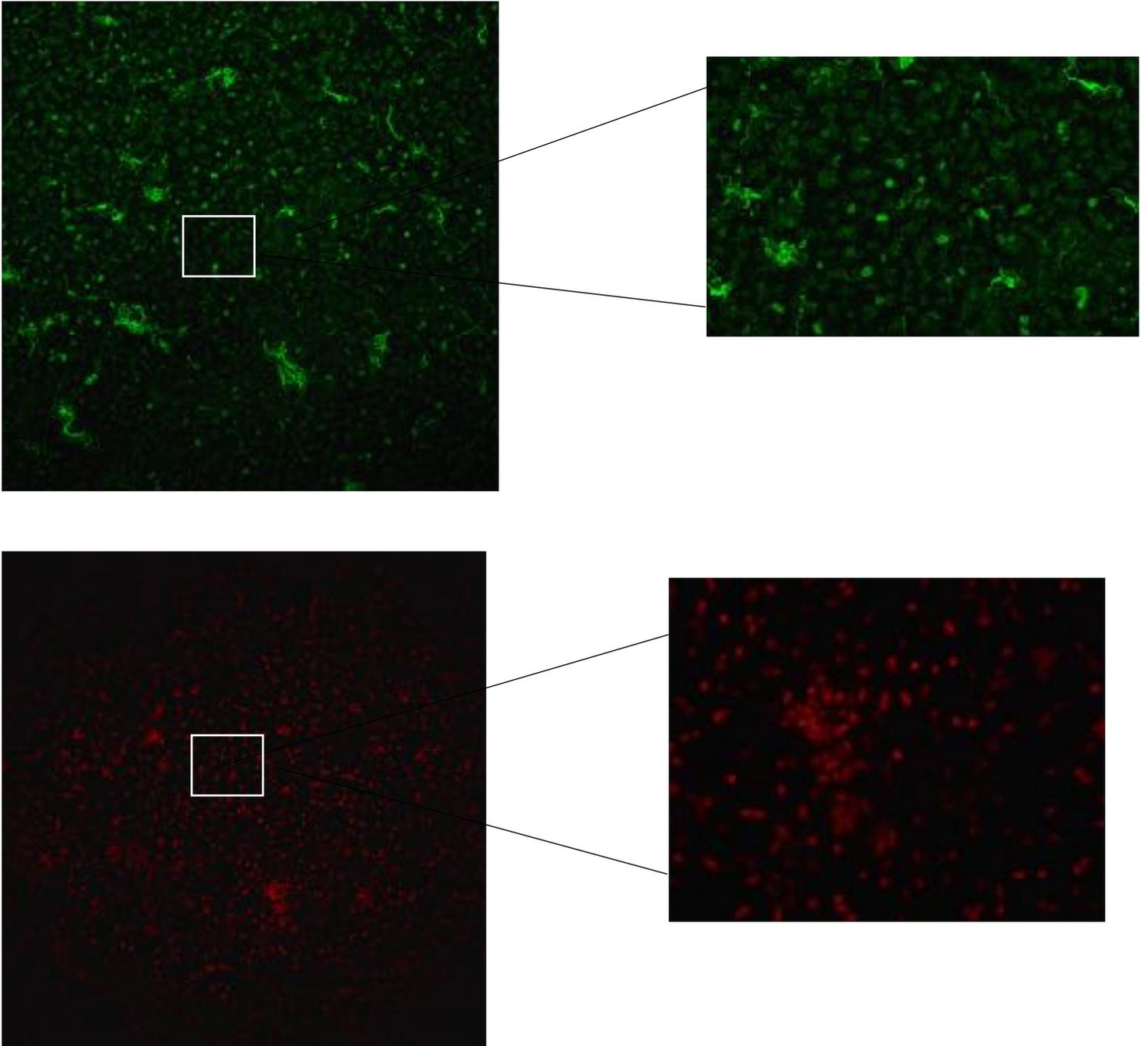


Figura 22: Imágenes representativas de la tinción con el anticuerpo secundario FITC acoplado al anticuerpo primario (arriba) donde se observan marcadas diferentes estructuras de la membrana celular, a la derecha se observa la misma imagen ampliada. Marcador Hoechst (abajo) en rojo donde representa el ADN bacteriano, derecha imagen ampliada.

Para la adquisición de las imágenes se seleccionaron entre 3 y 5 campos al azar en cada cubreobjetos y se obtuvieron secciones ópticas de 0,3 micras para cada día de incubación y para cada cepa.

Procesamiento de imágenes obtenidas por MLC

Para todas las cepas y todos los stacks se procedió de la misma forma. Las imágenes obtenidas mediante el MLC se deconvolucionaron empleando el software Huygens. Luego empleando el software sTimeCalc (IDL 7.1) se realizó la segmentación. Se utilizaron dos tipos de segmentación los cuales definen por un lado las bacterias y por otro la matriz extracelular asociada (Fig. 23), lo cual caracteriza a la biomasa del biofilm. Durante el proceso de segmentación se emplearon diversos filtros los cuales son necesarios para definir las estructuras de interés. Luego de la segmentación adecuada se procedió a la reconstrucción 3D del volumen total de bacterias y de la biomasa del biofilm obteniendo los parámetros descriptores.

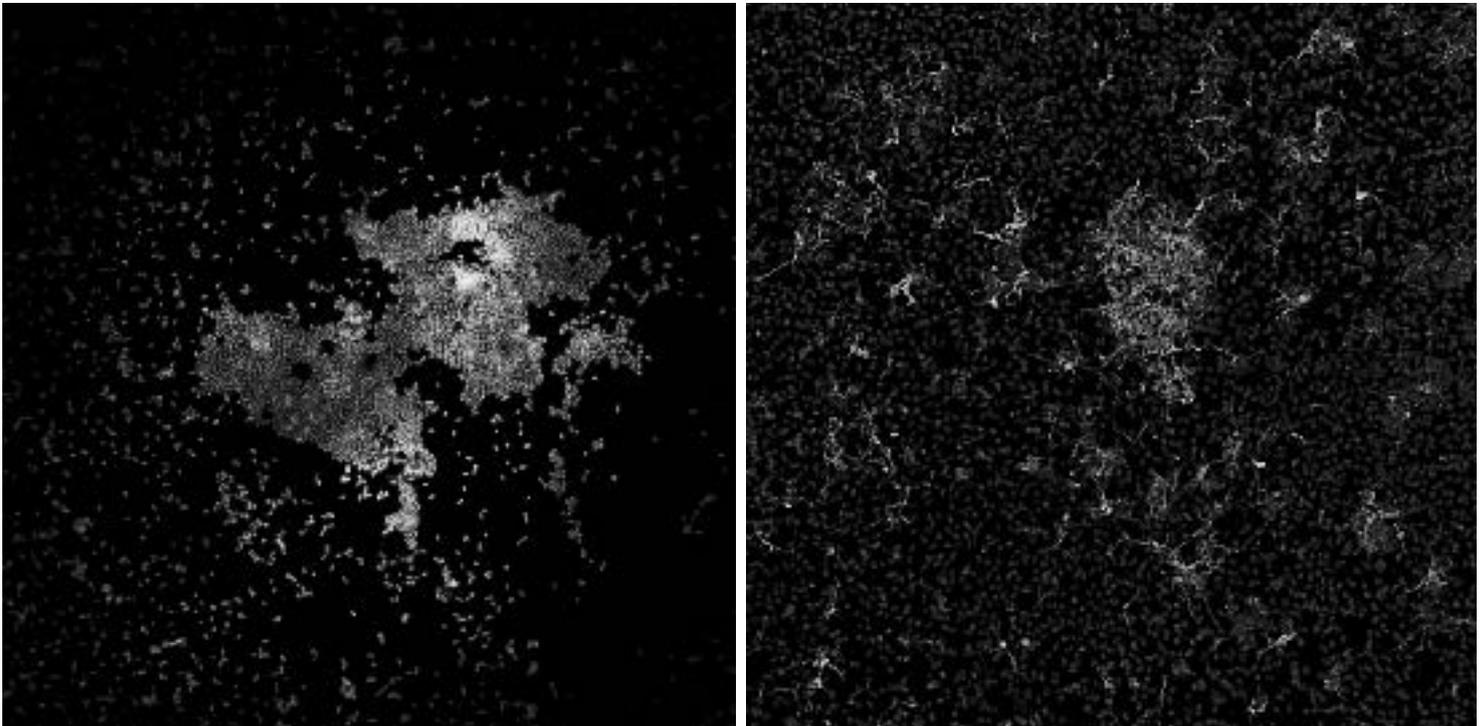


Figura 23: Imágenes representativas del proceso de segmentación, a la izquierda se observan la bacterias, a la derecha se observa la matriz extracelular asociada.

Análisis de la arquitectura de los biofilms de las cepas mutantes

A partir de los modelos 3D generados para cada cepa fue posible obtener los parámetros descriptores que nos brindan información sobre el número de bacterias, el volumen total de bacterias y el volumen de biomasa (volumen total de bacterias y de matriz extracelular).

A continuación se presentan los resultados obtenidos para cada grupo de mutantes. Se presenta en primer lugar el grupo de metabolismo del hierro, donde se detalla la obtención de cada parámetro. El procedimiento se realizó de la misma forma para todas las cepas evaluadas.

Metabolismo del hierro

◆ Número de bacterias

El primer parámetro a estudiar fue el número de bacterias por stack. En primer lugar observamos que si comparamos a la cepa m50 con la cepa parental Pr2921, forma un biofilm de mayor número de bacterias en los días 1 y 3 (Fig. 24 y 25). Estos resultados concuerdan y confirman los resultados obtenidos mediante la técnica de cristal violeta, donde la cepa m50 presenta un biofilm incrementado respecto a la cepa parental (evaluado a las 48 horas).

A los 5 y 7 días la cepa m50 presentó menor número de bacterias respecto a la cepa parental Pr2921, la cual a estos tiempos presenta un biofilm con mayor número de bacterias. Como ya se estableció en estudios previos (Schlapp et al., 2011) el biofilm de Pr2921 realizado en las condiciones que aquí se describen madura al día 5, mientras que para la cepa m50 la maduración probablemente se da a tiempos más cortos para luego pasar a la etapa de dispersión (día 5 al 7).

Por otra parte la cepa m110, de baja formación de biofilm de acuerdo a los resultados de la técnica de tinción con cristal violeta presenta el mismo comportamiento cuando se analiza mediante MLC, dado que en todos los días presentó un bajo número de bacterias (Fig. 24 y 25).

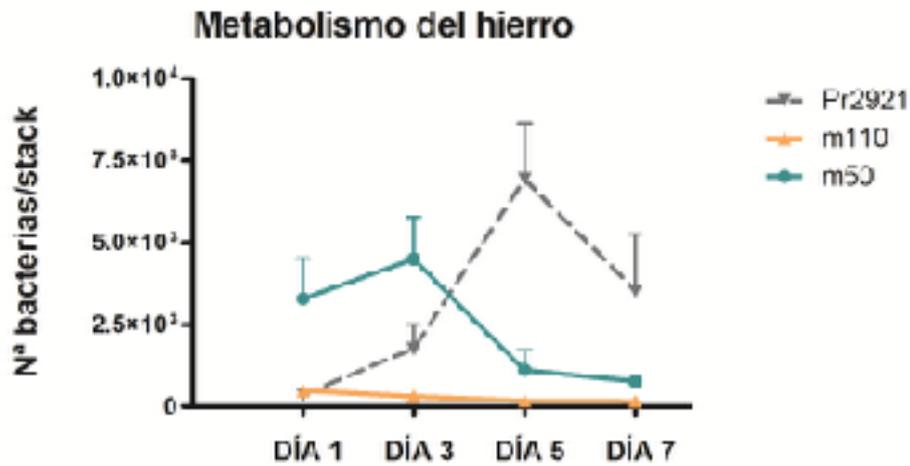


Figura 24: Variación del número de bacterias por stack para las cepas mutantes (m50 y m110) y la cepa parental Pr2921. Se muestran los valores obtenidos para cada stack y día de incubación, el error estándar y las medias.

En la figura 19 podemos ver imágenes obtenidas luego del proceso de deconvolución de las cepas m50 y m110 en función de los días evaluados, las mismas reflejan los valores obtenidos luego del análisis.

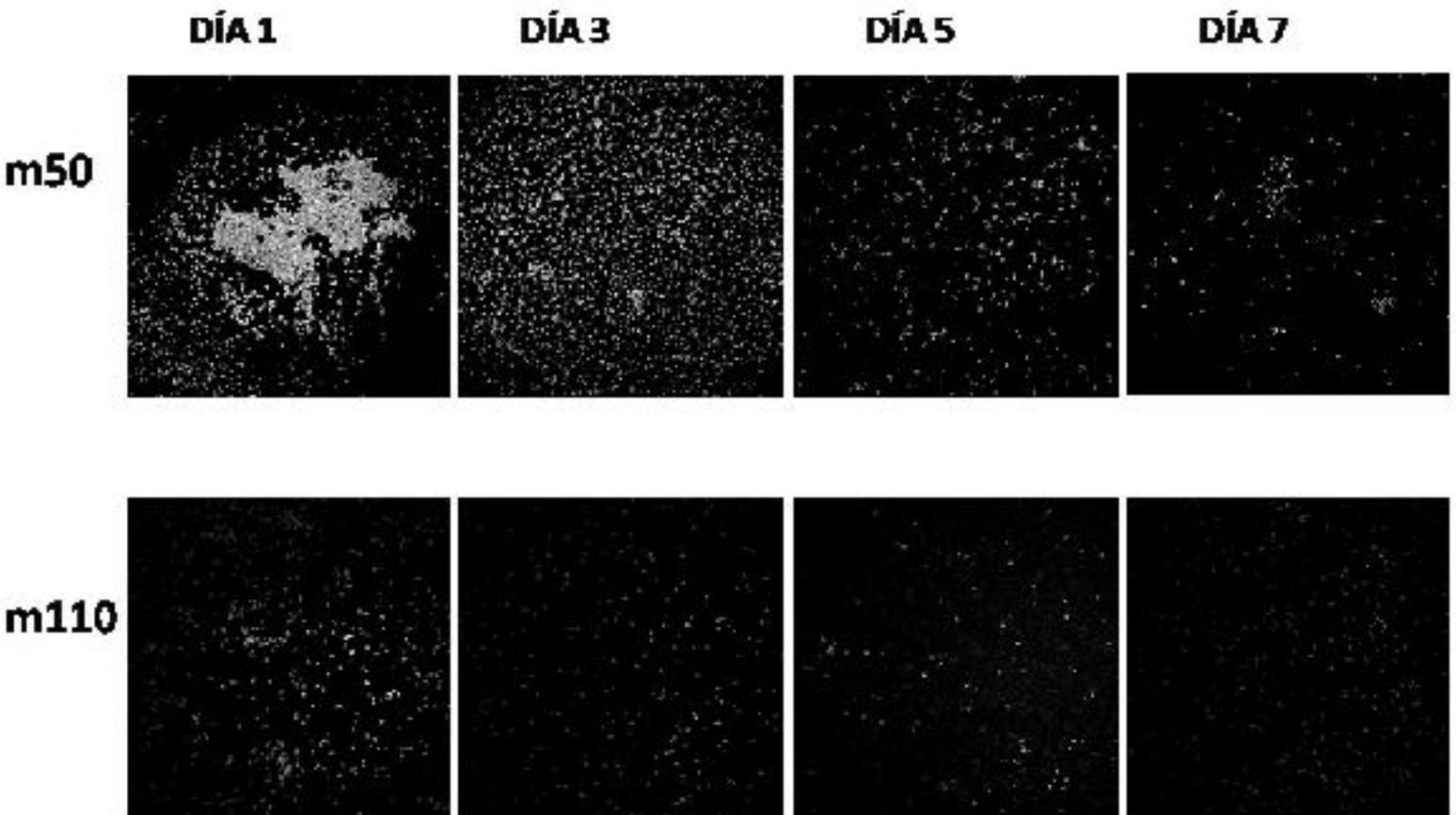


Figura 25: Imágenes representativas las cepas m50 y m110 en los días 1, 3, 5 y 7, donde se observa el número de bacterias. La cepa m50 presenta mayor número de bacterias en el día 1 y 3, mientras que la m110 posee bajo número de bacterias en todos los días evaluados.

◆ Volumen de bacterias

El volumen de las bacterias en cada stack se calcula a partir de los datos en los z-stack en tres dimensiones. Para calcular el volumen total de bacterias por stack se procede a realizar la suma de todos los volúmenes individuales de bacterias y a partir de estos se realiza el promedio y el error estándar para cada tiempo. Este parámetro es importante dado que *P. mirabilis* puede presentar células *swarmer* las cuales se cuentan como 1 objeto (1 bacteria) cuando se estudia el número de bacterias, pero su volumen puede llegar a ser 10 veces mayor que la célula normal.

Para el volumen bacteriano se observa que las cepas m50 y m110 presentan valores elevados de volumen bacteriano a los días 1 y 3 el cual decae drásticamente a los días 5 y 7. Mientras que la cepa parental Pr2921 tiene el comportamiento inverso, comienza con valores menores de volumen, el cual tiene su valor máximo al día 5 (maduración del biofilm) para disminuir al día 7 (Fig. 26).

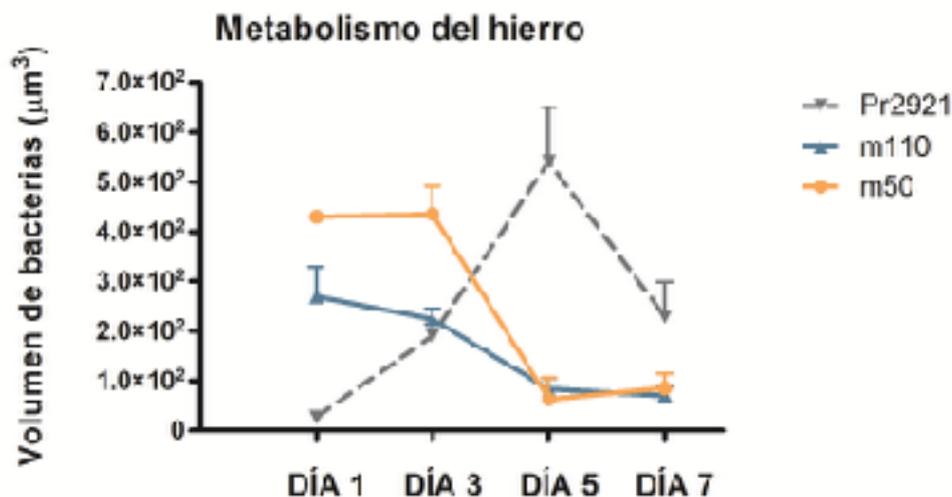


Figura 26: Variación del volumen bacteriano (μm^3) para las cepas mutantes (m50 y m110) y la cepa parental Pr2921. Se muestran los valores obtenidos para cada stack y día de incubación, el error estándar y las medias.

◆ Volumen de matriz extracelular

Como se describió anteriormente la técnica de inmunofluorescencia *in situ* empleada permite la cuantificación de matriz extracelular dado que se usó un anticuerpo policlonal que es capaz de reconocer diversas estructuras bacterianas. Es por esta tinción que se puede segmentar componentes de la matriz extracelular asociada y obtener el parámetro descrito como volumen de matriz.

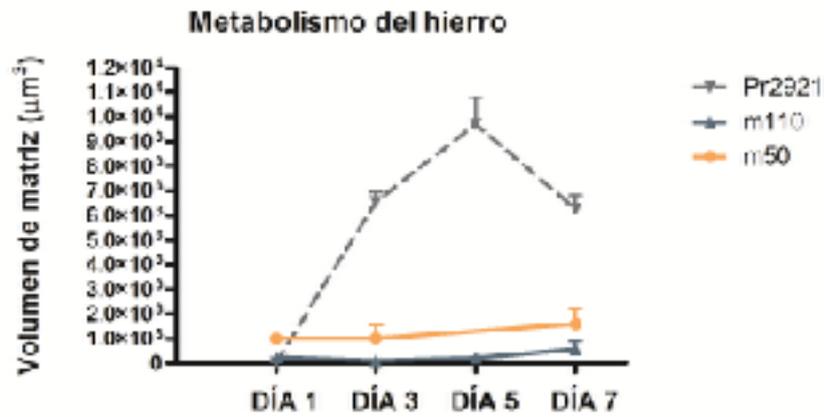


Figura 27: Variación del volumen de la matriz extracelular asociada (μm^3) para las cepas m50, m110 y la cepa parental Pr2921. Se muestran los valores obtenidos para cada stack y día de incubación, el error estándar y las medias.

Como se puede observar en la figura 27, la cepa parental Pr2921 tiene un incremento del volumen de matriz hasta alcanzar su punto máximo en el día 5 (día donde se da la maduración del biofilm). En cambio las cepas m50 y m110 no logran desarrollarse para producir matriz extracelular de forma significativa en los días evaluados.

A continuación se muestran las reconstrucciones 3D obtenidas mediante el software IDL 7.1, las mismas se obtuvieron a partir del volumen total de bacterias por stack y de biomasa superpuestas (bacterias en color amarillo(Pr2921)/verde(mutantes) y matriz extracelular en rojo) (Fig. 28).

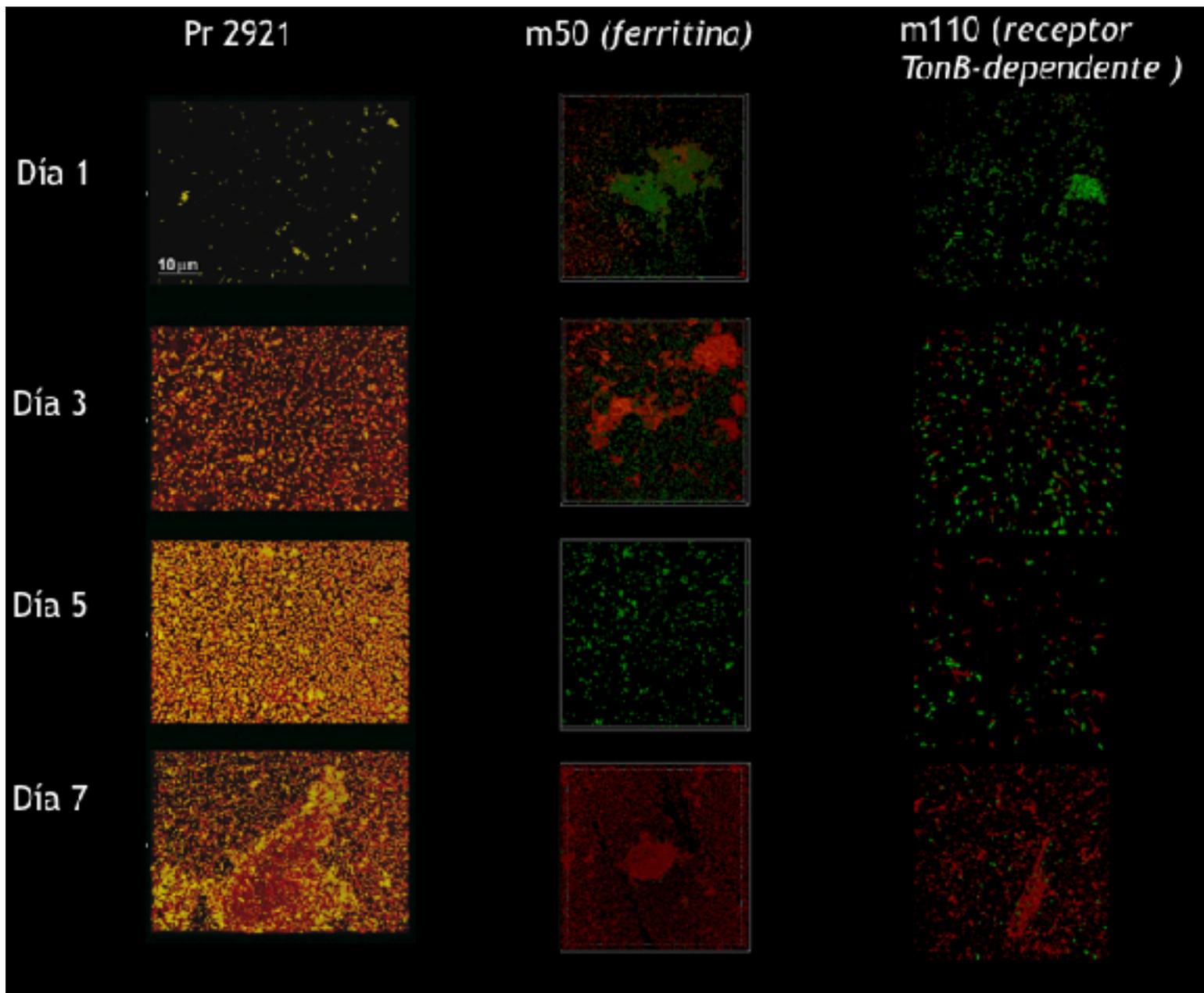


Figura 28: Etapas en la formación y maduración del biofilm de *P. mirabilis* Pr2921 y las cepas m50 y m110. Las imágenes corresponden a los modelos 3D de volumen total de bacterias y de biomasa superpuestos (bacterias en color amarillo(Pr2921)/verde(mutantes) y matriz extracelular en rojo).

Modelo de *lattice* hexagonal

Por otra parte empleando el *software* IDL se realizó un modelo 2D de distancias bacterianas. El modelo de *lattice* hexagonal nos muestra la distancia que hay entre una bacteria y sus 6 vecinas mas cercanas reflejando el grado de compactación celular. En la figura 29 se muestra la cepa parental Pr2921 y las mutantes del metabolismo del hierro. A partir de este modelo fue posible observar que la compactación y complejidad del bio-

film de Pr2921 van en aumento hasta el día 5 (día de maduración del biofilm). Luego, en el día 7 se ve cómo disminuye la compactación del biofilm lo que coincide con la dispersión característica de este día en el desarrollo del biofilm. Por otra parte vemos que la cepa m50 presenta un comportamiento inverso a la cepa parental dado que el grado de compactación mayor se da en el día 1 y día 3 luego se desestabilizaría el biofilm disminuyendo dramáticamente la compactación. Esto indica que el biofilm se forma en etapas tempranas del desarrollo pero luego se desarma rápidamente. La cepa m110 no presentan en ninguno de los días un nivel de compactación estable. Por lo tanto esta cepa no logra desarrollar un biofilm complejo ni estable en el tiempo.

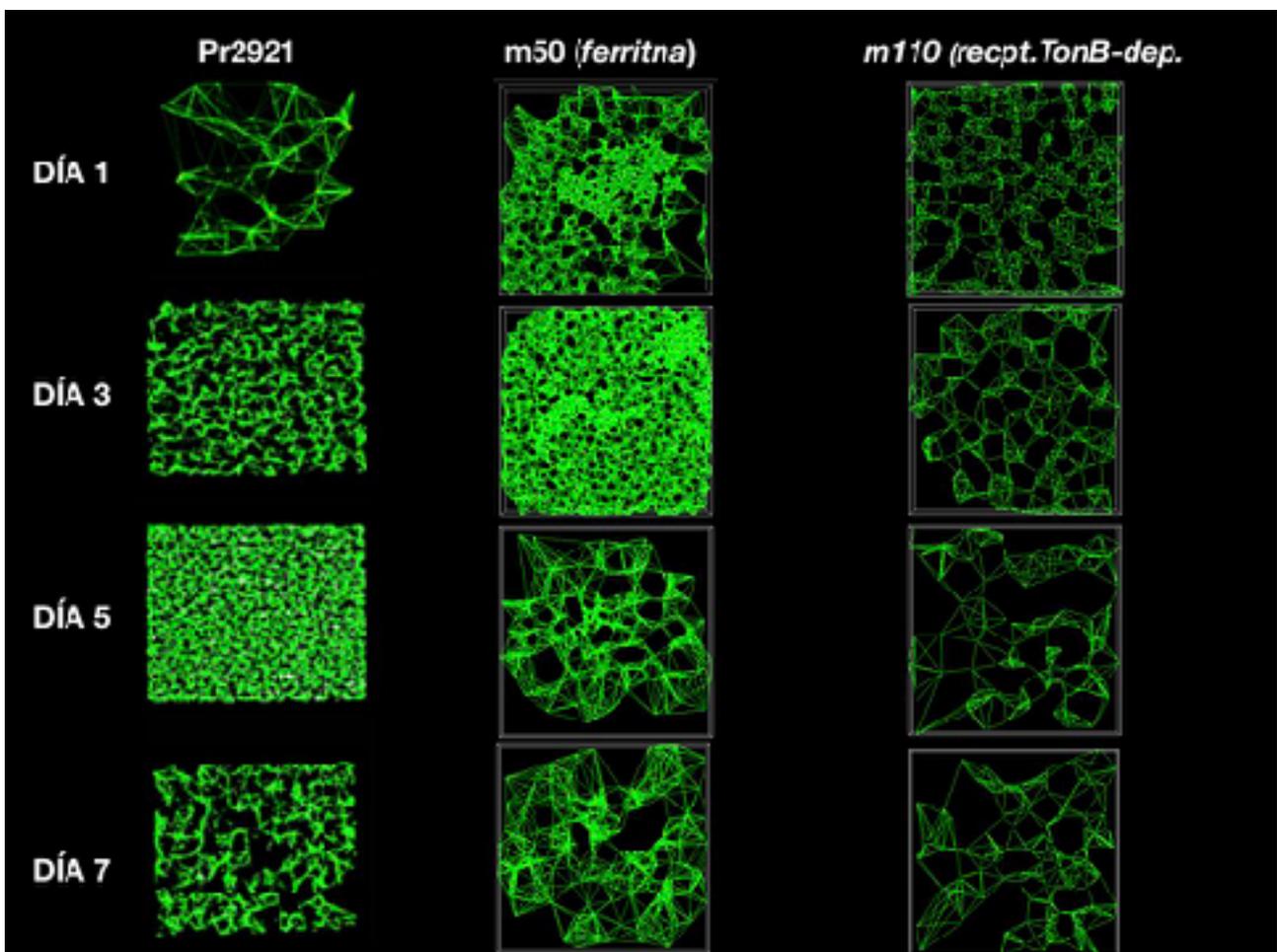


Figura 29: Modelo de *lattice* hexagonal, nivel de complejidad y compactación. Las imágenes corresponden a la cepa parental (Pr2921) y las cepas m50 y m110 en los días de incubación 1,3,5 y 7. Las líneas verdes indican la conexión entre las seis bacterias vecinas más cercanas a cada una.

Transportadores

◆ Número de bacterias y Volumen de matriz extracelular

El grupo transportador está compuesto por la cepa m40 (transportador de la familia MFS) de baja formación de biofilms según cristal violeta. Mediante el análisis de imágenes observamos que en el día 1 el número y el volumen de matriz extracelular es mayor al de la cepa salvaje. Sin embargo este comportamiento no se mantiene con el tiempo, ya que vemos que decae significativamente en los siguientes días evaluados (Fig.30).

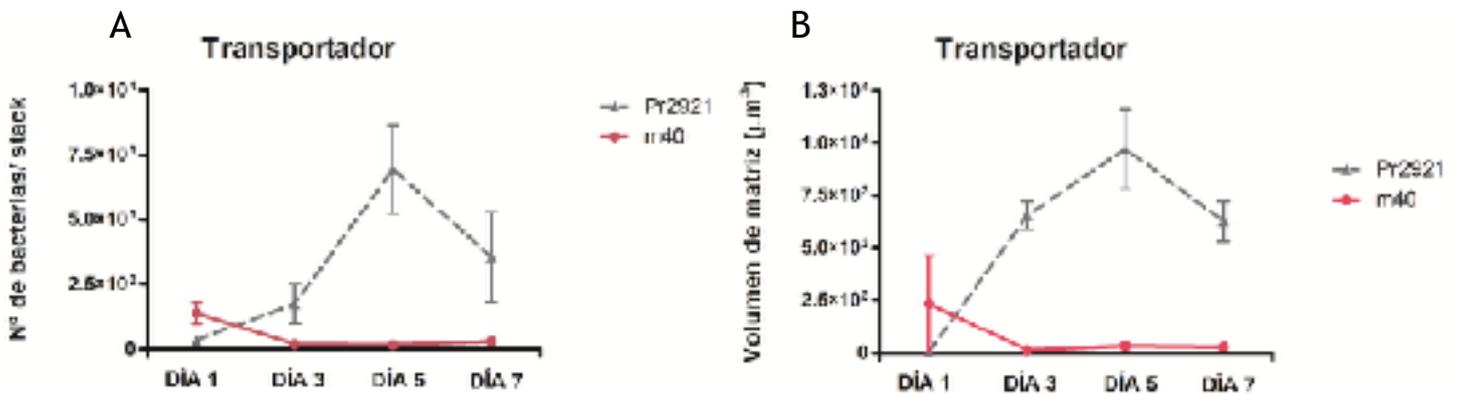


Figura 30: Variación de los parámetros del biofilm en los días de incubación. (A) número de bacterias por stack; (B) volumen de la matriz (μm^3) para la cepa m40 y la cepa parental Pr2921. Se muestran los valores obtenidos para cada stack y día de incubación, el error estándar y las medias.

◆ Volumen de bacterias

Cuando se analizaron los valores de volumen bacteriano, se observó que en el caso de m40 en el día 1 presentó un volumen de bacterias mayor a la cepa parental el cual decae drásticamente en el correr de los puntos evaluados (Fig.31).

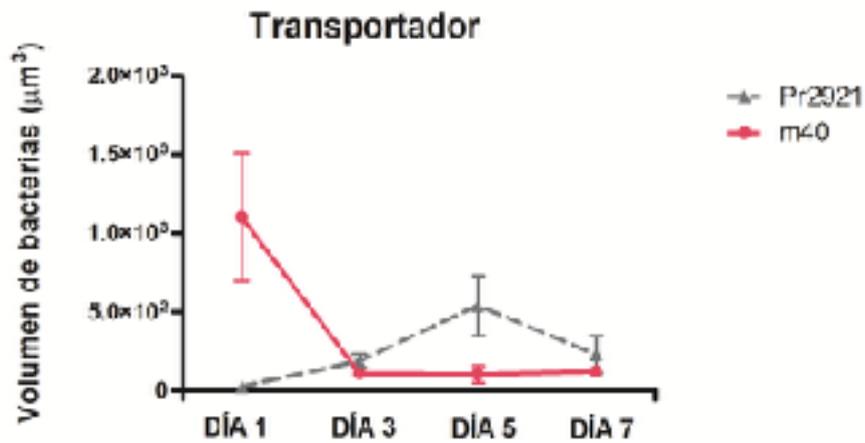


Figura 31: Variación del volumen bacteriano (μm^3) para la cepa m40 y la cepa parental Pr2921. Se muestran los valores obtenidos para cada stack y día de incubación, el error estándar y las medias

En la figura 32, se muestran las imágenes de los días 1 y 5 los cuales coinciden con los valores obtenidos del análisis de imágenes, donde en el día 1 se observa mayor número de bacterias mientras que en el día 5 ya se observa un bajo número de bacterias.

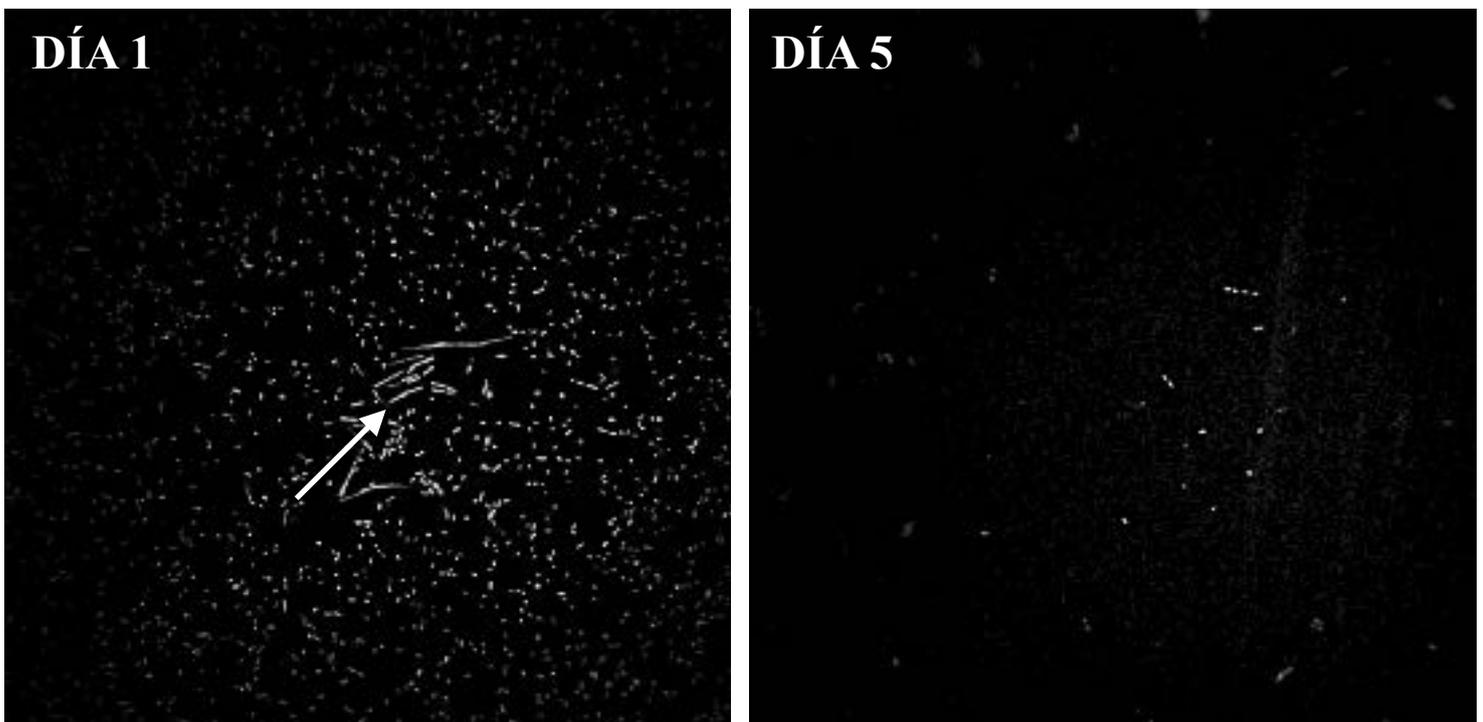


Figura 32: Imagen obtenida luego de la deconvolución en el día 1 y día 5 de la m40. Se observa células swarmer en el día 1, lo que explica el aumento del volumen bacteriano a dicho tiempo.

A continuación se representan los modelos 3D obtenidos (Fig. 33), los cuales representan las diferentes etapas en la formación de biofilm de la cepa mutante m40 en los días evaluados.

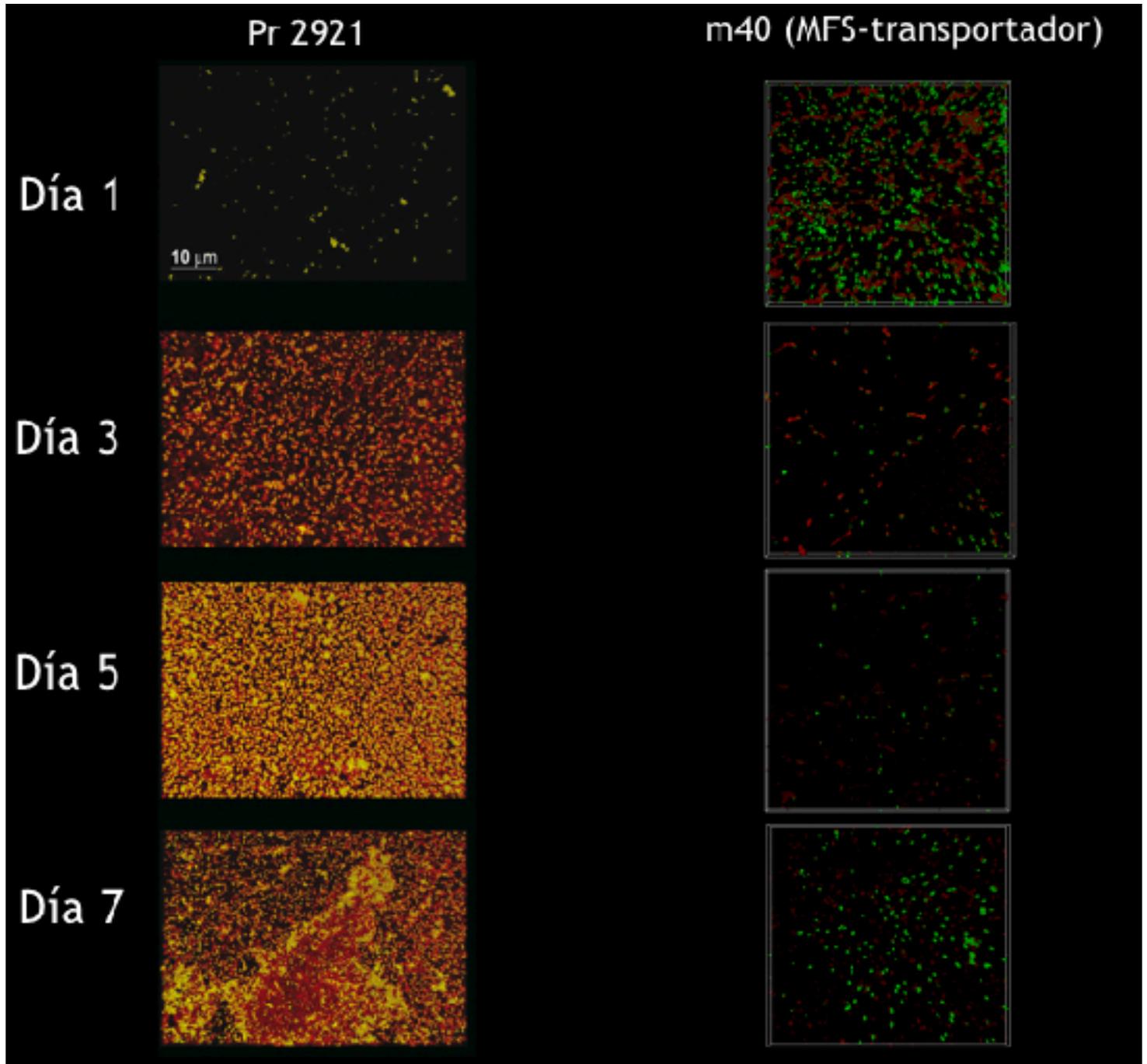


Figura 33: Las imágenes corresponden a los modelos 3D de volumen total de bacterias y de biomasa superpuestos (bacterias en color verde y matriz extracelular en rojo) para la cepa m40.

Finalmente, usando el modelo de *lattice* hexagonal fue posible observar la compactación y la complejidad del biofilm de la mutante m40. Como se observa en la figura 34 la m40 presenta el mayor grado de compactación al día 1, presentado un grado de descompactación constante en los siguientes días. Estos resultados coinciden con los anteriores, indicando que la m40 no es capaz de formar un biofilm compacto ni estable en el tiempo.

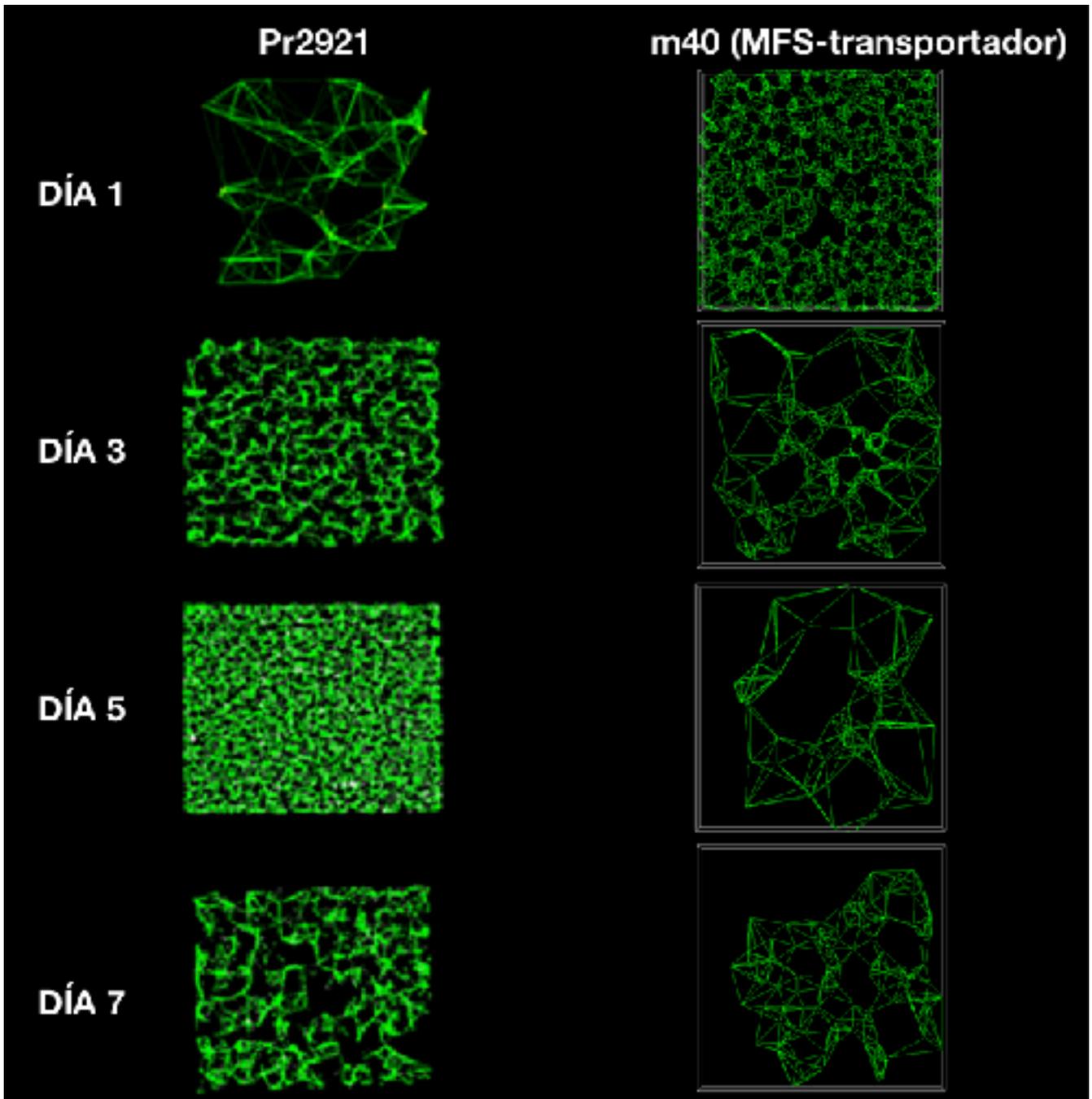


Figura 34: Modelo de *lattice* hexagonal, nivel de complejidad y compactación. las imágenes corresponden a la cepa m40 y la cepa Pr2921 en los días de incubación 1,3,5 y 7. Las líneas verdes indican la conexión entre las seis bacterias vecinas más cercanas a cada una.

Adhesión

El grupo adhesión está compuesto por las cepas m94, m106, m41, las cuales tienen interrumpido genes vinculados a fimbrias y la cepa m39 que tiene interrumpido el gen *serin proteasa intermembrana de la familia romboide*.

En las mutantes m39, m41 y m94, el número de bacterias, el volumen bacteriano así como el volumen de la matriz extracelular (Fig.35 A, B y C) es bajo en los días evaluados respecto a la cepa salvaje. De esta forma vemos que en ningún momento logra formar un biofilm estable.

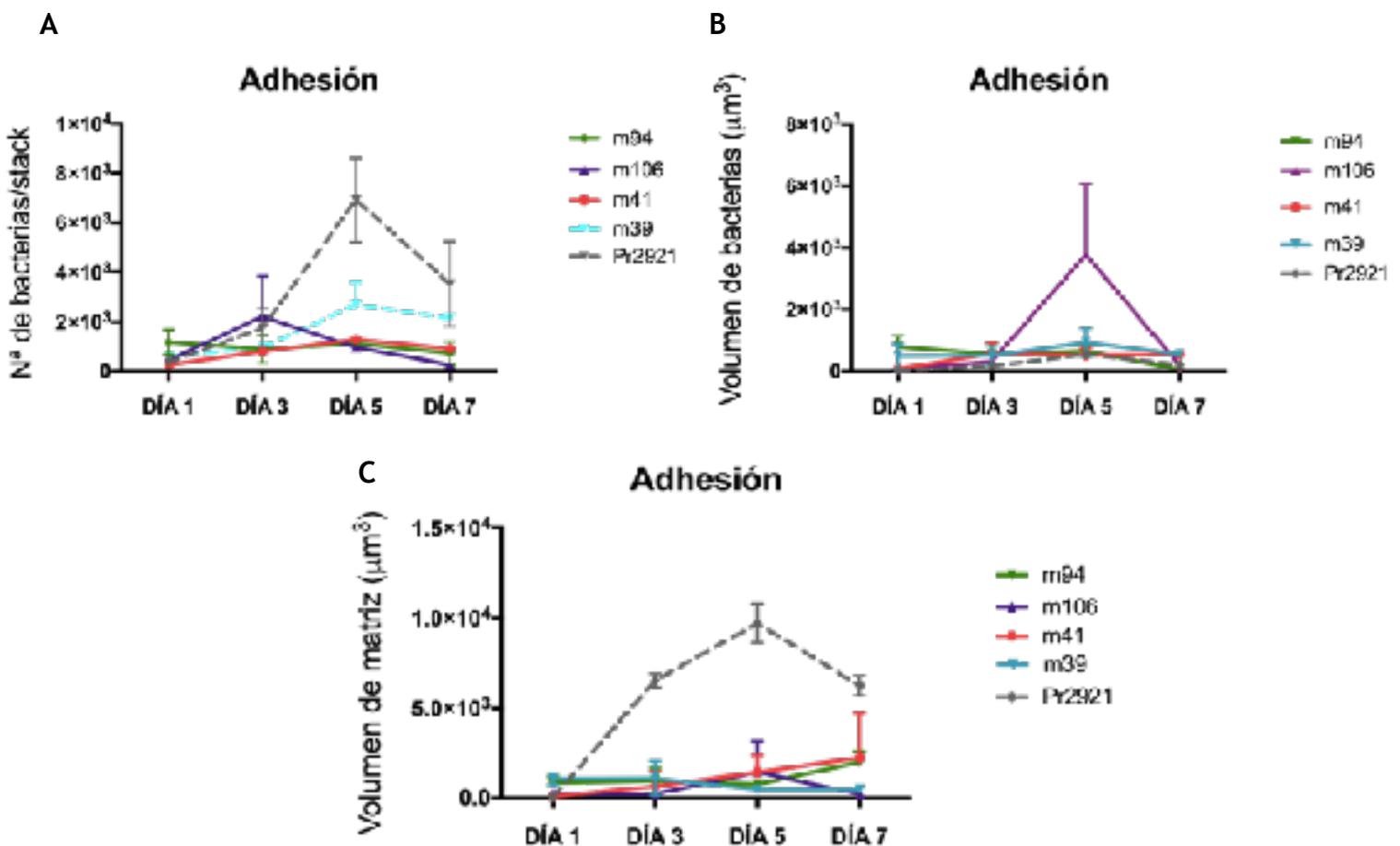


Figura 35: Variación de los parámetros del biofilm en los días de incubación. (A) Número de bacterias por stack; (B) volumen de la matriz (μm^3); (C) volumen de la matriz (μm^3), para las cepas m94, m106, m41, m39 y la cepa parental Pr2921. Se muestran los valores obtenidos para cada stack y día de incubación, el error estándar y las medias.

A continuación se muestran los modelos 3D generados para las mutantes m41, m94, m39 (Fig.36).

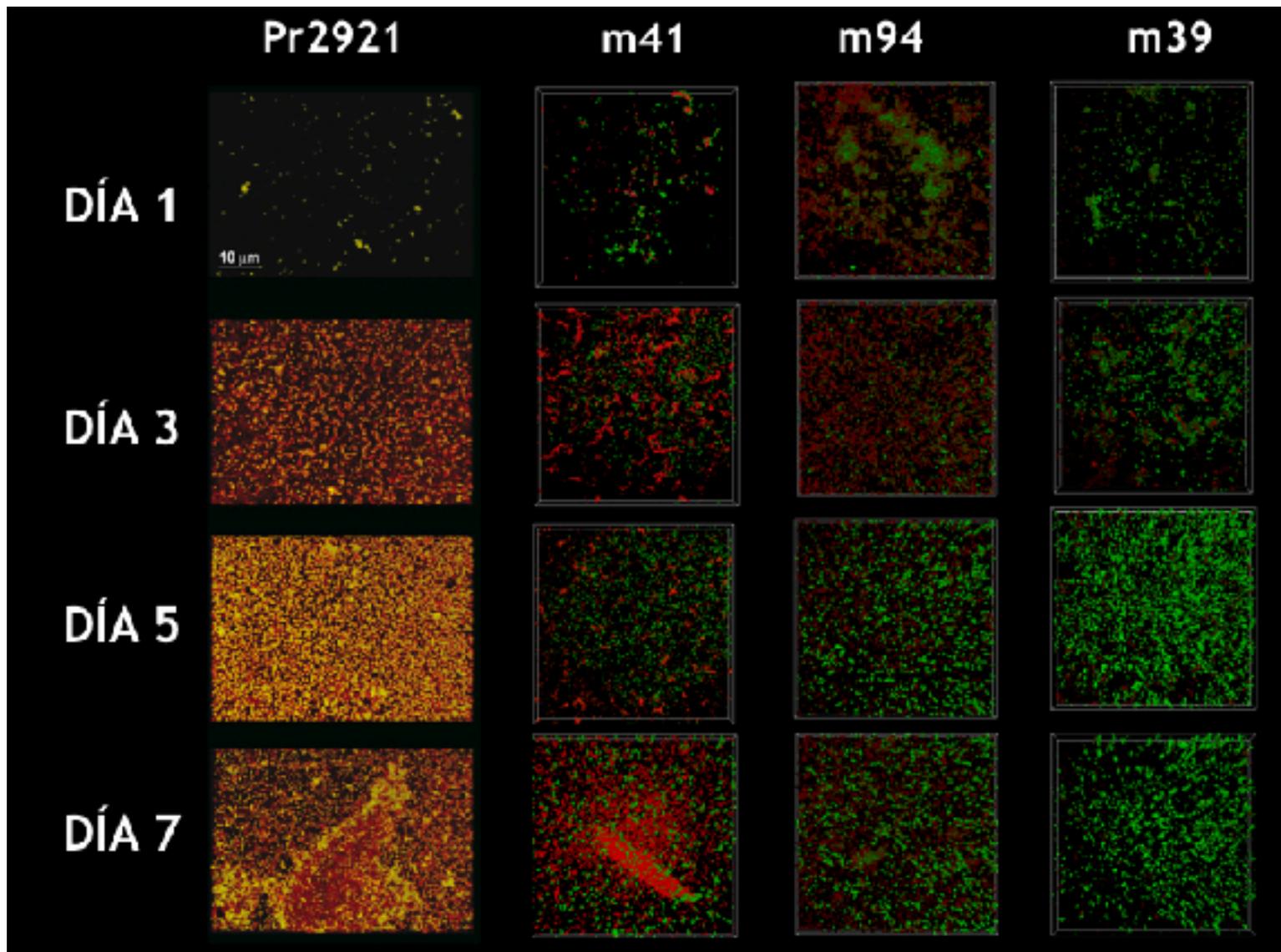


Figura 36: Las imágenes corresponden a los modelos 3D de volumen total de bacterias y de biomasa superpuestos (bacterias en color verde y matriz extracelular en rojo) para la cepa m41, m94 y m39.

A partir de la construcción del modelo *lattice hexagonal* fue posible evaluar la compactación para cada una de las mutantes m41, m94 y m39 (Fig.37).

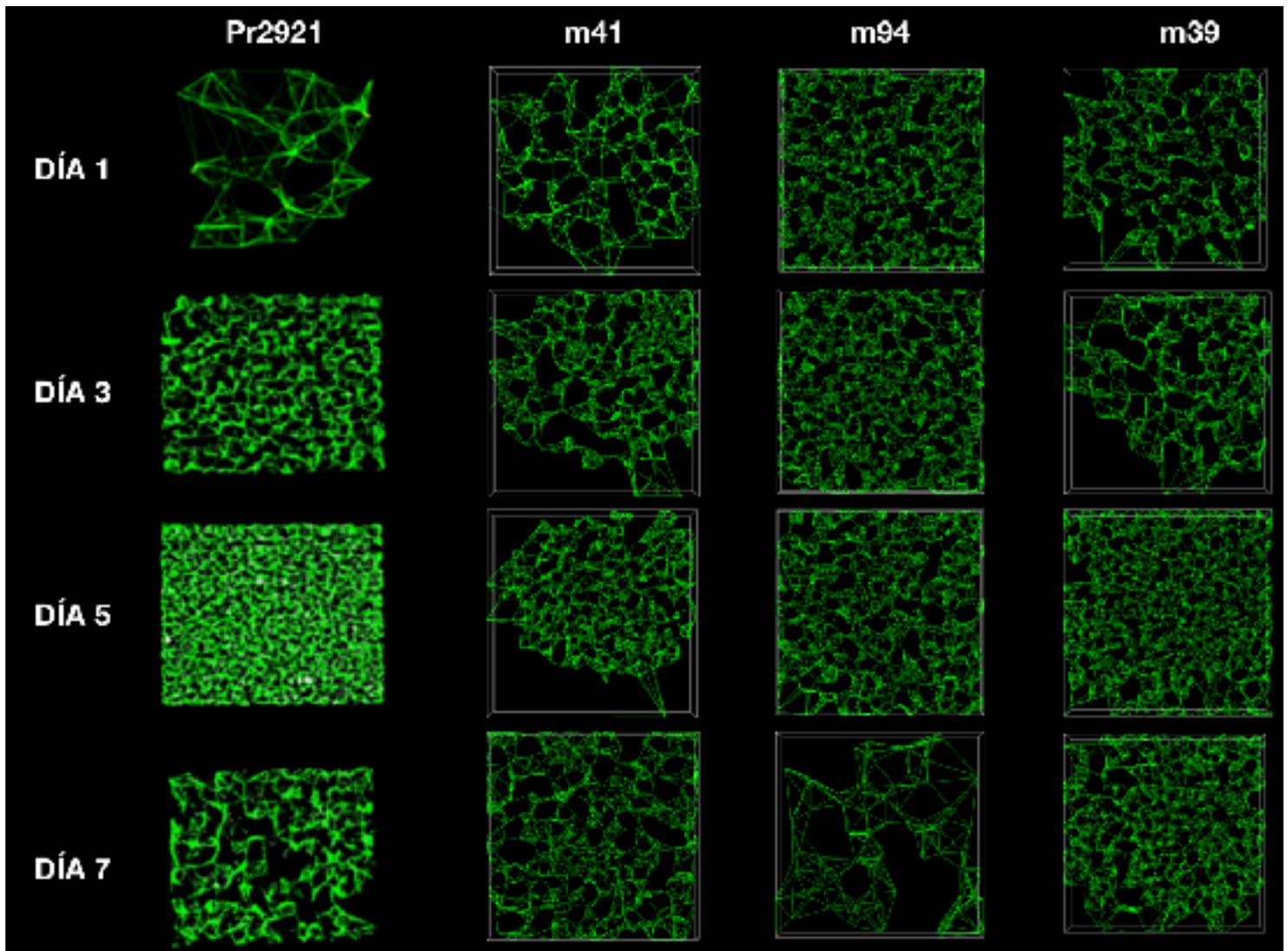


Figura 37: Modelo de *lattice hexagonal*, nivel de complejidad y compactación. las imágenes corresponden a las cepas m41, m94 y m39 y la cepa Pr2921 en los días de incubación 1,3,5 y 7. Las líneas verdes indican la conexión entre las seis bacterias vecinas más cercanas a cada una.

Como se puede observar en el modelo de *lattice hexagonal* (Fig. 37) la mutante m41 en los días 1, 3 y 5 presenta un bajo grado de compactación, mientras que en el día 7 logra su nivel de compactación mas elevado, pero nunca llega a ser como el de la cepa salvaje Pr2921. Por otra parte observamos que la cepa m94, presenta cierto grado de compactaciones en los días 1, 3 y 5 similares al día 3 de la cepa Pr2921, por lo tanto nos indica que no logra establecer un biofilm compacto ni estable en el tiempo. La mutante m39 logra niveles de compactación elevados en el día 5 y 7 aunque en ninguno de los días evaluados llega a ser comparable con la cepa Pr2921.

En la mutante m106 (*Subunidad mayor fimbrial*) cuando analizamos el volumen bacteriano vemos que es considerablemente mayor en el día 5, donde suponemos un biofilm maduro, respecto a la cepa salvaje Pr2921. Este resultado nos indica que la cepa aunque tenga mutado el gen de la subunidad fimbrial logra un volumen bacteriano grande lo cual sería un indicio de un biofilm maduro (Fig. 38 y Fig. 39)

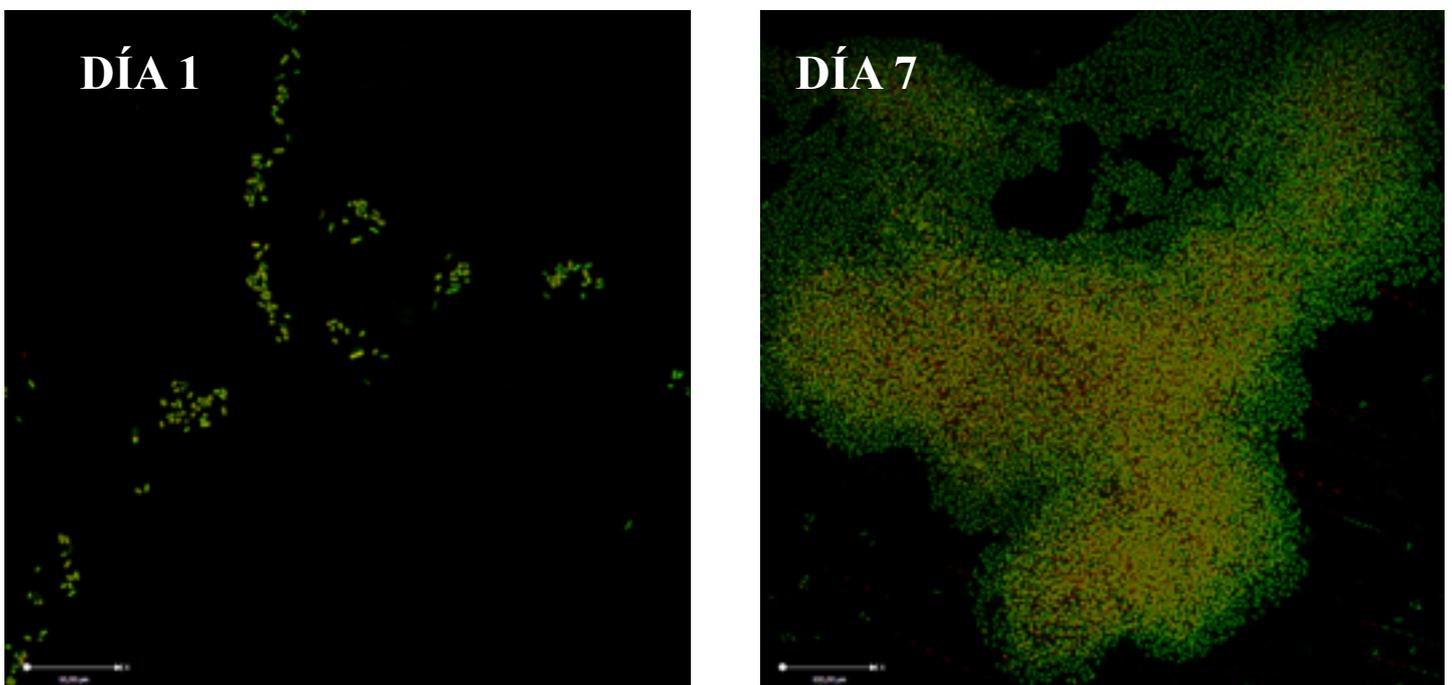


Figura 38: Imágenes obtenidas a partir del análisis de imágenes con el software Volocity. Se observa a la m106 en el día 1 y día 7. En verde las bacterias y rojo la matriz extracelular

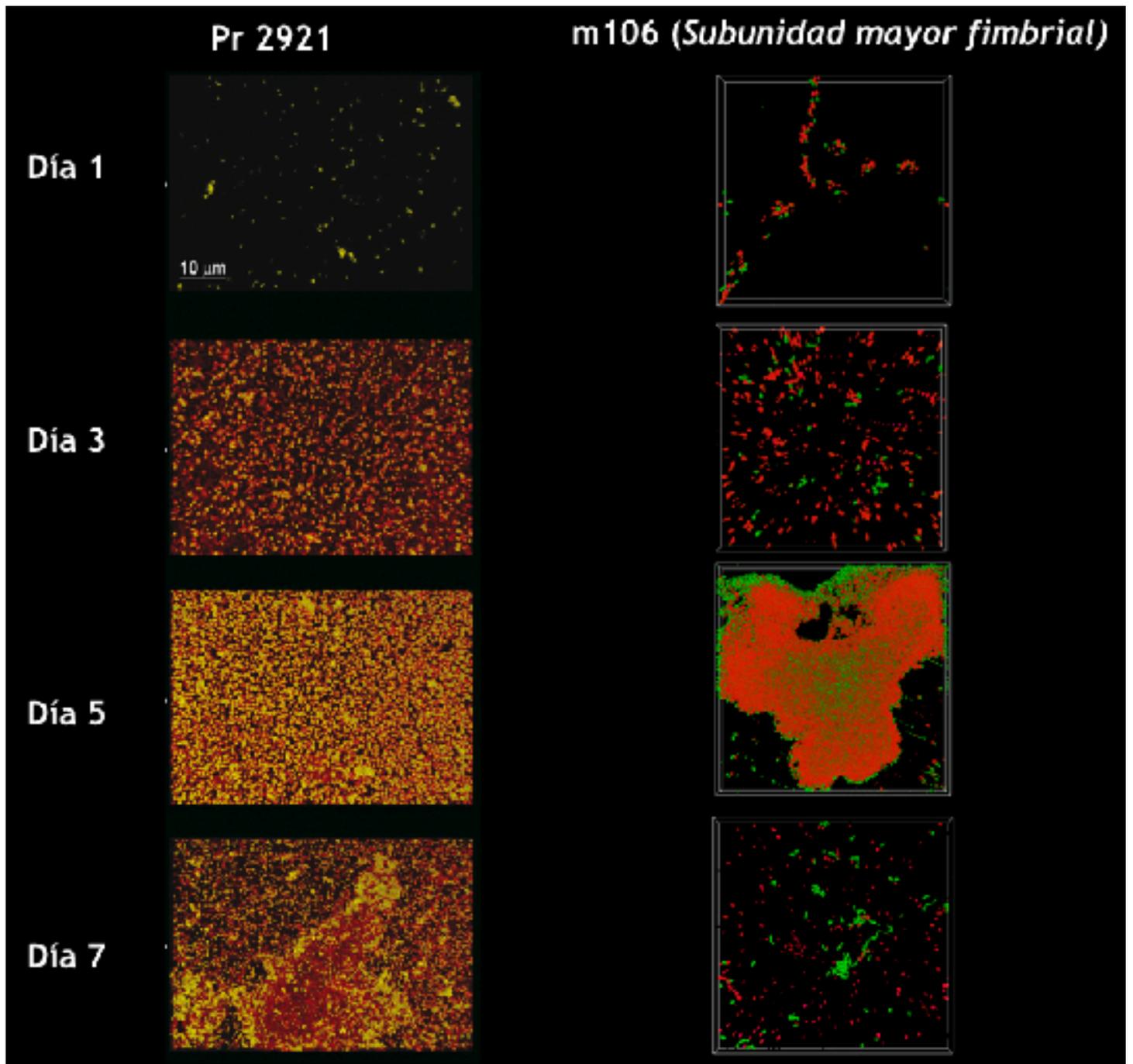


Figura 39: Las imágenes corresponden a los modelos 3D de volumen total de bacterias y de biomasa superpuestos (bacterias en color verde y matriz extracelular en rojo) para la cepa m106.

Cuando se estudió el modelo de *lattice hexagonal* para la mutante m106 se reflejó lo observado en los modelos 3D, donde en los días 1 y 3 hay pocas bacterias y la compactación es muy baja, mientras que en el día 5, se observa el biofilm maduro, compuesto principalmente por matriz extracelular y con cierto grado de compactación entre las bacterias. En el día 7 ya se observa el fenómeno de dis-

persión disminuyendo la cantidad de bacterias y bajando el grado de compactación (Fig. 40).

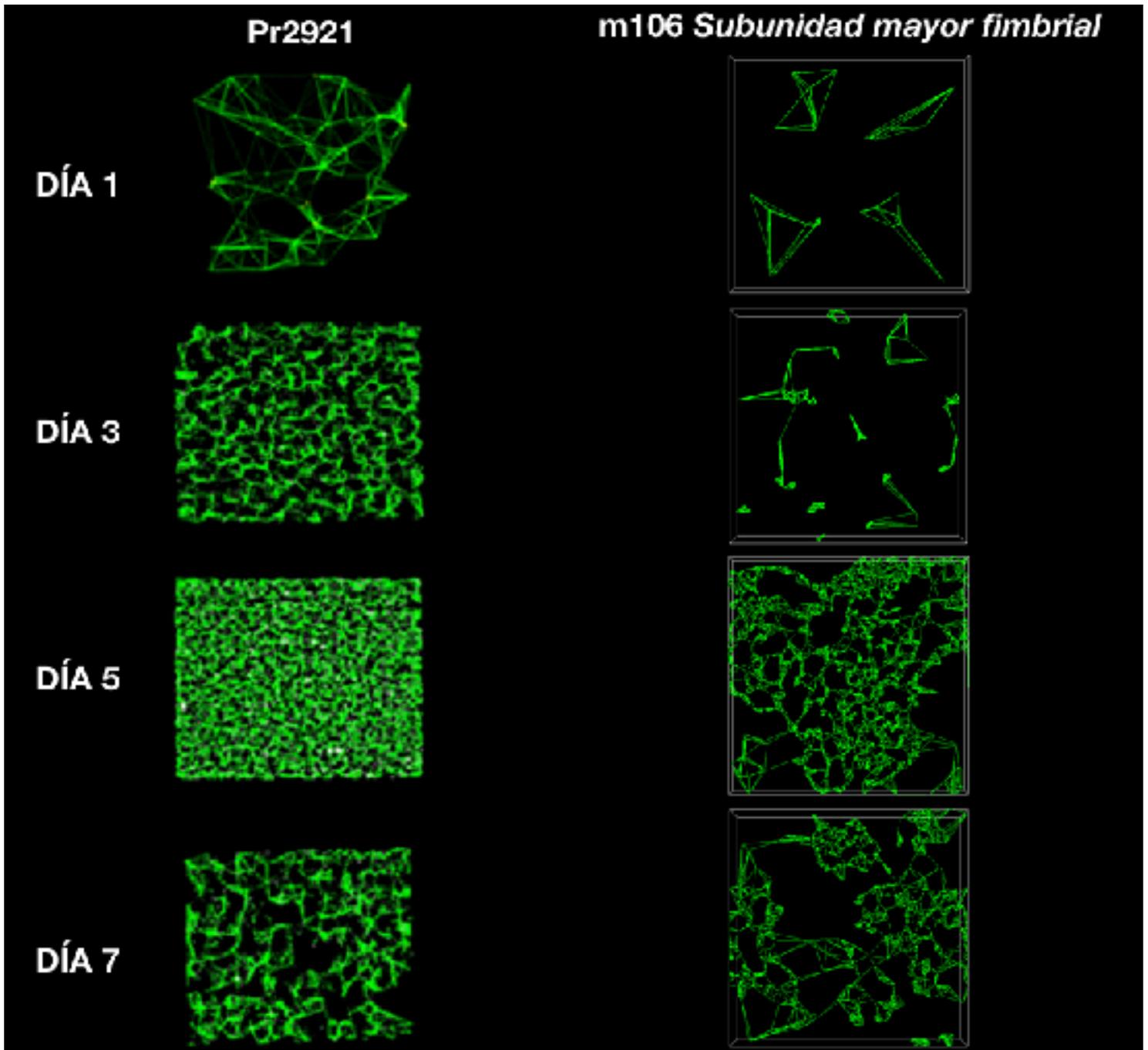


Figura 40: Modelo de *lattice* hexagonal, nivel de complejidad y compactación. las imágenes corresponden a la cepa m106 y a la cepa Pr2921 en los días de incubación 1,3,5 y 7. Las líneas verdes indican la conexión entre las seis bacterias vecinas más cercanas a cada una.

DISCUSIÓN

Los biofilms se definen como comunidades formadas por microorganismos adheridos de manera irreversible a un sustrato o interfase, embebidas en una matriz polimérica extracelular de producción propia y que exhiben un fenotipo particular en relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes (Donlan & Costerton, 2002). Estas comunidades tienen gran relevancia en el contexto clínico ya que están vinculadas a infecciones asociadas a dispositivos médicos como los catéteres urinarios, implantes comúnmente colonizados por bacterias que forman biofilms persistentes (Costerton et al., 1999). Las infecciones urinarias asociadas a catéteres representan el tipo de infección nosocomial más común y constituyen una causa de preocupación en la clínica dadas las complicaciones y la frecuente recurrencia (Darouiche, 2001). *P. mirabilis* aparece como una de las principales bacterias con alta incidencia en las infecciones urinarias asociadas a catéteres (Mobley, 1996), dando lugar a la formación de biofilms cristalinos, ocasionando la obstrucción en el lumen del catéter y generando serias complicaciones como pielonefritis y septicemia (Stickler, 2008).

El objetivo de este trabajo consistió en dilucidar diferentes aspectos relacionados con las bases moleculares y la biología de los biofilms de *P. mirabilis*. Para ello se evaluó la influencia de distintos factores implicados en la generación del biofilm mediante el análisis de una biblioteca de cepas mutantes en genes que afectan significativamente la formación de biofilms de *P. mirabilis*. Además, la influencia de los genes implicados en la formación de biofilms en la cepa salvaje (Pr2921) se evaluó por medio de RT-qPCR en forma planctónica y formando biofilms. La bioarquitectura de los biofilms generados por las cepas mutantes fue evaluada mediante el uso de MLC y análisis de imágenes.

Genes fimbriales y el desarrollo del biofilm

La formación de biofilms microbianos es un proceso complejo que depende de una amplia gama de genes (O'Toole 2000). Sin embargo, se sabe que las diferentes proteínas de superficie pueden ejercer un papel clave en el desarrollo del biofilm. *P. mirabilis* posee en su genoma 17 operones fimbriales putativos, el número más alto encontrado en cualquier especie bacteriana secuenciada hasta el momento (Pearson et al., 2008). Se ha evaluado la contribución a la infección de algunas de estas estructuras, pero se sabe

poco sobre su contribución en a la adherencia al catéter urinario y respecto a la formación de biofilm.

Las fimbrias de *P. mirabilis* que han sido estudiadas más extensamente son MRP (manosa Proteus-like), PMF (*P. mirabilis* fimbriae), ATF (temperatura ambiente fimbriae) y UCA (uroepithelial cell adhesin) (Nielubowicz y Mobley, 2010). Las fimbrias MRP, PMF y UCA han sido relacionadas con la infección del tracto urinario por *P. mirabilis* y con la adhesión a células uroepiteliales utilizando diferentes modelos. Una cepa de *P. mirabilis* con el gen de ATF interrumpido se vio que la capacidad de infección no estaba afectada cuando se usó el modelo UTI ascendente en el ratón (Zunino 2000). Por otra parte, un trabajo publicado recientemente por nuestro grupo, reveló que cuatro fimbrias de *P. mirabilis* (MRP, UCA, ATF y PMF) son claves en la formación de biofilms. Los resultados indicaron que las diferentes fimbrias contribuyen a la formación de un biofilm estable y funcional. Algunos mutantes (MRP y ATF) formaron biofilms más pequeños en comparación con la cepa salvaje, mientras que otros formaron biofilms significativamente más grandes (UCA y PMF) mostrando diferentes características de la bioarquitectura (Scavone et al., 2016).

Estos resultados coinciden con los obtenidos en el presente trabajo, dado que las tres mutantes fimbriales, pertenecientes al grupo adhesión (m94, m106 y m41) presentaron un biofilm poco estable en el tiempo y con diferencias en su bioarquitectura respecto a la cepa salvaje, según los resultados obtenidos por la observación al microscopio láser confocal y posterior análisis de imágenes. A su vez observamos que este grupo de cepas (m94, m106 y m41) presentaron bajo e incluso nula movilidad *swarming* lo que también se vio reflejado en la migración de estas cepas sobre la superficie de los catéteres urinarios evaluados. Estudios previos observaron que mutantes con fenotipos de biofilm alterado presentaban en su mayoría afectada la movilidad *swarming* (Holling et al., 2014). Sin embargo, Scavone et al., 2016 observaron que mutantes fimbriales no presentaban alteraciones en la movilidad *swarming*, pero si presentaban un desarrollo del biofilm poco estable en el tiempo. Stickler & Hughes (1999) demostraron que *P. mirabilis* era capaz de realizar *swarming* sobre diversos tipos de materiales de catéteres y sugirieron que este fenómeno podría estar implicado en la diseminación de sus biofilms sobre las superficies de catéteres y en el inicio de las infecciones urinarias asociadas a éstos.

Por lo tanto los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirman que los genes fimbriales identificados en el presente trabajo, son relevantes en las primeras etapas del establecimiento para el desarrollo del biofilm en *P. mirabilis*.

En cuanto a la expresión de estos genes fimbriales se observó que a los genes que codifican para proteína fimbrial SteB (m41), proteína fimbrial (m94) la expresión fue significativamente menor en la condición biofilm y en el caso del gen de la subunidad mayor fimbrial (m106) no fue estadísticamente significativa su disminución pero se observó claramente que se expresaba menos que en la condición planctónica. Estos resultados son coincidentes con lo reportado en la literatura, tal es el caso de Romero-Lastra et al., 2017, los cuales dentro de los genes que se expresaban de forma diferenciada en las condiciones biofilm y planctónico, uno de ellos era la fimbria, *fim D*, la cual disminuyó de forma significativa su expresión en el biofilm maduro. Estos resultados son esperables ya que las fimbrias estarían involucradas en las primeras etapas del desarrollo del biofilm (etapa inicial de adhesión reversible) por tanto no serían necesarios para el mantenimiento de un biofilm en estadio maduro (Whiteley et al., 2001; Yamamoto et al., 2011). Un estudio realizado mediante el análisis transcriptómico comparativo basado en microarrays, demostró que el 4,8% de los genes de *Porphyromonas gingivalis* se expresaban de forma significativamente diferencial en el biofilm en comparación con el crecimiento planctónico (Romero-Lastra et al., 2017). Estos resultados están de acuerdo con informes sobre otros patógenos, tales como *P. aeruginosa* o *E. coli* cultivados bajo similares condiciones de crecimiento (biofilm maduro y células planctónicas), en las que se observó que menos del 5% de expresión era diferencial (Waite et al., 2005; Whiteley et al., 2001; Schembri, et al., 2003; Valle et al., 2004).

Por otra parte, la cepa mutante m39, serin proteasa intermembrana de la familia romboide, también clasificada dentro del grupo adhesión, principalmente porque según las descripciones en la literatura es capaz de modelar la superficie de la membrana celular en bacterias y por tanto alterar las propiedades de adhesión.

En cuanto a su movilidad vimos que presentó baja movilidad *swarming*, no se encontró reportes sobre su papel en la movilidad *swarming*.

Además observamos que el gen serin proteasa intermembrana de la familia romboide se expresó de la misma forma en las dos condiciones (planctónica y biofilm). Las proteasas romboides son la familia más grande de enzimas que hidrolizan enlaces peptídicos dentro de la membrana celular (Sakai et al., 1996). En bacterias se ha descrito su función como facilitadoras de la detección del *quórum sensing* (Stevenson et al., 2007). De todas maneras existen pocos estudios sobre la función de esta proteína en bacterias y no hay reportes descriptos sobre biofilms.

El estudio de las propiedades de la superficie bacteriana como la hidrofobicidad, es un factor no específico que ha sido relacionado con el desarrollo del biofilm (Darouiche,

2001). Esta propiedad se relaciona con una mayor capacidad de adhesión a superficies no polares y por lo tanto una mayor capacidad de formación de biofilms (Donlan, 2002). Pompilio et al., 2008 observó que la hidrofobicidad modula la formación de biofilm en *Stenotrophomonas maltophilia*. En este trabajo se observó que las cepas m94, m106 y m41 presentaron un índice de hidrofobicidad similar al de la cepa salvaje (hidrofílicas). Mientras que la cepa m39 presentó un índice de hidrofobicidad significativamente mayor respecto a la cepa salvaje y al resto de las cepas mutantes. No se pudo encontrar una asociación entre los valores de hidrofobicidad y la formación de biofilm.

Migración sobre catéteres de uso comercial

La cateterización de la vejiga urinaria es un procedimiento llevado a cabo por una amplia variedad de razones. El uso de catéteres a corto plazo (≤ 2 semanas) se utiliza después de algunas cirugías urológicas y para la prevención de la posible retención urinaria aguda después de la cirugía. Sin embargo, aunque el catéter permanente puede ser un dispositivo necesario para planes de cuidados específicos, los catéteres urinarios no están libres de problemas y sólo deben insertarse cuando su uso pueda justificarse. Una de las principales razones de preocupación en el uso de catéteres urinarios es el desarrollo de infecciones urinarias asociados a estos dispositivos (ITU-C) (Wilson, 2011). Debido a la alta incidencia de las ITU en ambientes hospitalarios, medidas preventivas deben ser adoptadas para reducir complicaciones y costes de tratamiento. Como ya se mencionó *P. mirabilis* es uno de los principales agentes etiológicos aislados sobre la superficie de catéteres en pacientes con ITU (Stickler & Hughes, 1999). Este fenómeno estaría implicado en la diseminación de sus biofilms sobre las superficies de catéteres y en el inicio de las infecciones urinarias asociadas a éstos (Stickler & Hughes, 1999). Por otra parte, se ha observado que la movilidad *swarming* estaría relacionada con la migración y la colonización sobre las superficies de los catéteres urinarios (Jones et al., 2004; Sabubba et al., 2002; Stickler & Hughes, 1999).

En el presente trabajo observamos que las cepas mutantes presentaron un porcentaje de migración mayor en la superficie de los catéteres de látex respecto a lo observado en el material silicona. Tres de las cepas mutantes (m106, m50 y m40) fueron capaces de migrar sobre la superficie de los catéteres de látex, mientras que el resto de las cepas su migración fue significativamente menor al de la cepa salvaje Pr2921.

En los catéteres de silicona la cepa m50 (ferritina: grupo metabolismo del hierro), logró migrar la superase de el catéter de forma similar a la cosa salvaje, mientras que el resto de las mutantes su migración fue significativamente menor.

Respecto a la cepa salvaje Pr2921 observamos que en ambos materiales, látex y silicona logro una migración de un 87% y 93% respectivamente.

Cabe destacar que todas las cepas mutantes que presentaron disminución en la movilidad *swarming* también tenían afectado la migración sobre la superficie de los catéteres. Por lo tanto la movilidad *swarming* sería esencial para la colonización de catéteres urinarios, estos resultados son coincidentes con los observado por Jones et al., 2004.

Por otra parte, el resultado obtenido apoya la idea de que la composición del catéter influye en la adhesión y migración bacteriana lo cual ha sido expuesto por otro autores (Hosseinpour et al., 2014). El material empleado en la fabricación de los catéteres urinarios ha sido discutido en el correr de los últimos años. El látex fue el primer material utilizado para la fabricación de catéter foley, pero el uso de este material ha generado varios problemas como la baja biocompatibilidad y una gran susceptibilidad a la infección y a la incrustación (Lawrence et al., 2005). Sin embargo, el uso de catéteres recubiertos con silicona presenta una gran ventaja en la cateterización a largo plazo (Carton, 2016). Los catéteres recubiertos por silicona son más rígidos lo que hace que el drenaje sea mejor y por lo tanto tarde más tiempo en incrustarse y bloquearse (Lawrence et al., 2005; Morris et al., 1997). La principal desventaja del catéter de silicona es su costo (Denstedt et al., 1998) y además que puede ocasionar más molestias en los pacientes debido a su mayor rigidez (Hamill et al., 2007). Cualquier ventaja del catéter de silicona en términos de colonización bacteriana y formación de biofilm es todavía un tema de debate y estudio.

Transportadores y el desarrollo del biofilm

La superfamilia de transportadores (MFS) es uno de los grupos más grandes de transportadores activos secundarios conservados en bacterias y seres humanos. Las proteínas MFS transportan selectivamente un amplio espectro de sustratos a través de biomembranas, incluidos antibióticos, metales pesados, disolventes, péptidos, ácidos grasos, aminoácidos y nucleótidos y juegan un papel fundamental en múltiples procesos fisiológicos (Kumar et al., 2012). A pesar de la intensa investigación, sólo siete proteínas MFS de seis subfamilias han sido elucidado estructuralmente (Yan, 2013). El papel de las bombas de

eflujo en la eliminación de antibióticos de la célula se considera un mecanismo de resistencia clave en muchas especies. Además han sido reportadas como uno de los mecanismos responsables de la resistencia antimicrobiana en los biofilm microbianos. Se ha encontrado evidencia del papel de la bomba de eflujo en la resistencia en el biofilm en varios microorganismos como *Pseudomonas aeruginosa*, *Escherichia coli* y *Candida albicans*. Sin embargo, a pesar de los estudios sobre la importancia de las bombas de eflujo en el crecimiento del biofilm y sobre su relevancia en la formación de biofilm de resistencia a los antimicrobianos, aún no se ha determinado el papel exacto de estos sistemas de eflujo (Baugh et al., 2014; Holling et al., 2014; Soto, 2013).

En nuestro trabajo observamos que el papel del transportador MSF es crucial para el desarrollo del biofilm, en primer lugar cuando se evaluaron las características fenotípicas vimos que, el transportador MSF (m40) presentaba una movilidad *swimming* significativamente menor al de la cepa salvaje Pr2921, coincidiendo con el resultado de la movilidad *swarming*. En cuanto a las propiedades de la superficie bacteriana, observamos que la m40 presentó un índice de hidrofobicidad superior al de la cepa salvaje, clasificada como moderadamente hidrofílica. Estas características fenotípicas alteradas también coinciden con el estudio de la bioarquitectura del biofilm. Dado que la m40 no logra desarrollar un biofilm estable a lo largo de los días evaluados, el número de bacterias y el volumen de matriz extracelular asociada se mantuvo siempre muy bajo en los días evaluados.

Cuando se evaluó la expresión del gen transportador MSF, observamos que el mismo tiene un papel importante en el desarrollo del biofilm, dado que su expresión se vio aumentada significativamente en las células que formaban el biofilm. Ito et al., 2009 observaron resultados similares en una cepa de *E. coli*, las bombas de eflujo de esta cepa aumentan su expresión en el biofilm respecto a las células planctónicas. Además, Kviest et al., 2008 analizando los perfiles de transcripción en el crecimiento planctónico y en biofilm de *E. coli*, observaron que los genes que codifican para transportadores y bombas de eflujo eran los que se expresaban de forma aumentada durante la condición biofilm. Estos resultados coinciden con la incapacidad de la cepa m40 de formar biofilm, sugiriendo que el gen MSF transportador juega un papel esencial en la etapa de maduración del biofilm en *P. mirabilis*.

Metabolismo del hierro y el desarrollo del biofilm

El hierro es un elemento escaso en el interior de las células eucariotas, es por esta razón que muchas bacterias patógenas han desarrollado diferentes sistemas de adquisición de hierro, incluyendo sistemas basados en sideróforos, transporte de hierro ferroso y transportadores ABC (Hood et al., 2012, Andrews et al., 2003). Se predice que *P. mirabilis* codifica los cuatro tipos de sistemas de captación y puede crecer en hemoglobina, hemina y citrato férrico como única fuente de hierro, pero no en transferrina y lactoferrina. La importancia de estos sistemas en la colonización del tracto urinario se ha observado en estudios donde se emplearon mutantes de *P. mirabilis* con interrupción en el gen *nrp* (*non-ribosomal peptide siderophore system*). En ese estudio se realizó un experimento de co-desafío y se observó que la cepa mutante no logró la colonización de la vejiga ni de los riñones (Himpsl et al., 2010). Demostrando de esta forma que los sistemas de captación de hierro están altamente vinculados con la virulencia y desarrollo de la infección en el tracto urinario.

En el presente estudio se incluyeron dos cepas mutantes vinculadas al metabolismo del hierro m50 (ferritina) y m110 (receptor TonB- dependiente).

En los ensayos realizados observamos que la cepa m50 presentaba igual movilidad *swarming* que Pr2921, a su vez vimos que el desarrollo del biofilm ocurría en etapas tempranas (día 1 y día 3) donde se observó el mayor grado de compactación.

Sin embargo, la cepa m110 con baja movilidad *swarming* no fue capaz de desarrollar un biofilm estable en el tiempo. Proponemos que en este caso, la mutación afecto la capacidad de movilidad por lo tanto la cepa no pudo adherirse en las etapas iniciales del desarrollo del biofilm y por ende no logró un biofilm estable en ningún momento. Respecto a la m50 que si logro establecerse y desarrollar un biofilm en los primeros días pero no fue suficiente ya que este se desestabilizó rápidamente. Posiblemente la ferritina esté involucrada en etapas posteriores del desarrollo del biofilm y por eso no sigue el patrón observado en la cepa salvaje. Aunque no hay estudios directamente sobre el papel de la ferrita en la formación de biofilm, Nazik et al., 2015 observó que el hierro estimula la formación y desarrollo de el biofilm en *Aspergillus fumigatus*.

En este contexto hipotetizamos que al ser la ferrita una proteína almacenadora de hierro, si esta se encuentra interrumpida, por tanto no es capaz de almacenar el hierro disponible en el medio, en las primeras etapas del desarrollo del biofilm consume el medio disponible, genera un biofilm a etapas tempranas que luego se dispersa rápidamente por

no tener hierro disponible, el cual es esencial para el crecimiento de los microorganismos.

A partir de los resultados obtenidos podemos inferir que los genes del metabolismo del hierro tienen un papel relevante en la formación del biofilm de *P. mirabilis*, principalmente en la etapa de consolidación del biofilm, afectando tanto su estabilidad como su desarrollo.

Conclusiones y Perspectivas

La importancia de los biofilms en la clínica así como en la industria o incluso en el ambiente, hace que la dilucidación de los aspectos moleculares vinculados a su formación y a las características de su bioarquitectura sea de particular interés. En el contexto médico y clínico, los biofilms son inequívocamente relevantes porque causan infecciones agudas y crónicas vinculadas a implantes médicos, asociadas a elevados índices de morbilidad y mortalidad.

El análisis de los resultados obtenidos en el presente trabajo nos permite concluir que tanto las fimbrias, como genes implicados en el metabolismo del hierro y genes asociados a transportadores son claves para el establecimiento y desarrollo de un biofilm estable a lo largo del tiempo. Cada gen juega un papel relevante en alguna de las etapas del establecimiento y desarrollo del biofilm de *P. mirabilis*.

Las actividades se desarrollaron en el marco de una de las principales líneas de investigación del Departamento de Microbiología del IIBCE, centrada en el estudio del rol de diversos factores de virulencia de *P. mirabilis* uropatógeno. De esta manera se espera poder contribuir con el desarrollo de estrategias de control de las infecciones urinarias relacionadas con la formación de biofilms. Este conocimiento podrá ser útil además para la comprensión de otros modelos en el campo de la salud o en otras áreas como la industria o las ciencias ambientales.

Como perspectivas, en primer lugar debemos evaluar que el fenotipo caracterizado en cada cepa mutante se debe a la mutación del gen descrito, para ello se evaluará la expresión de los genes contiguos a la mutación y además se generaran mutantes complementarias.

Por otra parte, nos planteamos evaluar la patogénesis de este grupo de cepas (adhesión, metabolismo del hierro y transportador) en el desarrollo de infección en el tracto urinario. Para ello emplearemos el modelo puesto a punto en nuestro laboratorio de ITU experimental en murinos (Zunino et al., 2000). Este modelo de ITU experimental nos permitirá revelar el papel de los genes vinculados a la adhesión, metabolismo del hierro y transportador en la colonización del TU.

Por otra parte, estudiar el desarrollo del biofilm en un modelo de flujo continuo el cual simule el flujo de la orina, con el objetivo de lograr una comprensión mayor e in vivo del desarrollo del biofilm.

Por ultimo, pretendemos evaluar el conjunto de genes que se expresan en la condición biofilm respecto a la condición planctónica empleando técnicas como el ARNseq lo cual nos permitirá tener una visión mas global del desarrollo del biofilm en *P. mirabilis*.

BIBLIOGRAFÍA

- Adler, A. M., & Carlton, R. R. (2015). Introduction to Radiologic and Imaging Sciences and Patient Care-E-Book. Elsevier Health Sciences.
- Al-Bakri, A. G., Gilbert, P., & Allison, D. G. (2004). Immigration and emigration of *Burkholderia cepacia* and *Pseudomonas aeruginosa* between and within mixed biofilm communities. *Journal of applied microbiology*, 96(3), 455-463.
- Allison, C., Emody, L., Coleman, N., & Hughes, C. (1994). The role of swarm cell differentiation and multicellular migration in the uropathogenicity of *Proteus mirabilis*. *Journal of Infectious Diseases*, 169(5), 1155-1158.
- Andrews, S. C., Robinson, A. K., & Rodríguez-Quiñones, F. (2003). Bacterial iron homeostasis. *FEMS microbiology reviews*, 27(2-3), 215-237.
- Armbruster, C.E. & Mobley, H.L.T. (2012) Merging mythology and morphology: the multifaceted lifestyle of *Proteus mirabilis*. *Nat. Rev. Microbiol.* 10, 743-754
- Azeredo, J., Azevedo, N. F., Briandet, R., Cerca, N., Coenye, T., Costa, A. R., ... & Kačaniová, M. (2017). Critical review on biofilm methods. *Critical reviews in microbiology*, 43(3), 313-351.
- Barnhart, M. M., & Chapman, M. R. (2006). Curli biogenesis and function. *Annu. Rev. Microbiol.*, 60, 131-147.
- Belas, R. (1996). *Proteus mirabilis* swarmer cell differentiation and urinary tract infection. *Urinary tract infections: molecular pathogenesis and clinical management*. ASM Press, Washington, DC, 271-298.
- Beloin, C., Valle, J., Latour-Lambert, P., Faure, P., Kzreminski, M., Balestrino, D., ... & Ghigo, J. M. (2004). Global impact of mature biofilm lifestyle on *Escherichia coli* K-12 gene expression. *Molecular microbiology*, 51(3), 659-674.
- Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. (2008). *Escherichia coli* biofilms. In *Bacterial Biofilms* (pp. 249-289). Springer Berlin Heidelberg.
- Ben Nasr, A., Olsén, A., Sjöbring, U., Müller-Esterl, W., & Björck, L. (1996). Assembly of human contact phase factors and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Molecular Microbiology*, 20(5), 35-927.
- Bennett, P. M. (2008). Plasmid encoded antibiotic resistance: acquisition and transfer of antibiotic resistance genes in bacteria. *British journal of pharmacology*, 153(S1).
- Bhomkar, P., Materi, W., Semenchenko, V., & Wishart, D. S. (2010). Transcriptional response of *E. coli* upon FimH-mediated fimbrial adhesion. *Gene regulation and systems biology*, 4, 1.
- Billings, N., Ramirez Millan, M., Caldara, M., Rusconi, R., Tarasova, Y., Stocker, R., & Ribbeck, K. (2013). The Extracellular Matrix Component Psl Provides Fast-Acting Antibiotic Defense in *Pseudomonas aeruginosa* Biofilms. *PLoS Pathogens*, 9(8), e1003526. <http://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003526>
- Borlee, B. R., Goldman, A. D., Murakami, K., Samudrala, R., Wozniak, D. J., & Parsek, M. R. (2010). *Pseudomonas aeruginosa* uses a cyclic-di-GMP-regulated adhesin to reinforce the biofilm extracellular matrix. *Molecular microbiology*, 75(4), 827-842.
- Branda, S. S., Chu, F., Kearns, D. B., Losick, R., & Kolter, R. (2006). A major protein component of the *Bacillus subtilis* biofilm matrix. *Molecular microbiology*, 59(4), 1229-1238.

- Bridier, A., Tischenko, E., Dubois-Brissonnet, F., Herry, J. M., Thomas, V., Daddi-Oubekka, S., ... & Briandet, R. (2011).** Deciphering biofilm structure and reactivity by multiscale time-resolved fluorescence analysis. In *Bacterial Adhesion* (pp. 333-349). Springer Netherlands.
- Bryers, J. D., & Ratner, B. D. (2004).** Bioinspired implant materials befuddle bacteria. *ASM News-American Society for Microbiology*, 70(5), 232-232. 82742.
- Bryers, J. D. (2008).** Medical biofilms. *Biotechnology and bioengineering*, 100(1), 1-18.
- Burmølle, M., Webb, J. S., Rao, D., Hansen, L. H., Sørensen, S. J., & Kjelleberg, S. (2006).** Enhanced biofilm formation and increased resistance to antimicrobial agents and bacterial invasion are caused by synergistic interactions in multispecies biofilms. *Applied and environmental microbiology*, 72(6), 3916-3923.
- Ceri, H., Olson, M. E., Stremick, C., Read, R. R., Morck, D., & Buret, A. (1999).** The Calgary Biofilm Device: new technology for rapid determination of antibiotic susceptibilities of bacterial biofilms. *Journal of clinical microbiology*, 37(6), 1771-1776.
- Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., ... & Hultgren, S. J. (2002).** Role of *Escherichia coli* curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*, 295(5556), 851-855.
- Chole, R. A., & Faddis, B. T. (2003).** Anatomical evidence of microbial biofilms in tonsillar tissues: a possible mechanism to explain chronicity. *Archives of Otolaryngology-Head & Neck Surgery*, 129(6), 634-636.
- Chow, A. W., Taylor, P. R., Yoshikawa, T. T., & Guze, L. B. (1979).** A nosocomial outbreak of infections due to multiply resistant *Proteus mirabilis*: role of intestinal colonization as a major reservoir. *Journal of Infectious Diseases*, 139(6), 621-627.
- Cormen, T. H. (2009).** Introduction to algorithms. MIT press.
- Costerton, J. W. et al. Bacterial biofilms in nature and disease. Annu. Rev. Microbiol. 41, 435-464 (1987).**
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., DeBeer, D., Caldwell, D., Korber, D., & James, G. (1994).** Biofilms, the customized microniche. *Journal of bacteriology*, 176(8), 2137.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995).** Microbial biofilms-Annu. Rev. Microbio, 49, 711-745.
- Costerton, J. W., Stewart, P. S., & Greenberg, E. P. (1999).** Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science*, 284(5418), 1318-1322.
- Costerton, J. W. (2001).** Cystic fibrosis pathogenesis and the role of biofilms in persistent infection. *Trends in microbiology*, 9(2), 50-52.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., & Ehrlich, G. (2003).** The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *Journal of clinical investigation*, 112(10), 1466.
- Davies, D. G., Parsek, M. R., Pearson, J. P., Iglewski, B. H., Costerton, J. T., & Greenberg, E. P. (1998).** The involvement of cell-to-cell signals in the development of a bacterial biofilm. *Science*, 280(5361), 295-298.
- Danese, P. N., Pratt, L. A., & Kolter, R. (2000).** Exopolysaccharide production is required for development of *Escherichia coli* K-12 biofilm architecture. *Journal of bacteriology*, 182(12), 3593-3596.

- Darouiche, R. O.** (2001) Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clin Infect Dis.* 33:1567-72.
- De Vos, W. M.** Microbial biofilms and the human intestinal microbiome. *NPJ Biofilms Microbiomes* 1, 15005 (2015).
- Denstedt, J. D., Wollin, T. A., & Reid, G.** (1998). Biomaterials used in urology: current issues of biocompatibility, infection, and encrustation. *Journal of endourology*, 12(6), 493-500.
- Donlan, R. M.** (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*, 8(9), 881.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W.** (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193.
- Ehrlich, H. L., & Newman, D. K.** (1996). Geomicrobiology of sulfur. *Geomicrobiology* (3rd ed.), Marcel Dekker, New York, 508-559.
- Flemming, H. C., & Wingender, J.** (2010). The biofilm matrix. *Nature reviews. Microbiology*, 8(9), 623.
- Gualdi, L., Tagliabue, L., Bertagnoli, S., Ierano, T., De Castro, C., & Landini, P.** (2008). Cellulose modulates biofilm formation by counteracting curli-mediated colonization of solid surfaces in *Escherichia coli*. *Microbiology*, 154(7), 2017-2024.
- Gualdi, S., Scoccimarro, E., & Navarra, A.** (2008). Changes in tropical cyclone activity due to global warming: Results from a high-resolution coupled general circulation model. *Journal of climate*, 21(20), 5204-5228.
- Guo, K., Freguia, S., Dennis, P. G., Chen, X., Donose, B. C., Keller, J., ... & Rabaey, K.** (2013). Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environmental science & technology*, 47(13), 7563-7570.
- Guttenplan, S. B., Blair, K. M., & Kearns, D. B.** (2010). The EpsE flagellar clutch is bifunctional and synergizes with EPS biosynthesis to promote *Bacillus subtilis* biofilm formation. *PLoS genetics*, 6(12), e1001243.
- Halan, B., Buehler, K., & Schmid, A.** (2012). Biofilms as living catalysts in continuous chemical syntheses. *Trends in biotechnology*, 30(9), 453-465.
- Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P.** (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, 11(7), 1034-1043.
- Hamill, T. M., Gilmore, B. F., Jones, D. S., & Gorman, S. P.** (2007). Strategies for the development of the urinary catheter. *Expert review of medical devices*, 4(2), 215-225.
- Hamon, M. A., & Lazazzera, B. A.** (2001). The sporulation transcription factor Spo0A is required for biofilm development in *Bacillus subtilis*. *Molecular microbiology*, 42(5), 1199-1209.
- Heydorn, A., Ersbøll, B., Kato, J., Hentzer, M., Parsek, M. R., Tolker-Nielsen, T., ... & Molin, S.** (2002). Statistical analysis of *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development: impact of mutations in genes involved in twitching motility, cell-to-cell signaling, and stationary-phase sigma factor expression. *Applied and Environmental Microbiology*, 68(4), 2008-2017.
- Himpsl, S. D., Pearson, M. M., Arewång, C. J., Nusca, T. D., Sherman, D. H., & Mobley, H. L.** (2010). Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. *Molecular microbiology*, 78(1), 138-157.
- Hengge, R.** (2009). Principles of c-di-GMP signalling in bacteria. *Nature reviews. Microbiology*, 7(4), 263.

- Hobley, L., Ostrowski, A., Rao, F. V., Bromley, K. M., Porter, M., Prescott, A. R., ... & Stanley-Wall, N. R. (2013).** BslA is a self-assembling bacterial hydrophobin that coats the *Bacillus subtilis* biofilm. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(33), 13600-13605.
- Hola, V., Peroutkova, T., & Ruzicka, F. (2012).** Virulence factors in *Proteus* bacteria from biofilm communities of catheter-associated urinary tract infections. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 65(2), 343-349.
- Hood, M. I., & Skaar, E. P. (2012).** Nutritional immunity: transition metals at the pathogen-host interface. *Nature reviews. Microbiology*, 10(8).
- Holling, N., Lednor, D., Tsang, S., Bissell, A., Campbell, L., Nzakizwanayo, J., ... & Salvage, J. P. (2014).** Elucidating the genetic basis of crystalline biofilm formation in *Proteus mirabilis*. *Infection and immunity*, 82(4), 1616-1626.
- Hooton, T. M., Bradley, S. F., Cardenas, D. D., Colgan, R., Geerlings, S. E., Rice, J. C., ... & Nicolle, L. E. (2010).** Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 50(5), 625-663.
- Hosseinpour, M., Noori, S., Amir-Beigi, M., Pourfakharan, M. H., Ehteram, H., & Hamsayeh, M. (2014).** Safety of latex urinary catheters for the short time drainage. *Urology Annals*, 6(3), 198-201. <http://doi.org/10.4103/0974-7796.134257>
- Inagaki, T., Choi, M., Moschetta, A., Peng, L., Cummins, C. L., McDonald, J. G., ... & Gerard, R. D. (2005).** Fibroblast growth factor 15 functions as an enterohepatic signal to regulate bile acid homeostasis. *Cell metabolism*, 2(4), 217-225.
- Inoue, T., Shingaki, R., Hirose, S., Waki, K., Mori, H., & Fukui, K. (2007).** Genome-wide screening of genes required for swarming motility in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*, 189(3), 950-957.
- Jacobsen, S. M., Stickler, D. J., Mobley, H. L. T., & Shirtliff, M. E. (2008).** Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 26-59.
- Jefferson, K. K. (2004).** What drives bacteria to produce a biofilm?. *FEMS microbiology letters*, 236(2), 163-173.
- Jones, B. V., Young, R., Mahenthalingam, E., & Stickler, D. J. (2004).** Ultrastructure of *Proteus mirabilis* swarmer cell rafts and role of swarming in catheter-associated urinary tract infection. *Infection and immunity*, 72(7), 3941-3950.
- Jones, B. V., Mahenthalingam, E., Sabbuba, N. A., & Stickler, D. J. (2005).** Role of swarming in the formation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilms on urinary catheters. *Journal of medical microbiology*, 54(9), 807-813.
- Joo, H. S., & Otto, M. (2012).** Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chemistry & biology*, 19(12), 1503-1513.
- Kara, M. A., Ennahachi, M., Fockens, P., ten Kate, F. J., & Bergman, J. J. (2006).** Detection and classification of the mucosal and vascular patterns (mucosal morphology) in Barrett's esophagus by using narrow band imaging. *Gastrointestinal endoscopy*, 64(2), 155-166.
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009).** Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 73(2), 310-347
- Kobayashi, K., & Iwano, M. (2012).** BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Molecular microbiology*, 85(1), 51-66.

- Konopka, A.** (2009). What is microbial community ecology?. *The ISME journal*, 3(11), 1223.
- Lawrence, J. R., Korber, D. R., Hoyle, B. D., Costerton, J. W., & Caldwell, D. E.** (1991). Optical sectioning of microbial biofilms. *Journal of bacteriology*, 173(20), 6558-6567.
- Lawrence, E. L., & Turner, I. G.** (2005). Materials for urinary catheters: a review of their history and development in the UK. *Medical engineering & physics*, 27(6), 443-453.
- Legnani-Fajardo, C., Zunino, P., Piccini, C., Allen, A., & Maskell, D.** (1996). Defined mutants of *Proteus mirabilis* lacking flagella cause ascending urinary tract infection in mice. *Microbial pathogenesis*, 21(5), 395-405.
- Leriche, V., Briandet, R., & Carpentier, B.** (2003). Ecology of mixed biofilms subjected daily to a chlorinated alkaline solution: spatial distribution of bacterial species suggests a protective effect of one species to another. *Environmental Microbiology*, 5(1), 64-71.
- Lewis, K.** (2001). Riddle of biofilm resistance. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 45(4), 999-1007.
- Lindsay, D., & Von Holy, A.** (2006). Bacterial biofilms within the clinical setting: what healthcare professionals should know. *Journal of Hospital Infection*, 64(4), 313-325.
- Livak, K. J., & Schmittgen, T. D.** (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2⁻ΔΔCT method. *methods*, 25(4), 402-408.
- Martínez-García E, Calles B, Arévalo-Rodríguez M, de Lorenzo V.** (2011). pBAM1: an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology*. 11-38.
- McCARTER, L. I. N. D. A., & Silverman, M. I. C. H. A. E. L.** (1989). Iron regulation of swarmer cell differentiation of *Vibrio parahaemolyticus*. *Journal of bacteriology*, 171(2), 731-736.
- Macleod, S. M., & Stickler, D. J.** (2007). Species interactions in mixed-community crystalline biofilms on urinary catheters. *Journal of medical microbiology*, 56(11), 1549-1557.
- Manning, S. C.** (2003). Basics of biofilm in clinical otolaryngology. *Ear, nose & throat journal*, 82(8), 18.
- Marić, S., & Vraneš, J.** (2007). Characteristics and significance of microbial biofilm formation. *Periodicum Bilogorum*, 109, 115-121.
- Marger, M. D., & Saier, M. H.** (1993). A major superfamily of transmembrane facilitators that catalyze uniport, symport and antiport. *Trends in biochemical sciences*, 18(1), 13-20.
- Mathur, S., Sabbuba, N. A., Suller, M. T., Stickler, D. J., & Feneley, R. C.** (2005). Genotyping of urinary and fecal *Proteus mirabilis* isolates from individuals with long-term urinary catheters. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 24(9), 643-644.
- Matilla, M. A., Ramos, J. L., Duque, E., de Dios Alché, J., Espinosa-Urgel, M., & Ramos-González, M. I.** (2007). Temperature and pyoverdine-mediated iron acquisition control surface motility of *Pseudomonas putida*. *Environmental microbiology*, 9(7), 1842-1850.
- Matthews, S. J., & Lancaster, J. W.** (2011). Urinary tract infections in the elderly population. *The American journal of geriatric pharmacotherapy*, 9(5), 286-309.
- McCoy, W.F. et al.** (1981) Observations of fouling biofilm formation. *Can. J. Microbiol.* 27, 910-917

- Meckenstock, R. U., Elsner, M., Griebler, C., Lueders, T., Stumpp, C., Aamand, J., ... & Boon, N.** (2015). Biodegradation: updating the concepts of control for microbial cleanup in contaminated aquifers.
- Mobley, H. L., Belas, R., Lockatell, V., Chippendale, G., Trifillis, A. L., Johnson, D. E., & Warren, J. W.** (1996). Construction of a flagellum-negative mutant of *Proteus mirabilis*: effect on internalization by human renal epithelial cells and virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. *Infection and immunity*, 64(12), 5332-5340.
- Monroe, D.** (2007). Looking for chinks in the armor of bacterial biofilms. *PLoS biology*, 5(11), e307.
- Morris, N. S., Stickler, D. J., & Winters, C.** (1997). Which indwelling urethral catheters resist encrustation by *Proteus mirabilis* biofilms?. *BJU International*, 80(1), 58-63.
- Morris, N. S., Stickler, D. J., & McLean, R. J. C.** (1999). The development of bacterial biofilms on indwelling urethral catheters. *World journal of urology*, 17(6), 345-350.
- Nadell, C. D., Xavier, J. B., & Foster, K. R.** (2008). The sociobiology of biofilms. *FEMS microbiology reviews*, 33(1), 206-224.
- Nasr, A., Olsén, A., Sjöbring, U., Müller-Esterl, W., & Björck, L.** (1996). Assembly of human contact phase proteins and release of bradykinin at the surface of curli-expressing *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 20(5), 927-935.
- Nazik, H., Penner, J. C., Ferreira, J. A., Haagensen, J. A., Cohen, K., Spormann, A. M., ... & Stevens, D. A.** (2015). Effects of iron chelators on the formation and development of *Aspergillus fumigatus* biofilm. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 59(10), 6514-6520.
- Nielubowicz, G. R., & Mobley, H. L.** (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(8), 430-441.
- Neu, T. R., Manz, B., Volke, F., Dynes, J. J., Hitchcock, A. P., & Lawrence, J. R.** (2010). Advanced imaging techniques for assessment of structure, composition and function in biofilm systems. *FEMS microbiology ecology*, 72(1), 1-21.
- Noinaj, N., Guillier, M., Barnard, T. J., & Buchanan, S. K.** (2010). TonB-dependent transporters: regulation, structure, and function. *Annual review of microbiology*, 64, 43-60.
- O'Hara, C. M., Brenner, F. W., & Miller, J. M.** (2000). Classification, identification, and clinical significance of *Proteus*, *Providencia*, and *Morganella*. *Clinical microbiology reviews*, 13(4), 534-546.
- Olsén, A., Jonsson, A., & Normark, S.** (1989). Fibronectin binding mediated by a novel class of surface organelles on *Escherichia coli*. *Nature*, 338(6217), 652-655.
- O'toole, G. A., & Kolter, R.** (1998). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular microbiology*, 30(2), 295-304.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R.** (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Reviews in Microbiology*, 54(1), 49-79.
- Overhage, J., Bains, M., Brazas, M. D., & Hancock, R. E.** (2008). Swarming of *Pseudomonas aeruginosa* is a complex adaptation leading to increased production of virulence factors and antibiotic resistance. *Journal of bacteriology*, 190(8), 2671-2679.
- Palmer, R. J., & White, D. C.** (1997). Developmental biology of biofilms: implications for treatment and control. *Trends in microbiology*, 5(11), 435-440.

- Pao, S. S., Paulsen, I. T., & Saier, M. H. (1998).** Major facilitator superfamily. *Microbiology and molecular biology reviews*, 62(1), 1-34.
- Papazafiropoulou, A., Daniil, I., Sotiropoulos, A., Balampani, E., Kokolaki, A., Bousboulas, S., ... & Pappas, S. (2010).** Prevalence of asymptomatic bacteriuria in type 2 diabetic subjects with and without microalbuminuria. *BMC research notes*, 3(1), 169.
- Parton, R., & Davis, I. (2006).** Lifting the fog: Image restoration by deconvolution. *Cell biology*, 187-200.
- Parsek, M. R., & Fuqua, C. (2004).** Biofilms 2003: emerging themes and challenges in studies of surface-associated microbial life. *Journal of bacteriology*, 186(14), 4427-4440.
- Pearson, M. M., Rasko, D. A., Smith, S. N., & Mobley, H. L. (2010).** Transcriptome of swarming *Proteus mirabilis*. *Infection and immunity*, 78(6), 2834-2845
- Pearson, M. M., Sebahia, M., Churcher, C., Quail, M. A., Seshasayee, A. S., Luscombe, N. M., ... & Hauser, H. (2008).** Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *Journal of bacteriology*, 190(11), 4027-4037.
- Prigent-Combaret, C., Vidal, O., Dorel, C., & Lejeune, P. (1999).** Abiotic surface sensing and biofilm-dependent regulation of gene expression in *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 181(19), 5993-6002.
- Pompilio, A., Piccolomini, R., Picciani, C., D'Antonio, D., Savini, V., & Di Bonaventura, G. (2008).** Factors associated with adherence to and biofilm formation on polystyrene by *Stenotrophomonas maltophilia*: the role of cell surface hydrophobicity and motility. *FEMS microbiology letters*, 287(1), 41-47.
- Rabaey, K. (2013).** Effects of surface charge and hydrophobicity on anodic biofilm formation, community composition, and current generation in bioelectrochemical systems. *Environmental science & technology*, 47(13), 7563-7570.
- Rabin, N., Zheng, Y., Opoku-Temeng, C., Du, Y., Bonsu, E., & Sintim, H. O. (2015).** Biofilm formation mechanisms and targets for developing antibiofilm agents. *Future*, 7(4), 493-512.
- Reddy, V. S., Shlykov, M. A., Castillo, R., Sun, E. I., & Saier, M. H. (2012).** The major facilitator superfamily (MFS) revisited. *The FEBS journal*, 279(11), 2022-2035.
- Reisner, A., Haagensen, J. A., Schembri, M. A., Zechner, E. L., & Molin, S. (2003).** Development and maturation of *Escherichia coli* K-12 biofilms. *Molecular microbiology*, 48(4), 933-946.
- Romero-Lastra, P., Sánchez, M. C., Ribeiro-Vidal, H., Llama-Palacios, A., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017).** Comparative gene expression analysis of *Porphyromonas gingivalis* ATCC 33277 in planktonic and biofilms states. *PloS one*, 12(4), e0174669.
- Römling, U., Gomelsky, M., & Galperin, M. Y. (2005).** C-di-GMP: the dawning of a novel bacterial signalling system. *Molecular microbiology*, 57(3), 629-639.
- Römling, U., & Amikam, D. (2006).** Cyclic di-GMP as a second messenger. *Current opinion in microbiology*, 9(2), 218-228.
- Rózalski, A., Sidorczyk, Z., & Kotetko, K. R. Y. S. T. Y. N. A. (1997).** Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 61(1), 65-89.
- Sabbuba, N., Hughes, G., & Stickler, D. J. (2002).** The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. *BJU international*, 89(1), 55-60.

- Sakai, J., Duncan, E. A., Rawson, R. B., Hua, X., Brown, M. S., & Goldstein, J. L. (1996).** Sterol-regulated release of SREBP-2 from cell membranes requires two sequential cleavages, one within a transmembrane segment. *Cell*, 85(7), 1037-1046.
- Sanclement, J. A., Webster, P., Thomas, J., & Ramadan, H. H. (2005).** Bacterial biofilms in surgical specimens of patients with chronic rhinosinusitis. *The Laryngoscope*, 115(4), 578-582.
- Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L., Schlapp, G., Härtel, S., & Zunino, P. (2016).** Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(5), ftw033.
- Schaffer, J.N. and Pearson, M.M. (2015)** *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. *Microbiol Spectr* 3, UTI-0017-2013
- Schlapp, G., Scavone, P., Zunino, P., & Härtel, S. (2011).** Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms—A quantitative confocal microscopy approach. *Journal of microbiological methods*, 87(2), 234-240.
- Serra, D. O., Richter, A. M., Klauck, G., Mika, F., & Hengge, R. (2013).** Microanatomy at cellular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. *MBio*, 4(2), e00103-13.
- Shunmugaperumal, T. (2010).** Microbial colonization of medical devices and novel preventive strategies. *Recent patents on drug delivery & formulation*, 4(2), 153-173.
- Simionato, M. R., Tucker, C. M., Kuboniwa, M., Lamont, G., Demuth, D. R., Tribble, G. D., & Lamont, R. J. (2006).** *Porphyromonas gingivalis* genes involved in community development with *Streptococcus gordonii*. *Infection and immunity*, 74(11), 6419-6428.
- Sjöbring, U., Pohl, G., & Olsén, A. (1994).** Plasminogen, absorbed by *Escherichia coli* expressing curli or by *Salmonella enteritidis* expressing thin aggregative fimbriae, can be activated by simultaneously captured tissue-type plasminogen activator (t-PA). *Molecular microbiology*, 14(3), 443-452.
- Shirtliff, M., & Leid, J. G. (2009).** *The role of biofilms in device-related infections (Vol. 2)*. New York: Springer.
- Schembri, M. A., Kjærsgaard, K., & Klemm, P. (2003).** Global gene expression in *Escherichia coli* biofilms. *Molecular microbiology*, 48(1), 253-267.
- Shemesh, M., Tam, A., Kott-Gutkowski, M., Feldman, M., & Steinberg, D. (2008).** DNA-microarrays identification of *Streptococcus mutans* genes associated with biofilm thickness. *BMC microbiology*, 8(1), 236.
- Sonenshein, A. L. (2000).** Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. *Current opinion in microbiology*, 3(6), 561-566.
- Stevenson, L. G, Strisovsky, K, Clemmer, K. M, Bhatt, S, Freeman, M, Rather, P. N. (2007).** Rhomboid protease AarA mediates quorum-sensing in *Providencia stuartii* by activating TatA of the twin-arginine translocase *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, 104, pp. 1003-1008
- Stickler, D., Ganderton, L., King, J., Nettleton, J., & Winters, C. (1993).** *Proteus mirabilis* biofilms and the encrustation of urethral catheters. *Urological research*, 21(6), 407-411.
- Stickler, D. J., Morris, N. S., McLean, R. J., & Fuqua, C. (1998).** Biofilms on indwelling urethral catheters produce quorum-sensing signal molecules in situ and in vitro. *Applied and Environmental Microbiology*, 64(9), 3486-3490.
- Stickler, D., & Hughes, G. (1999).** Ability of *Proteus mirabilis* to swarm over urethral catheters. *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases*, 18(3), 206-208.

- Stickler, D. J., Feneley, R. C.** (2010) The encrustation and blockage of long-term indwelling bladder catheters: a way forward in prevention and control. *Spinal Cord*;48:784-790.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W.** (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Reviews in Microbiology*, 56(1), 187-209.
- Tart, A. H., Wolfgang, M. C., & Wozniak, D. J.** (2005). The alternative sigma factor AlgT represses *Pseudomonas aeruginosa* flagellum biosynthesis by inhibiting expression of fleQ. *Journal of bacteriology*, 187(23), 7955-7962.
- Thomas, V. C., Hiromasa, Y., Harms, N., Thurlow, L., Tomich, J., & Hancock, L. E.** (2009). A fratricidal mechanism is responsible for eDNA release and contributes to biofilm development of *Enterococcus faecalis*. *Molecular microbiology*, 72(4), 1022-1036.
- Trautner, B. W., & Darouiche, R. O.** (2004). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American journal of infection control*, 32(3), 177-183.
- Van Acker, H., Van Dijck, P., & Coenye, T.** (2014). Molecular mechanisms of antimicrobial tolerance and resistance in bacterial and fungal biofilms. *Trends in microbiology*, 22(6), 326-333.
- VanBogelen, R. A., Greis, K. D., Blumenthal, R. M., Tani, T. H., & Matthews, R. G.** (1999). Mapping regulatory networks in microbial cells. *Trends in microbiology*, 7(8), 320-328.
- Vasudevan, R., Kennedy, A. J., Merritt, M., Crocker, F. H., & Baney, R. H.** (2014). Microscale patterned surfaces reduce bacterial fouling-microscopic and theoretical analysis. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 117, 225-232.
- Verstraeten, N., Braeken, K., Debkumari, B., Fauvart, M., Fransaer, J., Vermant, J., & Michiels, J.** (2008). Living on a surface: swarming and biofilm formation. *Trends in microbiology*, 16(10), 496-506.
- Waite, R. D., Papakonstantinou, A., Littler, E., & Curtis, M. A.** (2005). Transcriptome analysis of *Pseudomonas aeruginosa* growth: comparison of gene expression in planktonic cultures and developing and mature biofilms. *Journal of bacteriology*, 187(18), 6571-6576.
- Wang, Q., Frye, J. G., McClelland, M., & Harshey, R. M.** (2004). Gene expression patterns during swarming in *Salmonella typhimurium*: genes specific to surface growth and putative new motility and pathogenicity genes. *Molecular microbiology*, 52(1), 169-187.
- Wazait, H. D., Patel, H. R. H., Veer, V., Kelsey, M., Van Der Meulen, J. H. P., Miller, R. A., & Emberton, M.** (2003). Catheter-associated urinary tract infections: prevalence of uropathogens and pattern of antimicrobial resistance in a UK hospital (1996-2001). *BJU international*, 91(9), 806-809.
- Webb, JS, Givskov, M, Kjelleberg, S.** (2003). Bacterial biofilms: prokaryotic adventures in multicellularity *Curr Opin Microbiol*, 6, pp. 578-585
- Wiener, M. C.** (2005). TonB-dependent outer membrane transport: going for Baroque?. *Current opinion in structural biology*, 15(4), 394-400.
- Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., & Flemming, H. C.** (2001). [25] Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in enzymology*, 336, 302-314.
- Whiteley, M., Banger, M. G., Bumgarner, R. E., & Parsek, M. R.** (2001). Gene expression in *Pseudomonas aeruginosa* biofilms. *Nature*, 413(6858), 860.
- Wilson, M.** (2011). Addressing the problems of long-term urethral catheterization: Part 1. *British Journal of Nursing*, 20(22).

Wingender, J., Strathmann, M., Rode, A., Leis, A., & Flemming, H. C. (2001). [25] Isolation and biochemical characterization of extracellular polymeric substances from *Pseudomonas aeruginosa*. *Methods in enzymology*, 336, 302-314.

Wolfe, A. J., & Visick, K. L. (2008). Get the message out: cyclic-Di-GMP regulates multiple levels of flagellum-based motility. *Journal of bacteriology*, 190(2), 463-475.

Yamamoto, R., Noiri, Y., Yamaguchi, M., Asahi, Y., Maezono, H., & Ebisu, S. (2011). Time-course gene expression during *Porphyromonas gingivalis* strain ATCC 33277 biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, AEM-00746.

Ye, J., Coulouris, G., Zaretskaya, I., Cutcutache, I., Rozen, S., & Madden, T. L. (2012). Primer-BLAST: a tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. *BMC bioinformatics*, 13(1), 134.

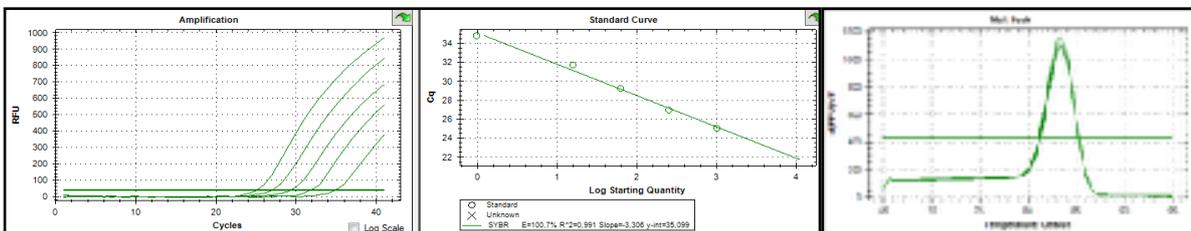
Zunino, P., Piccini, C., & Legnani-Fajardo, C. (1994). Flagellate and non-flagellate *Proteus mirabilis* in the development of experimental urinary tract infection. *Microbial pathogenesis*, 16(5), 379-385.

Zunino, P., Geymonat, L., Allen, A. G., Legnani-Fajardo, C., & Maskell, D. J. (2000). Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 29(2), 137-143.

ANEXO I

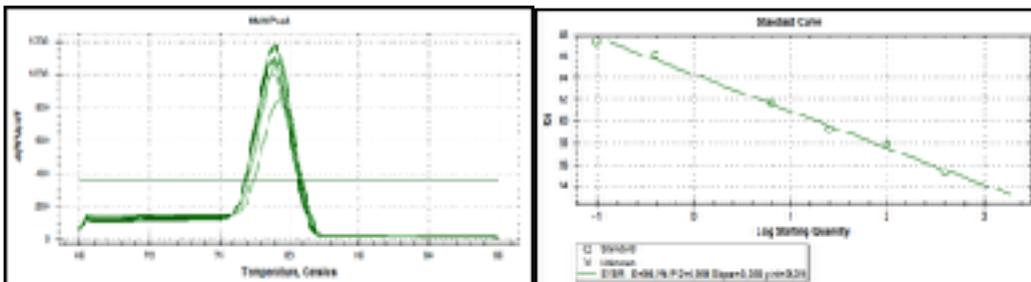
A continuación se observan las curvas de melting, eficiencia de reacción para el gen de referencia (*rpoA*) y para de los genes del grupo de metabolismo del hierro, fimbriales y gen transportador. Los gráficos fueron obtenidos por el programa Bio-Rad CFX Manager.

Calibración eficiencia y curva de melting del gen de referencia *rpoA*

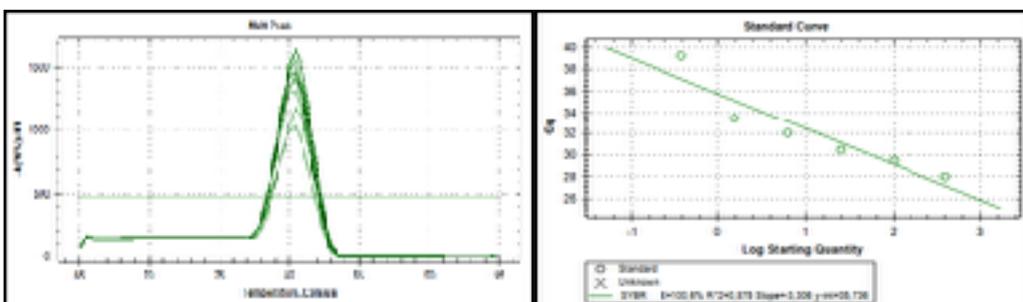


Genes Metabolismo del hierro

ferritina

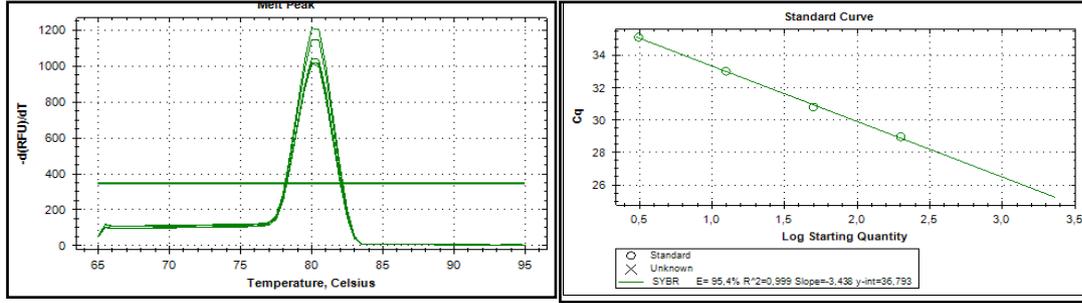


receptor Ton B dependiente

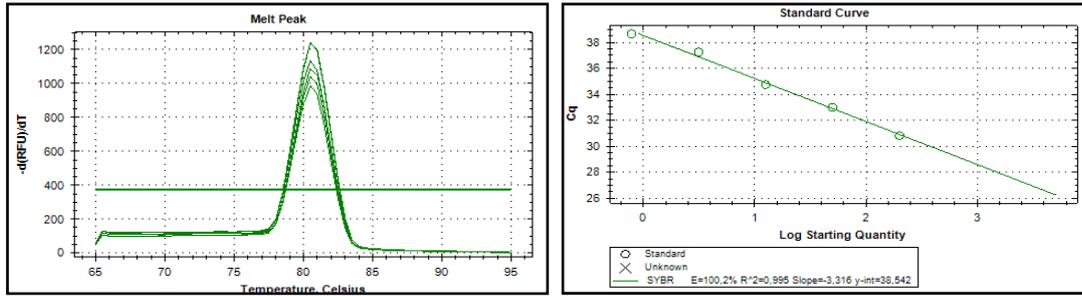


Genes fimbriales

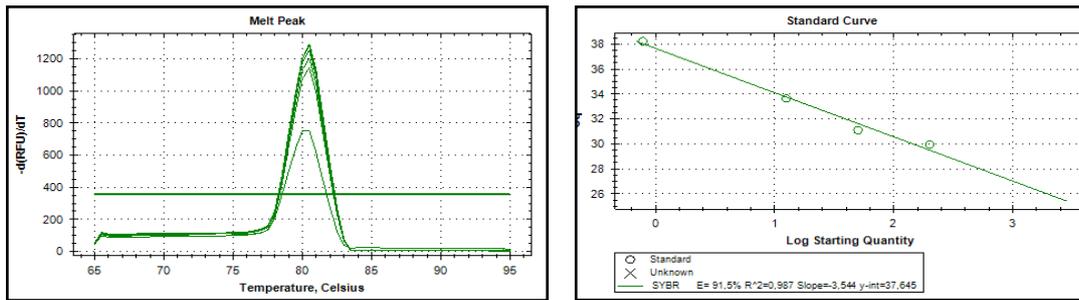
Proteina fimbrial SteB



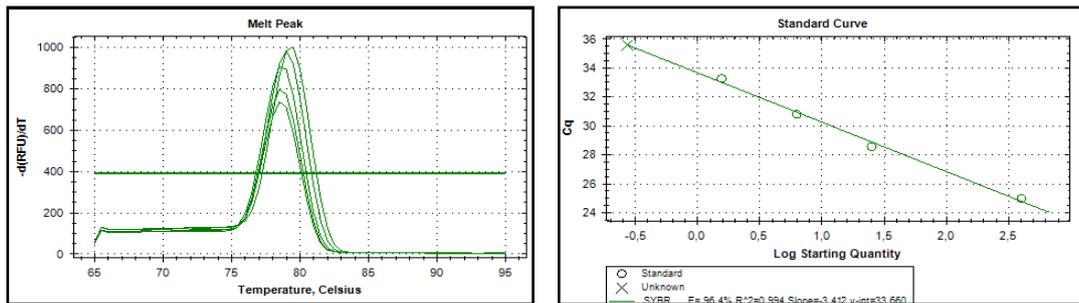
Proteina fimbrial



Subunidad mayor fimbrial



Serin proteasa intermembrana de la familia romboide



Gen transportador

Transportador de la familia MSF

