

Tesis de Maestría, PEDECIBA – Biología

Evaluación de los biofilms de cepas mutantes de *Proteus mirabilis* uropatogénico en modelos *in vivo*

Lic. Ana Caetano

Orientadora: Dra. Paola Scavone

Co-orientador: Dr. Pablo Zunino

Departamento de Microbiología



iibce INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
BIOLÓGICAS CLEMENTE ESTABLE

Tesis de Maestría, PEDECIBA-Biología

Evaluación de los biofilms de cepas mutantes de *Proteus* *mirabilis* uropatogénico en modelos *in vivo*

Lic. Ana Caetano

Orientadora: Dra. Paola Scavone

Co-orientador: Dr. Pablo Zunino

Departamento de Microbiología



Agradecimientos

A Paola, por aceptarme nuevamente como estudiante para hacer una maestría. Por las ideas, los consejos y por todo ese tiempo que me ha dedicado como profesional y persona. Por contagiarme con su energía y decirme siempre que **se puede!**

A Pablo, por abrirme las puertas del laboratorio, por ser mi otro orientador y por los conocimientos compartidos tanto de la Microbiología como de Veterinaria.

A mis compañeras de todos los días, principalmente a Vicky, Majo, Dani y Magalí, con quienes las jornadas han sido siempre más amenas, y con quienes hemos compartido mucho más que las mesadas.

A todos los compañeros del Departamento de Micro, que de una manera u otra han contribuido y ayudado durante mi estadía.

A Analía Richeri y Jessika Urbanavicius, por introducirme en el mundo de las Wistar y de la Histología.

Al personal de Bioterio, principalmente a Carmen Pérez por asistirme en el trabajo con animales.

A los amigos que la vida me ha dado, por estar siempre presentes.

A mi familia, que desde pequeña me han enseñado que las cosas se consiguen con esfuerzo y por apoyarme en todo momento.

A Seba, por bancarme más que nadie y por acompañarme siempre.

Índice

Resumen	6
Introducción	7
Los biofilms bacterianos.....	7
Relevancia de los biofilms	8
Estructura de los biofilms y sus etapas de desarrollo	8
ii) Adhesión irreversible y producción de exopolisacárido (EPS)	11
iii) Formación de las microcolonias	12
iv) Maduración del biofilm.....	12
v) Dispersión.....	13
Importancia clínica de los biofilms	14
Infecciones del tracto urinario (ITU)	14
Infecciones del tracto urinario asociado a catéteres (ITU-c)	15
<i>Proteus mirabilis</i> como agente etiológico de las ITU-c.....	16
Factores de virulencia	18
Biofilms, virulencia y capacidad de adaptación bacteriana	23
Hipótesis.....	28
Objetivo general.....	28
Objetivos específicos	28
Materiales y métodos.....	29
Cepas bacterianas	29
Colección de cepas mutantes de <i>P. mirabilis</i> generadas mediante mutagénesis al azar	29
Condiciones generales de cultivo	32
Conservación de las cepas	32
1. Propiedades fenotípicas de las distintas cepas mutantes de <i>P. mirabilis</i> ..	33
1.1 Curvas de crecimiento	33
1.2 Movilidad <i>swimming</i>	33
1.3 Movilidad <i>swarming</i>	34

2. Evaluación de la infección experimental de distintas cepas de <i>P. mirabilis</i> en el modelo de ITU ascendente en ratón	35
2.1 Animales	35
3. Evaluación de la infección experimental de distintas cepas de <i>P. mirabilis</i> en el modelo de cateterización en ratón	36
3.1 Modelo de infección del tracto urinario en ratones cateterizados (ITU-c)	36
3.2 Cuantificación de bacterias en orina	37
3.3 Peso de las vejigas.....	37
3.4 Cortes histológicos de vejigas	37
3.5 Tinción de los cortes con Hematoxilina y Eosina (H-E)	37
3.6 Escala de daño histológico	38
3.7 Presencia y localización bacteriana en la vejiga por inmunofluorescencia y Microscopía Láser Confocal (MLC).....	38
4. Evaluación de la formación y la bioarquitectura de biofilms de cepas mutantes de <i>P. mirabilis</i> en el modelo de Cámaras de Difusión Intraperitoneales en ratas.....	40
4.1 Animales	40
4.2 Modelo de cámaras de difusión intraperitoneales en ratas	40
4.3 Recuento bacteriano	41
4.4 Inmunofluorescencia de los biofilms en los cubreobjetos ubicados dentro de las cámaras	41
4.5 Obtención de imágenes por MLC.....	42
4.6 Procesamiento de imágenes	42
Análisis estadísticos	44
Resultados	45
Capítulo 1- Propiedades fenotípicas	45
Curvas de crecimiento	45
Movilidad <i>swimming</i>	45
Movilidad <i>swarming</i>	46
Capítulo 2- Capacidad infectiva de <i>P. mirabilis</i> en el tracto urinario (TU)	47
Recuento bacteriano del TU	47

Capítulo 3- Evaluación de factores de <i>P. mirabilis</i> en el tracto urinario cateterizado	48
Recuento bacteriano en orina.....	48
Peso de las vejigas	49
Escala de daño histológico	50
Presencia y localización bacteriana en la vejiga	54
Capítulo 4- Formación y bioarquitectura de biofilms de <i>P. mirabilis</i> en el medio interno	58
Cámaras de difusión intraperitoneales y recuento bacteriano	58
Inmunofluorescencia y obtención de imágenes de los biofilms por MLC ...	59
Procesamiento de imágenes.....	59
Deconvolución y segmentación	60
Comparación en la compactación del biofilm de <i>P. mirabilis</i> entre los modelos <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	61
Parámetros morfotopológicos.....	62
Generación de los modelos en 3D y de <i>lattice</i> hexagonal	66
Discusión	69
Conclusiones.....	82
Perspectivas.....	82
Referencias	83

Resumen

Los biofilms son comunidades microbianas, adheridas entre ellas y a un sustrato, inmersas en una matriz de producción propia. *Proteus mirabilis* es el principal agente causal de las infecciones urinarias asociadas a catéteres (ITU-C). La formación de densos biofilms de *P. mirabilis* en el interior de los catéteres favorece la supervivencia de los microorganismos frente a la acción del sistema inmune del hospedero y a la acción de antimicrobianos, permitiendo el desarrollo de infecciones persistentes. La hipótesis de este estudio plantea que diferentes factores son importantes para el establecimiento de la infección, colonización y la formación de biofilms *in vivo*. Con el fin de evaluar el rol de diferentes factores en la formación de biofilms de *P. mirabilis in vivo* y asociarlos con la urovirulencia, se emplearon cinco cepas mutantes de *P. mirabilis*, previamente generadas por transposición al azar a partir de una cepa de origen clínico, con una capacidad defectiva de formar biofilms. Los genes identificados codificaron para un transportador de la familia AEC (tAEC-101), glioxilato reductasa/hidroxipiruvato reductasa (GRHPR-105), D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa (DDC-109), FMN- proteína de unión MioC (MioC-119) y L- treonina 3-deshidrogenasa (LTDH-128). Las propiedades fenotípicas se caracterizaron a través de curvas de crecimiento y evaluación de la movilidad. La infectividad se evaluó por recuentos bacterianos de vejigas y riñones en el modelo de infección del tracto urinario (ITU) murino. El posible papel de los factores en la formación de biofilms asociados a cateterización en el tracto urinario fue evaluado a través de recuento bacteriano en orina, peso y evaluación histológica de vejigas en un modelo de cateterización (ITU-c) murino. La formación de biofilms *in vivo* fue evaluada por Microscopía Láser Confocal (MLC) en un modelo de cámaras de difusión intraperitoneales (IPC) en ratas. Se calcularon parámetros morfo-topológicos a partir de las imágenes de biofilms adheridos a un cubreobjetos dentro de las IPC. Los resultados mostraron que todas las cepas mutantes evaluadas presentaron movilidad diferente frente a la cepa salvaje y fueron defectivas en el establecimiento de una infección del tracto urinario. Las cepas mutantes en GRHPR-105 y en MioC-119 formaron biofilms alterados respecto a la cepa de referencia. Se puede concluir que todos los factores evaluados son importantes en la patogénesis y en la formación de biofilms.

Introducción

Los biofilms bacterianos

La mayor parte de los microorganismos fueron definidos y caracterizados como células planctónicas, de vida libre y se han estudiado en general empleando medios líquidos sobre la base de los cuales han surgido la mayoría de las evidencias fisiológicas, metabólicas y genéticas que explican su biología (Pratt & Kolter, 1999). En forma relativamente reciente se ha visto que la forma de vida predominante de los microorganismos en cualquier sistema biológico hidratado es una comunidad cooperativa denominada biofilm (Trautner & Darouiche, 2004). La primera descripción sobre los biofilms se remonta al siglo XVII cuando Van Leeuwenhoek examinó "animalículos" en su placa dental y la predominancia de los mismos fue expuesta por primera vez en 1978 por Costerton y colaboradores estudiando comunidades microbianas en ecosistemas acuáticos.

Actualmente los biofilms se definen como comunidades microbianas que se componen por células unidas irreversiblemente entre ellas y a un sustrato, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia y que presentan un fenotipo alterado con respecto a la tasa de crecimiento y la transcripción génica respecto a sus contrapartes planctónicas (Donlan & Costerton, 2002).

El conocimiento sobre los biofilms microbianos se ha generado en las últimas décadas, primero a través de técnicas estándar de cultivo y microscopía electrónica de barrido y luego utilizando la microscopía láser confocal (MLC) (Donlan, 2002). Estas tecnologías han permitido determinar que los biofilms son sistemas biológicos de un alto nivel de organización donde los microorganismos forman comunidades estructurales y funcionales coordinadas, cuyo desarrollo requiere de un comportamiento multicelular (Davey & O'Toole, 2000).

Los biofilms pueden estar compuestos por una o múltiples especies bacterianas y son capaces de formarse sobre una amplia variedad de superficies bióticas y abióticas, así como en interfases aire-líquido (Jamal *et al.*, 2015; Adal & Farr, 1996; Archivald & Gaynes, 1997; Dickinson & Bisno, 1993). Aunque los biofilms

formados por múltiples especies son más habituales en la naturaleza (Balcázar *et al.*, 2015), los que constan de una sola especie revisten un interés particular debido a su importancia clínica. Estos últimos pueden desarrollarse tanto en implantes médicos como en tejidos, contribuyendo de esta manera a la persistencia de una amplia variedad de infecciones (Costerton *et al.*, 1999; Chen & Wen, 2011).

Relevancia de los biofilms

En la naturaleza los biofilms juegan un rol clave en la producción y degradación de la materia orgánica, en el tratamiento de aguas residuales, en la dinámica de los nutrientes y en los ciclos del nitrógeno y muchos metales, procesos que requieren la actividad de bacterias que presentan diferentes capacidades metabólicas (Balcázar *et al.*, 2015). Los biofilms se forman también en ambientes de 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 (Davey & O'Toole, 2000). Así mismo, se asocian a problemas en otros ámbitos, como contaminación de alimentos y suministros de agua (Hunter, 2008).

Estas comunidades representan un modo de vida protegido que favorece la supervivencia microbiana, lo que resulta en una mayor adaptación al estrés ambiental, principalmente frente a la radiación UV y desecación (Stanley & Lazazzera, 2004) y en una elevada resistencia a agentes antimicrobianos como antibióticos, desinfectantes y germicidas (Donlan & Costerton, 2002, Marti *et al.*, 2017).

Estructura de los biofilms y sus etapas de desarrollo

El desarrollo de los biofilms ocurre en diferentes etapas donde los microorganismos se unen a una superficie sólida para formar una comunidad embebida por una matriz extracelular. Los biofilms se componen por microorganismos que representan menos del 10% de la masa seca y por una matriz extracelular que puede representar más del 90% del biofilm. La matriz extracelular está formada por una conglomeración de diferentes tipos de

biopolímeros, mayormente polisacáridos, proteínas y ácidos nucleicos, y en menor proporción lípidos, constituyendo el andamiaje para la cohesión en el biofilm y para la arquitectura en tres dimensiones que adopta (Flemming & Wingender, 2010). Los componentes de la matriz además cumplen con una función protectora para los microorganismos dentro del biofilm. Por ejemplo, la hidrofobina bacteriana BslA forma una "capa impermeable" resistente al agua en 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; Hobley *et al.*, 2013). Otros componentes de la matriz facilitan las interacciones entre las bacterias y las células del hospedero. Por ejemplo, las fibras *curli* producidas por *E. coli* constituyen un componente estructural del biofilm (Chapman *et al.*, 2002; Serra *et al.*, 2013), y 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 una infección (Olsen *et al.*, 1989; Sjobring *et al.*, 1994; Nasr *et al.*, 1996). Existen diversos mecanismos por los cuales diferentes especies bacterianas pueden entrar en contacto 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). La formación de un biofilm se desarrolla en cinco etapas bien definidas: (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; Markowska *et al.*, 2013) (Figura 1).

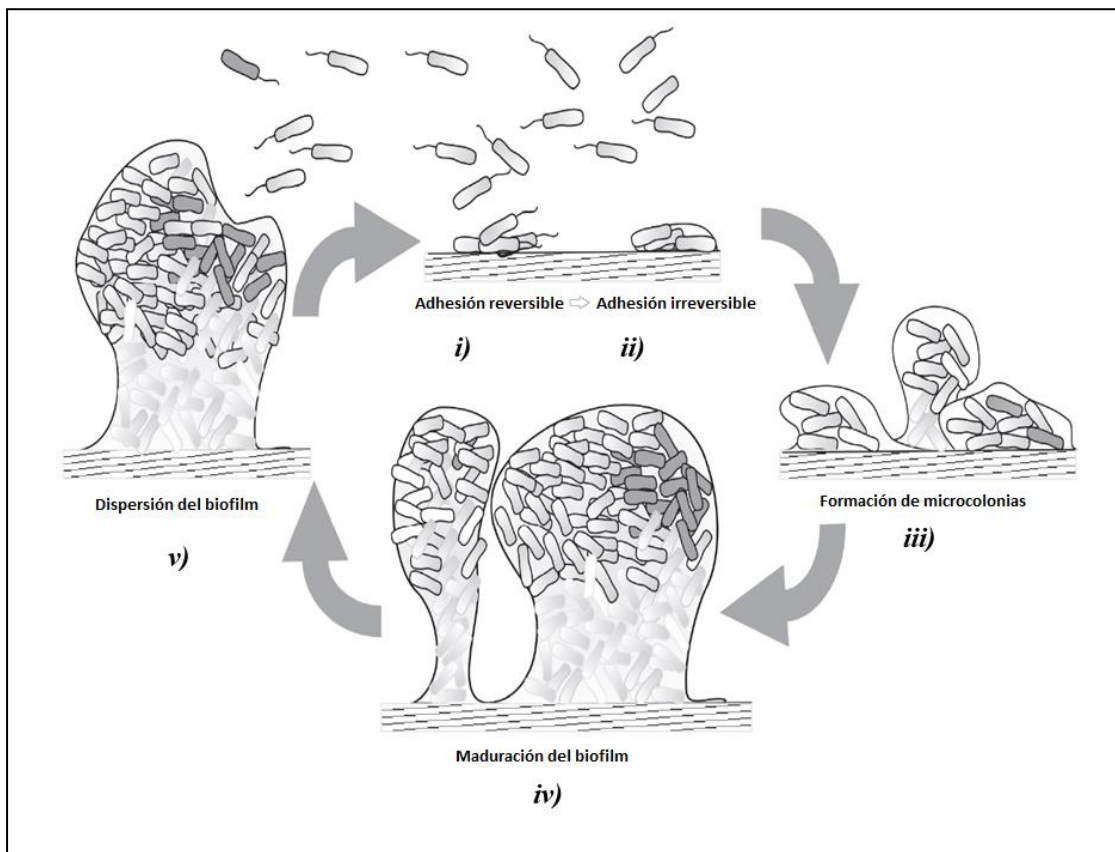


Figura 1- Esquema de las etapas en la formación del biofilm representando las diferentes etapas: *i*- Aproximación y adhesión reversible, *ii*- Adhesión irreversible y formación de exopolisacárido, *iii*- Formación de las microcolonias, *iv*- Maduración del biofilm, *v*- Dispersión del biofilm. Extraído de Markowska *et al*, 2013.

i) Aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie

Los microorganismos poseen múltiples vías genéticas que regulan el desarrollo de los biofilms, lo que evidencia la complejidad de las señales que regulan este proceso. Una misma especie bacteriana puede utilizar más de una vía para crecer en forma de biofilm, dependiendo de las señales y las condiciones del medio que han activado su formación. Por ejemplo, se ha visto que *Pseudomonas aeruginosa* forma biofilms en casi cualquier medio de cultivo que le permita crecer a diferencia de algunas cepas de *E. coli* K-12 que solo forman biofilms en medios con bajas concentraciones de nutrientes. (O'Toole *et al.*, 2000).

Esta primera etapa comienza con la aproximación y censado por parte de las bacterias a la superficie y/o ambiente donde se van a establecer (O'Toole *et al.*, 2000). La adhesión de las bacterias a las superficies esta mediada por factores no específicos como tensión superficial, hidrofobicidad y fuerzas electrostáticas

(Darouiche, 2001), así como factores específicos que incluyen estructuras de la superficie celular bacteriana como fimbrias, flagelos, proteínas de membrana externa, lipopolisacáridos y EPS (Donlan, 2002). La adhesión inicial suele ser reversible, permitiendo a las células su desprendimiento de la superficie si las condiciones cambian (Nadell *et al.*, 2008).

ii) Adhesión irreversible y producción de exopolisacárido (EPS)

Luego del primer contacto de las células a la superficie, algunas de ellas se adhieren de forma irreversible al mismo.

Es en esta etapa comienzan a producirse exopolisacáridos (EPS) cuya función es proporcionar adhesión entre células bacterianas para que pueda formarse un biofilm en varias capas (Joo & Otto, 2012). Como el EPS es altamente hidratado permite la incorporación de moléculas de agua por medio de puentes de hidrógeno. También pueden asociarse a cationes metálicos y a macromoléculas como el ADN, proteínas y lípidos. Este conjunto de sustancias conforma la matriz extracelular (Donlan, 2002) característica de los biofilms. La producción de EPS protege a las bacterias contra la desecación, brinda soporte estructural y defensa contra agentes antimicrobianos y componentes del sistema inmunitario (Dunne, 2002).

La hidrofobicidad de la superficie bacteriana también juega un papel importante en la adhesión debido a que cuanto menos polar es una superficie involucrada, mayor cantidad de interacciones hidrofóbicas tienden a establecerse sobre ella. La mayoría de las bacterias contienen componentes hidrofóbicos en su superficie. Las fimbrias son apéndices no flagelares que median la adhesión a distintas superficies, y en su gran mayoría contienen un alto porcentaje de residuos aminoácidos hidrofóbicos, por lo que contribuyen a la hidrofobicidad neta de la superficie bacteriana (Rosenberg & Kjelleberg, 1996). Se cree que el papel que juegan las fimbrias en la hidrofobicidad de la superficie bacteriana y en la adhesión está relacionado con la capacidad de vencer la repulsión electrostática inicial que existe entre la bacteria y el sustrato (Corpe, 1980).

iii) Formación de las microcolonias

Luego de la adhesión irreversible de las células bacterianas a una superficie tiene lugar el desarrollo de las microcolonias, unidades básicas en la organización de un biofilm. Las microcolonias se componen por comunidades bacterianas de unas 3 a 5 capas de microorganismos (Davey & O'Toole, 2000); al mismo tiempo en que se multiplican se reclutan otras células planctónicas con el EPS para continuar colonizando la superficie (Lindsay & Holy, 2006). La producción de EPS aumenta a medida que se incrementa el número de células. En un volumen del 100% el EPS representa el 90% mientras que las bacterias el restante 10% (Stodley *et al.*, 2013). Se ha observado que las fimbrias Tipo IV de *P. aeruginosa*, las cuales son responsables de la motilidad tipo *twitching*, tienen múltiples efectos sobre la formación del biofilm, como promover la formación de las microcolonias en determinadas 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 & Lazazzera, 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

Luego de la adhesión irreversible de la comunidad microbiana y la formación de las microcolonias comienza el proceso de maduración. Esta etapa incluye el aumento de la tasa de replicación, el aumento del espacio colonizado y también de la tasa de muerte dada la limitación de nutrientes disponibles. Existen también otros factores que regulan la maduración, como el pH interno, la osmolaridad, o la disponibilidad de oxígeno y carbono (Carpentier & Cerf, 1993).

Los biofilms maduros no son mono capas homogéneas de células microbianas sobre una superficie (Donlan & Costerton, 2002), sino que pueden presentar 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 fluido (O' Toole, 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). La estructura de los biofilms maduros cambia constantemente (Donlan & Costerton, 2002). La vida en un biofilm se considera exitosa y competitiva porque presenta una tasa de expresión diferencial de genes frente a las células planctónicas, son metabólicamente más eficientes y presentan protección y resistencia frente a varios factores de estrés (Lazzar, 2011).

La formación de la estructura tridimensional del biofilm maduro está dirigida por el proceso de comunicación celular *quorum sensing* (QS). Las moléculas encargadas del (QS), son pequeñas moléculas auto inductoras producidas por las mismas bacterias que forman el biofilm, como las acilhomoserin lactonas (AHL) (Davey & O'Toole, 2000; Fuqua *et al.*, 1994). La expresión génica de estas moléculas es regulada por la densidad celular y en su ausencia los biofilms que se forman son más finos y uniformes (Lazzar, 2011).

v) Dispersión

En esta fase, algunas bacterias que forman el biofilm se dispersan para colonizar nuevas superficies, cerrando el ciclo de desarrollo del biofilm. La etapa de dispersión es la menos comprendida del ciclo. Distintos autores coinciden en que la dispersión es un proceso complejo y activo y no solo una disgregación pasiva de la estructura celular (Parsek & Fuqua, 2004). La dispersión puede ser causada por perturbaciones externas (como incremento del fluido circundante), por procesos internos en el biofilm (degradación enzimática endógena) o por liberación del EPS. Se han identificado tres estrategias diferentes para la dispersión de las células del biofilm: 1-Dispersión *swarming*, cuando células individuales son liberadas de una microcolonia en el fluido o sustrato circundante. 2-Dispersión de aglomerados, donde grupos de bacterias son liberados en forma de agregados o émbolos. 3-Dispersión superficial, en donde estructuras del biofilm se mueven a través de las superficies (Hall-Stoodley *et al.*, 2004).

Aparentemente, el modo de dispersión afecta las características fenotípicas de los microorganismos. Los agregados grandes que se desprenden del biofilm tienden a retener algunas características como la resistencia a antimicrobianos, mientras que las células que se desprenden individualmente adoptan rápidamente el fenotipo planctónico (Donlan, 2002).

Importancia clínica de los biofilms

La medicina moderna ha logrado, mediante el desarrollo de vacunas y el empleo de antibióticos, un cierto nivel de control de las enfermedades infecciosas. Sin embargo, el surgimiento de cepas resistentes a antibióticos y el reconocimiento de las infecciones asociadas a biofilms, han desafiado a las ciencias médicas a encontrar nuevos métodos de prevención, control y tratamiento (Davey & O'Toole, 2000). En particular, los individuos que se encuentran en un estado de salud comprometido, son especialmente susceptibles a ser infectados por patógenos oportunistas que se adaptan a distintos ambientes formando biofilms (Donlan & Costerton, 2002). Es bien conocido que algunas infecciones crónicas como otitis media, periodontitis, infecciones pulmonares producidas por *P. aeruginosa* en pacientes con fibrosis quística, así como aquellas asociadas a un amplio espectro de implantes médicos como catéteres urinarios e intravenosos, válvulas cardíacas prostéticas y dispositivos intrauterinos, son producidas por microorganismos que crecen en forma de biofilms (Davey & O'Toole, 2000; Donlan, 2002, Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

Infecciones del tracto urinario (ITU)

Las infecciones del tracto urinario (ITU) resultan de la colonización y multiplicación de microorganismos en el tracto urinario (TU), ya sea en la vejiga o los riñones (Kunin *et al.*, 2002; Nicolle, 2001). Este tipo de infecciones son las más comunes en los seres humanos (Foxman, 2003). Se pueden clasificar como ITU inferior e ITU superior. Entre las primeras encontramos a la cistitis cuyos síntomas incluyen el aumento en la frecuencia al orinar, urgencia y disuria (dolor al orinar) (Guay, 2008). Entre las ITU superiores se encuentra la pielonefritis o infección de los riñones. Sus síntomas incluyen fiebre, náuseas, vómitos y dolor.

Las ITU superiores pueden evolucionar a infecciones más severas y septicemia (Kaye & Hesse, 1994).

Las ITU constituyen un serio problema sanitario y socioeconómico; se ha calculado que entre un 40% al 50% en mujeres y 12% en los hombres tendrán al menos un episodio de ITU una vez en su vida (Cassell, 1991; Nielubowicz & Mobley, 2010). Los niños y lactantes son también una población susceptible a ITU.

Las ITU también se clasifican como ITU complicadas e ITU no complicadas. Las ITU no complicadas se producen en pacientes aparentemente sanos más allá del episodio de infección, mientras que las ITU complicadas suceden en pacientes que sufren otros procesos concomitantes, como malformación anatómica o funcional del tracto urinario, presencia de alguna otra enfermedad general (por ejemplo diabetes), pacientes inmunocomprometidos o cateterizados por largo tiempo. La mayoría de las infecciones no complicadas son causadas por *E. coli*. En el caso de las ITU complicadas, en especial aquellas derivadas de cateterización a largo plazo, los agentes etiológicos son variados (Hooton *et al.*, 2010; Nicolle, 2005) siendo *Proteus mirabilis*, *Providencia stuartii*, *Morganella morganii*, *Klebsiella pneumoniae*, *E. coli*, *P. aeruginosa* algunos de los microorganismos más frecuentes encontrados.

Infecciones del tracto urinario asociado a catéteres (ITU-C)

Uno de los implantes médicos más comúnmente usados son los catéteres urinarios, dispositivos tubulares de látex o silicona que se insertan por la uretra hasta la vejiga para eliminar la orina durante una cirugía o para prevenir la retención o control de la incontinencia urinaria (Kunin, 1987; Warren *et al.*, 1989, Warren 1997; Darouiche, 2001; Jacobsen *et al.*, 2008). El uso de estos dispositivos por períodos cortos de tiempo (aproximadamente 7 días) puede conducir a infección del tracto urinario entre el 10% y 50% de los pacientes y llega al 100% en pacientes cateterizados por períodos prolongados (más de 28 días) (Stickler, 1996). El riesgo de adquirir una ITU-C aumenta en un 10% por cada día en el que el paciente permanece cateterizado (McLean *et al.*, 1997). A

pesar de que la mayoría de los casos de bacteriurias asociadas al uso de catéteres son asintomáticos, una vez que se vuelven sintomáticos las secuelas resultantes pueden variar entre moderadas (fiebre, uretritis, cistitis) a severas (pielonefritis aguda, daño renal, formación de cálculos, bacteriemia). Las infecciones que no son tratadas pueden llevar a urosepsis y muerte (Warren, 1997; Niel-Weise & van den Broek, 2005). Las ITU-C suelen ser recurrentes como consecuencia del desarrollo de biofilms en los catéteres y resultan en morbilidad a largo plazo (Jacobsen *et al.*, 2008). Estos biofilms no sólo provocan la incrustación y bloqueo de los catéteres, sino que aumentan la resistencia de las bacterias a la respuesta inmune del hospedero y a los antibióticos (Stickler & Zimakoff, 1994).

Dada la alta incidencia de las ITU-C nosocomiales (que representan más del 80%) los costos médicos totales asociados son muy elevados (Warren, 1997; Stamm, 1991; Hartstein *et al.*, 1981; Jarvis, 1996).

***Proteus mirabilis* como agente etiológico de las ITU-C**

En la Odisea de Homero, Proteo era perseguido por su habilidad de predecir el futuro y para escapar de sus perseguidores asumía diferentes formas. El nombre *Proteus* fue utilizado por primera vez por Hauser en 1885 para describir a una bacteria aislada de la carne que tenía capacidad de cambiar de forma (Hauser, 1885; Hoeniger, 1965). El género *Proteus* es constituido por bacilos Gram negativos móviles y ureasa positivos (Penner, 1984). Estos microorganismos están ampliamente distribuidos en varios ambientes, incluyendo aguas contaminadas, suelo y heces, donde *Proteus* cumple un rol en la descomposición de materia orgánica, así como en el tracto digestivo de los mamíferos (Jacobsen *et al.*, 2008; Nicolle, 2005; Hooton *et al.*, 2010, Ambruster *et al.*, 2018) (Figura 2).

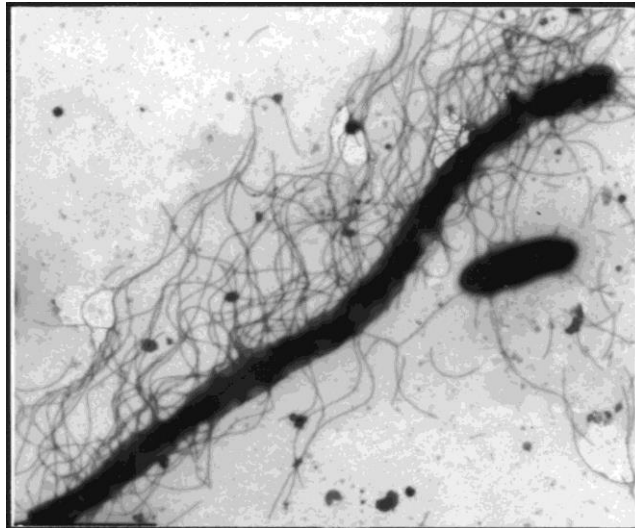


Figura 2- Micrografía electrónica de un aislamiento clínico de *P. mirabilis* (Pr2921). En la imagen se pueden identificar múltiples flagelos. Extraído de Zunino *et al.*, 1994.

P. mirabilis posee algunas características distintivas, particularmente un comportamiento multicelular en la migración sobre medios sólidos denominada *swarming*, donde se produce una diferenciación desde una forma unicelular vegetativa o *swimmer*, típica de medios líquidos, a una forma multicelular elongada hiperflagelada denominada *swarmer* (Belas, 1996). *P. mirabilis* es un patógeno oportunista del tracto urinario de grupos de pacientes vulnerables, tales como individuos con anomalías del tracto urinario y pacientes con cateterismo a largo plazo (Mobley & 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; Papazafiropoulou *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) (Ambruster *et al.*, 2018). *P. mirabilis* es el principal agente causal de las infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (ITU-C) y además es el principal agente en la pielonefritis, urolitiasis y prostatitis, 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) y 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 biofilms, inicialmente biofilms monomicrobianos, pero rápidamente se vuelven polimicrobianos. En la cateterización a largo plazo, hasta el 72% de los catéteres son colonizados por dos o más especies bacterianas (Macleod *et al.*, 2007).

Factores de virulencia

La patogenicidad de un microorganismo está relacionada con una muy diversa gama de atributos bacterianos o factores de virulencia que actúan de manera concertada. *P. mirabilis* posee un impresionante arsenal de factores de virulencia típicos tales como: actividad ureasa, fimbrias y adhesinas, flagelos, toxinas, sistemas de secreción, sistemas de captación de hierro y el elemento conjugativo integrativo ICE*Pm1* que contribuyen al establecimiento de una infección del tracto urinario (Ambruster *et al.*, 2018) (Figura 3).

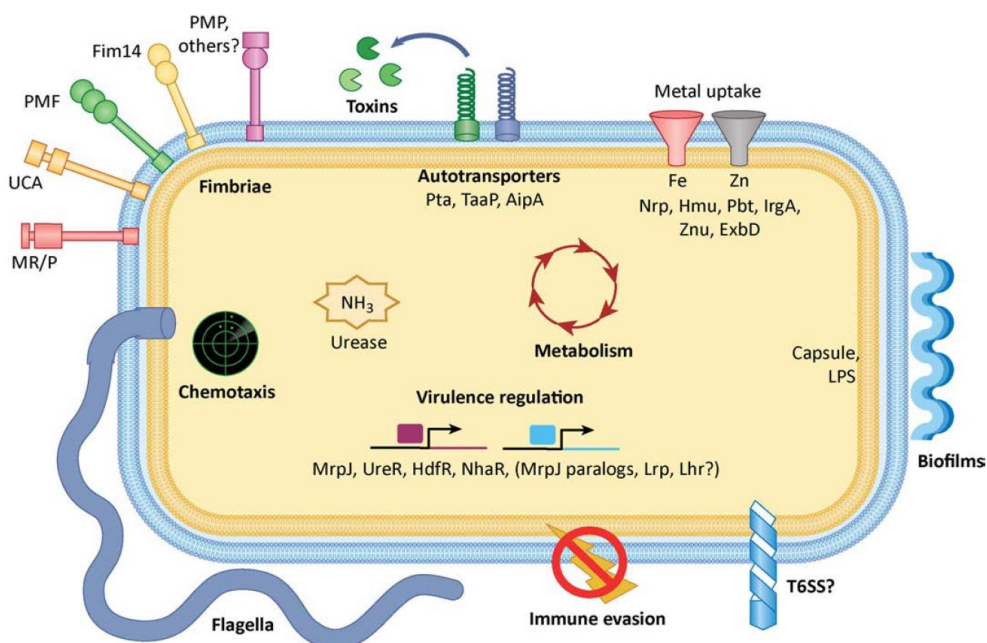


Figura 3- Representación esquemática de los factores de virulencia presentes en *P. mirabilis*. Extraído de Ambruster *et al.*, 2018.

Actividad ureasa- El grupo de genes *ureABCDEFGH* del operón ureasa en *P. mirabilis* están regulados positivamente por el inductor transcripcional *ureR* y produce una metaloenzima-níquel citoplasmática (ureasa) que actúa hidrolizando

la urea presente en la orina en amonio y dióxido de carbono (Ambruster *et al.*, 2018). El amonio liberado es una fuente de nitrógeno para las bacterias y puede ser asimilado a las biomoléculas a través de la vía de la Glutamina sintetasa (GlnA) o de la vía Glutamato deshidrogenasa (GdhA). El resultado de la actividad ureasa es un incremento del pH del medio. En el TU, el aumento de pH genera la precipitación de los iones calcio y magnesio y conlleva a la formación de cálculos urinarios de cristales de apatita (fosfato de calcio) y estruvita (fosfato de magnesio-amonio). Estos cristales forman agregados macroscópicos junto con las células bacterianas que se acumulan en la superficie del epitelio formando biofilms cristalinos característicos que pueden ser de gran tamaño, bloqueando el flujo de la orina y pudiendo causar daño en el tejido. A su vez, estos biofilms cristalinos protegen a las bacterias frente al sistema inmune del hospedero y la acción de antibióticos funcionando como puntos focales para que otras especies bacterianas puedan establecer ITU. En pacientes cateterizados pueden generar obstrucción en los catéteres y producir la retención de la orina en la vejiga o incontinencia provocada por la pérdida de orina alrededor de los bordes del catéter, comprometiendo la salud del paciente (Stickler, 2008; Stickler & Morgan, 2006; Schaffer & Pearson, 2015).

Fimbrias y adhesinas- Las fimbrias, o pili, son apéndices proteicos que protruyen de la superficie de las bacterias, tienen diversos tamaños y consisten de subunidades repetidas de péptidos con una adhesina en el extremo (Proft & Baker, 2009). *P. mirabilis* es capaz de producir varias clases de fimbrias, la secuenciación del genoma de *P. mirabilis* HI4320 reveló que contiene 17 operones fimbriales que codifican 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*) (Bahrani *et al.*, 1993) y ATF (*ambient temperature fimbriae*) (Massad *et al.*, 1996). Las fimbrias más ampliamente caracterizadas 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 (Schaffer *et al.*, 2016; Jansen *et al.*, 2004; Li *et al.*, 1999). Estas fimbrias, contribuyen a la virulencia de *P. mirabilis*, estando implicada en la

patogénesis renal por facilitamiento de la colonización del TU (Baharani *et al.*, 1994; Zunino *et al.*, 2001; Schaffer & Pearson, 2015). El operón fimbrial para MR/P, *mrp*, también codifica una proteína no estructural llamada MrpJ que reprime de manera directa la síntesis de flagelo, “apagando” la movilidad cuando la bacteria se está adhiriendo a una superficie.

En un trabajo publicado por nuestro grupo de investigación se observó que algunas de las fimbrias, en particular MR/P, UCA, ATF y PMF son necesarias para el desarrollo y establecimiento del biofilm en *P. mirabilis* (Scavone *et al.*, 2016).

Flagelos- Los flagelos son organelos que le permiten a la bacteria su desplazamiento tanto en soluciones líquidas como sobre superficies sólidas. Los flagelos participan en los estados iniciales de adhesión de las bacterias en la formación de biofilms (Belas, 2014). Teniendo en cuenta que la habilidad de *P. mirabilis* de diseminarse desde el sitio inicial de colonización en la superficie del catéter hasta las células uroepiteliales del tracto urinario es crítica para poder establecer ITU-C, la movilidad flagelar tiene un papel importante en este tipo de infecciones. El *swarming* es un proceso de diferenciación multicelular inducido que les permite a los microorganismos moverse de manera coordinada y expandirse sobre una superficie sólida (Mobley & Belas, 1995; Rather, 2005). La movilidad *swarming* se puede separar en al menos 3 etapas distintas, diferenciación a células *swarmer*, migración de la población, detención de la migración y cambio morfológico a células *swimmer* (consolidación) (Belas, 1996; Schaffer & Pearson, 2015). Las células *swarmer* migran desde el sitio original de inoculación de una manera rápida y altamente coordinada que depende de las interacciones multicelulares y señalización célula-célula mostrando un patrón característico, (“bull eye”, Belas, 1992) (Figura 4).

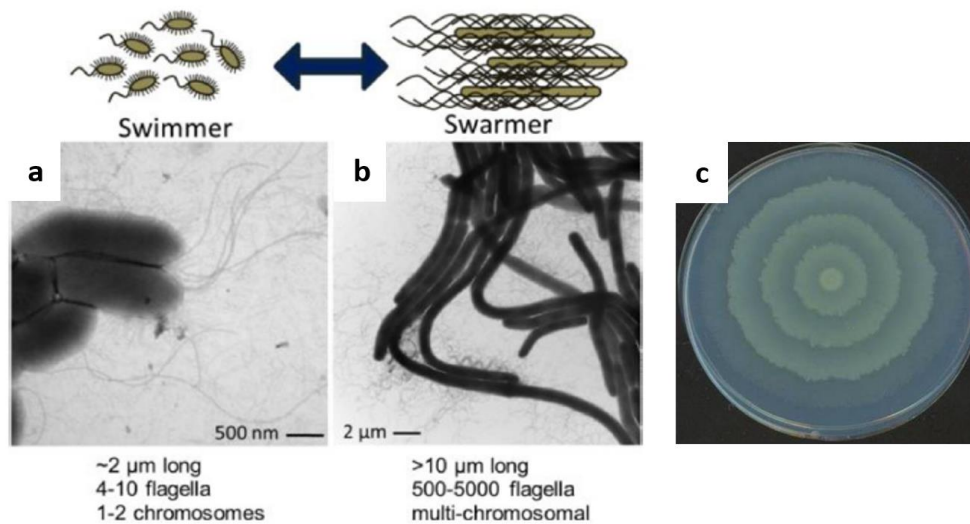


Figura 4- Morfologías de *P. mirabilis* y patrón de migración. En las primeras dos imágenes se observan micrografías electrónicas de transmisión obtenidas de un caldo de cultivo de a) células vegetativas (*swimming*) mostrando flagelos peritricos y b) de células *swarming*. En c) se muestra el patrón de migración característico sobre medios sólidos "bull eye" Imágenes extraídas de Schaffer & Pearson, 2015.

Toxinas- *P. mirabilis* produce dos toxinas, la hemolisina y la aglutinina tóxica de Proteus (Pta). Ambas toxinas están implicadas en el daño tisular y en el daño renal al inicio de la pielonefritis aguda. La hemolisina es producida durante la fase de crecimiento exponencial de los microorganismos y tiene la capacidad de insertarse en las membranas de células nucleadas y de los eritrocitos generando poros en las mismas. Estos poros producen un flujo de iones de sodio (Na^+) que finaliza con la lisis celular (Mobley *et al.*, 1991, Alamuri *et al.*, 2009; Flores-Mireles *et al.*, 2015). La Pta es una proteasa de superficie y solo es funcional a pH alcalino, como el generado bajo el efecto de la ureasa. El modelo de acción propuesto para Pta indica que esta toxina perfora la membrana celular del hospedero causando pérdida del contenido citosólico, estrés osmótico y despolimerización de las fibras de actina comprometiendo la integridad estructural celular y por lo tanto generando daño tisular en vejiga y riñón (Flores-Mireles *et al.*, 2015).

Sistemas de secreción- Los sistemas de secreción permiten a las bacterias transportar proteínas, toxinas y otras macromoléculas hacia el espacio extracelular. *P. mirabilis* posee varios sistemas de secreción: el I, III, IV, V y VI. (Ambruster *et al.*, 2018). Los sistemas de secreción tipo I, III y IV forman complejos multiproteicos para secretar los sustratos desde el citoplasma celular

hacia el medio extracelular. El sistema de secreción tipo I (SST1) exporta péptidos y factores de virulencia, tales como metaloproteasas, glicanasas (Delepelaire, 2004) y proteínas involucradas en la formación de biofilms (Russo *et al.*, 2006). El sistema de secreción de tipo III (SST3) transporta proteínas efectoras del citosol bacteriano a la célula hospedera que, una vez translocadas, intervienen en la alteración del metabolismo celular (Mota & Cornelis, 2005). El sistema de secreción tipo IV (SST4) es el único sistema de secreción que, además de transportar proteínas, es capaz de secretar ácidos nucleicos (Christie & Cascales, 2005). El SST4 está presente en varios organismos patógenos como *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Bordetella pertussis*. El sistema de secreción tipo V (SST5) permite la secreción de adhesinas, microorganismos como *E. coli*, *Haemophilus influenzae*, *Yersinia enterocolitica* y *Bordetella pertussis* poseen este sistema de secreción (Tseng *et al.*, 2009). El sistema tipo VI (SST6) al igual que el SST3 en *P. mirabilis*, es capaz de translocar proteínas efectoras directamente al citosol de la célula hospedera (Bingle *et al.*, 2008), así como también reconocer la identidad de proteínas de cepas iguales o similares, permitiendo la movilidad *swarming* cuando se cruzan las poblaciones bacterianas (que se relaciona con el fenómeno de inhibición mutua o test de Dienes) (Zepeda-Rivera *et al.*, 2018).

Sistemas de captación de hierro- El hierro es un elemento esencial para la función de muchas proteínas y enzimas de las bacterias. El tracto urinario es un ambiente en el cual la disponibilidad de hierro es limitada. Es por ello que los uropatógenos han desarrollado una gran variedad de mecanismos de adquisición y almacenamiento de este elemento. En *P. mirabilis*, el ADN codifica para genes putativos que están implicados en la captación de hierro ferroso, hierro férrico, citrato férrico, varios receptores dependientes de TonB y sistemas de transporte ABC relacionados con hierro (Pearson *et al.*, 2008; Himpsl *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 del tracto urinario (Pearson *et al.*, 2010; Nielubowicz *et al.*, 2008; Burall *et al.*, 2004; Himpsl *et al.*, 2008; Himpsl *et al.*, 2010).

Elemento conjugativo integrativo ICEPm1- En las bacterias, el material genético nuevo es generado por síntesis de *novus*, por mutaciones o por la transferencia horizontal de genes. La transferencia horizontal de genes puede darse a través de la transformación, transducción, conjugación o por fusión con vesículas de membrana externa que contienen ADN (Johnson & Grossman, 2015). Los elementos conjugativos e integrativos (ICE) se encuentran integrados en el cromosoma bacteriano y tienen la habilidad de escindirse de la célula formando un intermediario circular y transferirse por conjugación a otra célula bacteriana e integrarse a su genoma. Muchas islas genómicas pertenecen a este tipo de elementos móviles (Wozniak *et al.*, 2010). ICEPm1 es un elemento conjugativo integrativo identificado y conservado en *P. mirabilis*, *Providencia stuartii* y *Morganella morganii*. Estos tres microorganismos son productores de ureasa y agentes etiológicos de ITU-C. Los genes intercalados entre los módulos centrales de ICEPm1 codifican para un sistema de adquisición de hierro relacionado a *Yersinia* y para una adhesina, ambos contribuyentes en la virulencia en el modelo ITU en ratón (Flannery *et al.*, 2011).

Biofilms, virulencia y capacidad de adaptación bacteriana

Varios autores sugieren que el modo de crecimiento de un biofilm es importante para la adaptación de las bacterias en su entorno haciéndolas más persistentes y menos virulentas (Costerton *et al.*, 1999; Hoiby *et al.*, 2001, Singh *et al.*, 2000). Las bacterias se vuelven más persistentes porque los antígenos y ligandos que el sistema inmune del hospedero reconoce están ocultos en el biofilm (Parsek, 2003). Por otra parte, ya hemos mencionado en este trabajo que las bacterias en el biofilm coordinan su comportamiento a través de la comunicación celular (QS). Esta comunicación les permite a las bacterias sentir y responder a las condiciones del ambiente. En *P. aeruginosa* se ha visto que existe una relación entre el QS con la formación de biofilms y la producción de factores de virulencia (Jensen *et al.*, 2007).

La formación de biofilms es un proceso que involucra la participación de diversos factores de virulencia. Sin embargo, se propone que otras estructuras bacterianas que no responden a una caracterización típica como factor de

virulencia también participan en mecanismos de formación y persistencia del biofilm (Ambruster *et al.*, 2017). Existe evidencia de la contribución de los procesos del metabolismo básico en la virulencia de *P. mirabilis*, algunos de los cuales incluyen genes involucrados en el metabolismo de los carbohidratos y de los aminoácidos (Burall *et al.*, 2004; Himpsl *et al.*, 2008). Incluso se ha visto la influencia de un solo aminoácido (arginina) en la movilidad y fitness en una infección en *P. mirabilis* (Ambruster *et al.*, 2014). Un trabajo más reciente de Ambruster y colaboradores determinó genes y factores esenciales que contribuirían en una infección. Este grupo de investigadores utilizó un *pool* de cepas mutantes de *P. mirabilis* generadas por mutagénesis y observaron que 629 genes (que equivalen al 16.8% de los genes codificados por *P. mirabilis* HI4320) eran genes candidatos como factores de virulencia en una ITU-C. Entre los genes candidatos, 36 genes fueron categorizados como más importantes para la colonización de la vejiga cateterizada (Ambruster *et al.*, 2017) y algunos de estos genes ya habían sido identificados como factores involucrados en una ITU (Pearson *et al.*, 2011). Dentro de este grupo encontramos genes que codifican para transportadores de fosfato, factor de elongación Tu, peptidasas dependientes de ATP, reguladores transcripcionales, citocromo quinol oxidasa, una porina de membrana externa, transportador de la familia MSF entre otros (Ambruster *et al.*, 2017).

Como se ha descrito, los factores y vías que están involucrados en la patogénesis por *P. mirabilis* en el TU son múltiples. El rol de algunos de estos factores asociados a la infección o a la formación de biofilms no han sido estudiados. En este trabajo, se evaluaron 5 atributos bacterianos que no son considerados como típicos factores de virulencia.

Los transportadores de la familia AEC pertenecen a la familia de las MSF (del inglés *major facilitator superfamily*) (Lorca *et al.*, 2007), que son una de las 6 superfamilias de sistemas de eflujo (Du *et al.*, 2018; Slipski *et al.*, 2018). Las bombas de eflujo pueden ser específicas para un sustrato o pueden transportar de manera inespecífica una amplia gama de compuestos químicamente diferentes, como los antimicrobianos, asociando la presencia de estas bombas

con la resistencia a antibióticos (Marchetti, Errecalde & Mestorino 2011). La relevancia de las bombas de eflujo también subyace por su contribución en la patogénesis (Sun *et al.*, 2014; Buckley *et al.*, 2006; Nishino *et al.*, 2006) y en la formación de biofilms (Holling *et al.*, 2014; Kvist *et al.*, 2008; Matsumura *et al.*, 2011).

La enzima glioxilato reductasa / hidroxipiruvato reductasa (GRHPR), está altamente conservada y presente en la mayoría de los organismos conocidos, incluidos mamíferos y plantas superiores. Las GRHPR son enzimas de doble actividad, catalizan la reducción de glioxilato en glicolato que es excretado y la conversión de hidroxipiruvato en D-glicerato, un precursor en la ruta de la gluconeogénesis (Figura 5) (Lassalle *et al.*, 2016, Hubenova *et al.*, 2017).

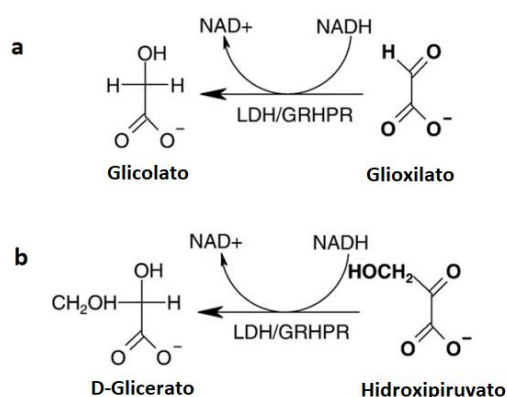


Figura 5 - Reacciones de reducción por las enzimas GRHPR. En a se muestra la reducción del glioxilato a glicolato y en b la reducción de hidroxipiruvato a D-glicerato. Extraído de Mdluli *et al.*, 2005

La D-alanil D-alanina carboxipeptidasa (DDC) cataliza la liberación de un residuo de D-alanina en el extremo carboxi-terminal del peptidoglucano en formación. El peptidoglucano (PG) es la unidad básica de la pared bacteriana. Está compuesto por dos derivados de azúcares (N-acetilglucosamina y ácido N-acetilmurámico) y algunos aminoácidos (L y D-alanina, D-ácido glutámico, L-lisina o ácido diaminopimélico DAP). Estos constituyentes se conectan de manera repetida

formando un tetrapéptido. La síntesis del peptidoglicano comienza con la formación de precursores de PG en el citoplasma que luego son llevados a la membrana citoplasmática por un transportador llamado bactoprenol. El bactoprenol una vez que llega al periplasma, interactúa con enzimas transglicosilasas que insertan a los precursores del PG en un "punto de crecimiento" (los puntos de crecimiento son pequeños Gaps formados por autolisinas de la propia bacteria) de la pared celular existente catalizando enlaces glucosídicos. Este polímero de PG naciente es lineal y sufre un entrecruzamiento por transpeptidación con un PG aceptor preexistente. La reacción final en la formación de peptidoglicano es una transpeptidación, dada entre el DAP, en bacterias Gram negativas, de un péptido y la D-alanina del péptido adyacente dejando dos residuos de alanina al final del PG precursor. Durante la transpeptidación uno de los residuos de D-alanina es removido por la enzima D-alanil D-alanina carboxipeptidasa, esta enzima es crucial en la rigidez y la integridad de la pared celular bacteriana (Figura 6). Las penicilinas y otros antibióticos beta-lactámicos compiten con esta enzima y establecen uniones más estables con el PG en formación inhibiendo el final de su síntesis, por lo que esta enzima pertenece a la familia de las *Penicilin binding proteins* (PBP) (Madigan *et al*, 2015; Davies, White & Nicholas 2001).

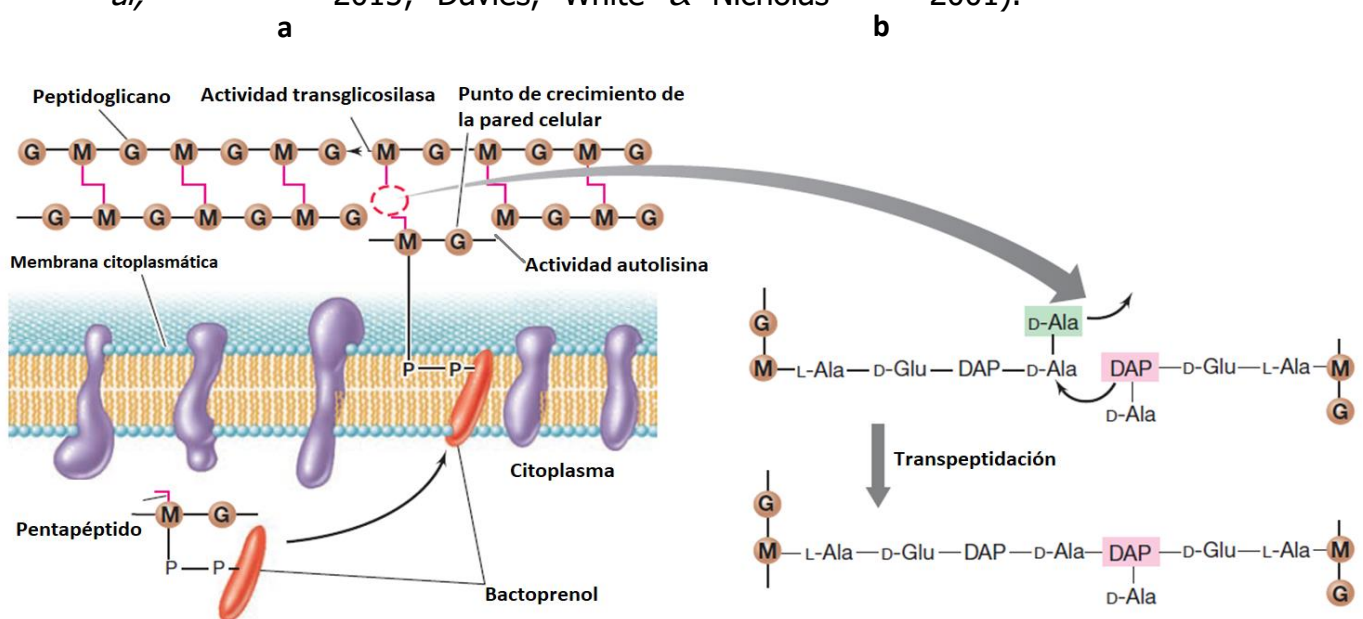


Figura 6- Síntesis de peptidoglicano en bacterias Gram negativas. En a) se observa el transporte de los precursores del peptidoglicano a través de la membrana citoplasmática hasta el punto de crecimiento de la pared. Las autolisinas rompen los enlaces glucosídicos en el peptidoglicano preexistente, mientras que las transglicosilasas los sintetizan y unen el peptidoglicano preexistente con el peptidoglicano nuevo. En b) se muestra la reacción de transpeptidación que lleva al entrecruzamiento de dos cadenas de peptidoglicano. Extraído de Madigan *et al*, 2015.

Las flavodoxinas son proteínas de transporte de electrones, encontradas principalmente en bacterias, que contienen mononucleótidos de flavina (FMN) como grupo prostético. Estas proteínas están involucradas en varios procesos biológicos como la reducción de nitrato, la síntesis de metionina, la activación de varias enzimas y la síntesis de biotina (Vitamina B8). Las flavodoxinas se clasifican como de cadena larga o de cadena corta de acuerdo a la presencia o ausencia de un loop de 20 aminoácidos en la hoja beta. La proteína MioC ha sido identificada en *E. coli* como una flavodoxina de cadena corta y se compone de 147 aminoácidos. Recientemente se ha sugerido que la proteína MioC juega un rol promoviendo la actividad de la Biotin sintasa (BioB) *in vitro*, una enzima que cataliza el paso final en la síntesis de Biotina (Hu *et al*, 2006; Birch *et al*, 2000).

La L-treonina 3-deshidrogenasa es una enzima que se encuentra en un amplio rango de especies desde bacterias hasta mamíferos. En *E. coli* LTDH está involucrada en el catabolismo de la treonina y en la síntesis de glicina. Esta enzima utiliza el NAD⁺ como coenzima para catalizar la deshidrogenación del carbono 3' del átomo de la L- treonina. El producto de esta reacción es el α -amino- β -cetobutirato y es convertido a glicina por la enzima α -amino- β -cetobutirato CoA liasa (Ma *et al*, 2014; Nakano *et al*, 2014).

Hipótesis

Diversos factores bacterianos están involucrados en la formación de biofilms de *P. mirabilis* uropatogénico, los cuales además tienen relevancia en la infección del tracto urinario.

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo fue dilucidar el papel de factores vinculados a la formación de biofilms de *P. mirabilis* en distintos modelos *in vivo* y evaluar su asociación con la virulencia en el tracto urinario.

Objetivos específicos

- 1- Caracterizar fenotípicamente un conjunto de cepas mutantes de *P. mirabilis* con capacidad defectiva en la formación de biofilms.
- 2- Evaluar el papel de los atributos asociados a la formación de biofilms de *P. mirabilis* en la capacidad de infectar el tracto urinario normal.
- 3- Examinar el rol de los atributos asociados a la formación de biofilms de *P. mirabilis* en la infección del tracto urinario cateterizado.
- 4- Analizar el papel de los atributos de *P. mirabilis* en la formación y la bioarquitectura de biofilms en condiciones de simulación del medio interno.

Materiales y métodos

Cepas bacterianas

La cepa salvaje de *P. mirabilis*, Pr 2921, aislada de la orina de un paciente con ITU sintomática fue utilizada como cepa parental para la generación de mutantes. Esta cepa presenta resistencia a tetraciclina, eritromicina, polimixicina y es sensible a ampicilina, tiene movilidad *swarming* y es productora de hemolisina y ureasa (Zunino *et al.*, 2000). Se ha probado que *P. mirabilis* Pr2921 es patogénica y capaz de formar biofilms (Zunino *et al.*, 2001; Zunino *et al.*, 2003; Schlapp *et al.*, 2011) Además, se empleó un grupo de 5 cepas mutantes con capacidad alterada de formar biofilms previamente generadas por transposición en nuestro laboratorio a partir de Pr2921.

Colección de cepas mutantes de *P. mirabilis* generadas mediante mutagénesis al azar

Cinco cepas, de una biblioteca de mutantes de *P. mirabilis* generada mediante mutagénesis al azar por inserción del transposón miniTn5, fueron utilizadas en este trabajo. Para la generación de estas cepas se empleó un sistema de conjugación en el cual se empleó como cepa parental *P. mirabilis* (Pr2921) y como cepa donadora una *E. coli* S17-1 λ pir con el plásmido suicida pBAM1, cuya replicación depende de la proteína π , codificada por el gen *pir*, ausente en *P. mirabilis*. El plásmido pBAM1 incluye un mini transposón derivado de Tn5, flanqueado por elementos mosaico (ME, del inglés: *Mosaic Element*) de 19 pares de bases, denominadas ME-I y ME-O. Entre los extremos, se sitúa un gen de resistencia a kanamicina (Km^R) que se utiliza como marcador de selección, y un sitio de clonado múltiple (MCS, del inglés: *Multiple Cloning Site*) con 15 sitios de corte para enzimas de restricción. pBAM1 también posee el gen de la transposasa *tnpA* que cataliza la inserción aleatoria del módulo móvil en el genoma, y el gen *bla* que codifica para una β -lactamasa, otorgando resistencia a ampicilina (Martínez-García *et al.*, 2011).

Las cepas mutantes obtenidas por esta técnica son tetraciclina resistentes como la cepa parental, kanamicina resistentes, debido al gen de resistencia a kanamicina que queda inserto en el genoma y ampicilina sensibles, ya que el gen que otorga resistencia a este antibiótico no se integra al genoma por localizarse fuera del transposón (Figura7).

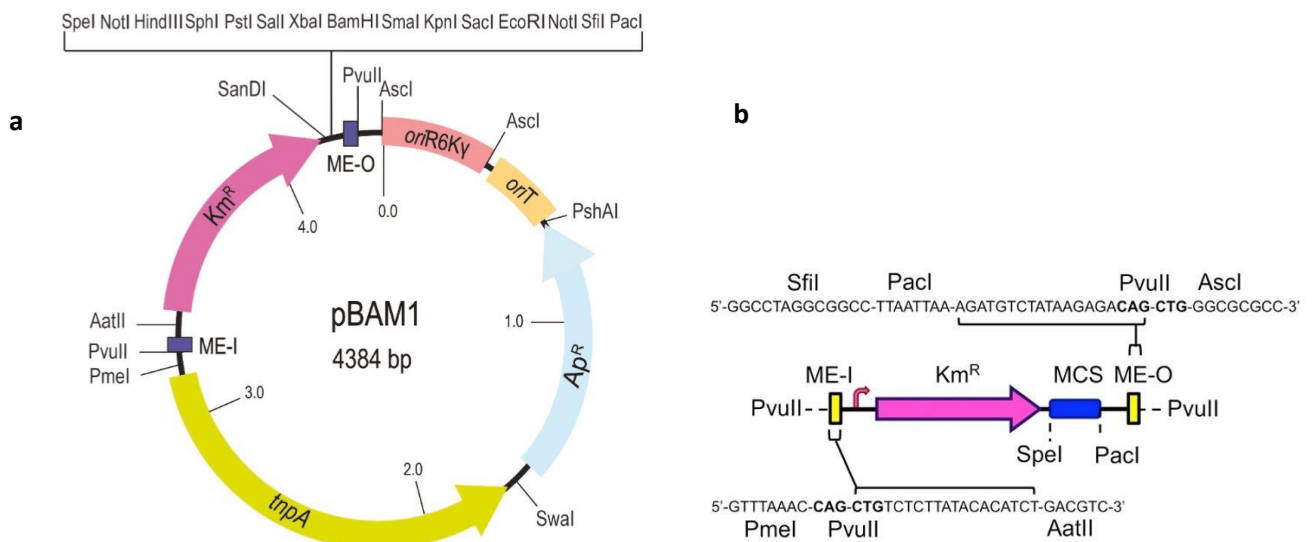


Figura 7- Mapa del plásmido pBAM1- (a)Elementos funcionales del plásmido y (b)porción plasmídica que queda inserta en el genoma de *P. mirabilis*. Extraído de Martínez-García *et al.*, 2011.

La capacidad de formación de biofilms de las distintas cepas mutantes de *P. mirabilis* se determinó mediante un método semicuantitativo que se basa en la habilidad de las bacterias para formar biofilms en superficies abióticas. Este método permite estimar de manera indirecta el biofilm adherido a los pocillos de poliestireno mediante tinción con cristal violeta (Pratt & Kolter, 1998). Las cepas con capacidad alterada de formar biofilms fueron seleccionadas de acuerdo al criterio establecido por Villegas *et al.*, 2013. Este criterio determinaba que cepas con $DO_{595nm} < 0.25$ eran cepas de baja formación de biofilms y cepas con $DO_{595nm} > 1.2$ eran cepas de alta formación de biofilms.

Posteriormente se verificó que las cepas tuvieran una única inserción del transposón en el genoma mediante la técnica de *Southern Blot* (Iribarnegaray, 2014). La identificación del sitio de inserción y por lo tanto del gen interrumpido

se realizó por PCR arbitraria de las regiones contiguas al sitio de inserción del transposón y una posterior secuenciación de los productos obtenidos (Tuja, 2015). La PCR arbitraria consta de dos rondas de amplificación, donde el ADN molde utilizado en la segunda ronda corresponde al producto de la primera ronda. Se emplearon cebadores diseñados de forma arbitraria, que hibridan en secuencias arbitrarias del genoma y cebadores interno y externo (ME-I-int y ME-I-ext), (Martínez-García *et al.*, 2011). Los productos obtenidos en el segundo ciclo de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa. Luego, los fragmentos de ADN de interés fueron enviados a secuenciar al servicio de *Macrogen Inc.* y posteriormente las secuencias obtenidas se analizaron a través de herramientas informáticas del NCBI (*National Center for Biotechnology Information*). Así, las secuencias flanqueantes al sitio de inserción fueron comparadas con las de *P. mirabilis* HI4320, cepa cuyo genoma se ha secuenciado de manera completa (Pearson *et al.*, 2008), y así genes involucrados en la formación de biofilms fueron identificados.

Se obtuvieron 38 cepas mutantes con capacidad alterada de formar biofilms, 13 cepas de alta formación de biofilms y 25 cepas de baja formación de biofilms (Caetano, 2014). En el presente trabajo se seleccionaron cinco de esas cepas cuyas mutaciones no estaban localizadas en genes que se pudieran considerar como típicamente asociados a la virulencia.

Tres de estas cepas son defectivas para proteínas involucradas en el metabolismo, una cepa es defectiva en una proteína involucrada en la eliminación de metabolitos tóxicos y una cepa es defectiva en una proteína involucrada en la síntesis de peptidoglicano. Las características de las cepas mutantes seleccionadas se detallan a continuación (Tabla 1).

Tabla 1: Cepas mutantes de *P. mirabilis* empleadas en este trabajo

Cepa	Gen interrumpido	Función asociada	Formación de biofilm <i>in vitro</i> *	Identificación del gen PMI en <i>Pm</i> HI4320
tAEC-101	Transportador de la familia AEC	Transporte	Baja	RS05875
GRHPR-105	Glioxilato reductasa/Hidroxipiruvato reductasa	Metabolismo	Baja	RS05300
DDC-109	D-alanil D-alanina carboxipeptidasa	Estructural	Baja	RS03290
MioC-119	FMN- Proteína de unión MioC	Metabolismo	Baja	RS15125
LTDH-128	L- treonina 3- deshidrogenasa	Metabolismo	Alta	RS15715

*Evaluada por CV, de acuerdo al criterio establecido por Pratt & Kolter, 1998.

Condiciones generales de cultivo

Los cultivos bacterianos se realizaron en aerobiosis a 37° C en caldo LB (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 0.5%, pH 6.8) o LB agar cuando se necesitó un medio sólido (LB caldo suplementado con 1.5% de agar bacteriológico).

Para los recuentos bacterianos se utilizaron placas con agar nutritivo (NA) que evita la movilidad *swarming* permitiendo contar las colonias aisladas (extracto de carne 3 g/L, peptona 5 g/L, agar bacteriológico 15 g/L, pH7).

Los medios fueron suplementados con los antibióticos Kanamicina (40 µg/mL) y tetraciclina (15 µg/mL) si las condiciones de cultivo lo requerían.

Conservación de las cepas

Las cepas se conservaron a -80° C en caldo LB con glicerol al 20% como crioconservante.

1. Propiedades fenotípicas de las distintas cepas mutantes de *P. mirabilis*

1.1 Curvas de crecimiento

Las curvas de crecimiento para las cepas se realizaron por recuento en placa con NA a los tiempos 4h, 6h, 8h, 24h y 48h. Los cultivos líquidos para los recuentos se realizaron en placas de 96 pocillos.

A partir de cada cultivo bacteriano en medio sólido, se realizó una suspensión en PBS estéril con una DO_{600nm} igual a 1. Para cada cepa, se inocularon 20 μ L de la suspensión en 180 μ L de medio LB. La placa se incubó en forma estática en una estufa a 37°C y se tomaron alícuotas a los distintos tiempos para hacer el recuento en placas de NA. El ensayo se realizó dos veces y los resultados se compararon empleando el test no paramétrico de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

1.2 Movilidad *swimming*

La movilidad *swimming* de las distintas cepas mutantes fue evaluada de acuerdo a la técnica propuesta por Holling y colaboradores (Holling *et al.*, 2014). Las cepas bacterianas fueron cultivadas en 15mL de medio líquido LB a 37°C ON. Luego se inocularon 2 μ L del cultivo con una $DO_{600nm} = 1$ en el centro de placas de Petri e inmerso en el LB *soft* agar (0,3%). Las placas se incubaron por 6h a 37°C. La movilidad *swimming* se evaluó como la distancia 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 compararon empleando el test de Student ($P < 0,05$).

1.3 Movilidad *swarming*

La movilidad *swarming* de las distintas cepas mutantes se evaluó según el protocolo desarrollado por Jones y colaboradores con modificaciones (Jones *et al.*, 2004). Las distintas cepas fueron cultivadas en 15mL de medio LB durante 4h y luego se inocularon 10 μ L del cultivo con una DO_{600nm}=1 en el centro de placas de Petri con LB agar al 1,5%. Las gotas se dejaron secar a temperatura ambiente y luego las placas se incubaron 24hs a 37°C. Para determinar la movilidad de cada cepa, se midió la distancia desde el centro de la placa hasta el frente de migración (radio de desplazamiento) (Figura 8) y se determinó el área de la elipse. Este ensayo se realizó nueve veces. Los datos fueron comparados utilizando el test de Student ($P < 0,05$).

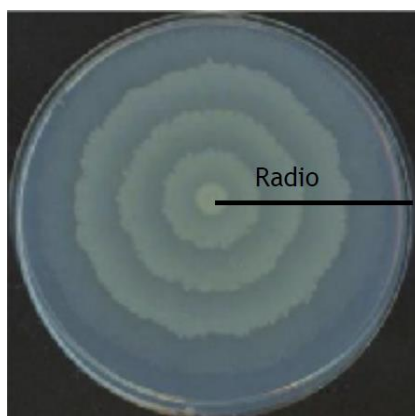


Figura 8- Representación de la movilidad *swarming* en una placa de Petri. Se detalla el radio de desplazamiento.

2. Evaluación de la infección experimental de distintas cepas de *P. mirabilis* en el modelo de ITU ascendente en ratón

2.1 Animales

En todos los procedimientos en que se utilizaron ratones se usaron hembras CD-1 de 6 a 8 semanas de vida, alimentadas con agua y ración comercial *ad libitum*. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del bioterio del IIBCE y los protocolos de experimentación fueron previamente aprobados por la Comisión de Ética de Uso de Animales (CEUA) del IIBCE.

2.2 Modelo de infección ascendente del tracto urinario en ratón (ITU)

El modelo de infección experimental ascendente empleado fue el desarrollado por Hagberg y colaboradores para *E. coli* con modificaciones (Hagberg *et al.*, 1983). Dicho modelo consiste en instilar transuretralmente 50µL de una suspensión bacteriana de 4×10^{10} UFC/mL (2×10^8 UFC/animal) (Zunino *et al.*, 2000). Los animales fueron previamente anestesiados con xilazina (10mg/kg) y ketamina (50mg/kg) y sus vejigas vaciadas con suaves masajes abdominales. Por medio de la introducción de un catéter de polietileno (0.61mm de diámetro externo) en la uretra se les administró la suspensión bacteriana lentamente con el fin de evitar el reflujo vesicouretral. Los animales se sacrificaron a los 7 días de realizada la infección por dislocación cervical, los riñones y las vejigas se extrajeron de forma aséptica para realizar recuento bacteriano.

2.3 Cuantificación de bacterias en el tracto urinario

Para evaluar los niveles de infección se emplearon entre 5 y 6 animales para cada cepa de la manera siguiente: tAEC-101(n=5), GRHPR-105(n=6), DDC-109(n=6), MioC-119(n=6) y LTDH-128(n=6) y la cepa 2921 como control (n=13). Cada vejiga y riñón extraído de los animales se homogeneizó en 10mL de PBS estéril en un Stomacher 80 (Seward). Posteriormente se realizaron diluciones seriadas en PBS y siembra en placas de NA, incubadas por 24hs a 37°C, con el fin de realizar recuentos de bacterias viables. Los resultados fueron comparados a través del test no paramétrico de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3. Evaluación de la infección experimental de distintas cepas de *P. mirabilis* en el modelo de cateterización en ratón

3.1 Modelo de infección del tracto urinario en ratones cateterizados (ITU-C)

El modelo de infección del tracto urinario en ratones cateterizados utilizado fue en base a un modelo propuesto por Guiton y colaboradores para *Enterococcus* spp., con modificaciones (Guiton *et al.*, 2010). Este modelo se basó en el implante intravesical de una sección de 3mm de catéter blando de silicona estéril de 0,61mm de diámetro externo por medio de una suave tracción ejercida por un catéter rígido de diámetro similar, hasta su introducción en la vejiga. Inmediatamente después del implante, los animales se infectaron y se sacrificaron a los 3 días, ya que en ese período de tiempo los animales retenían el catéter en la vejiga. Previo al sacrificio de cada animal, una muestra de orina se obtuvo para hacer recuento bacteriano. El sacrificio de los ratones se realizó por medio de dislocación cervical y se obtuvieron las vejigas en forma aséptica. Se tomó el peso de las vejigas de los animales infectados, y mediante cortes histológicos y posterior tinción con hematoxilina y eosina, se determinó el grado de daño histológico de los tejidos. También se verificó la presencia y localización de las bacterias en la vejiga.

Con el fin de comparar las variaciones entre los modelos de infección ascendente y el modelo de cateterización se agregaron grupos de animales infectados de acuerdo al modelo de ITU sin cateterizar de acuerdo al siguiente diagrama:

Grupos a evaluar

Naïve	Naïve catéter	ITU cepa mutante	ITUc cepa mutante	ITU 2921	ITUc 2921
n= 6	n= 7	tAEC-101 n= 4 GRHPR-105 n= 3 DDC-109 n= 4 MioC-119 n= 5 LTDH-128 n= 4	tAEC-101 n= 4 GRHPR-105 n=3 DDC-109 n= 4 MioC-119 n= 5 LTDH-128 n= 5	n= 9	n= 6

Los animales *naïve* son aquellos que no han sido infectados (animales sanos).

3.2 Cuantificación de bacterias en orina

La cuantificación bacteriana en orina de los animales empleados en el modelo de ITU-C se realizó por recuento en placa. Al tercer día post infección se extrajo una muestra de orina de cada animal por medio de suaves masajes abdominales y se sembraron 10µL en una placa de NA de forma individual. Las placas se incubaron 24hs a 37°C y se contaron las colonias presentes. Los recuentos bacterianos fueron comparados a través del test no paramétrico de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3.3 Peso de las vejigas

Una vez obtenidas las vejigas de los animales, se pesaron con el fin de estimar posibles diferencias entre los valores obtenidos en los distintos grupos de animales. Además, se buscó evidenciar una posible asociación entre la infección con las diferentes cepas con un aumento del tamaño del órgano, dado por una respuesta del sistema inmune del hospedero.

Los pesos de las vejigas fueron comparados a través del test no paramétrico de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3.4 Cortes histológicos de vejigas

Las vejigas se fijaron en paraformaldehído al 4% en PBS durante dos horas y luego se crioprotegieron con una solución de sacarosa al 20% en PBS para su conservación en bloques de *Tissue-tek* a -80°C hasta su procesamiento. Los cortes histológicos se realizaron en crióstato LEICA CM1800 con un ancho de 12µm.

3.5 Tinción de los cortes con Hematoxilina y Eosina (H-E)

La mayoría de las células y cortes de tejidos no poseen un color propio, por lo cual, se realizan tinciones con colorantes adecuados para la observación de sus

características morfológicas. Se realizaron tinciones con hematoxilina y eosina. La hematoxilina tiñe estructuras ácidas como los ácidos nucleicos de los núcleos mientras que la eosina tiñe estructuras básicas como es el citoplasma celular. Los portaobjetos con los cortes de las vejigas fueron fijados en paraformaldehído al 4% durante 15 min. Posteriormente, se lavaron con PBS y se sumergieron en una solución de hematoxilina durante 7 min. Luego se colocaron en agua destilada durante 7 min. Transcurrido el tiempo del paso anterior los cortes se colocaron en una solución de eosina durante 1.5 min. Luego se siguieron pasos de deshidratación de 1 min, primero con alcohol al 95%, luego alcohol al 95% PPA y por último con alcohol absoluto PPA. Las muestras se colocaron en Xilol durante 1 min y fueron montadas con bálsamo de Canadá. Una vez que el bálsamo secase, los portaobjetos se guardaron a temperatura ambiente hasta su observación en el microscopio.

3.6 Escala de daño histológico

Los cortes de vejigas teñidos con H-E se visualizaron al microscopio óptico y se evaluó el daño histológico de acuerdo al criterio establecido por Alamuri y colaboradores (Alamuri *et al.*, 2009). Este grupo de investigadores estableció que la severidad de la cistitis se podía categorizar de acuerdo a una escala de 0 a 3 de la siguiente manera: 0- sin alteraciones, 1- ocasional infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia, 2- generalización de infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia con diseminación mínima en el tejido muscular o epitelio y 3- inflamación perivascular extendida, distribución transmural y células inflamatorias intraepiteliales. Los valores de daño histológico fueron comparados a través del test no paramétrico de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

3.7 Presencia y localización bacteriana en la vejiga por inmunofluorescencia y MLC

A partir de los cortes histológicos se realizó también inmunofluorescencia *in situ*, según el método descrito por Schlapp *et al.*, 2011 con modificaciones, para localizar las bacterias en la vejiga (Schlapp *et al.*, 2011; Scavone 2013). Todos

los pasos de la tinción se realizaron a temperatura ambiente y entre las distintas incubaciones se realizaron 3 lavados con PBS. Los portaobjetos que contenían los cortes de tejido fueron fijados con paraformaldehído al 4% durante 15 min. Posteriormente se incubaron con un buffer de bloqueo (BB: Sero Albúmina bovina 2% y NH₄Cl 50mM en PBS Ca/Mg) durante 20 min. Transcurrido dicho tiempo los cortes se sometieron a un buffer de permeabilización (BP: Sero Albúmina bovina 2% y NH₄Cl 50mM, Tritón X100 0.3% en PBS Ca/Mg) durante 15 min. Luego, se incubaron durante 1h con una dilución 1/50 de suero policlonal anti-*P. mirabilis*, preparada en BB. Luego, los portaobjetos se colocaron bajo una solución que contenía un anticuerpo secundario anti-IgG de ratón acoplado a FIT-C, que se une al anticuerpo primario adherido en la muestra, para marcar proteínas o moléculas de *P. mirabilis* presentes allí. Las células eucariotas del tejido se marcaron con los fluoróforos Hoesch 33342 (1/100) para marcar ADN y rodamina-faloidina (1/100) para marcar actina. La solución con los fluoróforos se preparó en BB y luego se incubó durante 30 min sobre los portaobjetos. Pasada la media hora los portaobjetos se lavaron con PBS, luego con agua destilada y se escurrieron para montarles los cubreobjetos correspondientes con Citifluor y se sellaron los bordes. Los portaobjetos con los cortes teñidos se guardaron a -20°C hasta su observación en el microscopio láser confocal (MLC).

La presencia de las bacterias teñidas con los marcadores fluorescentes en los distintos cortes de las vejigas, se evidenciaron mediante la observación en el MLC BX-61 FV300 utilizando el software Fluoview 4.3. La visualización de las mismas se realizó a tres aumentos diferentes (20X, 40X y 100X) empleando los láseres Kr 488nm, He-Ne 543nm y Diodo 405nm. Las imágenes que se obtuvieron fueron de 1024 x 1024 pixeles y se procesaron en el programa Volocity Demo.

4. Evaluación de la formación y la bioarquitectura de biofilms de cepas mutantes de *P. mirabilis* en el modelo de Cámaras de Difusión Intraperitoneales en ratas

4.1 Animales

En este ensayo se utilizaron ratas hembras Wistar de 8 semanas de vida, que tuvieran un peso comprendido entre los 200-250g, alimentadas con agua y ración comercial ad *libitum*. Los animales fueron mantenidos en las instalaciones del bioterio del IIBCE y los protocolos de experimentación fueron previamente aprobados por la Comisión de Ética de Uso de Animales (CEUA) del IIBCE.

4.2 Modelo de cámaras de difusión intraperitoneales en ratas

El modelo de implantes de cámaras de difusión intraperitoneales en ratas fue adaptado por Zunino y colaboradores en nuestro laboratorio y es una aproximación para estudiar a los microorganismos en condiciones *in vivo* (Zunino *et al.*, 1999). En esta oportunidad, el modelo fue utilizado para evaluar si las cepas mutantes en estudio tenían capacidad de formar biofilms en estas condiciones. Este modelo permite inferir el papel de los productos de la expresión de genes involucrados en la formación de biofilms, analizando imágenes obtenidas por MLC de los biofilms adheridos y teñidos a un cubreobjetos dentro de las cámaras.

El modelo consiste en introducir en la cavidad peritoneal de los animales dos tubos cónicos de 1,5mL. La boca del mismo está obturada por un filtro de nitrocelulosa de 0,45µm que permite el recambio de medio entre la cámara y la cavidad peritoneal del animal, sin liberar a los microorganismos contenidos allí. Dentro de cada cámara se introdujo un cubreobjeto de 22mm X 6mm y 1mL de una suspensión bacteriana de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL. Los animales fueron sacrificados a los 5 días para recuperar las cámaras y realizar los ensayos previstos.

Para llevar a cabo el experimento los animales fueron anestesiados

intramuscularmente con Ketamina (90mg/Kg) y Xilacina (10mg/Kg). Una vez presente el efecto anestésico, las cámaras de difusión fueron introducidas en la cavidad peritoneal de los animales por medio de una incisión en el abdomen de 1 a 2cm de longitud, posteriormente la incisión fue suturada utilizando hilo Vicryl 0000 para la pared abdominal e hilo nylon 000 para la piel. En todos los animales se aplicó un protocolo de analgesia en base a Tramadol (2mg/Kg) y Dipirone (30mg/Kg) cuando el efecto anestésico comenzaba a desaparecer. Las ratas fueron sacrificadas a los 5 días y se recuperaron las cámaras asépticamente para su análisis.

4.3 Recuento bacteriano

Con el objetivo de verificar que las distintas cepas tuvieran la capacidad de crecer bajo las condiciones del experimento *in vivo* se realizó recuento bacteriano de las células planctónicas en placas de NA.

Una vez recuperadas las cámaras del animal, se tomó una alícuota de 100µL de la suspensión bacteriana, se realizaron diluciones seriadas y siembra en placas con NA. Las placas se incubaron a 37°C entre 24h y 48h y se contaron las colonias presentes. Los recuentos bacterianos fueron comparados a través del test no paramétrico de Mann-Whitney ($P < 0,05$).

4.4 Inmunofluorescencia de los biofilms en los cubreobjetos ubicados dentro de las cámaras

Los biofilms desarrollados sobre los cubreobjetos *in vivo* fueron teñidos de acuerdo al método de inmunofluorescencia *in situ* (Schalpp *et al.*, 2011) detallado en el modelo de ITU-C con la excepción del uso del fluoróforo rodamina-faloidina, ya que en este ensayo no fue preciso teñir células eucariotas. Los portaobjetos se conservaron a -20°C hasta su observación en el MLC.

4.5 Obtención de imágenes por MLC

Los biofilms de *P. mirabilis* se observaron por medio de un microscopio láser confocal Olympus BX-61 FV300, empleando el software Olympus Fluoview Versión 4.3 disponible en el IIBCE. La visualización se llevó a cabo con un objetivo de inmersión en aceite 100X, apertura numérica 1.35 y empleando los láseres de excitación- emisión Kr 488 nm y Diodo 405 nm. El uso del microscopio láser confocal presenta varias ventajas respecto a los microscopios de fluorescencia. La fluorescencia procedente de los planos fuera de foco (o plano focal) es eliminada por un diafragma o *pinhole* haciendo que las imágenes obtenidas tengan mayor nitidez. También este microscopio permite la obtención de secciones ópticas consecutivas llamadas *stacks* que nos brinda información del interior de los cortes. Se seleccionaron entre 3 y 5 campos al azar en cada cubreobjetos y se obtuvieron *stacks* en el eje z empleando un *step size* de 0,3µm entre una imagen y la siguiente. Se utilizó un tamaño de imagen de 1024 x 1024 píxeles y un tamaño de pixel de 0,070µm. El número de imágenes en cada *stack* varió de acuerdo al grosor del biofilm en el eje z.

4.6 Procesamiento de imágenes

Con el objetivo de analizar las imágenes obtenidas por MLC para generar las reconstrucciones tridimensionales de los biofilms y adquirir los parámetros morfotopológicos asociados se procedió a restaurar y procesar la imagen. El procesamiento de una imagen consta de tres procesos consecutivos, deconvolución, segmentación y obtención de parámetros de interés con generación de modelados.

4.6.1 Deconvolución

En microscopía, la convolución modeliza matemáticamente el proceso de formación de una imagen digital la cual sufre degradación por desenfoque y ruido (ruido fotónico). El desenfoque aparece porque se trabaja en el límite de resolución del dispositivo debido a la difracción de la luz en las lentes. La deconvolución, es el proceso iterativo inverso a la convolución, se utiliza para la

restauración de una imagen. El proceso revierte la distorsión óptica producida principalmente en el eje z, reduce las zonas borrosas y el ruido fotónico, obteniendo una representación más real del objeto. Las imágenes de los *stacks* se deconvolucionaron usando el software Huygens Professional (Scientific Volume Imaging, Hilversum, Netherlands – www.svi.nl).

ii-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 SciaSoft IDL 7.1 (Interactive Data Language, ITT, Co, USA) desarrollado en el Laboratorio de Análisis de Imágenes Científicas (SciaLab) 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*, el cual consiste en resaltar los bordes de los objetos de interés, *median*, que suaviza las imágenes preservando los contornos y *fill/remove*, que rellena huecos y remueve objetos pequeños, entre otros.

iii-Cálculo de parámetros y generación de los modelos 3D

Para poder caracterizar los biofilms de *P. mirabilis*, se seleccionaron aquellos parámetros disponibles que resultaran útiles para este fin. Para cada *stack* de

imágenes se calcularon el número de bacterias, el volumen total de bacterias, el volumen de material extracelular, el volumen de biomasa y se generaron los modelos en 3D. También se evaluó cualitativamente la formación de *lattice* hexagonal según Härtel *et al.*, (2005). El modelo de *lattice* hexagonal es una representación en 2D que calcula la distancia entre un objeto (1 bacteria) y sus 6 vecinos más cercanos en el *slice* con mayor número de bacterias. Este modelo se representa por líneas entre uno y otro objeto, permitiendo visualizar de forma rápida el grado de compactación del biofilm.

Análisis estadísticos

Con el fin de hacer un análisis de varianza (ANOVA) por test paramétricos, al conjunto de datos de cada ensayo se les evaluó normalidad y homogeneidad de varianzas. Cuando estos supuestos no se cumplieron, los datos se transformaron y se evaluaron nuevamente. Si luego de esto los datos resultaron no normales y con varianzas no homogéneas, utilizamos test no paramétricos. En cada sección se especificó el test utilizado.

Se consideraron diferencias significativas los valores de $P < 0,05$.

Los análisis estadísticos se realizaron con el programa Prism 5.

Resultados

Capítulo 1- Propiedades fenotípicas

Curvas de crecimiento

Cuando se evaluaron las curvas de crecimiento en LB para todas las cepas bacterianas, se pudo observar que los recuentos bacterianos obtenidos para las cepas mutantes a las 24h mostraron diferencias frente a la cepa salvaje, sin embargo, en el conjunto de datos las diferencias no fueron significativas ($P > 0,05$) (Figura 9).

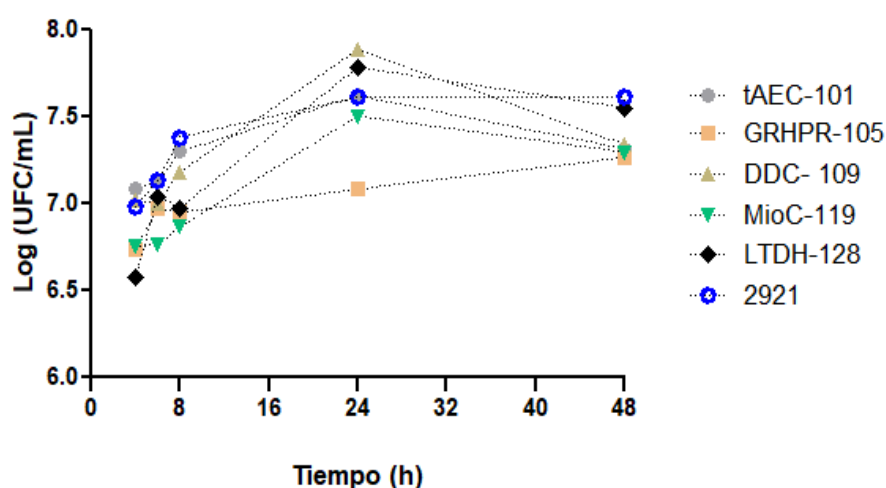


Figura 9- Curva de crecimiento en medio líquido LB para las cepas mutantes y la cepa salvaje. Los cultivos se incubaron durante 48h a 37°C y se tomaron alícuotas a los tiempos 4h, 6h, 8h, 24h y 48h para hacer recuento en placas con NA. Se graficaron los valores promedios de los logaritmos de los recuentos obtenidos en dos ensayos independientes. Las diferencias entre los recuentos se analizaron a través del test Mann-Whitney.

Movilidad *swimming*

La movilidad *swimming* se calculó como la distancia lineal migrada desde el inóculo inicial hasta el frente de migración de cada cepa en placas de LB *soft* agar. Los resultados obtenidos mostraron que todas las cepas mutantes evaluadas tienen una movilidad *swimming* significativamente menor con respecto a la movilidad de la cepa salvaje Pr2921 ($P < 0,05$) (Figura 10).

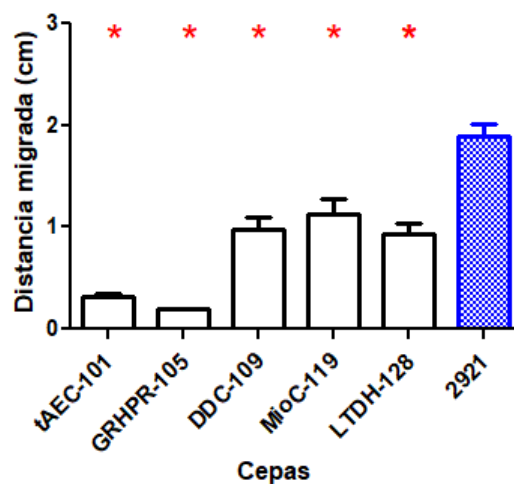


Figura 10- gráficos de distancia migrada *swimming* de las cepas mutantes y la cepa salvaje. Las columnas representan las medias y las barras la desviación estándar. Las diferencias significativas son marcadas con asterisco ($P < 0,05$, Test de Student).

Movilidad *swarming*

La movilidad *swarming* se calculó a partir de las áreas de las elipses generadas por los frentes de migración. Los resultados obtenidos mostraron que la cepa mutante en GRHPR-105 no presentó *swarming*. Las cepas mutantes en tAEC-101, MioC-119 y LTDH-128 presentaron una disminución significativa en la movilidad *swarming* con respecto a la cepa salvaje Pr2921 ($P < 0,05$). La cepa mutante en DDC-109 presentó una movilidad *swarming* similar a Pr2921 (Figura 11).

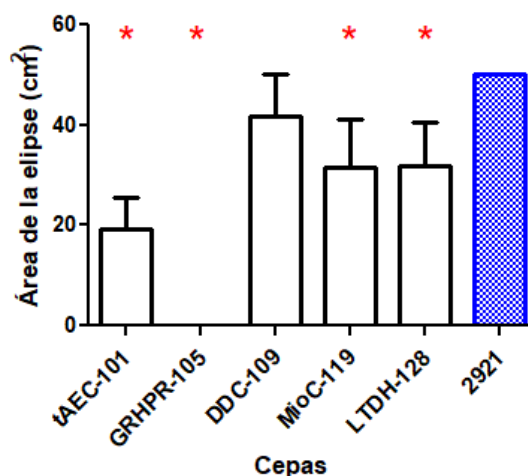


Figura 11- Gráficos de las áreas de la elipse para las cepas mutantes y la cepa salvaje. Las columnas representan las medias y las barras la desviación estándar. Las diferencias significativas son marcadas con asterisco ($P < 0,05$, Test de Student).

Capítulo 2- Capacidad infectiva de *P. mirabilis* en el tracto urinario (TU)

Recuento bacteriano del TU

Los resultados de la ITU ascendente mostraron que las cepas mutantes GRHPR-105, DDC-109 y MioC-119 clasificadas previamente como cepas de baja formación de biofilms, fueron significativamente menos capaces para infectar tanto riñones como vejigas con respecto a la cepa salvaje Pr2921. Las cepas mutantes en tAEC-101 y LTDH-128, la primera clasificada como baja formadora y la segunda como alta formadora de biofilms, presentaron una capacidad disminuida significativamente de infectar los riñones ($P < 0,05$). En el caso de las vejigas de los animales infectados con las cepas mutantes tAEC-101 y LTDH-128, si bien se observó una disminución de los valores de UFC esas diferencias no fueron significativas (Figura 12).

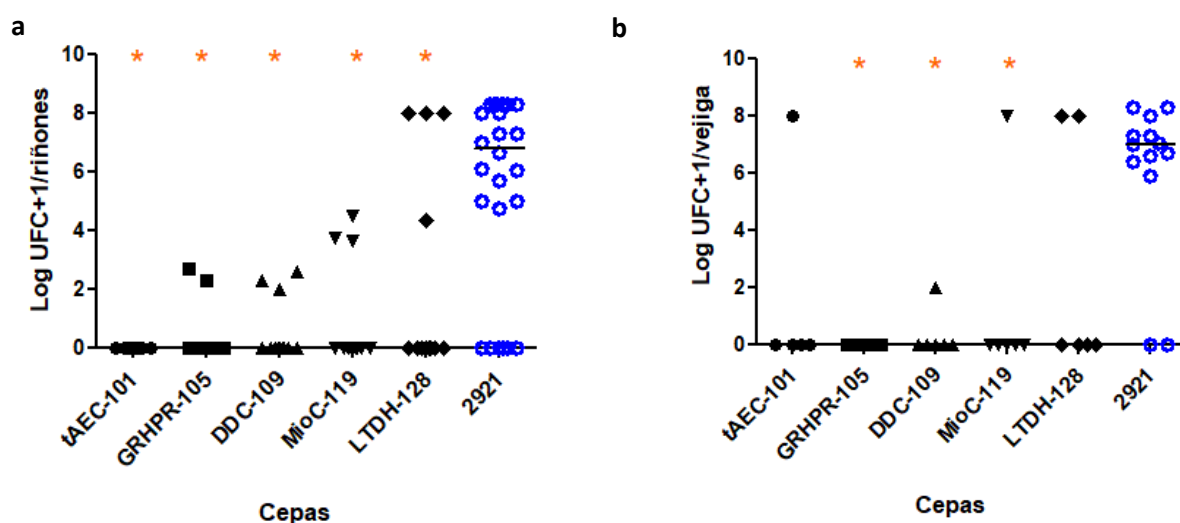


Figura 12- Recuentos bacterianos de las cepas mutantes y el control obtenidos en (a) riñones y (b) vejigas. Los símbolos representan los valores de los recuentos de cada órgano y las barras representan las medianas de los valores de los recuentos. Las diferencias significativas son marcadas con asterisco ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney).

Capítulo 3- Evaluación de factores de *P. mirabilis* en el tracto urinario cateterizado

Recuento bacteriano en orina

Con respecto a la capacidad de las mutantes de *P. mirabilis* de colonizar el tracto urinario de ratones cateterizados, en la figura 13 se presentan los resultados de los recuentos bacterianos en orina de cada animal a los 3 días de la infección y antes de su sacrificio (Figura 13).

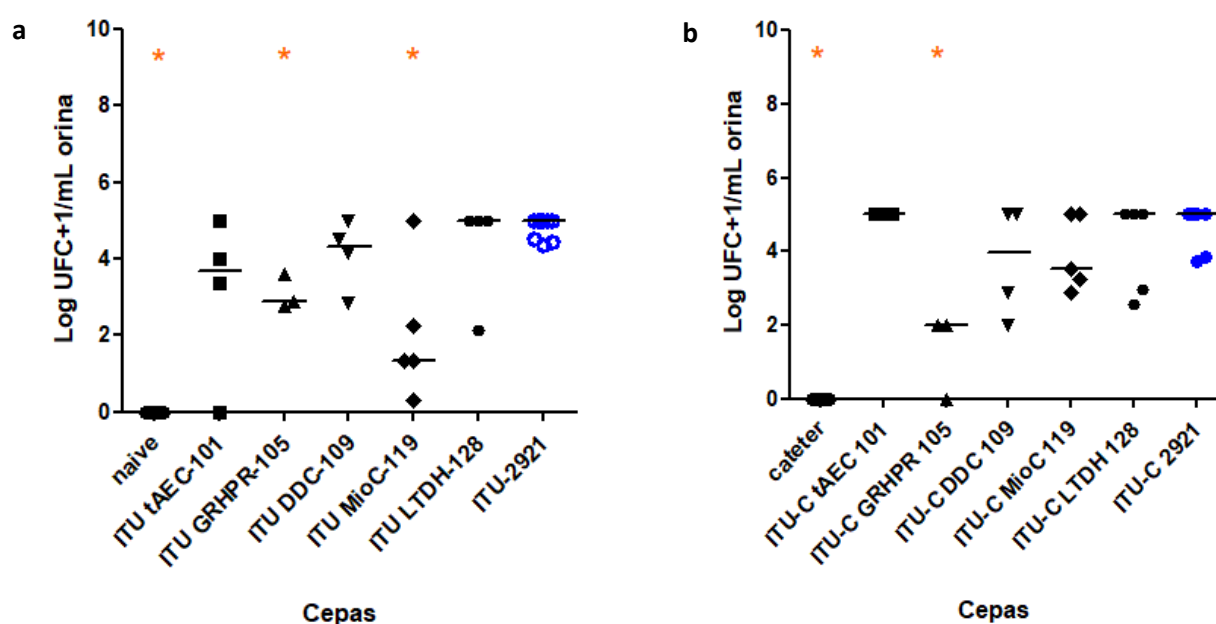


Figura 13 - Gráficos de recuento bacteriano obtenido a partir de una muestra de orina de los animales infectados con las diferentes cepas mutantes y controles con la cepa 2921 y animales sin infectar. En a) se muestran los resultados para ITU y en b) para ITU-C. Los símbolos representan los valores de recuento de las cepas y las barras representan las medianas de los valores de los recuentos. Las diferencias significativas son marcadas con asterisco* ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney).

En los animales cateterizados, el recuento bacteriano en la orina de los animales infectados con la cepa mutante GRHPR-105 fue significativamente menor al de los ratones infectados con la cepa salvaje Pr2921 ($P < 0,05$). Las cepas mutantes para DDC-109 y MioC-119 exhibieron recuentos en orina menores a los valores obtenidos para la cepa salvaje, aunque no fueron significativos. Las cepas mutantes en tAEC-101 y LTDH-128 mostraron valores de recuentos en orina

similares a la cepa salvaje Pr2921. En los animales infectados sin cateterizar empleados en este ensayo, las cepas mutantes GRHPR-105 y MioC-119 tuvieron valores de recuentos bacterianos en orina significativamente menores que los recuentos bacterianos en orina para Pr2921 ($P < 0,05$). Las cepas mutantes en tAEC-101 y DDC-109 tuvieron valores de recuentos menores frente a 2921 aunque no fueron significativos. La cepa mutante LTDH-128 tuvo un recuento bacteriano en orina similar al de la cepa parental. Los animales sin infectar (tanto cateterizados como sin cateterizar), como era esperable, no presentaron recuento bacteriano en orina (Figura 13).

Al comparar los resultados para cada cepa en los modelos de ITUc y sin cateterizar, no se encontraron diferencias significativas ($P > 0,05$ Test de Kruskal Wallis).

Peso de las vejigas

En el modelo de ITU, la comparación entre los pesos de las vejigas de los animales infectados con las cepas mutantes y los de los animales infectados con la cepa salvaje, no mostraron diferencias significativas ($P > 0,05$) (Figura 14).

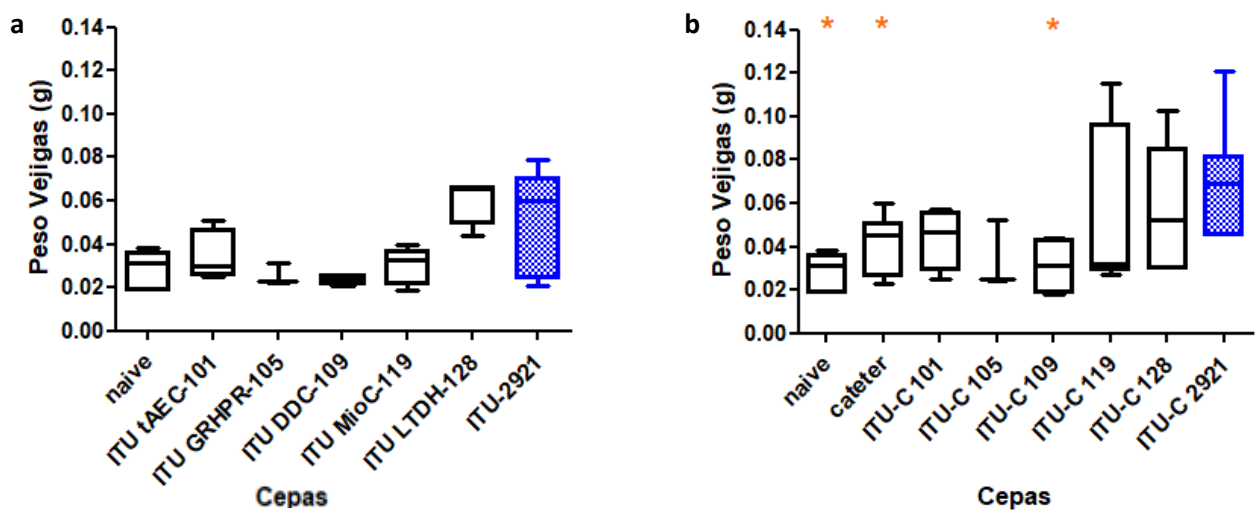


Figura 14- Boxplot de los pesos de las vejigas de los animales infectados por los modelos a) ITU y b) ITUc. Los boxes representan los percentiles 25 y 75, las líneas dentro de los boxes representan las medianas de los pesos y las barras representan los valores de peso mínimo y máximo. Las diferencias significativas frente a Pr2921 son marcadas con asterisco* ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney).

En el desarrollo del modelo de cateterización (ITU-C), los grupos de animales infectados con la cepa mutante en DDC-109 así como los animales sin infectar, presentaron pesos de las vejigas significativamente menores a los pesos de las vejigas de los animales infectados con la cepa salvaje ($P < 0,05$). Las vejigas de los animales infectados con las cepas mutantes en tAEC-101, GRHPR-105 y MioC-119 tuvieron pesos de vejigas menores a los obtenidos para las vejigas infectadas con la cepa salvaje, aunque las diferencias no fueron significativas. Los animales infectados con la cepa mutante en LTDH-128 tuvieron pesos de vejigas similares a los pesos de las vejigas de los animales infectados con la cepa salvaje (Figura 14).

Los pesos de las vejigas de los animales infectados con el tracto urinario sin modificar se compararon con los pesos de las vejigas de los animales empleados en el modelo de cateterización, mostrando una tendencia en el aumento de los pesos de las vejigas para las cepas MioC-119, LTDH-128 y 2921 en ITUc, aunque las diferencias no fueron significativas. (Figura 14).

Escala de daño histológico

En las imágenes de los cortes de vejigas para los animales sanos se pudo identificar la luz de la vejiga, el epitelio de transición, la lámina propia y el tejido muscular (Figura 15).

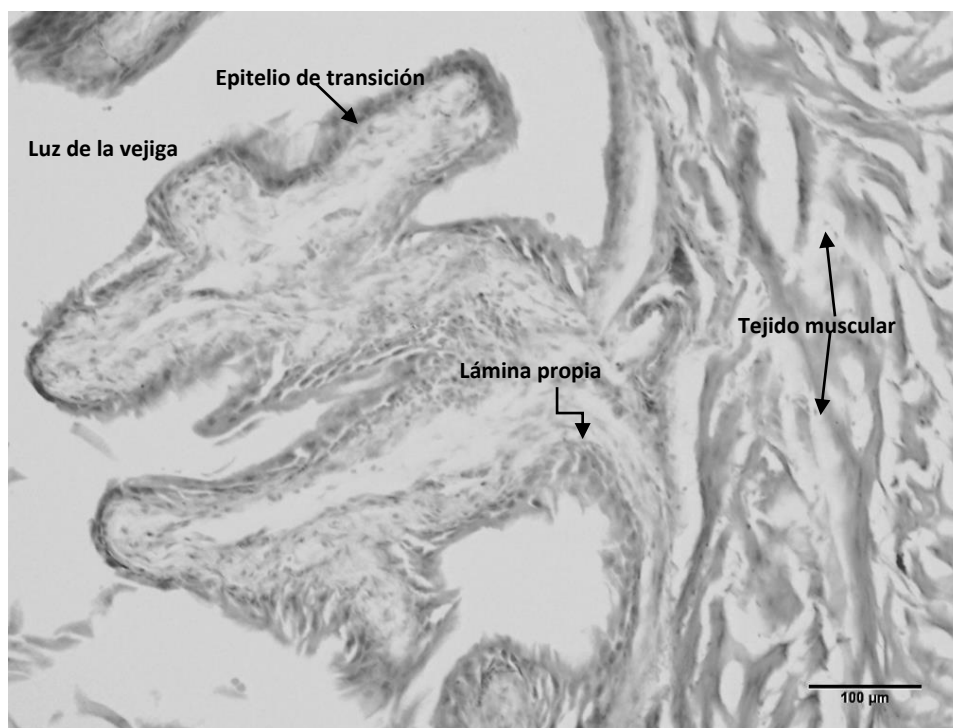


Figura 15 – Corte de vejiga proveniente de un animal sano (*naïve*), teñido con hematoxilina y eosina visto a un aumento de 10X. En la imagen se muestran las distintas zonas identificadas en el tejido vesical.

En el presente trabajo fueron seleccionadas 3 vejigas al azar de los grupos de ratones infectados con la cepa salvaje y las cepas mutantes en las condiciones ITU e ITU-C, 3 vejigas de animales *naïve* y 3 vejigas de animales cateterizados sin infectar.

En la Figura 16 se muestran imágenes representativas obtenidas de los cortes de vejigas teñidas con H-E de los animales empleados en el ensayo. En ellas se representa la evaluación del grado de daño histológico a los aumentos 10X, 20X y 40X (Figura 16).

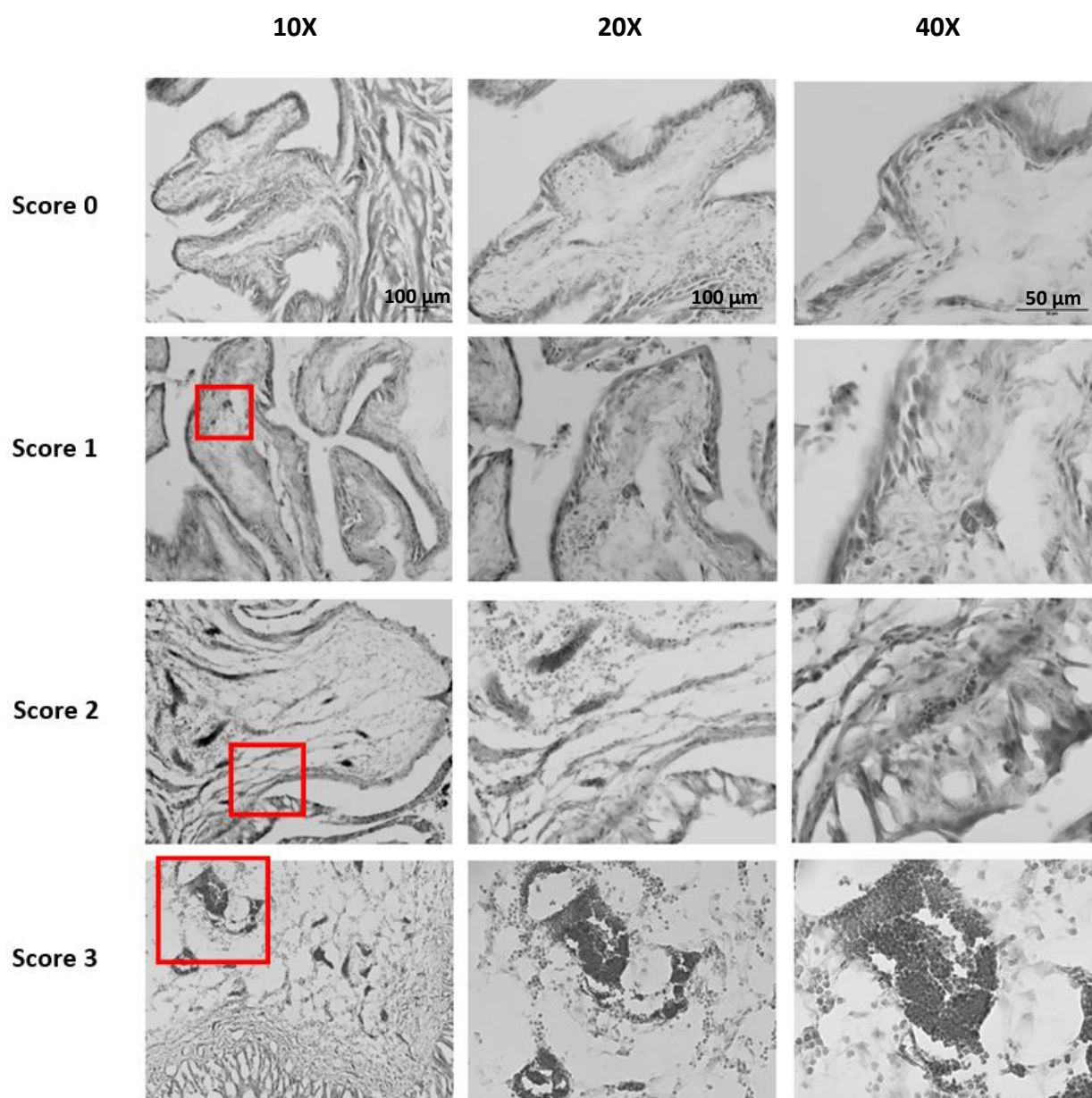


Figura 16- Imágenes representativas de cortes de vejigas teñidos con H-E de animales sin infectar (control-score 0) y de animales infectados con las diferentes cepas mutantes, mostrando los diferentes grados de daño histológico encontrados a los tres días de infección. Los valores de *score* de daño histológico se designan 0- sin alteraciones, 1- ocasional infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia, 2- generalización de infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia con diseminación mínima en el tejido muscular o epitelio y 3- inflamación perivascular extendida, distribución transmural y células inflamatorias intraepiteliales. Se aprecian algunos agregados en recuadros rojos. Se muestran imágenes a los aumentos 10X, 20X y 40X.

Las vejigas de los animales infectados el modelo de ITU presentaron un *score* de daño menor que las vejigas de los animales infectados por el modelo de ITU-C, con la excepción de la cepa mutante en LTDH-128 (Figura 17).

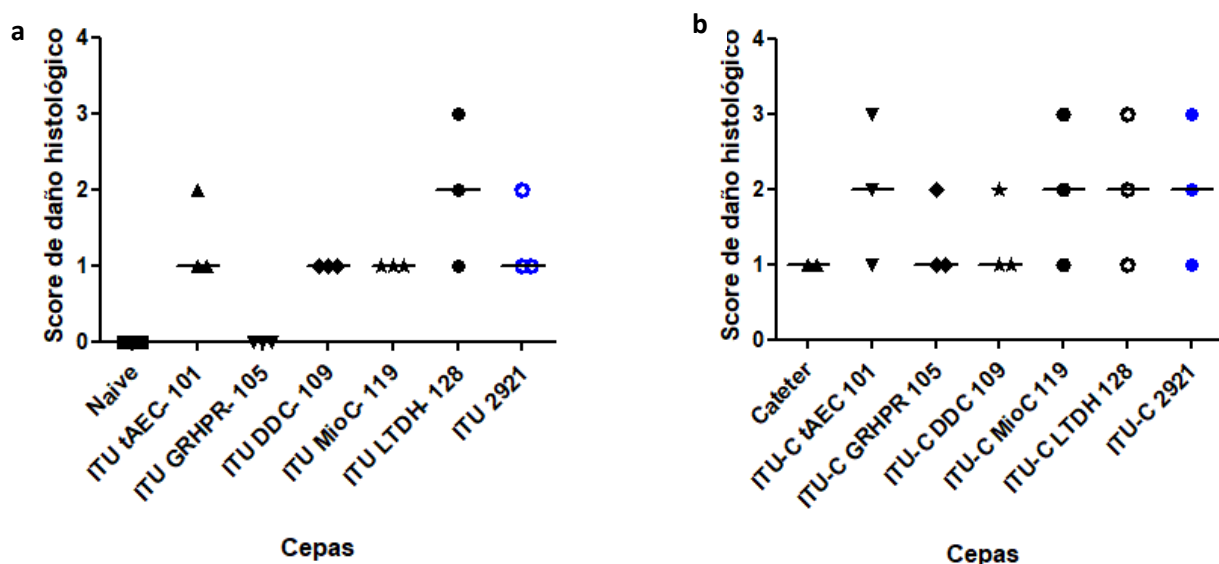


Figura 17- Gráfico de escala de daño histológico de vejigas con 3 días de infección en a) ITU y b) ITU-C. Los valores de *score* de daño histológico se designan 0- sin alteraciones, 1- ocasional infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia, 2- generalización de infiltrado de células inflamatorias en la lámina propia con diseminación mínima en el tejido muscular o epitelio y 3- inflamación perivascular extendida, distribución transmural y células inflamatorias intraepiteliales. Los símbolos representan los valores de *score* para las cepas evaluadas y las barras representan las medianas de los valores de *score* ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney).

Dentro del grupo de animales evaluado para ITU, la cepa mutante GRHPR-105 no generó daño (*score* 0) en el tejido vesical. Las cepas mutantes en tAEC-101, DDC-109, MioC-119 y la cepa salvaje Pr2921 presentaron un grado de daño histológico de leve a moderado (*score* 1-2). La cepa mutante en LTDH-128 generó mayor daño en las vejigas (*score* 1-3) que la cepa Pr2921, aunque estos valores no fueron significativos frente a la cepa salvaje.

En el caso de los animales evaluados en el modelo de ITU-C, las cepas mutantes GRHPR-105 y DDC-109 tuvieron un grado de daño bajo (*score* 1), similar al grupo de animales que solamente fueron cateterizados (controles). Las cepas tAEC-101, MioC-119, LTDH-128 y la cepa salvaje Pr2921 generaron daño del tejido que variaba desde leve a severo (*score* 1-3). Los valores de *score* para las cepas mutantes y los animales sin infectar se compararon frente a los valores para la cepa salvaje y no presentaron diferencias significativas.

En resumen, en el modelo ITU todas las cepas, salvo la cepa mutante GRHPR-105, generaron cambios histopatológicos (daño) en el tejido vesical de los animales evaluados. En el modelo ITU-C todas las cepas bacterianas sin

excepción, generaron cambios histopatológicos (daño) en el tejido de las vejigas. Además, pudo observarse que la sola inserción del catéter fue suficiente para observar modificaciones en la histología del tejido vesical (Figura 17).

Presencia y localización bacteriana en la vejiga

Con el fin de evaluar la presencia y la localización de las bacterias en las vejigas de los animales infectados, se realizó inmunofluorescencia *in situ* de los cortes del tejido vesical. Primero se evaluaron las tinciones en cortes de tejidos de animales sin infectar con los tres fluoróforos (Figura 18).

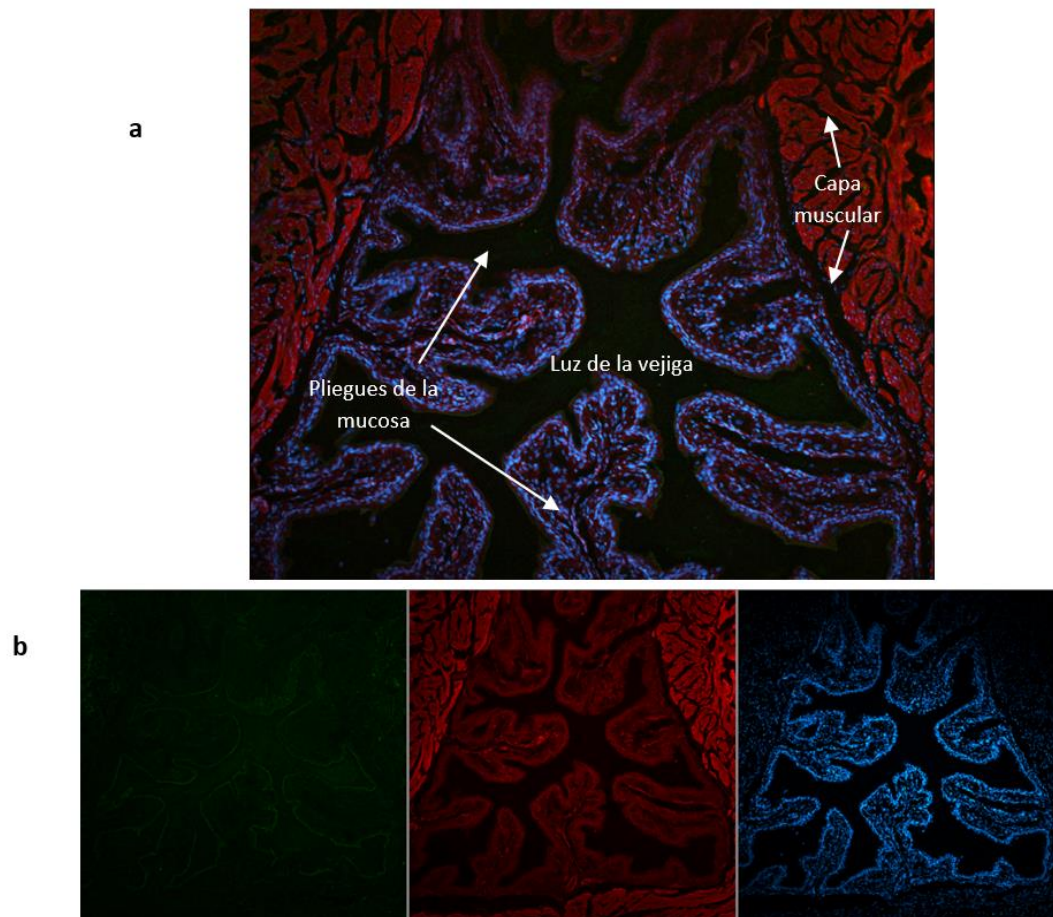


Figura 18- Imágenes representativas de fluorescencia de los cortes histológicos de animales sin infectar a un aumento de 10X. En la imagen (a) se observa el corte de tejido con la señal de los tres canales (FITC, rodamina-faloidina y Hoescht 33342) superpuestos. En la imagen (b) se observan las señales para cada canal de forma individual. Los núcleos de las células se ven en azul, la actina en rojo. Las bacterias se observarían en verde, en este caso se observa una señal de muy baja intensidad (inespecífica) por tratarse de animales sin infectar.

Los núcleos de las células eucariotas del tejido, y en algunos casos las bacterias presentes en el mismo, se observaron en color azul, utilizando el fluoróforo Hoescht 33342. El citoesqueleto de actina de las células fue marcado con rodamina-faloidina y se observó en color rojo. Las bacterias (específicamente las proteínas en la superficie de *P. mirabilis*) se observaron por el uso de dos anticuerpos. Un anticuerpo primario se unió a las proteínas de superficie y un anticuerpo secundario acoplado a FIT-C se unió al anticuerpo primario. La señal para las bacterias se observó en color verde. En algunos casos se observó fluorescencia inespecífica (de baja intensidad) para FIT-C. Este fenómeno es debido a que algunas estructuras en los tejidos de los animales como lo son el colágeno y la elastina (presentes en el tejido conectivo de las vejigas) presentan autofluorescencia con longitudes de onda de absorción-emisión similares al del fluoróforo FITC.

En el corte de tejido vesical de un animal sano se pudieron identificar varias estructuras que se detallaron en la figura 18a.

La localización bacteriana se evaluó en los cortes de las vejigas de los animales a los tres días de infección. En los cortes de las vejigas provenientes de animales infectados sin cateterización, para todas las cepas, pudo observarse una localización bacteriana en la luz de la vejiga y en contacto con el epitelio de transición (Figura 19).

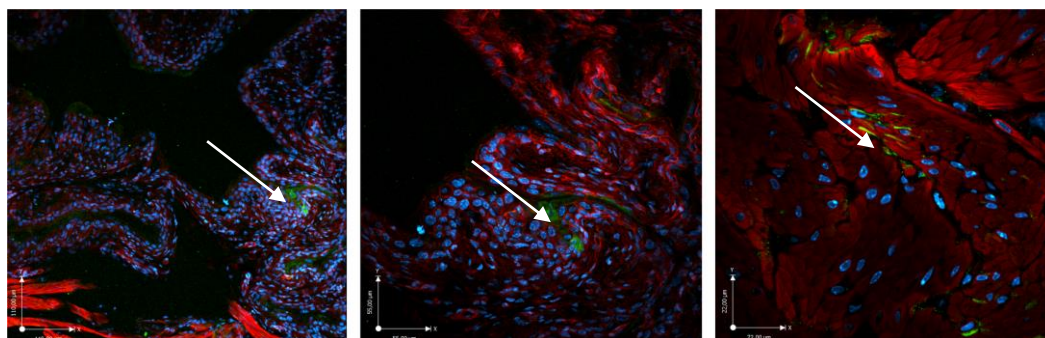


Figura 19- Imágenes representativas de los cortes de vejigas para animales infectados con las diferentes cepas en el modelo de ITU a los aumentos 20X, 40X y 100X. Las bacterias se observan en color verde, el ADN se observa en azul y la actina del tejido se observa en color rojo. Las flechas indican la presencia bacteriana.

Cuando evaluamos las imágenes de los cortes de las vejigas de los animales cateterizados (ITU-C) la cepa salvaje Pr2921 y las mutantes en LTDH-128 y MioC-119 mostraron una ubicación bacteriana similar al caso anterior. La cepa mutante en MioC-119 mostró la particularidad de agruparse en forma de *clusters* adheridos al epitelio y que protruyen hacia la luz de la vejiga. Las mutantes GRHPR-105 y DDC-109 presentaron células individuales localizadas en forma dispersa en contacto con el epitelio de transición mientras que la cepa mutante en tAEC-101 tuvo una localización generalizada en el epitelio y en la lámina propia (Figura 20).

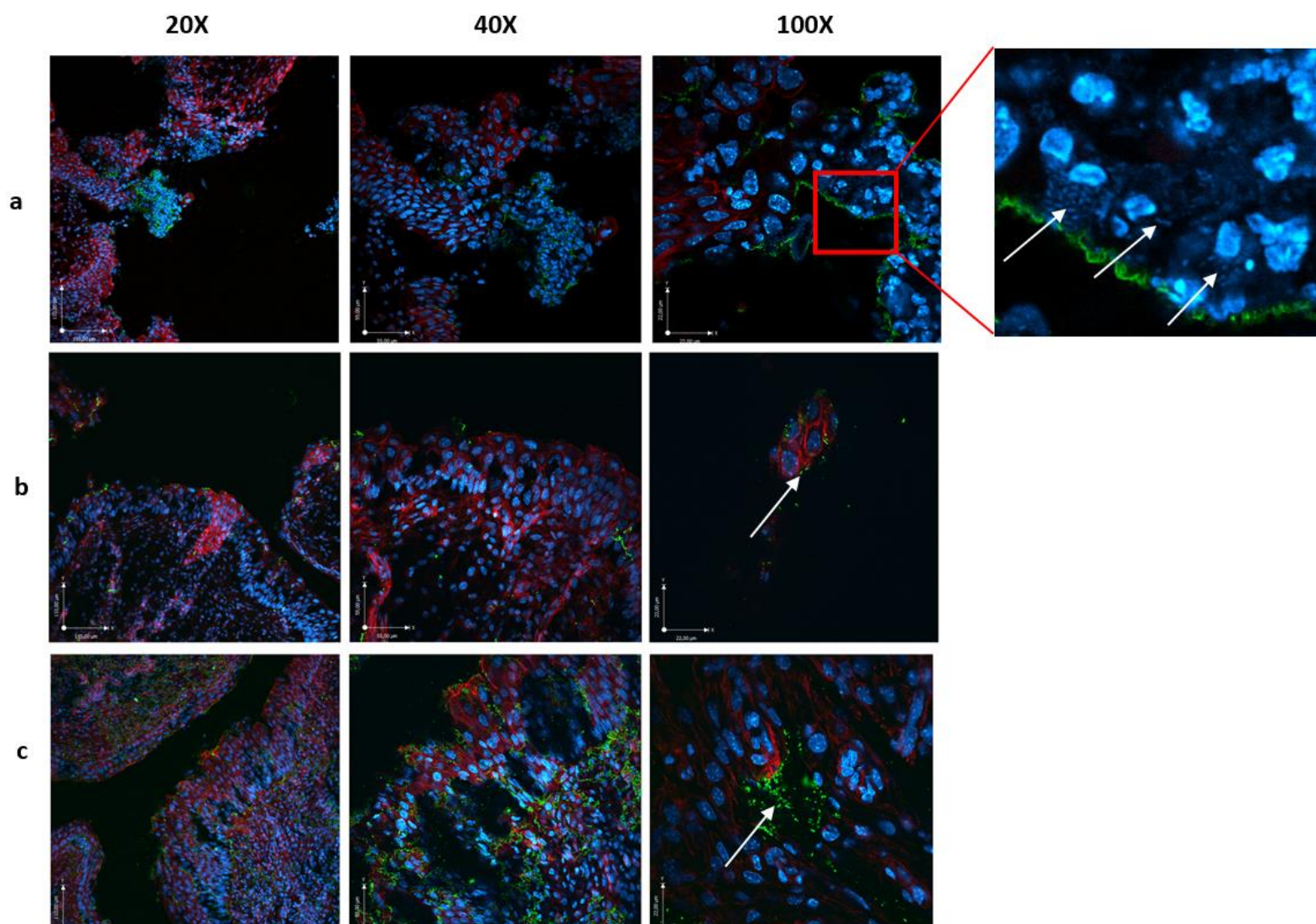


Figura 20- Panel de imágenes representativas de cortes de vejigas de animales infectados con las cepas mutantes (a-MioC-119, b- GRHPR-105 y c-RAEC-101 respectivamente) por el modelo ITU-C a los aumentos 20X, 40X y 100X. Las bacterias se observan en color verde, el ADN se observa en azul y la actina del tejido se observa en color rojo. En (a) se observa una localización bacteriana situada entre la luz vesical y en contacto con el epitelio de transición y se muestra a la derecha un zoom del aumento 100X, en (b) la localización se ubica en el epitelio de transición y en (c) se localizan en el epitelio y en la lámina propia. Las flechas indican la presencia bacteriana.

Capítulo 4- Formación y bioarquitectura de biofilms de *P. mirabilis* en el medio interno

Cámaras de difusión intraperitoneales y recuento bacteriano

Inicialmente se realizó el recuento de bacterias planctónicas de las cámaras, con el fin de evaluar la capacidad de crecimiento de las cepas mutantes bajo las condiciones del experimento *in vivo*. Los resultados mostraron que los recuentos correspondientes a todas las cepas bacterianas se ubicaron en el entorno de 10^8 UFC/mL al día 5, indicando que todas las cepas fueron capaces de crecer en el medio *in vivo*. Los recuentos bacterianos de las cepas mutantes no mostraron diferencias significativas con respecto a los de la cepa salvaje ($P > 0,05$) (Figura 21).

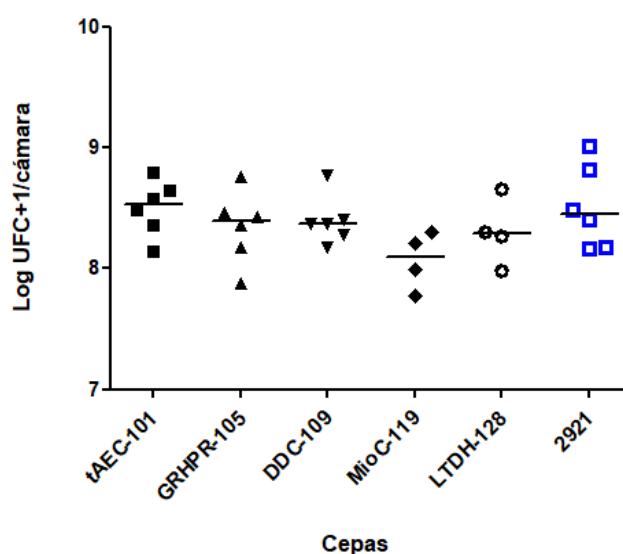


Figura 21- Gráfico de recuento bacteriano planctónico recuperado de las cámaras de difusión para las cepas mutantes y la cepa salvaje. Los símbolos representan los valores de recuento bacteriano de las cepas mientras las barras representan las medianas de los recuentos. ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney).

Inmunofluorescencia y obtención de imágenes de los biofilms por MLC

Las imágenes de los biofilms que fueron analizadas empleando MLC, mostraron señales consistentes para los marcadores FITC y Hoescht 33342 para todas las cepas mutantes y la cepa salvaje (Figura 22).

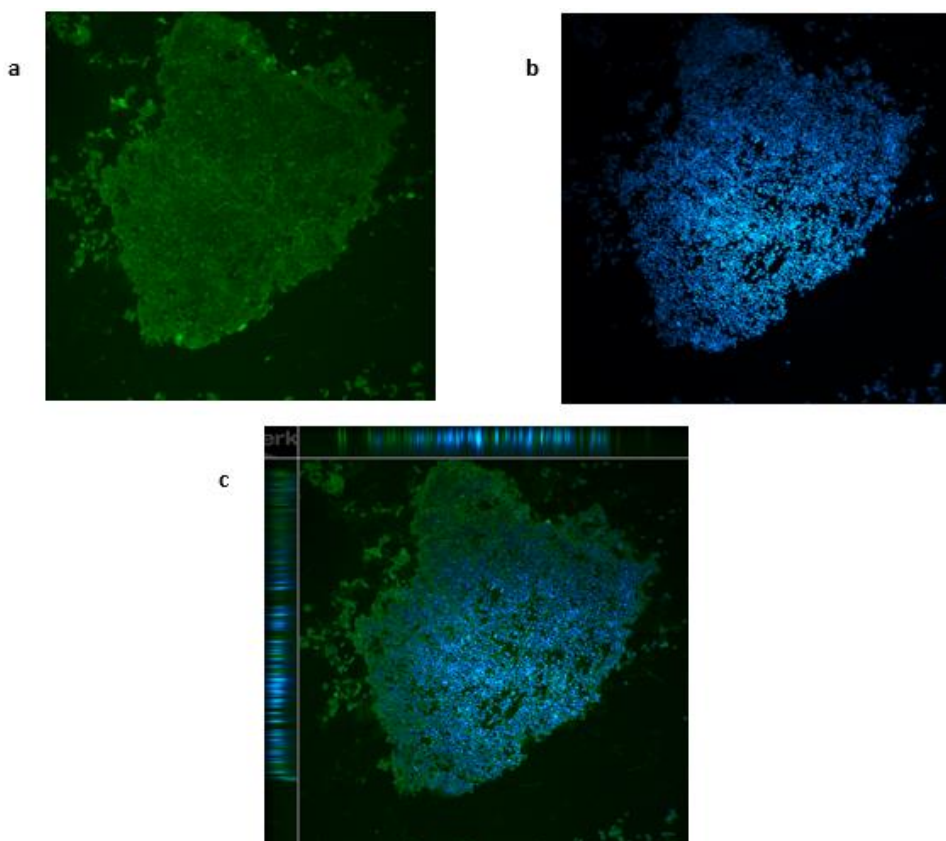


Figura 22- Imagen de un biofilm con 5 días de desarrollo para la cepa 2921 obtenida por MLC a un aumento 100X. En las imágenes superiores puede apreciarse la señal obtenida en el canal FITC (a) y Hoescht 33242 (b). En la imagen c se observa la superposición de los canales vistos en el eje xy (imagen frontal), xz (franja superior) y en el eje yz (franja izquierda).

Procesamiento de imágenes

Para cada cubreobjetos fueron seleccionados 3 a 5 campos al azar y se obtuvieron *stacks* de imágenes en el eje z con un *step size* de 0.3 μ m para cada cepa en estudio. Posteriormente se realizó el procesamiento de las imágenes que arrojó los resultados a continuación.

Deconvolución y segmentación

Se procedió de la misma forma para todos los *stacks* obtenidos en los canales para los fluoróforos Hoescht (en la tinción de ADN bacteriano) y FITC (en la tinción del material extracelular asociado). Las imágenes de los *stacks* para bacterias que se observaron (Figura 23-a) se deconvolucionaron empleando el software Huygens Professional (Figura 23-b) y luego se segmentaron de manera manual empleando diferentes filtros de la ventana *Segmentation method* en el programa Interactive Data Language (IDL versión 7.1) (Figura 23-c). En el ángulo inferior derecho de cada imagen se observan porciones de las mismas en zoom. En estas porciones se observaron cambios importantes en la restauración por deconvolución porque se pudo identificar de manera individual bacterias que previamente aparecían unidas en la imagen original. En la última porción en zoom se mostró el resultado final de la segmentación para las bacterias, aquí los objetos de interés se observaron en blanco (bacterias) (Figura 23). De estos objetos de interés (bacterias y material extracelular) se calcularon los parámetros morfotopológicos para número bacteriano y volumen bacteriano y luego los modelados de compactación y 3D fueron generados.

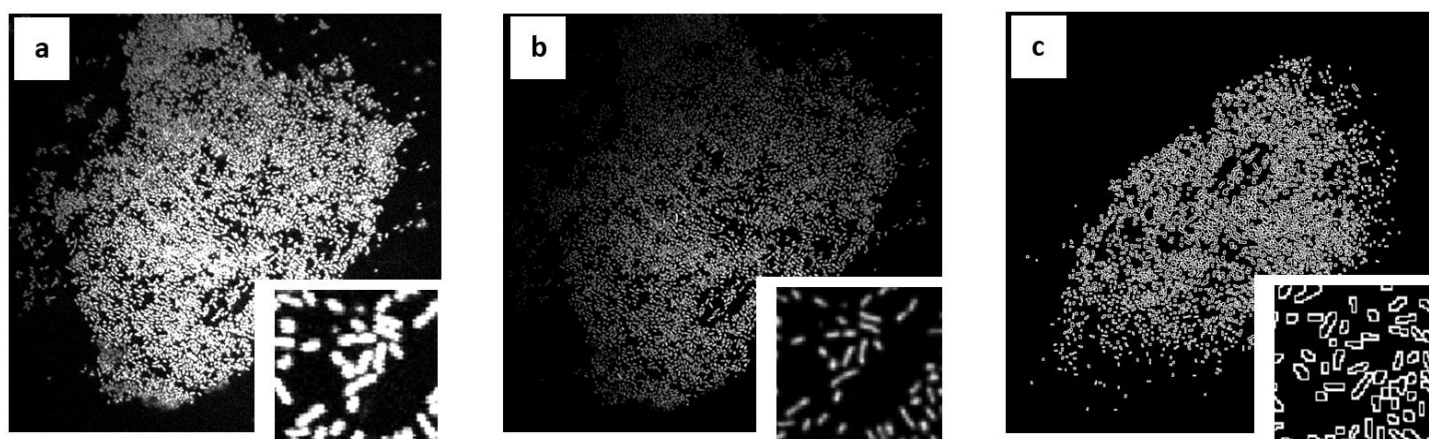


Figura 23- Procesamiento de una imagen desde su obtención por MLC hasta su segmentación. En a observamos la imagen obtenida del microscopio, en b la imagen obtenida luego del proceso de deconvolución y en c se observa la imagen segmentada que luego es modelada en 3D. Debajo de cada imagen se observa una porción de la misma con un zoom al 150%.

Comparación en la compactación del biofilm de Pr2921 entre los modelos *in vitro* e *in vivo*

El modelo de *lattice* hexagonal permite visualizar de forma rápida el grado de compactación de un biofilm. El trabajo publicado por Schlapp *et al.*, 2011 demostraba que en un modelo *in vitro* la dinámica en la formación de biofilms de *P. mirabilis* tenía su desarrollo máximo al día 5. Es por ello que utilizamos ese día para evaluar los biofilms de *P. mirabilis in vivo*. Para esta cepa, cuando comparamos los grados de compactación entre el modelo *in vitro* obtenido previamente por Schlapp y el modelo *in vivo* de este trabajo, se pudo constatar a un mismo tiempo de evaluación, la compactación del biofilm *in vivo* es similar a la compactación en el modelo *in vitro* (Figura 24).

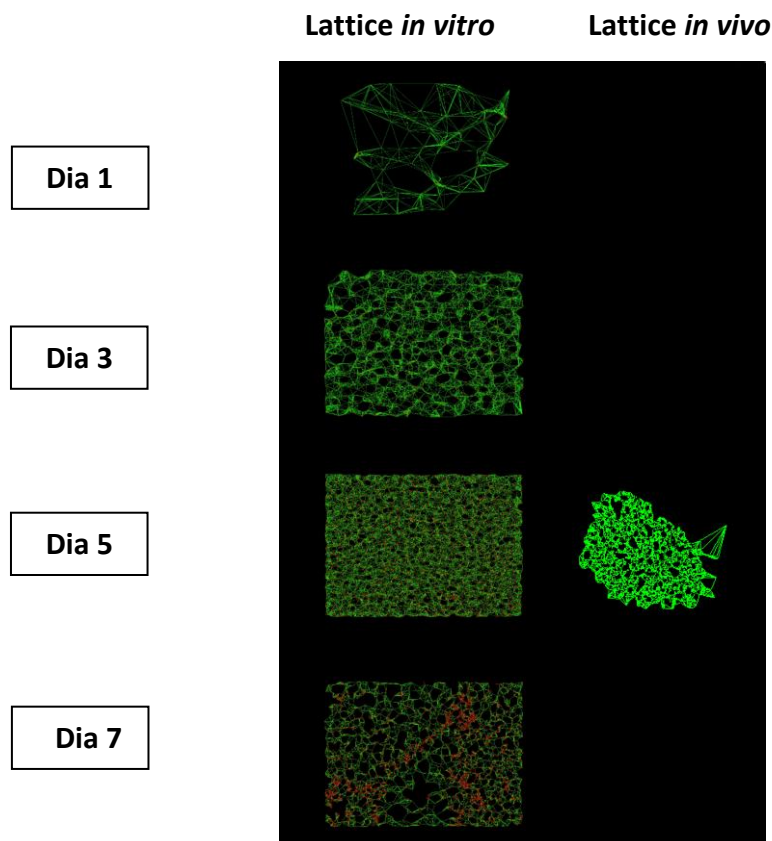


Figura 24- Modelos de *lattice* hexagonal para la cepa salvaje Pr2921 en el modelo *in vitro* a los días 1,3,5 y 7 y en el modelo *in vivo* al día 5.

Obtención de parámetros y generación de los modelos en 3D y de lattice

Parámetros morfotopológicos

A partir de los objetos de interés o máscaras binarias se generaron los modelos en 3D utilizando diversos elementos de la ventana ROI (*Region Of Interest*) del programa IDL 7.1. La obtención del modelado en 3D se acompañaba de archivos *RawData* con la información de los descriptores en 3D para número y volumen bacteriano y volumen de material extracelular.

El número bacteriano es la cantidad de bacterias en los *z-stacks*. Los resultados mostraron que la cepa mutante en DDC-109 presentó un número de bacterias significativamente mayor con respecto a la cepa salvaje ($P < 0,05$). La cepa mutante tAEC-101 presentó un número bacteriano mayor que la cepa Pr2921, aunque no fue significativo. Las cepas mutantes en GRHPR-105, MioC-119 y LTDH-128 presentaron números bacterianos similares a Pr2921 (Figura 25).

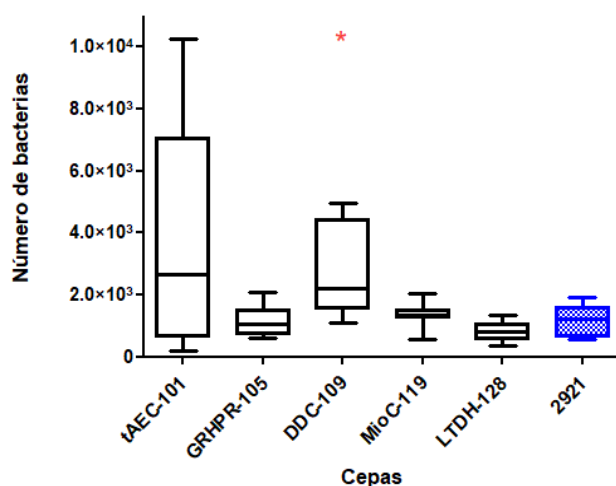


Figura 25 -Boxplot para el número bacteriano del biofilm formado para cada cepa evaluada luego de 5 días de incubación en las IPCs. Los boxes abarcan el intervalo entre los percentiles 25 y 75, las líneas centrales representan las medianas de los valores y las barras corresponden con los valores máximo y mínimo. Se utilizaron los datos de tres ensayos independientes. Las diferencias significativas son marcadas con asterisco ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney).

El volumen total de las bacterias, parámetro calculado a partir de los datos en los *z-stacks* en tres dimensiones, por la suma de todos los volúmenes individuales de las bacterias, mostró que La cepa mutante en MioC-119 exhibió un volumen bacteriano significativamente mayor que la cepa salvaje Pr2921 ($P < 0,05$). Las cepas mutantes en tAEC-101 y DDC-109 presentaron volúmenes bacterianos mayores frente al volumen bacteriano de la cepa salvaje, aunque estos no fueron significativos. Las cepas mutantes GRHPR-105 y LTDH-128 tuvieron volúmenes bacterianos similares al del control (Figura 26).

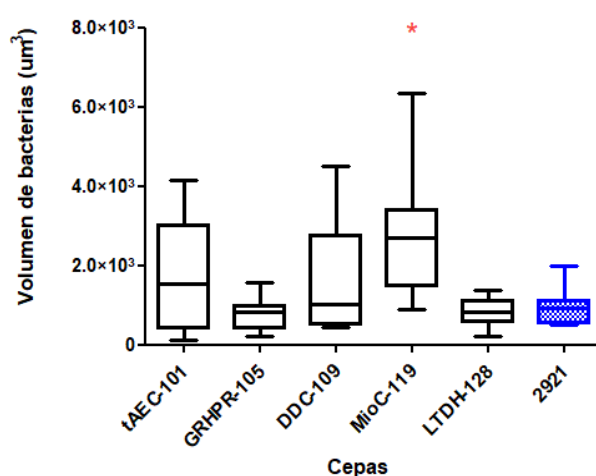


Figura 26- Boxplot para el volumen bacteriano medido en (μm^3) del biofilm formado para cada cepa evaluada luego de 5 días de incubación en las IPC. Los boxes abarcan el intervalo entre los percentiles 25 y 75, las líneas centrales representan las medianas de los valores y las barras corresponden con los valores máximo y mínimo. Se utilizaron los datos de tres ensayos independientes. Las diferencias significativas son marcadas con asterisco ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney).

Otro parámetro evaluado fue el volumen de material extracelular (VME). El VME fue calculado a partir de los datos en los *z-stacks* en tres dimensiones. La técnica empleada permite la cuantificación del material extracelular dado que se emplea un anticuerpo policlonal que es capaz de reconocer diversas estructuras bacterianas. Para calcular el VME total se procedió a realizar la suma de todos los VME de los *stacks*. Las cepas mutantes en GRHPR-105 y MioC-119 presentaron diferencias significativas respecto a la cepa Pr2921. En un caso (GRHPR-105)

tuvo un VME significativamente menor con respecto a la cepa salvaje, mientras que la cepa MioC-119 presentó un VME significativamente mayor que la cepa control ($P < 0,05$). Las restantes cepas mutantes no presentaron diferencias significativas con respecto a la cepa salvaje (Figura 27).

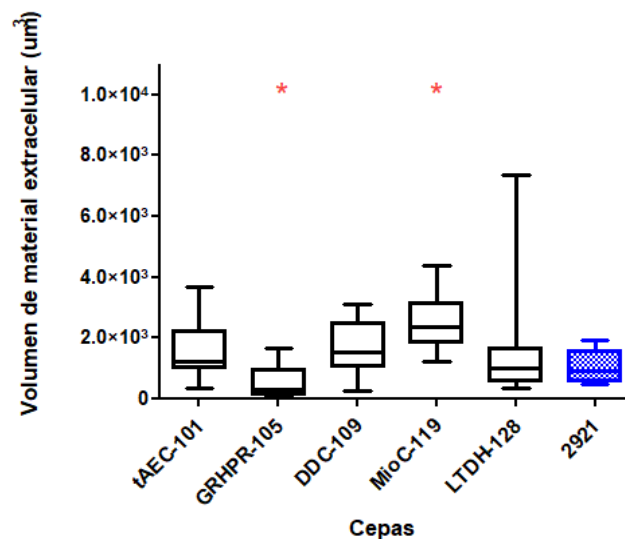


Figura 27- Boxplot para el volumen de material extracelular medido en (μm^3) del biofilm formado para cada cepa bacteriana luego de 5 días de incubación en las IPCs. Los boxes abarcan el intervalo entre los percentiles 25 y 75, las líneas centrales representan las medianas de los valores y las barras corresponden con los valores máximo y mínimo. Se utilizaron los datos de tres ensayos independientes. Las diferencias significativas son marcadas con asterisco ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney).

El último parámetro calculado fue el volumen del biofilm. El volumen del biofilm fue estimado como el resultante de la suma del volumen bacteriano y el volumen del material extracelular. El volumen del biofilm para la cepa mutante en MioC-119 fue significativamente mayor que el volumen del biofilm de Pr2921 ($P < 0,05$). Las cepas mutantes en tAEC-101 y DDC-109 tuvieron volúmenes de biofilm mayores frente al obtenido para la cepa salvaje, aunque estos no fueron significativos. Las cepas mutantes en GRHPR-105 y LTDH-128 presentaron volúmenes de biofilm similares respecto a Pr2921 (Figura 28).

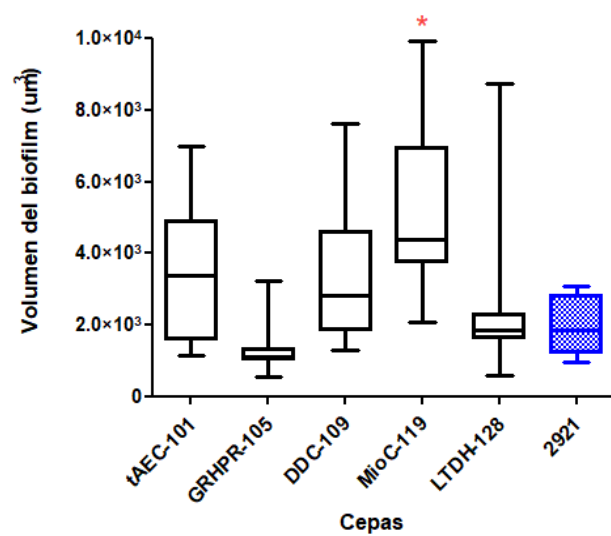


Figura 28- Boxplot para el volumen del biofilm en (μm^3) del biofilm formado para cada cepa bacteriana luego de 5 días de incubación en las IPCs. Los boxes abarcan el intervalo entre los percentiles 25 y 75, las líneas centrales representan las medianas de los valores y las barras corresponden con los valores máximo y mínimo. Se utilizaron los datos de tres ensayos independientes. Las diferencias significativas son marcadas con asterisco ($P < 0,05$ Test Mann-Whitney)

Generación de los modelos en 3D y de *lattice* hexagonal

A partir de las imágenes del microscopio confocal se procedió a la realización de la reconstrucción 3D de los biofilms para todas las cepas. Esta aproximación nos permitió modelar la bioarquitectura que adoptaba el biofilm adherido al cubreobjeto en la IPC (Figura 29).

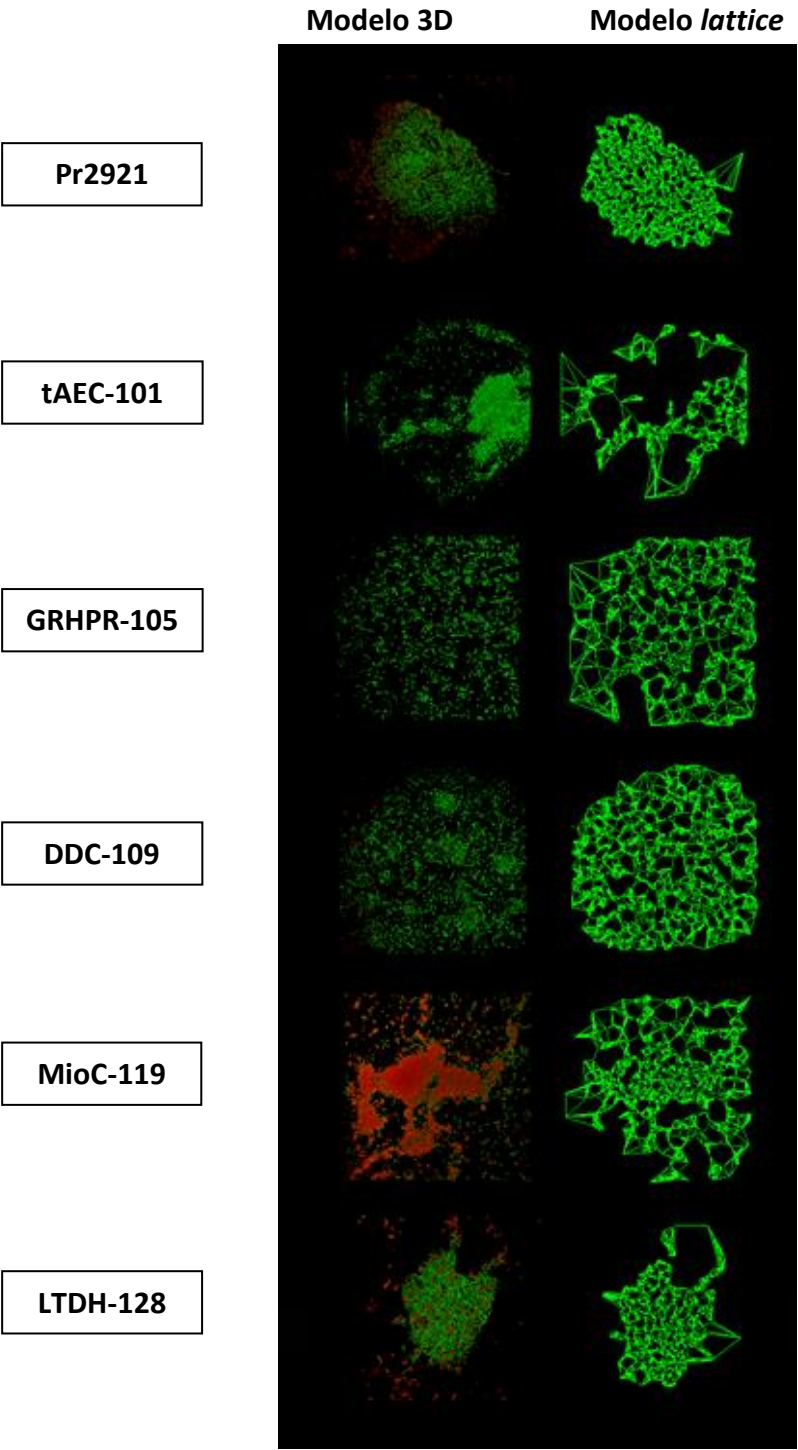


Figura 29- Modelados en 3D y 2D de lattice hexagonal para las cepas mutantes y la cepa salvaje Pr2921. Las imágenes de la izquierda se corresponden a los modelados 3D de los volúmenes de las bacterias y del material extracelular superpuestos (en verde se observan las bacterias y en rojo el material extracelular). Las imágenes de la derecha se corresponden con los modelos en 2D de lattice hexagonal de las cepas. Este modelo representa el grado de compactación del biofilm.

Las cepas mutantes en GRHPR-105 y DDC-109 presentaron una distribución uniforme del biofilm a lo largo de los ejes x e y, mientras que las cepas mutantes tAEC-101 y MioC-119 presentaron zonas con mayor concentración bacteriana y luego zonas con menor concentración de bacterias. La cepa mutante LTDH-128 y la cepa de referencia Pr2921 presentaron una distribución del biofilm concentrada en el área central de la imagen.

Los resultados para este modelado mostraron que todas las cepas mutantes formaron biofilms menos compactos que la cepa Pr2921.

Un resumen de los resultados obtenidos se muestra en la siguiente tabla:

							A 7 días		A 3 días				A 5 días					
Cepa mutante	Gen interrumpido	Función asociada	Formación de biofilm <i>in vitro</i>	Crecimiento en LB	<i>swimming</i>	<i>swarming</i>	ITU recuento (Riñones/Vejigas)		ITU-C recuento de orina	ITU-C Peso Vejigas	ITU-C score Vejigas	Presencia bacteriana	Localización bacteriana	IPC recuento planctónico	Número de bacterias	Volumen de bacterias	Volumen de material extracelular	Volumen del biofilm
tAEC-101	Transportador AEC	Transporte									2	Individual	Epitelio T. y lámina propia					
GRHPR-105	Glioxilato reductasa	Metabolismo									1	Individual	Epitelio T.					
DDC-109	D-alanil, D-alanina carboxipeptidasa	Estructural									1	Individual	Epitelio T.					
MioC-119	FMN proteína de unión MioC	Metabolismo									2	Agregados	Epitelio T. y luz vesical					
LTDH-128	L-treonina 3-deshidrogenasa	Metabolismo									2	Agregados	Epitelio T. y luz vesical					
				Prop. fenotípicas			Patogenicidad		Patogenicidad y formación de bofilm				Formación de biofilm <i>in vivo</i>					



- Valores disminuidos significativamente
- Valores aumentados significativamente
- Valores sin diferencias significativas

Discusión

Los biofilms son comunidades formadas por microorganismos adheridos de manera irreversible entre ellos y a un sustrato, embebidos en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia, que exhiben un fenotipo particular en relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes respecto a sus contrapartes planctónicas (Donlan & Costerton, 2002).

Los biofilms son relevantes en determinados contextos, en el ámbito médico y clínico se asocian con diversos tipos de infecciones crónicas, en particular causadas por implantes médicos (Davey & O'Toole, 2000; Donlan, 2002, Hall-Stoodley & Stoodley, 2009).

Entre los implantes médicos más comúnmente usados se ubican los catéteres urinarios (Darouiche, 2001). La relevancia clínica del uso de catéteres, se ha manifestado muy frecuentemente en pacientes que se encuentran bajo cateterización prolongada por el desarrollo de infecciones urinarias. Estas infecciones están asociadas a la formación de biofilms en la superficie de los dispositivos (Trautner & Darouiche, 2004).

P. mirabilis es el principal agente causal de las infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (Jacobsen *et al*, 2008), dando lugar a biofilms cristalinos que pueden obstruir el catéter y generar serias complicaciones como pielonefritis y septicemia (Stickler, 2008). Varios trabajos han descrito el desarrollo de un biofilm como un proceso secuencial compuesto por varias etapas en las cuales están implicados diversos factores bacterianos, incluyendo flagelos, adhesinas, exopolisacáridos, entre otros (Costerton *et al*, 2003; Davey & O'Toole, 2000; Schlapp *et al*, 2011; Scavone *et al*, 2016).

El objetivo de este trabajo fue dilucidar el papel de factores involucrados en la formación de biofilms de *P. mirabilis* en la virulencia, utilizando 3 aproximaciones *in vivo* diferentes (modelo de infección experimental ascendente en ratón, modelo de infección experimental asociada a

cateterización en ratón y el modelo de cámaras de difusión intraperitoneales en ratas).

La selección de las cepas mutantes utilizadas en este trabajo, respondió al objetivo de analizar el papel de atributos en la formación de biofilms que no se relacionaran con los factores de virulencia tradicionalmente descritos en *P. mirabilis*.

Para alcanzar este objetivo fueron empleadas una cepa salvaje de origen clínico de *P. mirabilis* (Pr2921) y cinco cepas mutantes en genes que codifican para un transportador secundario de la familia AEC (tAEC-101), glioxilato reductasa (GRHPR-105), D-alanil-D-alanina carboxipeptidasa (DDC-109), FMN- proteína de unión MioC (MioC-119) y L- treonina 3-deshidrogenasa (LTDH-128).

Movilidad de las distintas cepas mutantes de *P. mirabilis*

La movilidad en bacterias como *P. mirabilis* es mediada por flagelos peritricos de unos 15µm de longitud (Macnab, 1996; Graham *et al.*, 2005). En la biosíntesis de flagelos hay más de 40 genes involucrados que se expresan y regulan en un orden de jerarquías de tres niveles, que comienza con la acción del operón flagelar *flhDC* el cual activa una serie de genes que codifican para los diferentes factores necesarios en la síntesis de los flagelos (Morgenstein *et al.*, 2010; Graham *et al.*, 2005). La expresión del operon flagelar *flhDC* es regulada por una variedad de productos génicos (Morgenstein *et al.*, 2010) y algunos de ellos intervienen en varias rutas del metabolismo (Calvo & Matthews, 1994; Newman & Lin, 1995; Romeo *et al.*, 1993). La movilidad *swarming* es un comportamiento multicelular durante la migración a través de una superficie sólida y requiere la diferenciación desde una célula planctónica (*swimmer*) a una célula *swarmer* (Belas, 1992). Para la iniciación del *swarming* se requiere que las bacterias entren en contacto con una superficie y que haya cambios en la composición del lipopolisacárido de la pared (Belas & Suvanasuthi, 2005; Cusick *et al.*, 2012), eventos que están vinculados con la actividad del operón flagelar (Belas & Suvanasuthi, 2005; Cusick *et al.*, 2012). Varios autores han observado en *P. mirabilis* una relación entre la movilidad

swarming y el metabolismo bacteriano, (Alteri *et al.*, 2012; Himpf *et al.*, 2008; Falkinham & Hoffman 1984) así como también puede verse afectada por otros factores (Burall *et al.*, 2004).

Burall y colaboradores en el año 2004 trabajando con cepas mutantes de *P. mirabilis* mostraron que factores diversos como proteínas hipotéticas, sistema de dos componentes/sensor quinasa, transferasa de la fosfopanteteína (que forma parte de la estructura de la CoA), proteínas de intercambio aniónico y sintetasa de peptidoglicano poseían movilidad *swarming* aberrante o defectuosa, mostrando que la movilidad es un fenómeno muy complejo (Burall *et al.*, 2004). Posteriormente otro trabajo publicado por Holling y colaboradores mostró también que diversos factores como el Nitrito reductasa, una subunidad fimbrial, una proteína de membrana hipotética, una bomba de eflujo del tipo MSF y una lipoproteína hipotética, eran importantes para la movilidad *swimming* y *swarming* (Holling *et al.*, 2014). En este trabajo los resultados de movilidad mostraron una concordancia con la bibliografía consultada, porque las proteínas evaluadas ya sean pertenecientes a una ruta del metabolismo, asociadas a la síntesis de PG o bombas de eflujo son factores diversos y las cepas bacterianas mutantes en esos factores presentaron movilidad afectada tanto en la movilidad *swimming* como *swarming*. Ahora bien, podría pensarse que las cepas mutantes para los factores evaluados en este trabajo son defectivas en la formación de biofilms *in vitro* porque tienen afectada la movilidad por la ausencia de flagelos. Sin embargo, todas las cepas mutantes presentaron un grado de movilidad *swimming* (recordando que es una movilidad típica de células planctónicas y dependiente de flagelos). Por otra parte, algunos autores han relacionado la movilidad *swarming* con la virulencia en el tracto urinario (Allison *et al.*, 1994; Mobley *et al.*, 1996), mientras que dos trabajos en nuestro laboratorio demostraban que los flagelos no son necesarios para establecer infección (Legnani-Fajardo, 1996; Zunino *et al.*, 1994).

En resumen, en este capítulo se pudo observar que todas las cepas mutantes evaluadas vieron afectada su movilidad tanto *swimming* como *swarming*, mostrando que las proteínas evaluadas tendrían relación con la movilidad, y

que además la misma es un fenómeno complejo y multifactorial. Ya que la movilidad y la virulencia son factores independientes, en el siguiente capítulo se evaluó el rol de estas proteínas de *P. mirabilis* en la capacidad de infectar el tracto urinario.

Patogenicidad de *P. mirabilis* en el tracto urinario

Las estrategias propuestas tradicionalmente en la patogénesis de *P. mirabilis* incluyen adherencia, movilidad, producción de toxinas y evasión del sistema inmune del hospedero. Sin embargo, diversos autores han propuesto redefinir estos conceptos. Según Nielubowicz & Mobley, un factor de virulencia además de ser una proteína o estructura macromolecular que contribuya en la habilidad de un patógeno para generar enfermedad en el hospedero, puede ser un atributo que no siendo necesario para la virulencia propiamente dicha ofrezca una ventaja competitiva durante una ITU (Nielubowicz & Mobley, 2010).

Los sistemas de transporte de membrana, como las bombas de eflujo del tipo AEC pertenecen a la familia de las MSF (del inglés *major facilitator superfamily*) que son la familia más grande de transportadores secundarios. Existe evidencia de que las bombas de eflujo tienen funciones fisiológicas en situaciones de estrés, en la virulencia y patogénesis bacteriana (Sun *et al.*, 2014). Buckley y colaboradores asociaron el rol de las bombas de eflujo en la virulencia de *Salmonella typhimurium*, evaluando cepas defectivas para dos bombas de eflujo en un modelo en pollos. Los resultados de ese trabajo mostraron que las mutantes en las bombas de eflujo *acrB/tolC* colonizaban poco y no persistían en el tracto intestinal del ave (Buckley *et al.*, 2006). En otro modelo de *S. typhimurium*, Nishino y colaboradores utilizaron una cepa que carecía de los genes *macAB*, que codificaban para una bomba de eflujo, en un modelo de infección murino y observaron que esa cepa mostraba una disminución significativa en la virulencia. También evaluaron una cepa de *S. typhimurium* que carecía de todas las bombas de eflujo asociadas a antimicrobianos y observaron que no era virulenta (Nishino *et al.*, 2006). Holling y colaboradores trabajando con *P. mirabilis* en un modelo *in vitro*, mostraron que una cepa

mutante en una bomba de eflujo (NHBFF9) produjo biofilms cristalinos más pequeños que los formados una cepa salvaje (Holling *et al.*, 2014). Dicho trabajo al igual que el propuesto por Matsumura *et al.*, 2011 para *E. coli*, evidenciaron que los sistemas de eflujo contribuyen en la formación de biofilms (Holling *et al.*, 2014; Matsumura *et al.*, 2011). Los resultados obtenidos en este trabajo muestran concordancia con la literatura, ya que la cepa mutante en t-AEC tuvo una colonización menor que la cepa salvaje, mostrando que estos factores son importantes para la patogénesis de *P. mirabilis*.

Varios autores han reportado una relación entre el metabolismo bacteriano y la patogénesis en el TU. Burall y colaboradores en el año 2004 utilizaron el modelo de mutagénesis al azar STM (*del inglés signature-tagged mutagénesis*) en *P. mirabilis* HI4320 en conjunto con el modelo de ITU en ratón para encontrar factores determinantes en la virulencia del tracto urinario. El trabajo de estos investigadores mostró que además de la ureasa, flagelos y fimbrias junto con otros factores de virulencia ya conocidos, se encontraban proteínas clave del metabolismo (por ejemplo, los sistemas de transporte de fosfato inorgánico) que fueron relevantes en la infección del tracto urinario (Burall *et al.*, 2004). Otro trabajo de Alteri y colaboradores en el año 2015 comenzó a focalizar a la fisiología de las bacterias en roles esenciales para la patogénesis. Ellos mostraron que *E. coli* modulaba su actividad respiratoria y limitaba o revertía el potencial de membrana como una medida protectora contra las defensas del hospedero durante una ITU. Mostraron un vínculo entre la obtención de energía y la patogénesis y sugirieron que el metabolismo energético podría ser una señal importante utilizada por los patógenos bacterianos para identificar microambientes específicos del hospedero. Estos autores encontraron también que *E. coli* requería las vías metabólicas del ciclo de ácidos tricarboxílicos (TCA) y de la gluconeogénesis intacta para establecer infección del tracto urinario (Alteri *et al.*, 2015). En ese mismo año el grupo de Alteri publicó otro artículo sobre el uso de las vías del metabolismo central en una ITU *in vivo* para *E. coli* y *P. mirabilis*. Allí determinaron que *P. mirabilis* necesitaba las rutas de la glucólisis, de la fase oxidativa de las pentosas fosfato y la vía de Entner-Doudorof intactas para establecer una ITU (Alteri *et al.*,

2015). Los resultados de esas publicaciones sustentan lo observado en el presente trabajo, donde las enzimas GRHPR, MioC y LTDH participan en la colonización por *P. mirabilis* en el TU.

Con respecto a la D-alanil D-alanina carboxipeptidasa (DDC) se conoce que la expresión aumentada de esta enzima en *Vibrio parahaemolyticus*, daba como resultado células con paredes laxas, aunque esta condición mantenía viabilidad de las células. (Hung *et al*, 2017). En el presente trabajo hemos visto que la cepa mutante en esta proteína tiene poca capacidad de infectar el TU y además tiene movilidad *swimming* y *swarming* afectada. En un trabajo previo en nuestro laboratorio se observó que la cepa mutante de *P. mirabilis* en DDC tenía una capacidad disminuída para migrar sobre la superficie de catéteres (Caetano, 2014), siendo la migración un movimiento dependiente de los flagelos (Pratt & Kolter, 1998; Jacobsen *et al*, 2008). Como se ha mencionado en el capítulo anterior, algunos autores han relacionado la movilidad *swarming* con la capacidad de colonizar el tracto urinario (Allison *et al*, 1994; Mobley *et al*, 1996), sin embargo, un trabajo previo en nuestro laboratorio trabajando con una cepa de *P. mirabilis* carente de flagelos demostró que esa cepa era igual de virulenta que una cepa salvaje en un modelo de ITU. Esos resultados mostraron que los flagelos no son necesarios para establecer una ITU (Legnani-Fajardo, 1996; Zunino *et al*, 1994). La información previa, junto con nuestros resultados nos muestran una relación entre la proteína DDC y la patogenicidad, porque si se afecta esta enzima disminuye la movilidad *in vitro* y disminuye la capacidad de infectar el tracto urinario *in vivo*.

En este capítulo se observó que todas las cepas mutantes fueron defectivas en la colonización del tracto urinario. Se puede afirmar que proteínas del metabolismo básico, de eliminación de sustancias tóxicas y otra proteína involucrada en la síntesis de PG tienen un rol en la infección del TU, mostrando su relevancia en la patogénesis de *P. mirabilis*.

Patogenicidad y formación de biofilms de *P. mirabilis* en el tracto urinario cateterizado

Las infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres por *P. mirabilis* pueden causar varias complicaciones como la formación de biofilms cristalinos por la actividad ureasa, la formación de cálculos urinarios, el desarrollo de pielonefritis y septicemia (Schaffer & Pearson, 2015; Stickler, 2008; Coker *et al.*, 2000).

Las vejigas de los animales infectados con las diferentes cepas fueron pesadas luego de extraídas, con el fin de evaluar una posible asociación entre la infección bacteriana y procesos patológicos como la inflamación del órgano infectado en las condiciones ITU e ITU-C. Este parámetro podría ser relevante, porque en el transcurso de una infección algunas estructuras bacterianas desencadenan una respuesta inmunológica por parte del hospedero. En esa respuesta se secretan citoquinas que inducen la inflamación y se reclutan células inflamatorias (como los polimorfonucleares) al sitio de infección, aumentando el número de células en el órgano y por lo tanto el peso del mismo. Un trabajo de Ambruster y colaboradores trabajando con *P. mirabilis* y adaptando un modelo murino de ITU-C para evaluar la patogenicidad de este microorganismo, constató que el mantenimiento del segmento del catéter en la vejiga incrementaba dramáticamente la inflamación y la severidad de la infección (Ambruster *et al.*, 2017). Para las cepas mutantes MioC-119, LTDH-128 y la cepa salvaje, observamos una tendencia en el incremento del peso de las vejigas cuando hubo cateterización, sin embargo, analizando el grupo total de cepas no encontramos una relación clara entre el peso de las vejigas y la ITU-C. En el caso de la cepa mutante DDC-109, el incremento en el peso de las vejigas cuando hubo cateterización fue menor que para las cepas mutantes anteriores y fue significativamente menor frente a la cepa salvaje. Los resultados obtenidos en esta sección mostraron que la proteína DDC (que interviene en la conformación del peptidoglicano), puede tener un papel en la ITU-C, porque al contrario de lo observado por Ambruster *et al.*, 2017, no pudo observarse un aumento en el peso del órgano como una medida indirecta de inflamación asociada a la infección.

Las diferentes cepas bacterianas, también fueron evaluadas de acuerdo a los recuentos bacterianos recuperados de la orina de los animales y a su localización en la vejiga. Schaffer y colaboradores evaluando la infección por *P. mirabilis* en un modelo de ITU *in vivo*, mostraron la colonización bacteriana a lo largo del tiempo, en un período de 24 horas. Ellos constataron que entre las 6 y las 24 horas *post* infección, los recuentos bacterianos en orina crecían significativamente mientras que los recuentos bacterianos del órgano no aumentaron. *P. mirabilis* invadía rápidamente el epitelio de la vejiga al comienzo de una infección, y luego esa capacidad decrecía. Este grupo de investigadores consideraron que esos resultados, así como lo habían observado en UPEC (*E. coli* uropatógena), podían deberse a que las células del epitelio expulsaban a las bacterias desde el tejido hacia la luz de la vejiga, (Schaffer *et al.*, 2016). En este capítulo, para todas las cepas mutantes pudieron recuperarse recuentos bacterianos de la orina, mostrando que la infección bacteriana fue persistente al día de la toma de la muestra (día 3 *post* infección). Estas observaciones concuerdan con los recuentos bacterianos recuperados de la orina, porque las bacterias situadas en las capas más externas del tejido vesical son más propensas a ser eliminadas por arrastre junto con el flujo de la orina, o por la descamación de las células epiteliales de la vejiga, permitiendo recuperarlas. Varios autores han descrito la localización bacteriana de *P. mirabilis* en vejigas murinas durante una ITU mostrando que pueden formarse grandes grupos o *clusters* de bacterias adheridas a la superficie del lumen de la vejiga o que puede encontrarse de manera individual en el tejido. Los *clusters* en *P. mirabilis* resultan de la conjunción de las bacterias y de la deposición mineral (apatita y estruvita) ocasionada por la actividad de la ureasa en presencia de la orina. La formación de estos agregados son parte de la formación de los biofilms cristalinos y de la formación de las piedras urinarias (urolitiasis) (Schaffer *et al.*, 2016; Ambruster *et al.*, 2018). Se conoce que las bacterias defectivas en la fimbria MR/P o en la actividad ureasa pueden colonizar áreas exfoliadas donde el tejido conectivo y la lámina propia fueran expuestas (Jansen *et al.*, 2004; Ambruster *et al.*, 2018). Los resultados de este trabajo mostraron que algunas cepas de *P. mirabilis* se localizaron

individualmente en el tejido (las cepas mutantes en GRHPR-105, LTDH-128 y DDC-109) y no estaban formando agregados, mostrando que estas proteínas podrían intervenir en la formación de los biofilms cristalinos en la vejiga.

Ya se ha descrito que la cateterización es un proceso que genera daño al epitelio y exfoliación, edema, producción de citoquinas proinflamatorias (como la IL-6) y el reclutamiento de células del sistema inmune derivadas del linaje mieloide (Guiton *et al*, 2012). El efecto de las cepas mutantes en la generación de daño histológico durante una ITU-C fue evaluado a través del criterio establecido por Alamuri y colaboradores (Alamuri *et al*, 2009). Las primeras células en llegar al sitio de una infección son los neutrófilos. Los neutrófilos poseen tres estrategias para defender al organismo de las infecciones bacterianas: fagocitosis, degranulación y formación de trampas extracelulares (NETs, del inglés *neutrophil extracellular traps*). Mientras ellos actúan, varias moléculas son liberadas al espacio extracelular reconocidas como patrones moleculares asociados al daño o DAMPS (del inglés *Damage Associated Molecular Patterns*) generando una respuesta inflamatoria (Chen *et al*, 2018) acompañada de destrucción del tejido. También ha sido reportado por varios autores que en un modelo de ITU-C, los catéteres sirven como sustrato para la formación de autoagregados o *clusters* bacterianos, facilitando el desarrollo de la población bacteriana (Guiton *et al*, 2013; Murphy *et al*, 2013; Ambruster *et al*, 2017). Al evaluar el modelo ITU-C en este trabajo, observamos que todas las cepas bacterianas generaron daño vesical y que la inserción del catéter en animales sanos también indujo daño del tejido vesical, coincidiendo con las observaciones hechas por los otros autores.

Los resultados obtenidos en esta sección hacen suponer que la GRHPR y D-alanil D-alanina carboxipeptidasa revistan un interés especial en la formación de biofilms y la infección asociada a catéteres. La mutante GRHPR-105 mostró que es una cepa defectiva en la patogénesis del TU, porque en una infección los recuentos de los órganos, así como los de orina fueron significativamente menores en comparación con la cepa salvaje. La infección con esta cepa en la vejiga no mostró una respuesta por parte del hospedero, porque no fueron

evidenciados cambios en los pesos de las vejigas infectadas (por una inflamación) ni se observaron cambios histológicos del tejido asociados a la infección. Además, en las vejigas de los animales infectados con esta cepa, las bacterias observadas no estaban formando *clusters*, mostrando, una posible relación de la proteína GRHPR en la formación de biofilms *in vivo*. La cepa mutante en DDC-109 mostró ser defectiva en la infección del TU porque tuvo una disminución en los valores de recuento bacteriano en vejigas y riñones frente a la cepa salvaje. Esta cepa, al igual que la mutante GRHPR-105, mostró que no hubo una respuesta asociada a la presencia de la bacteria con respecto al aumento del peso de las vejigas, al grado de daño observado y que también podría ser defectiva en la formación de biofilms *in vivo*, porque no se encontraron *clusters* bacterianos en la vejiga.

Bioarquitectura de biofilms de *P. mirabilis in vivo*

Las cámaras de difusión intraperitoneales (ó IPC) en ratas se han utilizado para estudiar aspectos de la biología bacteriana en condiciones *in vivo*, con la posibilidad de recuperar todas las células dentro de las mismas y analizarlas por diversas técnicas. Este modelo ha sido utilizado previamente en nuestro laboratorio para estudiar la expresión *in vivo* de factores de virulencia de *P. mirabilis*, así como su tasa de multiplicación y diferenciación celular (Zunino *et al.*, 1999). Además, ha sido utilizado para evaluar la expresión de proteínas de membrana externa, así como para caracterizar el papel de sistemas de adquisición de hierro de *P. mirabilis* (D'Alessandro *et al.*, 2011).

En este modelo las cepas mutantes y la cepa salvaje fueron primeramente evaluadas en su capacidad de crecimiento en las IPC. Un trabajo publicado por Zunino y colaboradores en el año 1999 evaluando los patrones de crecimiento de *P. mirabilis* Pr990 en este modelo determinaron que la cepa bacteriana pudo sobrevivir y crecer bien bajo las condiciones experimentales (Zunino *et al.*, 1999). En este trabajo observamos que todas las cepas mutantes crecieron en niveles similares entre ellas y con relación a la cepa salvaje, llegando a valores de recuento similares a los de un cultivo *in vitro*, así como lo describieron Zunino *et al.* (1999). Estos resultados mostraron que la formación de biofilm

sobre el vidrio dentro de las IPC no estuvo condicionada por una capacidad de crecimiento afectada de las cepas mutantes.

Los análisis de las imágenes obtenidas de los biofilms por MLC para Pr2921 fueron evaluados previamente *in vitro* en nuestro laboratorio (Schlapp *et al.*, 2011). Los descriptores asociados con la formación de biofilms fueron determinados a partir de imágenes obtenidas por MLC de los biofilms adheridos. Los *stacks* de las imágenes fueron deconvolucionados y segmentados de manera manual. Se ha descrito que el proceso de segmentación es crítico en el estudio de la estructura 3D de los biofilms ya que tiene una gran influencia sobre los análisis posteriores (Yerly *et al.*, 2007). En el trabajo de Schlapp *et al.*, 2011, pudo establecerse que al día 1 se daba la adhesión reversible de las bacterias al sustrato, luego al día 2 se desarrollaba la adhesión irreversible y el comienzo de la producción de EPS. Al tercer día se constituían las microcolonias. Luego, el biofilm maduraba hasta alcanzar su máximo al día 5 y al día 7 el biofilm se dispersaba. A través del modelo de lattice hexagonal en dicho trabajo, se corroboró el desarrollo del biofilm de acuerdo a la compactación del mismo. El modelo mostraba un aumento en el grado de compactación del biofilm hasta su máximo al día 5 y transcurrido dicho día el modelo mostraba que la compactación disminuía. En este trabajo las cepas mutantes fueron evaluadas a los 5 días, en base a la dinámica de la formación de biofilms de *P. mirabilis* descrita por Schlapp *et al.*, 2011. Pudimos observar que todas las cepas mutantes pudieron formar biofilms *in vivo* independientemente de la categorización previa, que fue evaluada por el método de Cristal Violeta (Cepas mutantes de baja formación de biofilms, tAEC-101, GRHPR-105, DDC-109 y MioC-119 o de alta formación de biofilms como la cepa LTDH-128) (Pratt & Kolter, 1998). Este resultado nos muestra que en la formación de un biofilm el factor ambiental es condicionante, porque se observaron resultados distintos en un modelo *in vitro* frente a un modelo *in vivo*, así como lo han visto Jones y colaboradores evaluando biofilms de *P. mirabilis* en dos medios de cultivos diferentes, LB y orina artificial. Mientras que los biofilms formados en medio LB crecían con arquitecturas tipo “hongo”, en

orina artificial los biofilms formados eran planos y casi sin canales para el flujo de los nutrientes (Jones *et al*, 2007).

La mutante en GRHPR-105 produjo poca matriz con respecto a la cepa salvaje. La matriz extracelular es característica de un biofilm microbiano (Dunne, 2002), por lo cual un biofilm no existe sin el desarrollo de una matriz extracelular que lo soporte y proteja. El exopolisacárido (EPS) es el mayor constituyente de la matriz extracelular. Varios EPS son homopolisacáridos generados a partir de fructosa, sacarosa derivada de glucosa y celulosa (Flemming & Wingender, 2010). GRHPR está involucrada en la generación de un precursor en la síntesis de glucosa (Lassalle *et al*, 2016, Hubenova *et al*, 2017). Si bien los precursores en la gluconeogénesis son varios, observamos que cuando el gen que codifica para GRHPR está interrumpido hay poca matriz extracelular y este resultado refuerza lo que observamos en el modelo de cateterización demostrando, que la GRHPR es importante en la formación de biofilms *in vivo*.

El mantenimiento (o estabilidad) y la arquitectura de un biofilm dependen de la matriz extracelular (Flemming & Wingender, 2010), y para la cepa mutante en MioC-119 la matriz presentó valores alterados respecto a la cepa salvaje. Un trabajo previo en nuestro laboratorio sobre la dinámica en la formación de biofilm de cepas mutantes en genes de adhesión, captación de hierro y transporte *in vitro*, mostró que los biofilms eran menos estables en el tiempo y con una arquitectura diferente que el formado por la cepa salvaje Pr2921 (Iribarnegaray 2017). Otro trabajo publicado por nuestro equipo reveló que cuatro fimbrias de *P. mirabilis* (MR/P, UCA, ATF y PMF) eran claves en la formación de biofilms *in vitro* y al trabajar con cepas mutantes de esas fimbrias los biofilms formados fueron más pequeños (para las mutantes en MR/P y ATF) o más grandes (para las mutantes en UCA y PMF) que el formado por la cepa salvaje, mostrando además que habían diferencias en la bioarquitectura de los biofilms resultantes (Scavone *et al*, 2016). Considerando la información previa, podríamos suponer que la proteína MioC podría tener un rol en la arquitectura en la formación de biofilms. No podemos hipotetizar un rol de MioC en la dinámica de la formación de biofilms porque en este trabajo los parámetros

asociados con la formación de biofilms se tomaron en un solo momento y no en un período de tiempo.

La cepa mutante en D-alanil D-alanina carboxipeptidasa presentó el número de bacterias aumentado en comparación con la cepa salvaje. En la formación de un biofilm la producción de matriz extracelular es un factor condicionante, porque sin matriz no podemos hablar de un biofilm, sin embargo, el número de bacterias presentes en el biofilm puede ser variable. Entonces, esta proteína no mostró una relevancia en la formación del biofilm.

Las otras cepas mutantes evaluadas no mostraron diferencias en la formación de biofilms *in vivo* con respecto a la cepa salvaje.

Dado que la formación y el mantenimiento de los biofilms depende de la producción y de la cantidad de la matriz extracelular (Flemming & Wingender, 2010) las cepas mutantes que presentaron alteraciones en la formación de esta matriz son de mayor interés. Por lo tanto, podemos decir que las proteínas GRHPR y MioC muestran un rol en la formación de biofilms *in vivo*.

Conclusiones

En el contexto médico y clínico, los biofilms son relevantes porque causan infecciones asociadas a los implantes médicos como los catéteres urinarios. La hipótesis de este trabajo establece que diversos factores bacterianos están involucrados en la formación de biofilms de *P. mirabilis* uropatogénico, los cuales además tienen relevancia en la infección del tracto urinario en modelos *in vivo*.

El análisis global de nuestros resultados, nos permiten concluir que factores con funciones implicadas en diferentes vías del metabolismo, en la síntesis de peptidoglicano y en la eliminación de sustancias tóxicas para las células tienen un rol en la patogenia de *P. mirabilis in vivo*.

La Glioxilato reductasa/hidroxipiruvato reductasa y MioC son importantes para la formación de biofilms de *P. mirabilis in vivo*.

Perspectivas

Dado que la evaluación en la formación de biofilms a lo largo del tiempo determina la dinámica y estabilidad que adopta el mismo, se propone evaluar las cepas mutantes para GRHPR y MioC a lo largo de 7 días como se ha descrito para la cepa salvaje Pr2921.

Por otro lado, se puede evaluar de una forma global el desarrollo del biofilm de *P. mirabilis* a través de la comparación de transcriptomas de células planctónicas y células formando biofilms por ARNseq.

Referencias

Adal, K.A. & Farr, B.M. (1996). Central venous catheter-related infections: a review. *Nutrition* 12:208-13.

Alamuri, P.; Eaton, K.A.; Himpsl, S.D.; Smith, S.N.; Mobley, H.L.T. (2009). Vaccination with *Proteus* toxic agglutinin, a hemolysin-independent cytotoxin in vivo, protects against *Proteus mirabilis* urinary tract infection.

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.

Alteri, J.C. & Mobley, H.L.T. (2015). Metabolism and fitness of urinary tract pathogens. *Microbiol Spectr.* June; 3(3). doi: 10.1128/microbiolspec.MBP-0016-2015.

Alteri, J.C.; Himpsl, S.D.; Engstrom, M.D.; Mobley, H.L.T. (2012). Anaerobic respiration using a complete oxidative TCA cycle drives multicellular *swarming* in *Proteus mirabilis*. *mBio* 3(6): e00365-12. doi:10.1128/mBio.00365-12.

Alteri, J.C.; Himpsl, S.D.; Mobley, H.L.T. (2015). Preferential use of central metabolism *in vivo* reveals a nutritional basis for polymicrobial infection. *PLOS Pathogens*, 11 (1): e1004601, doi: 10.1371/journal.ppat.1004601.

Ambruster, C.E.; Forsyth-DeOrnellas, V.; Johnson, A.O.; Smith, S.N.; Zhao, L.; Wu, W.; Mobley, H.L.T. (2017). Genome-wide transposon mutagenesis of *Proteus mirabilis*: essential genes, fitness factors of catheter-associated urinary tract infection, and the impact of polymicrobial infection on fitness requirements. *PLOS Pathogens* June 2017 13(6): e 1006434. doi: 10.1371/journal.ppat.1006434.

Ambruster, C.E.; Hodges, S.A.; Mobley, H.L.T. (2013). Initiation of *swarming* motility by *Proteus mirabilis* occurs in response to specific cues present in urine and requires excess L-glutamine. *Journal of Bacteriology*. Vol 195 No 6 p. 1305–1319.

Ambruster, C.E.; Hodges, S.A.; Smith, S.N.; Alteri, C.J.; Mobley, H.L.T. (2014). Arginine promotes *Proteus mirabilis* motility and fitness by contributing to conservation of the proton gradient and proton motive force. *MicrobiologyOpen* 2014; 3(5):630-641.

Ambruster, C.E.; Mobley, H.L.T.; Pearson, M. (2018). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* Infection. *EcoSal Plus* 2018; doi:10.1128/ecosalplus.ESP-0009-2017.

Ambruster, C.E.; Smith, S.N.; Johnson, A.O.; Forsyth-DeOrnellas, V.; Eaton, K.A.; Yep, A.; Mody, L.; Wu, W.; Mobley, H.L.T. (2017). The pathogenic potential of *Proteus mirabilis* is enhanced by other uropathogens during polymicrobial urinary tract infection. Infection and Immunity Vol 85 Issue 2 e00808-16

Archibald, L.K. & Gaynes, R. P. (1997). Hospital acquired infections in the United States: the importance of interhospital comparisons. Nosocom Infect.11:245-55.

Bahrani, F.K.; Cook, S.; Hull, R.A.; Massad, G. & Mobley, H.L.T. (1993). *Proteus mirabilis* fimbrial N-terminal amino acid sequence of a major fimbrial subunit and nucleotide sequences of the gene from two strains. Infect Immun 61: 884–891.

Bahrani, F.K; Massad, G.; Lockatell, C.V; Johnson, D.E.; Russel, R.G.; Warren, J.W.; Mobley, H.L.T. (1994). Construction of a MR/P fimbrial mutant of *Proteus mirabilis*: Role in virulence in a mouse model of ascending urinary tract infection. Infect and Immun, Aug, 1994, p. 3363-3371.

Balcázar, J.L.; Subirats, J. & Borrego, C.M. (2015). The role of biofilms as environmental reservoirs of antibiotic resistance. Front.Microbiol. 6:1216. doi:10.3389/fmicb.2015.01216.

Becerra, G.; Plascencia, A.; Luévanos, A.; Domínguez, M.; Hernández, I. (2009). Mecanismo de resistencia a antimicrobianos en bacterias. Enf Inf Microbiol 2009 29 (2): 70-76.

Belas, R. & Suavanasuthi, R. (2005). The ability of *Proteus mirabilis* to sense surfaces and regulate virulence gene expression involves FliL, a flagellar basal body protein. J Bacteriol Vol.187 No1 9. p. 6789–6803

Belas, R. (1992). The *swarming* phenomenon of *Proteus mirabilis*. ASM News 58:15-22.

Belas, R. (1996). *Proteus mirabilis* swarmer cell differentiation and urinary tract infection. En Mobley HL & Warren J (eds.), Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management. ASM Press, Washington DC.

Belas, R. (2014). Biofilms, flagella, and mechanosensing of surfaces by bacteria. Trends Microbiol. 22:517-527.

Belas, R.; Erskine, D. & Flaherty, D. (1991). *Proteus mirabilis* mutants defective in swarmer cell differentiation and multicellular behavior. J Bacteriol 173, 6279–6288.

Bingle, L.; Bailey, C. and Pallen, M. (2008). Type VI secretion: A beginner's guide. Curr. Opin. Microbiology 11(1): 3-8.

Birch, O.; Heitson, K.S.; Fuhrmann, M.; Burgdorf, K.; Baldwin, J.E.; Roach, P.L.; Shaw, N.M. (2000). MioC Is an FMN-binding Protein That Is Essential for *Escherichia coli* Biotin Synthase Activity *in Vitro*. Journal of Biological Chemistry Vol. 275 No 41, pp 32277-32280. October 13, 2000.

Bryers, J.D. & Ratner, B.D. (2004). Bioinspired implant materials befuddle bacteria. ASM News-American Society for Microbiology, 70(5), 232-232. 82742.

Buckley, A.M.; Webber, M.A.; Cooles, S.; Randall, L.P.; La Ragione, R.M.; Woodward, M.J.; Piddock, L.J. (2006). The AcrAB-TolC efflux system of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* plays a role in pathogenesis, Cell. Microbiol. 8 (2006) 847–856.

Burall, L.S.; Harro, J.M.; Li, X.; Lockatell, C.V.; Himpel, S.D.; Hebel, J.R.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. (2004). *Proteus mirabilis* Genes That Contribute to Pathogenesis of Urinary Tract Infection: Identification of 25 Signature Tagged Mutants Attenuated at Least 100-Fold. Infection and Immunity, May 2004, p. 2922–2938.

Caetano, A. (2014). Caracterización fenotípica de mutantes defectivas en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis*. Tesina Lic. en Bioquímica, Udelar.

Calvo, J.M. & Matthews, R.G. (1994). The leucine-responsive regulatory protein, a global regulator of metabolism in *Escherichia coli*. Microbiol Rev 58: 466–490.

Carpentier, B. & Cerf, O. (1993). Biofilms and their consequences, with particular reference to hygiene in the food industry. J. Appl. Bacteriol. 75:499-511.

Cassel, E.J. (1991). The importance of understanding suffering for clinical ethics. J Clin Ethics. 2:81-82.

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.

Chen, L. & Wen, Y. (2011). The role of bacterial biofilm in persistent infections and control strategies. Int J Oral Sci 3: 66-73.

Chen, L.; Zhao, Y.; Lai, D.; Zhang, P.; Yang, Y.; Li, Y.; Jiang, G.; Fan, J. (2018). Neutrophil extracellular traps promote macrophage pyroptosis in sepsis. Cell Death and Disease 9:597 DOI 10.1038/s41419-018-0538-5.

Christie, P. & Cascales, E. (2005) Structural and dynamic properties of bacterial type IV secretion systems (review). *Mol. Membr. Biol.*, 22(1-2): 51-61.

Coker, C.; Poore, C.A.; Li, X.; Mobley, H.L. (2000). Pathogenesis of *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *Microbes Infect* Oct;2(12) p:1497-1505.

Cormen, T.H. (2009). Introduction to algorithms. MIT press.

Corpe, W.A. (1980). Microbial surface components involved in adsorption of microorganisms onto surfaces. *En Bitton G., Marshall K. C., editores. Adsorption of microorganisms to surfaces.* New York: John Wiley& Sons. p 105-144.

Costerton, J.W.; Geesey, G.G.; Cheng, K.J. (1978). How bacteria stick. *Sci Am* 238:86-95.

Costerton, J.W.; Stewart, P.S.; Greenberg, E.P. (1999). Bacterial biofilms: a common cause of persistent infections. *Science* 284:318-22.

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.

Cusick, K.; Lee, Y.Y.; Youchak, B.; Belas, R. (2012). Perturbation of FliL interferes with *Proteus mirabilis* swarmer cell gene expression and differentiation. *J. Bacteriol.* 194:437–447.

D'Alessandro, B.; Lery, L.M.; von Krüger, W.M.A.; Lima, A.; Piccini, C.; Zunino, P. (2011). Proteomic análisis of *Proteus mirabilis* outer membrane proteins reveals differential expresión *in vivo* vs. *in vitro* conditions. *FEMS Immunol Med Microbiol* 63(2011) p: 174-182.

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 macro problem that starts with micro adherence. *Clin Infect Dis.* 33:1567-72.

Davey, M.E. & O'Toole, G.A., (2000). Microbial Biofilms: from Ecology to Molecular Genetics. *Microbiol.Mol. Biol. Rev.* 64:847-67.

Davies, C.; White, S.W.; Nicholasi, R.A. (2001). Crystal Structure of a Deacylation defective Mutant of Penicillin-binding Protein 5 at 2.3-Å Resolution. *The Journal of Biological Chemistry* Vol. 276, No. 1, Issue of January 5, pp. 616–623, 2001.

Delepelaire, P. (2004) Type I secretion in gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1694(1–3): 149-161.

Dickinson, M. & Bisno A.L. (1993). Infections associated with prosthetic devices: clinical considerations. *Int. J. Artif.Organs* 16:749-54.

Donlan, R.M. & Costerton, J.W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clin.Microbiol.Rev.* 15: 167-93.

Donlan, R.M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerg Infect Dis.* 8:881-890.

Du, D.; Wang-Kan, X.; Neuberger, A.; van Veen, H.W.; Pos, K.M.; Piddock, L.J.V.; Luisi B.F. (2018). Multidrug efflux pumps: structure, function and regulation. *Nature Reviews/Microbiology* <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0048-6>.

Dunne, W.M. (2002). Bacterial adhesion: Seen Any Good Biofilms Lately? *ClinMicrobiol. Rev.*15:155-166.

Falkinham, J.O. & Hoffman, P.S. (1984). Unique developmental characteristics of the swarm and short cells of *Proteus vulgaris* and *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* 158:1037–1040.

Feng, Y.; Zhang, H.; Cronan, J.E. (2013). Profiligate biotin synthesis in α -Proteobacteria. A developing or degenerating regulatory system? *M. Microbiol*; 88 (1) p- 77-92 doi: 10.1111/mmi.12170.

Flannery, E.L.; Antezak, S.M. and Mobley, H.L.T. (2011). Self-transmissibility of the integrative and conjugative element ICEPm1 between clinical isolates requires a functional integrase, relaxase, and tipe IV secretion system. *Journal of Bacteriology*, Aug, 2011, p. 4104-4112.

Flemming, H.C. & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews Microbiology* 8(9):623-33.

Flores-Mireles, A.L.; Walker, J.N.; Caparon, M.; Hultgren, S.J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nat Rev Microbiol.* 2015 May; 13(5): 269–284. doi:10.1038/nrmicro3432.

Foxman, B. (2003). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *Dis. Mon.* 49:53-70.

Fuqua, C.; Winans, S.C.; Grennberg, E.P. (1994). MINIREVIEW Quorum Sensing in Bacteria: the LuxR-LuxI Family of Cell Density-Responsive Transcriptional Regulatorst. J Bacteriol.176: 269–275.

Graham, P.S.; Tomoo, O.; Hughes, C. (2005). Binding and transcriptional activation of non-flagellar genes by *Escherichia coli* flagellar master regulator FlhD₂C₂. Microbiology 2005 June; 151 (Pt6): 1779-1788 doi:10.1099/mic.0.27879-0.

Gualdi, S.; Scoccimarro, E. & Navarra, A. (2008). Changes in tropical cyclone activity due toglobal warming: Results from a high-resolution coupled general circulation model. Journal of climate, 21(20), 5204-5228.

Guay, D.R. (2008). Contemporary management of uncomplicated urinay tract infections. Drugs 2008; 68 (9): 1169-1205.

Guiton, P.S.; Hannan, J.T.; Ford, B.; Caparon, M.G.; Hultgren S.J. (2012). *Enterococcus faecalis* overcomes foreign body-mediated inflammation to entablish urinary tract infections. Infection and Immunity Vol 81 No1. p:329-339.

Guiton, P.S.; Hannan, T.J.; Ford, B.; Caparon, M.G.; Hultgren, S.J. (2013). *Enterococcus faecalis* overcomes foreign body-mediated inflammation to establish urinary tract infections. Infection and Immunity. 81:329–339.

Guiton, P.S.; Hung, C.S.; Hancock, L.E.; Caparon, M.G.; Hultgren S.J. (2010). Enterococcal biofilm formation and virulence in an optimized murine modelo of forgeign body-associated urinary trac infections. Infection and Immunity, Oct. 2010, p:4166-4175.

Hagberg, L.; Engberg, I.; Freter, R.; Lam, J.; Olling, S.; Svanborg, Edén C. (1983). Ascending, unobstructed urinary tract infection in mice caused by pyelonephritogenic *Escherichia coli* of human origin. Infect. Immun, 1983 Apr, 40(1): 273-283.

Hall-Stoodley, L. & Stoodley, P. (2009). Envolving concepts in biofilm infection. Cellular Microbiology (2009) 11(7), 1034-1043.

Hall-Stoodley, L.; Costerton, J.W.; Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: From the natural enviroment to infectious diseases. Nat. Rev. Microbiol. 2 London: Nature Publishing Group,2004, 95-108.

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.

Hart, B.R. & Blumenthal, R.M. (2011). Unexpected coregulator range for the global regulator Lrp of *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *J. Bacteriol.* 193:1054 –1064.

Härtel, S.; Fanani, M.L.; Maggio, B. (2005). Shape transitions and lattice structuring of ceramide enriched domains generated by sphingomyelinase in lipid monolayers. *Biophys J.* 88:287-304.

Hartstein, A.I.; Garber, S.B.; Ward, T.T.; Jones, S.R.; Morthland, V.H. (1981). Nosocomial urinary tract infection: a prospective evaluation of 108 catheterized patients. *Infect. Control* 2:380-86.

Hauser, G. (1885). Über Fäulnisbakterien und deren Beziehungen zur Septicämie; ein Beitrag zur Morphologie der Spaltpilze.

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.

Himpfl, S.D.; Lockatell, C.V.; Hebel, J.R.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. (2008). Identification of virulence determinants in uropathogenic *Proteus mirabilis* using signatura-tagged mutagenesis. *Journal of Medical Microbiology*, (2008), 57 p1068-1078.

Himpfl, 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.

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.

Hoener, J.F.M. (1965). Development of flagella by *Proteus mirabilis*. *J Gen Microbiol.* 1965; 40:29–42.

Hoiby, N.; Krogh Johansen, H.; Moser, C.; Song, Z.; Ciofu, O.; Kharazmi, A. (2001). *Pseudomonas aeruginosa* and the *in vitro* and *in vivo* biofilm mode of growth. *Microbes Infect.* 3:23-35.

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. *Clin Infect Dis*. 50:625-663.

Hu, Y.; Li, Y.; Zhang, X.; Guo, X.; Xia, B.; Changwen, Jin C. (2006). *The Journal of Biological Chemistry* Vol 281 No 46, pp 35454-35466. November 17, 2006.

Hubenova, Y.; Hubenova, E.; Slavcheva, E.; Mitov, M. (2017). The glyoxylate pathway contributes to enhanced extracellular electron transfer in yeast-based biofuel cell. *Elsevier B.V. Bioelectrochemistry* 116 (2017) 10–16.

Hung, W.C.; Jane, W.N.; Wong, H.C. (2017). Association of a D-Alanyl-D-Ananine Carboxypeptidase gene with the formation of aberrantly shaped cells during the induction of viable but nonculturable *Vibrio parahaemolyticus*.

Hunter, P. (2008). The mob response. The importance of biofilm research for combating chronic diseases and tackling contamination. *EMBO Rep*. 2008 Apr; 9(4): 314–317.

Iribarnegaray, V. (2014). Evaluación de mutantes defectivas en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis*. Tesina Lic. Ciencias Biológicas, Udelar.

Iribarnegaray, V. (2017). Evaluación del papel de distintos factores bacterianos en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis* uropatogénico. Tesina de Maestría PEDECIBA-Biología opción Microbiología, Udelar.

Jacobsen, S.M.; Stickler, D.J.; Mobley, H.L.; Shirtliff, M.E. (2008). Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clin Microbiol Rev*. 21:26-59.

Jamal, M.; Tasneem, U.; Hussain, T. and Andleeb, S. (2015). Bacterial Biofilm: Its Composition, Formation and Role in Human Infections. *RRJMB Volume 4 Issue 3* e-ISSN:2320-3528 p-ISSN:2347-2286.

Jansen, A.M.; Lockatell, V.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. (2004). Mannose-resistant *Proteus* like fimbriae are produced by most *Proteus mirabilis* strains infecting the urinary tract, dictate the in vivo localization of bacteria, and contribute to biofilm formation. *Infect Immun* 72(12):7294–7305.

Jarvis, W.R. (1996). Selected aspects of the socioeconomic impact of nosocomial infections: morbidity, mortality, cost, and prevention. *Infect. Control Hosp. Epidemiol*. 17:552-57.

- Jensen**, P.Ø.; Bjarnsholt, T.; Phipps, R.; Rasmussen, T.B.; Calum, H.; Christoffersen, L., *et al.* (2007) Rapid necrotic killing of polymorphonuclear leukocytes is caused by quorum-sensing-controlled production of rhamnolipid by *Pseudomonas aeruginosa*. *Microbiology* 153: 1329–1338.
- Johnson**, C.M. & Grossman, A.D. (2015). Integrative and conjugative elements (ICEs): What they do and how they work. *Annu. Rev. Genet.* 2015; 49:577-601 doi:10.1146/annurev-genet-112414-055018.
- Jones**, B.V.; Young, R.; Mahenthiralingam, 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**, S.M.; Yerli, J.; Hu, Y.; Ceri, H.; Martinuzzi, R. (2007). Structure of *Proteus mirabilis* biofilms grown in artificial urine and standard laboratory media. *FEMS Microbiol, Lett* 268 (2007) p: 16-21.
- Joo**, H.S. & Otto, M. (2012). Molecular basis of in vivo biofilm formation by bacterial pathogens. *Chem. Biol.*19:1503-13.
- Kaye**, D. & Hessen, M.T. (1994). Infections associated with foreign objects in the urinary tract. In: bisno A.L., Waldvogel F.A. (eds) *Infections Associated with Indwelling Medical Devices*. ASM Press, Washington, pp. 291-307.
- Kobayashi**, K. & Iwano, M. (2012). BslA (YuaB) forms a hydrophobic layer on the surface of *Bacillus subtilis* biofilms. *Molecular microbiology*, 85(1), 51-66.
- Kornberg**, H.L.; Madsen, N.B. (1958). The metabolism of C2 compounds in micro-organisms. 3. Synthesis of malate from acetate via the glyoxylate cycle. *Biochem. J*; 68 pp, 549-557.
- Kunin**, C.M., (1987). *Detection, prevention and management of urinary tract infections*, Lea & Febiger, Philadelphia, Pa. 4th edition, p. 245-88.
- Kunin**, C.M.; Evans, C.; Bartholomew, D.; Bates, D.G. (2002) The antimicrobial defense of the female urethra: a reassessment. *J. Urol*, 168:413-419.
- Kvist**, M.; Hancock, V.; Klemm, P. (2008). Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Appl. Environ. Microbiol.* 74(2008) p: 7376-7382

Lassalle, L.; Engilberge, S.; Madern, D.; Vauclare, P.; Franzetti, B.; Girard, E. (2016). New insights into the mechanism of substrates trafficking in Glyoxylate/ Hydroxypyruvate reductases. Scientific Reports | 6:20629 | DOI: 10.1038/srep20629.

Lazzar, V. (2011). Quorum sensing in biofilms. How to destroy the bacterial citadels or their cohesion/power? Anaerobe. 17:280-285.

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 p: 395-405.

Li, X.; Johnson, D.E.; Mobley, H.L.T. (1999). Requirement of MrpH for mannose-resistant Proteus-like fimbria-mediated hemagglutination by *Proteus mirabilis*. Infect Immun 67(6):2822–2833.

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.

Lorca, G.L.; Barabote, R.D.; Zlotopolski, V.; Tran, C.; Winnen, B.; Hvorup, R.H.; Stonestrom, A.J.; Nguyen, E.; Huang, L.W.; Kim, D.S.; Saier, M.H. jr. (2007). Transport capabilities of eleven gram-positive bacteria: comparative genomic analyses. Biochimica et Biophysica Acta 1768 (2007) 1342–1366.

Ma, F.; Wang, T.; Ma, X.; Wang, P. (2014). Identification and Characterization of Protein Encoded by orf382 as L-Threonine Dehydrogenase. J. Microbiol. Biotechnol. (2014), 24(6), 748–755.

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.

Macnab, R.M. (1996). Flagella and Motility. In: Neidhardt, FC., editor. *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*, Cellular and Molecular Biology. Washington, DC: American Society for Microbiology; p. 123-145.

Madigan, M.T.; Martiniko, J.M.; Bender, K.S.; Buckley, D.H.; Stahl, D.A. (2015). Brock biology of microorganisms — Fourteenth edition. Copyright © 2015, 2012, 2009 Pearson Education, Inc. p148-149.

Marchetti, M.L.; Errecalde, J.; Mestorino, N. (2011). Resistencia bacteriana a los antimicrobianos ocasionada por bombas de eflujo. Impacto en la multiresistencia. Analecta Vet 2011; 31 (2): 40-53.

Marti, R.; Schmid, M.; Kulli, S.; Schneeberger, K.; Naskova, J.; Knøchel, S.; Ahrens, C.H.; Hummerjohann, J. (2017). Biofilm Formation Potential of Heat-Resistant *Escherichia coli* Dairy Isolates and the Complete Genome of Multidrug- Resistant, Heat-Resistant Strain FAM21845. Appl Environ Microbiol. 2017 Jul 17;83(15). pii: e00628-17. doi: 10.1128/AEM.00628-17.

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.

Matsumura, K.; Furukawa, S; Ogihara, H.; Morinaga, Y (2011). Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. Biocontrol Science, 16(2), 69-72 doi:10.4265/bio.16.69.

Matthews, S.J. & Lancaster, J.W. (2011). Urinary tract infections in the elderly population. The American journal of geriatric pharmacotherapy, 9(5), 286-309.

Mckee, T. & Mckee, J. (2013). Biochemistry: The molecular basis of life 5th edition. Copyright © 2013, 2009 by Oxford University Press. Copyright © 2003, 1999, 1996 by The McGraw-Hill Companies, Inc. ISBN: 978-0-19-992046-4. Chap 15.2.

McLean, R.J.; Whiteley, M.; Stickler, D.J.; Fuqua, W.C. (1997). Evidence of autoinducer activity in naturally occurring biofilms. FEMS MicrobiolLett. 154:259-263.

Mdluli, K.; Booth, M.P.S.; Brady, R.L.; Rumsby, G. (2005). A preliminary account of the properties of recombinant human Glyoxylate reductase (GRHPR), LDHA and LDHB with glyoxylate, and their potential roles in its metabolism. Biochimica et Biophysica Acta 1753 (2005) 209–216.

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.

Mobley, H.; Chippendale, G.R.; Kristin, G.; Swihart, G.; Welch, A. (1991). Cytotoxicity of the HpmA hemolysin and urease of *Proteus mirabilis* and *Proteus vulgaris* against cultured human renal proximal tubular epithelial cells. INFECTION AND IMMUNITY, June 1991, p. 2036-2042.

Mobley, H.L. & Belas, R. (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. Trends. Microbiol. 3:280-284.

Mobley, H.L. & Warren, J.W. (1987). Urease-positive bacteriuria and obstruction of long-term urinary catheters. *J. Clin Microbiol.* Nov, 25 (11): 2216-7.

Morgenstein, R.M.; Szostek, B.; Rather, P.N. (2010). Regulation of gene expresión during *swarmer* cell differentiation in *Proteus mirabilis*. *FEMS Microbiol.* 34 (2010) p. 753-763. doi:10.1111/j.1574-6976.2010.00229.

Mota, L. & Cornelis, G. (2005) The bacterial injection kit: Type III secretion systems. *Annals of Medicine*, 37(4): 234-249.

Murphy, C.N.; Mortensen, M.S.; Krogfelt, K.A.; Clegg, S. (2013). Rol of *Klebsiella pneumoniae* type 1 and 3 fimbriae in colonizing silicone tubes implanted into the bladders of mice as a modelo of catheter-associated urinary tract infections. *Infections and Immunity* Vol. 81 No 8 p. 3009-3017.

Nadell, C.D.; Xavier, J.B.; Foster, K.R. (2008). Sociobiology of biofilms. *FEMS Microbiol.* 33:206-224.

Nakano, S.; Okazaki, S.; Tokiwa, H.; Asano, Y. (2014). Binding of NAD₊ and L-Threonine Induces Stepwise Structural and Flexibility Changes in *Cupriavidus necator* L-Threonine Dehydrogenase. *The Journal of Biological Chemistry* vol. 289, NO. 15, pp. 10445–10454, April 11, 2014.

Nambu, T.; Minamino, T.; Macnab, R.M.; Kutsukake, K. (1999). Peptidoglycan-hidrolazing activity of the FlgJ protein, essential for flagelar rod formation in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*, Mar.1999, p. 1555-1561.

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.

Newman, E.B. & Lin, R. (1995) Leucine-responsive regulatory protein: a global regulator of gene expression in *Escherichia coli*. *Annu Rev Microbiol* 49: 747–775.

Nicolle L.E. (2005). Complicated urinary tract infection in adults. *Can J Infect Dis Med Microbiol.*16:349-36.

Nicolle, L. (2001). Epidemiology of urinary tract infection. *Infect. Med.* 18:153-162.

Nielubowicz, G.R. & Mobley, H.L.T. (2010). Host-patogen interations in urinary tract infection. *Nature Rev Urology*. 78:430-441.

Niel-Weise, B.S. & Van der Broek, P.J. (2005). Urinary catheter policies for long term bladder drainage. Cochrane Database Syst. Rev. 2005:CD004201.

Nishino, K.; Latifi, T.; Groisman, E.A. (2006). Virulence and drug resistance roles of multidrug efflux systems of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*, Mol. Microbiol. 59 (2006) 126–141.

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.

Old, D.C.; Adegbola, R.A. (1982). Haemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. J. Med. Microbiol. Vol 15(1982): 551-564.

Olsen, 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.A.; Kaplan, H.B. & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. Annual Reviews in Microbiology, 54(1), 49-79.

Padilla E; Llobet E; Domenech-Sanchez A; Martinez-Martinez L; Bengoechea JA; Alberti S (2010) *Klebsiella pneumoniae* AcrAB Efflux Pump contributes to antimicrobial resistance and virulence, Antimicrob. Agents Chemother. 54 (2010) 177–183.

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.

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.T. (2010). Transcriptome of *Swarming Proteus mirabilis*. Infection and Immunity, 78(6), 2834–2845. doi:10.1128/iai.01222-09.

Pearson, M.M.; Sebaihia, M.; Churcher, C.; Quail, M.A.; Seshasayee, A.S.; Luscombe, N.M.; Abdallah, Z.; Arrosmith, C.; Atkin, B.; Chillingworth, T.; Hauser, H.; Jagels, K.; Moule, S.; Mungall, K.; Norbertczak, H.; Rabinowitsch, E.; Walker, D.; Whithead, S.; Thomson, N.R.; Rather, P.N.; Parkhill, J.; Mobley, H.L.T. (2008). Complete genome sequence of uropathogenic

Proteus mirabilis, a master of both adherence and motility. Journal of bacteriology, 190(11), 4027-4037.

Pearson, M.M.; Yep, A.; Smith, S.N.; Mobley, H.L.T. (2011). Transcriptome of *Proteus mirabilis* in the murine urinary tract: virulence and nitrogen assimilation gene expresión. Infection and Immunity, July, p, 2619-2631 doi:10.1128/IAI.05152-11

Penner, J.L. (1984). *Proteus*. Bergey's manual of systematic bacteriology. N.R. Krieg. Baltimore, Williams and Wilkins: 491-494.

Piddock, L.J.; White, D.G.; Gensberg, K.; Pumbwe, L.; Griggs, D.J. (2000). Evidence for an efflux pump mediating multiple antibiotic resistance in *Salmonella* entérica serovar Typhimurium, Antimicrob. Agents Chemother. 44 (2000) 3118–3121.

Pratt, L.A. & Kolter, R. (1998). Genetic análisis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. Mol. Microbiol. 1998, Oct, 30(2): 285-293.

Pratt, L.A. & Kolter, R. (1999) Genetic analyses of bacterial biofilm formation. Curr Opin Microbiol. 2:598-603.

Proft, T. & Baker, E.N. (2009). Pili in Gram-negative and Gram-positive bacteria- structure, assembly and their role in disease. Cell. Mol. Life Sci. 66 (2009): 613-635. DOI 10.1007/s00018-008-8477-4.

Rather, P.N. (2005). Swarmer cell differentiation in *Proteus mirabilis*. Environ. Microbiol. 7:1065-73.

Romeo, T.; Gong, M.; Liu, M.Y.; Brun-Zinkernagel, A.M. (1993). Identification and molecular characterization of *csrA*, a pleiotropic gene from *Escherichia coli* that affects glycogen biosynthesis, gluconeogenesis, cell size and surface properties. J. Bacteriol. Aug (1993), p. 4744-4755.

Rosenberg & Kjelleberg. (1996). Hydrophobic interactions in bacterial adhesion. Advances in Microbial Ecology. 9:353-93.

Rózalski, A.; Sidorczyk, Z.; Kotełko, K. (1997) Potential virulence factors of *Proteus* bacilli. Mol Biol Rev.61:65-89.

Russo, D.M.; Williams, A.; Edwards, A.; Posadas, D.M.; Finnie, C.; Dankert, M.; Downie, J.A.; Zorreguieta, A. (2006) Proteins exported via the PrsD-PrsE type I secretion system and the

acidic exopolysaccharide are involved in biofilm formation by *Rhizobium leguminosarum*. J. Bacteriol, 188(12): 4474-4486.

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.

Scavone, P. (2013). Papel de las fimbrias MR/P y flagelos de *Proteus mirabilis* en la colonización del tracto urinario. Tesis de Doctorado, PEDECIBA- Biología opción Microbiología, Udelar.

Scavone, P.; Iribarnegaray, V.; Caetano, A.; Schlapp, G.; Härtel, S.; Zunino, P. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. Pathogens and Disease, 74, 2016, ftw033. doi: 10.1093/femspd/ftw033.

Schaffer, J.N. & Pearson, M.M. (2015). *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. Microbiol Spectr 3, UTI-0017-2013.

Schaffer, J.N.; Norsworthy, A.N.; Sun, T.T.; Pearson M. (2016). *Proteus mirabilis* fimbriae- an ureasa- dependent clusters assemble in an axtracellular niche to initiate stone formation. Proc Natl Acad Sci U S A. 2016 Apr 19;113(16):4494-9. doi: 10.1073/pnas.1601720113.

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 celular resolution and spatial order of physiological differentiation in a bacterial biofilm. MBio, 4(2), e00103-13.

Singh, P.K.; Schaefer, A.L.; Parsek, M.R.; Moninger, T.O.; Welsh, M.J.; Greenberg, E.P. (2000). Quorum-sensing signals indicate that cystic fibrosis lungs are infected with bacterial biofilms. Nature 407:762-64.

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.

Slipski, C.J.; Zhanel, G.G.; Bay, D.C. (2018). Biocide selective Tol C-independent efflux pumps in Enterobacteriaceae. J Membrane Biol (2018) 251:15–33 doi.org/10.1007/s00232-017-9992-8.

Sonenshein, A. L. (2000). Control of sporulation initiation in *Bacillus subtilis*. Current opinion in microbiology, 3(6), 561-566.

Stamm, W.E. (1991). Catheter-associated urinary tract infections: epimiology, pathogenesis, and prevention. Am. J. Med. 91:65S-71S.

Stanley, N.R. & Lazazzera, B.A. (2004). Environmental signals and regulatory pathways that influence biofilm formation. Mol Microbiol. 52:917-924.

Stickler, D.J. & Hughes, G. (1999). Ability of *Proteus mirabilis* to swarm over urethral catheters. Eur J Clin Microbiol Infect Dis. 18:206-8.

Stickler, D.J. & Morgan, S.D. (2006). Modulation of crystalline *Proteus mirabilis* biofilm development on urinary catheters. J. Med. Microbiol. 2006 May; 55 (pt 5): 489-494.

Stickler, D.J. & Zimakoff, V. (1994). Complications of urinary tract infections associated with devices used for long term bladder management. J. Hosp. Infect. 28:177-94.

Stickler, D.J. (2008). Bacterial biofilms in patients with indwelling urinary catheters. Nat Clin Pract Urol. 5:598-608.

Stickler, D.J., (1996). Bacterial biofilms and the encrustation of urethral catheters. Biofouling 94:293-305.

Stickler, D.J.; King, J.B.; Winters, C.; Morris, S.L. (1993) Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. J Infect. 27:133-135.

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.

Stodley, P. Hall- Stodley, L.; Costerton, B.; Demeo, P.; Shirliff, M.; Gawalt, E.; Kathju, S. (2013). Biofilms, Biomaterials, and Device-Related Infections. App Med and Medical Devices.77-102.

Sun, J.; Deng, Z.; Yan, A. (2014). Bacterial multidrug efflux pumps: Mechanisms, physiology and pharmacological exploitations. Biochemical and Biophysical Research Communications 453 (2014) 254–267.

Sycuro, L.K.; Wyckoff, T.; Biboy, J.; Born, P.; Pincus, Z.; Vollmer, W.; Salama, N.R. (2001). Multiple peptidoglycan modification networks modulate *Helicobacter pylori*'s cell shape, motility and colonization potential. PLOS Pathogens Vol 8 (3) / e1002603.

Thanassi, D.G.; Cheng, L.W.; Nikaido, H. (1997). Active efflux of bile salts by *Escherichia coli*. J. Bacteriol. 179 (1997) 2512–2518.

Trautner, B.W. & Darouiche, R.O. (2004). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. Am J Infect Control 32:177-183.

Trunk, T.; Khalil, H.S.; Leo, J.C. (2018). Bacterial autoaggregation. AIMS Microbiology, 4(1) p:140-164.

Tseng, Tsai-Tien.; Tyler, B. and Setubal, J. (2009). Protein secretion systems in bacterial-host associations and their description in the gene ontology (review). BMC Microbiol, 9(Suppl 1): S2.

Tuja, A. (2015). Identificación de genes involucrados en la formación de biofilms de *Proteus mirabilis*. Tesina Lic. en Bioquímica, Udelar.

Varma, A. & Young, K. (2004). FtsZ collaborates with penicilin binding proteins to generate bacterial cell shape in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology Oct p:6768-6774.

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.

Villegas, N.; Baronetti, J.; Albesa, I.; Polifroni, R.; Parma, A.; Etcheverría, A.; Becerra, M.; Padola, N.; Paraje, M. (2013). Relevance of Biofilms in the Pathogenesis of Shiga-Toxin-Producing *Escherichia coli* Infection. The Scientific World Journal. 2013:1-7.

Warren, J.W. (1997). Catheter-associated urinary tract infections. Infect. Dis. Clin. N. Am. 11:609-22.

Warren, J.W.; Steinberg, L.; Hebel, J.R.; Tenney, J.H. (1989). The prevalence of urethral catheterization in Maryland nursing homes. Arch Intern Med. 149:1535-1537.

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.

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

Wozniak, R.A.; Waldor M.K. (2010). Integrative and conjugative elements: mosaic mobile genetic elements enabling dynamic lateral gene flow. *Nature reviews Microbiology*, 2010, Vol 8, 552-563 doi: 10.1038/nrmicro2382.

Wray, S.K.; Hull, S.I.; Cook, R.G.; Barrish, J.; Hull, R.A. (1986). Identification and characterization of a uroepithelial cell adhesin from a uropathogenic isolate of *Proteus mirabilis*. *ASM Infection and Immunity* Oct. 1986. p: 43-49.

Yerli, J.; Hu, Y.; Jones, S.; Martinuzzi, R. (2007). A two-step procedure for automatic and accurate segmentation of volumetric CLSM biofilms images. *Journal of Microbiological Methods* 70(2007) p: 424-433.

Yoshikawa, S.; Arai, R.; Kinoshita, Y.; Uchikubo-Kamo, T.; Wakamatsu, T.; Akasaka, R.; Masui, R.; Terada, T.; Kuramitsu, S.; Shirouzu, M.; Yokoyama, S. (2006). Structure of archeal glyoxylate reductase from *Pyrococcus horikoshii* OT3 complexed with nicotinamide adenine dinucleotide phosphite. *Acta Cryst.* (2007). D63, 357–365. doi:10.1107/S0907444906055442

Zepeda-Rivera, M.A.; Saak, C.C.; Gibbs, K.A. (2018). A proposed chaperone of the bacterial type VI secretion system functions to constrain a self-identity protein. *J. Bacteriol.* Doi: 10.1128/JB.00688-17.

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 Immunol Med Microbiol.* 29:137-144.

Zunino, P.; Geymonat, L.; Allen, A.G.; Preston, A.; Sosa, V.; Maskell, D.J. (2001). New aspects of the role of MR/P fimbriae in *Proteus mirabilis* urinary tract infection. *FEMS Immunol Med Microbiol.* 31:113-120.

Zunino, P.; Piccini, C.; Legnani-Fajardo, C. (1994). Flagellate and non-flagelated *Proteus mirabilis* in the development of experimental urinary tract infection. *Microbial Pathogenesis*; 16 p: 379-385.

Zunino, P.; Piccini, C.; Legnani-Fajardo, C. (1999). Growth, celular differentiation and virulence factor expresión by *Proteus mirabilis* *in vitro* and *in vivo*. *J. Med. Microbiol.* Vol 48 (1999) p:527-534.

Zunino, P.; Sosa, V.; Allen, A.G.; Preston, A.; Schlapp, G.; Maskell, D.J. (2003). *Proteus mirabilis* fimbriae (PMF) are important for both bladder and kidney colonization in mice. *Microbiology* 149(Pt 11):3231-3237.

Zunino, P.; Sosa, V.; Schlapp, G.; Allen, A.; Preston, A.; Maskell, D.J. (2007). Mannose-resistant Proteus-like and *P. mirabilis* fimbriae have specific and additive roles in *P. mirabilis* urinary tract infections. FEMS Immunol Med Microbiol 51(2007) p:125-133.