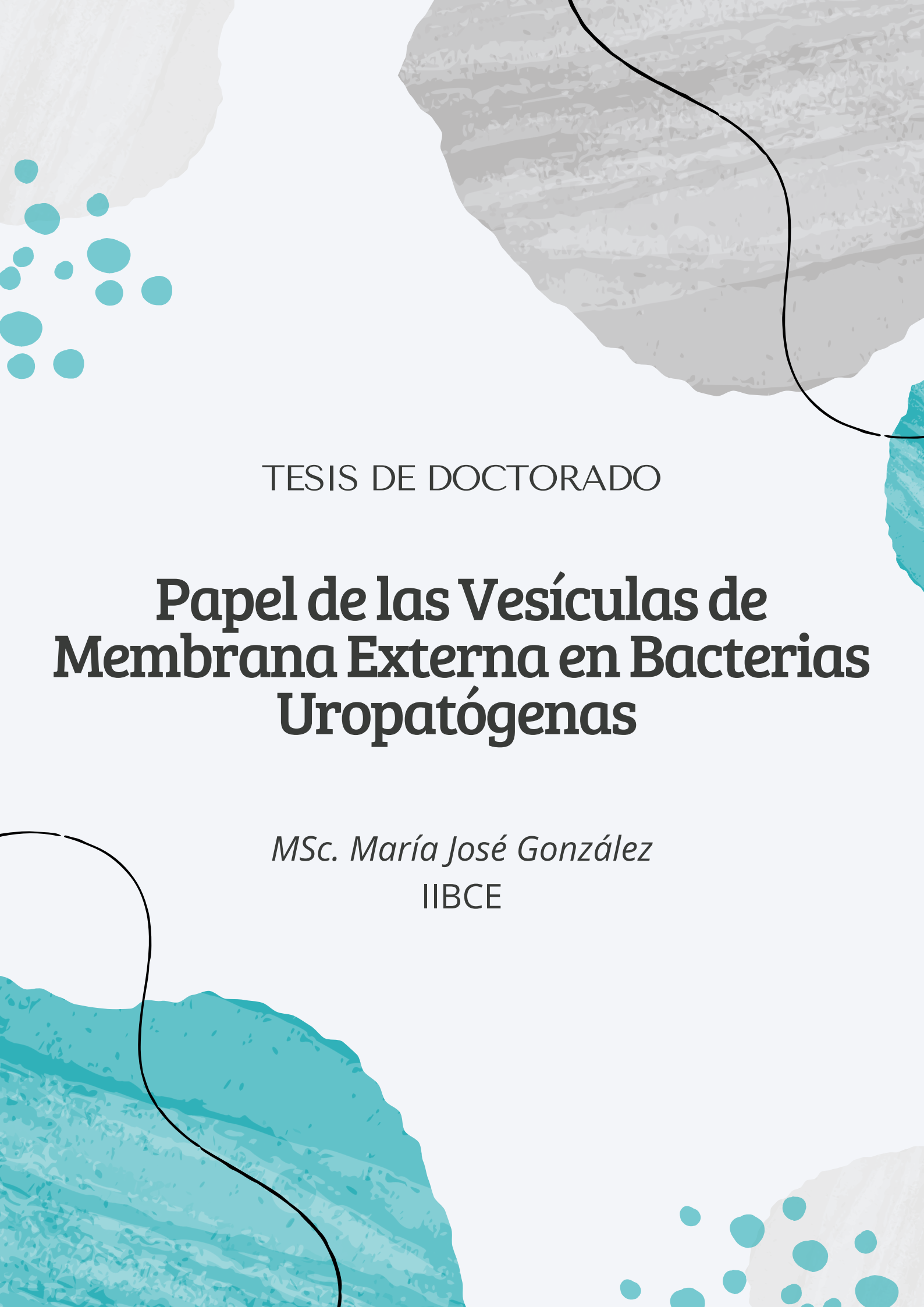




TESIS DE DOCTORADO

Papel de las Vesículas de Membrana Externa en Bacterias Uropatógenas

MSc. María José González
IIBCE

Papel de las vesículas de membrana externa en bacterias uropatógenas

M.Sc. María José González

Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas

2024

Orientadora PhD. Paola Scavone

Lab. de Biofilms Microbianos

Depto. De Microbiología

IIBCE

Co-orientadora PhD. Luciana Robino

ud. Académica de Bacteriología y Virología

Instituto de Higiene

FMED

¿La percepción varía cada vez que miramos un mismo objeto?
¿cada mirada revela algo nuevo o es nuestra atención la que se detiene en una cualidad distinta?

Mirar supone dejarse llevar por el desconcierto
De caminar por el pretil de la incertidumbre
vacío en la contemplación
Revelación de un distinto intemporal
Que nos incita a creer en la fugaz trascendencia.

Mariana Rubio

Agradecimientos

A Paola y Luciana por ser las primeras en lanzarse al maravilloso desafío que es tutorear a una doctoranda. Gracias por el salto de fe, la paciencia y la confianza que depositaron en mi persona. Gracias por ser referentes y modelos a seguir, demostrando que con determinación y con pasión por lo que uno hace es posible siempre salir adelante. Pero, sobre todo, gracias por el apoyo constante y por ser parte de mi vida.

A Nico y Erlen por convertirse en mis hermanos de la vida. Gracias por sacarme de apuros, aguantar mis dudas, ser mi soporte, acompañarme cuando estaba nerviosa, corregirme las cosas, hacerme críticas constructivas, esperar mientras hago mis experimentos para no sentirme sola y ser los mejores compañeros de equipo. Además, gracias por las salidas y cenas compartidas, los juegos, los viajes y las fiestas de fin de año.

A Analía y mis colegas del Pasteur donde hice mi pasantía, que me aceptaron con los brazos abiertos y tuvieron la confianza de dejarme andar a mis anchas, compartir los almuerzos y las charlas. Pero sobre todo a Analía, que tuvo todas las ganas y la paciencia de enseñarme al menos un poco de lo que sabe. Gracias por todo tu apoyo.

A mis amigos y compañeros de la colonia, gracias por el aguante, las palabras de aliento, las discusiones constructivas, las charlas de sobremesa (el podcast), el tiempo compartido, por brindarme sus puntos de vista, por soportar mi risa, por darme ánimos en todo momento, por compartir seminarios, cursos, congresos, por ser muchas veces la voz de la razón y ayudarme a encontrar la solución. Fueron épocas difíciles, pero compartir con ustedes me ayudó a procesar todo de la mejor forma posible.

A los biocosas por ser mi cable a tierra, por aguantarme todos estos años, por los juegos de mesa y las charlas sobre biología y filosofía, por los mates compartidos y por todos estos años de anécdotas junto a ustedes.

A Caro y Regie por ser mis hermanas de la vida, por estar en mis peores y mejores momentos, por decirme que iba a terminar esta tesis todo el tiempo.

A Maru mi psicóloga, porque gracias a sus sesiones y sus palabras pude encontrar mi camino. Porque sin su soporte, no tengo dudas de que lo hubiera logrado igual, pero me habría costado mil veces más.

A mi familia, porque sin ustedes no sería quien soy. Me enseñaron a soñar en grande y a ir tras mis sueños mientras me acompañan en el camino. No podría pedir nada más. Los amo.

¡GRACIAS!

Dedico este trabajo a mi gato bebe Loki, a mi sobrina perruna Zula y a mi sobrina humana Luna que, a diferencia del astro, nos ilumina con su luz propia.

Resumen

Escherichia coli y *Proteus mirabilis* son los principales patógenos responsables de las infecciones del tracto urinario, que afectan a una gran proporción de personas en el mundo. Las bacterias gram-negativas son capaces de producir vesículas de la membrana externa (VME). Estas VME pueden actuar como un sistema de *delivery* bacteriano, proporcionando la posibilidad de exportar ADN, ARN, lípidos, proteínas y toxinas, entre otros. Las VME pueden participar en la producción de biofilm, la adquisición de nutrientes y en la protección inmunitaria de la bacteria, siendo el objetivo de varios antimicrobianos y fagos. Las VME podrían actuar en la patogenia de la infección, como intermediarias en la comunicación bacteriana, así como cargar diversos factores de virulencia. El objetivo de este trabajo consistió en evaluar la producción, composición y posible función de las VME en dos cepas uropatógenas de aislamientos clínicos. Para ello se emplearon las cepas de *E. coli* U144 y *P. mirabilis* 2921 ampliamente caracterizadas previamente, cultivadas en caldo Luria-Bertani (LB) y orina artificial (OA). Las VME fueron purificadas mediante filtración y ultracentrifugación y posteriormente caracterizadas en tamaño y carga superficial por DLS (ZetasizerZS) y mediante imagenología por TEM (STEM Inspect F50). El contenido proteico fue analizado por espectrometría de masas de alta resolución empleando la estrategia de shotgun, en un nano-LC MS/MS. El análisis de los péptidos y las proteínas se realizó con el software PatternLab for Proteomics 4.0. Para los ensayos de comunicación, las suspensiones bacterianas (OD₆₀₀/0.5) de *E. coli*, *P. mirabilis* y *E. coli* ATCC se incubaron durante 30 min, 1, 3 y 5 horas con VME marcadas con el fluoróforo FM4-64 para evaluar la asociación de las VME con las bacterias. La tasa de asociación se obtuvo mediante la cuantificación de la fluorescencia bacteriana adquirida observada después de la incubación. Finalmente, se evaluó el efecto de las VME sobre la formación de biofilm mediante el método del cristal violeta.

Las VME de *E. coli* tuvieron un tamaño de 185.5 y 257.6 nm en LB y OA, respectivamente. Mientras tanto, las VME de *P. mirabilis* midieron 267.6 y 320.4 nm. Todas las VME tuvieron un potencial zeta negativo. El análisis proteómico identificó 282 y 353 proteínas en las VME de cultivos de *E. coli* y *P. mirabilis* en LB, y 215 y 103 proteínas cuando se cultivaron en OA, respectivamente. La mayoría de las proteínas provenían de la envoltura de la bacteria, con algunas relacionadas con la movilidad y la adhesión. La composición de las proteínas de las VME difiere en función del medio de cultivo, con proteínas relacionadas con la captación de zinc y hierro que podrían desempeñar un papel importante en la OA.

En relación con la asociación de VME, *E. coli* fue capaz de aceptar sus propias VME después de 30 minutos de incubación, mientras que *P. mirabilis* tarda más de 3 horas en aceptar sus propias VME. Curiosamente, *E. coli* ATCC fue capaz de aceptar tanto las VME de *E. coli* como las de *P. mirabilis* en 30 min y 3 h, respectivamente. La diferencia en la asociación observada podría implicar roles diferentes para las VME, una vesícula estaría implicada en la comunicación intraespecífica y la otra en la comunicación interespecífica. Al evaluar la formación de biofilm, observamos un aumento significativo en la biomasa cuando *E. coli* y *P. mirabilis* se incubaron con sus propias VME. Concluimos que *E. coli* y *P. mirabilis* uropatógenas producen VME que participan en la comunicación bacteriana intra e inter especie y mejoran la formación de biofilm.

Estos resultados nos permiten avanzar en nuestra comprensión del rol de las VME en la patogénesis de las infecciones del tracto urinario.

Tabla de contenido

Agradecimientos	3
Resumen	4
Tabla de contenido	6
1. Introducción.....	8
1.1 Infecciones del tracto urinario	8
1.2 <i>Escherichia coli</i> uropatogénica.....	9
1.3 <i>Proteus mirabilis</i>	10
1.4 Principales factores de virulencia relacionados a las ITU	11
1.5 Formación de biofilms.....	15
1.6 Dinámica de la pared bacteriana.....	16
1.7 Vesículas de Membrana Externa	17
1.7. 1 Biogénesis y estructura	17
1.7. 2 Funciones biológicas	19
1.7. 3 VME en Uropatógenos	21
2. Hipótesis del trabajo	23
3. Objetivos.....	23
3.1 Objetivos específicos.....	23
4. Materiales y métodos	24
4. 1 Cepas bacterianas.	24
4. 2 Condiciones de cultivo	24
4. 3 Obtención de VME nativas	24
4. 4 Purificación de las VMEs	25
4. 5 Marcado de las vesículas con fluoróforo.....	25
4. 6 Caracterización de las VME	25
4. 6. 1 Dispersión por luz dinámica (DLS)	25
4. 6. 2 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)	26
4. 6. 3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)	26
4. 7 Proteómica de las VME	26
4. 7. 1 Perfil proteico.....	26
4. 7. 2 Análisis de espectrometría de masas por digestión en gel.....	27
4. 7. 3 Digestión proteolítica en gel y extracción de péptidos.....	27
4. 7. 4 Limpieza y preparación de muestras.....	28
4. 7. 5 Carga de muestras al espectrómetro de masas.....	28
4. 7. 5 Identificación y análisis de proteínas.....	28

4. 8 VME en la Comunicación entre bacterias.....	29
4. 9 Rol de las VME en la formación de biofilm.....	29
5. Resultados	31
5. 1 Caracterización de las VME de <i>E. coli</i> 144 y <i>P. mirabilis</i> 2921 en medio LB y OA	31
5. 1. 1 Visualización de las VME por Microscopía Láser Confocal.	31
5. 1. 2 Radio hidrodinámico, carga superficial de las VME e índice de polidispersidad.....	32
5. 1. 3 Cuantificación de las VME	33
5. 1. 4 Visualización de las VME	34
5. 1. 5 Resumen de resultados	37
5. 2 Proteómica de las VME	37
5. 2. 1 Perfil proteico de las VME	37
5. 2. 2 Caracterización proteómica de VME de <i>E. coli</i> en LB y OA.	38
5. 2. 3 Análisis cuantitativo comparativo de proteínas de VME de EcLB y EcOA.....	43
5. 2. 4 Caracterización proteómica de VME de <i>P. mirabilis</i> en LB y OA.	48
5. 2. 5 Análisis cuantitativo comparativo de proteínas de VME de PmLB y PmOA.....	52
5. 3 VME como mecanismo de comunicación bacteriana.....	60
5. 3. 1 Asociación de las VME a la superficie bacteriana	60
5. 3. 2 Formación de biofilms.....	63
6. Discusión.....	64
6.1 Tamaño de las VME.....	65
6.2 Composición de las VME	67
6.3 Perfil proteómico de las VME.....	69
6. 3. 1 Proteínas en las VME de <i>E. coli</i> 144.....	69
6. 3. 2 Proteínas en las VME de <i>P. mirabilis</i> 2921.....	71
6.4 Producción de VME como mecanismo de comunicación entre bacterias.....	73
6.5 La formación de biofilms y el rol de las VME.....	75
7. Conclusión.....	75
8. Referencias bibliográficas	77
9. Anexo	90

1. Introducción

1.1 Infecciones del tracto urinario

Las infecciones del tracto urinario (ITU) se encuentran entre las más comunes que afectan a los seres humanos. Las mismas se definen como la presencia, crecimiento y multiplicación de microorganismos en el tracto urinario, causando la presencia de síntomas y signos debido a la inflamación (Nicolle, 2002). Las ITU son clasificadas según el sitio de infección o según el estado del paciente. Si la infección afecta a la vejiga, se denomina ITU baja o cistitis. En cambio, si afecta principalmente a los riñones, es ITU alta o pielonefritis. También pueden clasificarse como complicadas o no complicadas. Las no complicadas suelen afectar a individuos que no poseen ninguna anomalía en el tracto urinario. Las ITU que se clasifican como complicadas están asociadas a factores relacionados a anomalías funcionales y/o anatómicas en el tracto urinario o a un sistema inmune deficiente. Dentro de estos factores se encuentran la obstrucción y la retención urinaria, la inmunosupresión, falla o trasplante renal, el embarazo, y la presencia de cuerpos extraños, como la presencia de cálculos o de dispositivos médicos como el catéter (Lichtenberg, 2008; Hooton, 2012; Levison, 2013).

La incidencia de las ITU viene en aumento, una tendencia que se da a nivel global. Se estima que el 50% de las mujeres tendrán al menos un episodio de ITU en sus vidas, y a pesar del tratamiento antibiótico, entre el 20 y 30% de las mismas experimentarán al menos un episodio de recurrencia (Foxman, 2003). En niños la probabilidad de tener un episodio de recurrencia alcanza el 40% (O'Hanley, 1996). En Uruguay, si bien los datos epidemiológicos de ITU son escasos, las tasas de mortalidad relacionadas con ITU en 2019 fue de las más elevadas siendo la segunda más alta de 204 países (Zeng, 2022).

Las ITU son causadas principalmente por bacilos entéricos Gram-negativos, siendo *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) el principal agente etiológico en los casos de ITU no complicada (75%), seguido en prevalencia por *Klebsiella pneumoniae*, *Staphylococcus saprophyticus*, *Enterococcus faecalis*, *Proteus mirabilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, y *Staphylococcus aureus* (Ronald, 2002; Foxman, 2014). En cuanto a las ITU complicadas, además de UPEC, otros patógenos prevalentes son *Enterococcus* spp., *K. pneumoniae*, *S. aureus*, *P. mirabilis* y *P. aeruginosa* (Flores-Mireles, 2015). *E. coli* es el patógeno predominante en todos los rangos etarios (Alonso, 2001).

1.2 *Escherichia coli* uropatogénica

E. coli es un bacilo Gram-negativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*. Presenta una gran variabilidad genética y fenotípica que le permite encontrarse en la microbiota intestinal de animales y humanos y en diversos ambientes. Esta variabilidad de *E. coli* le confiere la posibilidad de adaptarse a diversos nichos, pero también de adquirir factores de virulencia que le permiten desarrollar diversas infecciones. Según los factores de virulencia que posea, se clasifican en 3 grupos principales: *E. coli* comensal, *E. coli* patógeno intestinal y *E. coli* patógeno extraintestinal, ExPEC (Kaper, 2004; Russo, 2000). Dentro del grupo de ExPEC se encuentran las UPEC, que son capaces de causar ITU (figura 1). Las UPEC difieren de las *E. coli* comensales ya que presentan genes que codifican para factores de virulencia, usualmente en islas de patogenicidad, que contribuyen con la patogenicidad de la bacteria. Dentro de estos factores determinantes se incluyen toxinas, proteínas secretadas, lipopolisacáridos, cápsulas, sistemas de adquisición de hierro y adhesinas (Donnenberg y Welch, 1996; Yamamoto, 1996).

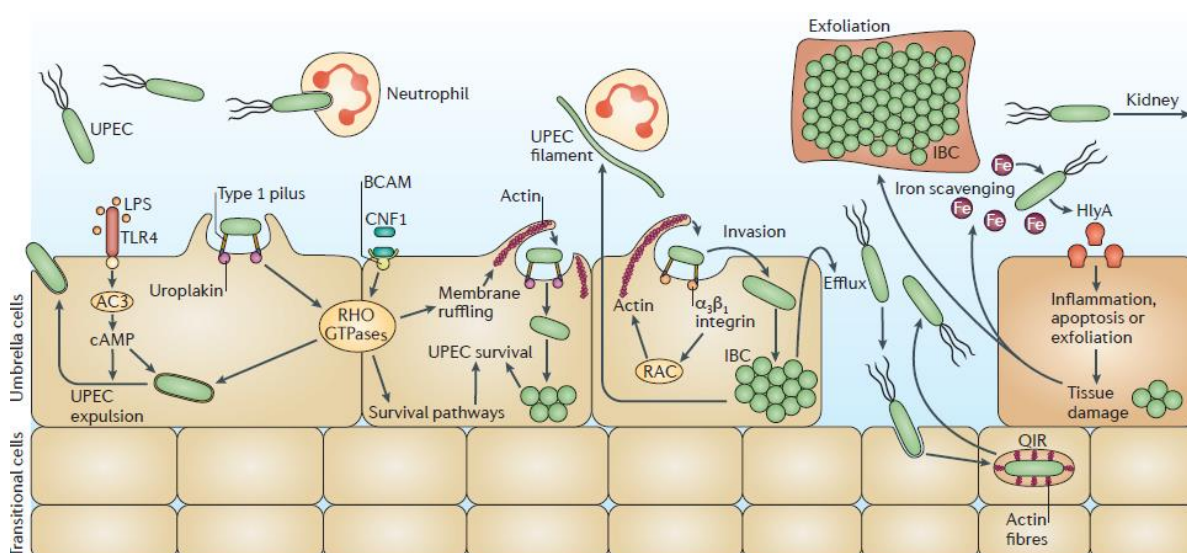


Figura 1. Modelo de colonización e invasión de *E. coli* uropatogénica en el uroepitelio de la vejiga. UPEC presenta varios factores de virulencia que le permiten la invasión del tracto urinario. La expresión de fimbrias de tipo 1 es esencial para la colonización, invasión y persistencia. La adhesina FimH se une a las uroplaquinas e integrinas que se encuentran en la superficie de las células uroepiteliales (células Umbrella). Esto le permite a UPEC invadir la célula eucariota y persistir evadiendo la respuesta inmune y el efecto de los antimicrobianos. Tomado de Flores-Mireles 2015

1.3 *Proteus mirabilis*

P. mirabilis es el principal agente etiológico de las ITU asociadas a catéteres urinarios (ITU-C). Es un microorganismo Gram-negativo también perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae* (Jabcohsen, 2008). Las ITU-C son las infecciones más frecuentes asociadas con el cuidado de la salud en el mundo, siendo el 40% de las infecciones adquiridas en los hospitales (Hooton, 2010). *P. mirabilis* generalmente no es el primer organismo encontrado en la superficie del catéter, pero es el más común en la cateterización a largo plazo (Stickler, 2010; Schaffer y Pearson, 2017). El principal mecanismo para la supervivencia y colonización de esta bacteria en una superficie abiótica como el catéter es la capacidad de formar biofilms cristalinos (figura 2) (Jabcohsen, 2008). Los biofilms que se forman en los catéteres tienden a ser monomicrobianos en primera instancia, pero rápidamente se vuelven polimicrobianos, el 72% terminan siendo colonizados por dos o más especies (Macleod, 2007).

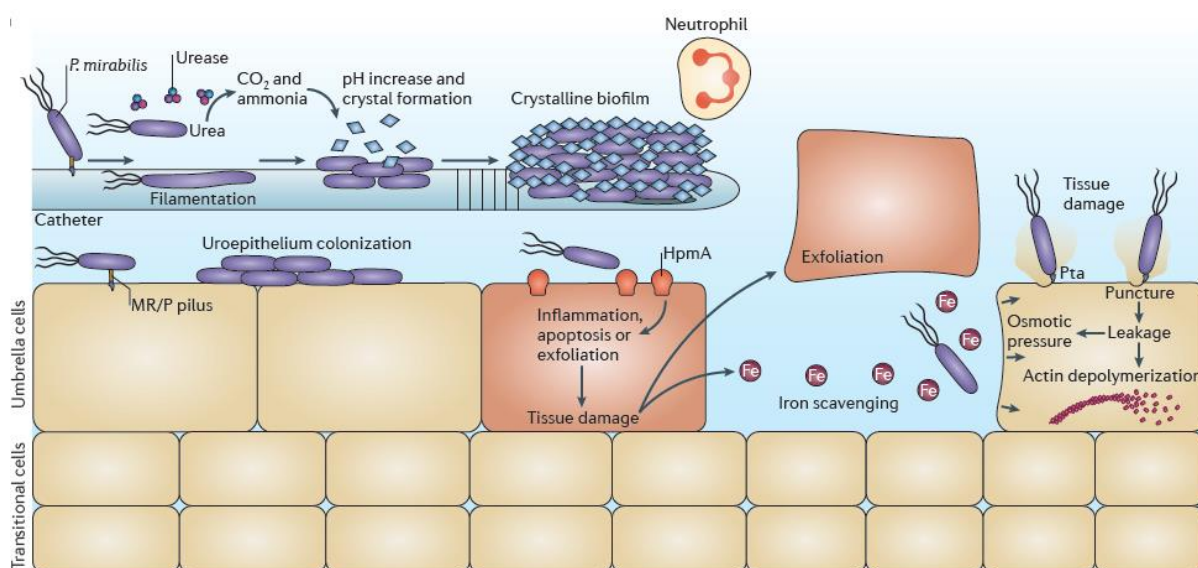


Figura 2. Modelo de colonización e invasión de *P. mirabilis* en el uroepitelio de la vejiga. Las infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres (ITU-c) mediadas por *Proteus mirabilis* dependen de la expresión de pili MR/P para la adhesión inicial y la formación de biofilm en el catéter y la vejiga. La posterior producción de ureasa induce la formación de cristales de calcio y precipitados de fosfato de magnesio y amonio en la orina además de un aumento en el pH. La producción de matriz extracelular por las bacterias adheridas al catéter retiene los cristales, permitiendo la formación de un biofilm cristalino, que protege a las bacterias del sistema inmune del hospedero y de los antibióticos. Tomado de Flores-Mireles 2015

1.4 Principales factores de virulencia relacionados a las ITU

Los microorganismos uropatógenos, como UPEC y *P. mirabilis*, presentan una diversidad de determinantes de virulencia que le permiten la colonización y la invasión en el tracto urinario. Los factores de virulencia se pueden clasificar en i) los relacionados con la adhesión y colonización, ii) la producción de proteasas o toxinas, iii) los que permiten la captación de hierro, y por último, iv) los relacionados con la evasión del sistema inmune (Barber, 2016).

i) Adherencia y colonización

Con el fin de lograr la adhesión en el uroepitelio de la vejiga, tanto UPEC como *P. mirabilis* emplean diversos tipos de adhesinas, fimbriales y no fimbriales. Las fimbrias o pili son apéndices bacterianos que cubren el exterior de la superficie bacteriana. Están formadas por subunidades repetidas de polipéptidos y presentan una adhesina en el extremo externo, que permiten a la bacteria reconocer receptores en el epitelio de la vejiga, que a su vez también median la colonización (Chahales y Thanassi, 2016).

Las fimbrias que presenta UPEC más comúnmente son el tipo 1, Pili P, Pili S y Pili F1C, que son codificadas por los operones *fim*, *pap*, *sfa* y *foc* respectivamente (Bien, 2012). La interacción y expresión de estos operones responde en parte a factores ambientales, lo que le permite a la bacteria expresar de forma variable las fimbrias apropiadas para cada situación (Holden, 2007). La expresión variable dentro de una misma cepa de UPEC puede dar lugar a subpoblaciones que expresen fimbrias funcionalmente distintas, aumentando la probabilidad de adherencia o invasión de los tejidos del hospedador (Holden y Gally, 2004).

Dentro de las fimbrias más estudiadas se encuentran las fimbrias tipo 1 que pertenecen a la familia de las chaperonas (CUP). Las CUP están involucradas en un sistema de secreción bacteriano altamente conservado, la cual facilita el ensamblaje de las fimbrias en la superficie bacteriana mediante la translocación de proteínas (Kline, 2010; Wurpel, 2013). Además de su papel en la interacción con el hospedero, las CUP promueven interacciones bacterianas que favorecen la formación de biofilms (Vallet, 2001). En el genoma de UPEC, se han identificado 38 operones que codifican para CUP, con la posibilidad de que una misma cepa tenga hasta 12 tipos diferentes de fimbrias tipo CUP (Wurpel, 2013). Cada tipo de fimbria tiene en su extremo distal una adhesina específica que reconoce receptores específicos, lo que le permite asociarse con diferentes tipos de células o epitelios, como los de la vejiga o el epitelio renal (Wright, 2006).

Las fimbrias tipo 1 son codificadas por un operón que contiene 9 genes presentes en el cromosoma bacteriano: *fimB*, *fimE*, *fimA*, *fimI*, *fimC*, *fimD*, *fimF*, *fimG*, y *fimH*. Son complejos proteicos tubulares de 0,2 a 2 μm de largo. Se componen de una proteína estructural mayor

(FimA) y en su extremo distal se encuentran varias proteínas menores de adhesión donde se encuentra la adhesina FimH. FimH reconoce a las uroplaquinas, integrinas (alfa 3 y beta 1) y al receptor TLR4 ("Toll-like receptor 4" que forma parte de la inmunidad innata), los cuales se encuentran presentes en todas las células uroteliales (Schilling, 2001; Mossman, 2008). FimH además de mediar la adhesión de UPEC al urotelio, estaría implicado en la internalización de las células del epitelio de la vejiga (Eto, 2007). Las cepas de UPEC son capaces de invadir las células del uroepitelio, persistiendo dentro de ellas como reservorios quiescentes o pueden escapar hacia el citoplasma celular en donde se replican rápidamente formando comunidades bacterianas intracelulares (CBI). Las CBI son estructuras similares a los biofilms con ciclos particulares de desarrollo (Mulvey, 2001; Anderson, 2003; Justice, 2004; Blango, 2014). La internalización a la célula uroepitelial ocurre mediante endocitosis, la cual es iniciada por la activación de una cascada de señales que activa las Rho GTPasas, lo que produce un reordenamiento de los filamentos de actina en la célula epitelial y permite la entrada de la bacteria (Hultgren, 1985; Mulvey, 1998; Martínez, 2002). Éstos pilis participan también en la formación de biofilms (Barber, 2016).

P. mirabilis también presenta varias clases de fimbrias, pudiendo llegar a contener hasta 17 operones fimbriales diferentes que codifican para distintas fimbrias, como se encontró en el genoma de *P. mirabilis* HI4320 (Pearson, 2008). Entre las fimbrias más estudiadas se conocen las fimbrias MR/P (mannose-resistant Proteus-like), UCA (uroepithelial cell adhesin), PMF (*P. mirabilis* fimbriae), ATF (ambient temperature fimbriae) y PMP (*P. mirabilis* P-like pili) (Old, 1982; Nielubowicz y Mobley, 2010; Kuan, 2014).

MR/P es la fimbria mejor caracterizada en *P. mirabilis* hasta el momento. El operon *mrp* (*mrpABCDEFGHJ*) codifica para la subunidad estructural principal (*mrpA*), 4 subunidades menores (*mrpBEFG*), una chaperona (*mrpD*), un adaptador (*mrpC*), una adhesina (*mrpH*) y un regulador transcripcional (*mrpJ*) (Baharani y Mobley, 1993). Esta fimbria participa en la autoagregación, lo que facilita la formación de biofilms y la colonización tanto de la vejiga como de los riñones, siendo relevante para la formación del biofilm en el catéter (Nielubowicz y Mobley, 2010). Al igual que las fimbrias de tipo 1 en UPEC, MR/P presenta una expresión variable (variación de fase) que le permite aumentar la expresión según las condiciones del ambiente (Zhao, 1997). Esto favorece a *P. mirabilis* durante la colonización de la vejiga (Li, 2002).

ii) Producción de proteasas y toxinas

Una vez establecido el microorganismo en la superficie del uroepitelio o en el catéter, los mismos deben adaptarse al ambiente en el tracto urinario y adquirir nutrientes. Para esto, los uropatógenos son capaces de producir enzimas degradativas y toxinas, que más allá de causar un daño al hospedador, tienen como fin el obtener los nutrientes para sobrevivir. Las proteasas son de vital importancia para todas las bacterias. Estas pueden ser secretadas y actuar de forma extracelular o pueden actuar dentro de la misma bacteria (recambio de proteínas y remoción de proteínas dañadas o viejas) (Gottesman, 1996).

E. coli es capaz de producir diversas toxinas, entre ellas la hemolisina (HlyA), el factor citotóxico necrotizante (CNF1), y diversos autotransportadores como la toxina Sat, Pic y Tsh (Flores-Mireles, 2015). Si bien estos factores de virulencia son los más estudiados por su rol en la patogenia, *E. coli* cuenta con varias proteasas que son determinantes de virulencia, como la proteína de membrana externa T (OmpT), identificada como una de las proteasas responsables de la resistencia a péptidos antimicrobianos (Stumpe et al., 1998).

P. mirabilis también produce diversas toxinas y proteasas. Las principales toxinas son la hemolisina (HpmA) y la aglutinina tóxica de *Proteus* (Pta) que están implicadas en el daño al tejido y en la diseminación de la infección a los riñones, causando pielonefritis aguda (Cestari, 2013). HpmA es una citolisina dependiente de calcio que produce poros en la membrana celular causando un eflujo de Sodio (Jacobsen, 2008). Por el contrario, Pta es funcional a pH alcalino, que es inducido por la actividad de la ureasa (Alamuri y Mobley, 2008).

Además de estas toxinas ampliamente caracterizadas, *P. mirabilis* presenta varias proteasas menos estudiadas que contribuyen con la patogenicidad, como por ejemplo la proteasa Lon (también presente en UPEC) que participa en la regulación de la movilidad swarming y en la expresión de diversos genes de virulencia (Clemmer y Rather, 2008).

iii) Captación de hierro

El ambiente de la vejiga es principalmente limitado en hierro, siendo un factor de defensa frente a la invasión de microorganismos patógenos. Los microorganismos uropatógenos, para poder crecer en la orina humana emplean múltiples sistemas que incluyen sistemas de captación de grupos hemo receptores de transferrina o lactoferrina, transportadores de hierro férrico o ferroso y la producción de sideróforos para la obtención de hierro (Fe³⁺) (Ruso, 2001; Cassat y Skaar, 2013). Los sideróforos están compuestos por la maquinaria de ensamblaje, un sideróforo responsable de unirse al hierro y un receptor de membrana que internaliza al complejo sideróforo-hierro (Caza, 2013).

Los sistemas de adquisición del hierro son de vital importancia durante la ITU causadas por UPEC, siendo demostrado en trabajos previos una regulación positiva en la cepa de UPEC

CFT073 durante la infección en un modelo de ITU ascendente en ratones, en comparación con la cepa creciendo en cultivo in vitro estático en LB (Snyder, 2004). En *E. coli* uropatógena hay reportados hasta 10 sistemas de captación de hierro y varios transportadores putativos. Aerobactina, yersiniabactina, enterobactina y salmochelina son algunos sideróforos de este grupo, esenciales en el tracto urinario, con sus receptores correspondientes IutA, FyuA, FepA/Iha y IroN (García, 2011).

El genoma de *P. mirabilis* codifica al menos para 21 sistemas putativos de adquisición de hierro (Pearson, 2008). Estos sistemas incluyen tres formas de captar el hierro: proteobactina (Pbt), un sistema de síntesis de péptidos no ribosomales (Nrp) y α -cetoácidos. *P. mirabilis* también es capaz de usar el sideróforo enterobactina, producido por otras bacterias entéricas (como *E. coli*), ya que no puede sintetizarla por sí mismo (Himpsl, 2010). Además, *P. mirabilis* codifica para genes putativos que están implicados en la captación de hierro ferroso, hierro férrico y citrato férrico y varios receptores dependientes de TonB y sistemas de transporte ABC relacionados con hierro (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 completa del tracto urinario (Iribernagaray, 2021; Chakkour, 2024).

iv) Evasión del sistema inmune

La principal respuesta innata se da a partir de la activación del receptor Toll-like 4 (TLR-4), usualmente por el LPS de bacterias gram-negativas. La estimulación de TLR-4 activa la vía de señalización NF- κ B a través de MyD88, la quinasa asociada al receptor de interleucinas (IL) y otras quinasas en las células epiteliales e inmunitarias epiteliales e inmunitarias del huésped, lo que lleva a la expresión de IL-6 e IL-8 (Hunstad y Justice, 2010). Además del LPS otros productos bacterianos pueden activar los TLR-4 y otros TLRs producidos por las células uroepiteliales y/o efectores inmunitarios residentes del tracto urinario (Hunstad y Justice, 2010). Aunque los pili de tipo 1 y la adhesina FimH promueven la adhesión e invasión bacteriana y la invasión (que a su vez facilitan el reconocimiento de LPS), también estimulan el TLR4 por sí mismos (Ashkar, 2008). El TLR-2 es estimulado por el peptidoglicano, así como por lipoproteínas y quizás OmpA de otros *E. coli* patógenos extraintestinales (Jeanning, 2002). Los TLR-5 son activados por la flagelina bacteriana. La activación de los TLRs promueve la secreción de citoquinas proinflamatorias y quimioatrayentes, reclutando neutrófilos (Hang, 2000).

Los microorganismos patógenos presentan varias estrategias para evadir tanto al sistema inmune como el uso de antimicrobianos. Una de las estrategias de evasión de UPEC es el retraso en el reconocimiento de los PAMPs y por lo tanto de la secreción de citoquinas y quimioquinas inflamatorias uroteliales durante las primeras fases de la infección. Este retraso

impide el reclutamiento de neutrófilos al lumen de la vejiga, lo que le permite a la bacteria invadir las células de uroepitelio (Billips, 2007). Una vez dentro de la célula, puede persistir en el citoplasma de la misma y formar CBI. La modulación por UPEC de la respuesta inmune innata también puede afectar a otras respuestas uroteliales. Entre estas respuestas se encuentran la apoptosis y las vías de señalización dependientes de TLR4 recientemente descritas e implicadas en la invasión intracelular, a través de intermediarios de señalización comunes, como el AMP cíclico y el calcio (Song, 2007).

Otro mecanismo de persistencia y evasión de la respuesta inmune es la capacidad de UPEC de, una vez estando dentro de la célula de la capa transicional, permanecer como un reservorio intracelular quiescente (QIR). En este estado, queda protegida dentro de una membrana en el citoplasma celular, y sin replicarse (Schilling, 2002).

En cuanto a *P. mirabilis*, su principal mecanismo de evasión de la respuesta inmune es la formación de biofilms cristalinos, pero además posee otros factores que le permiten persistir en el tracto urinario, como la variación antigénica, cápsulas, proteasas de IgA y LPS. La proteína flagelina de *P. mirabilis* puede sufrir variaciones antigénicas como mecanismo para evitar una respuesta de los anticuerpos. En ocasiones *Proteus* presenta un polisacárido capsular (CPS o glicocalix), que está muy hidratado y se encuentra en la superficie de la bacteria. Además de participar en la formación de cálculos cristalinos, también participa de forma protectora frente al sistema inmune y a los antibióticos, en la adhesión y en la movilidad swarming (Rahman, 1999).

1.5 Formación de biofilms

Los biofilms son comunidades bacterianas que se encuentran adheridas entre si y/o a una superficie, rodeadas de una matriz extracelular polimérica de producción propia. La matriz está compuesta por agua, polisacáridos, proteínas, ácidos nucleicos, lípidos y otros biopolímeros (Donlan y Costerton, 2002; Sauer, 2022). Si bien los biofilms constituyen el estilo de vida más ampliamente distribuido, también tienen manifestaciones patogénicas que son de gran relevancia en el contexto médico y clínico. Con frecuencia se han descrito como perjudiciales para la salud encontrándose asociados a dispositivos médicos e implantes incluyendo catéteres, así como asociados a enfermedades crónicas (Vasudevan, 2014). La importancia que revisten los biofilms a nivel clínico es principalmente por las poblaciones que conforman el biofilm, ya que presentan resistencia a antibióticos, reducción de la tasa de crecimiento, secreción de diferentes moléculas superficiales y factores de virulencia (Hall-Stoodley & Stoodley, 2009; Vasudevan, 2014). A su vez facilitan la transferencia de genes

entre las bacterias que conformar el biofilm lo que puede conducir a un aumento en el número de cepas virulentas (Michaelis y Grohmann, 2023).

La habilidad de formar biofilm les permite a los microorganismos la persistencia en el tracto urinario, siendo un mecanismo intrínseco de resistencia contra el ambiente desfavorable (la orina, el flujo), los antimicrobianos y el sistema inmune (Niveditha, 2012).

E. coli uropatogénica es capaz de formar biofilm, donde tienen un papel fundamental las adhesinas, como las fimbrias tipo 1 y curli, que permiten la adhesión irreversible (Sharma, 2016). También es importante la adhesina UCA-like (UCL) que participa en la adhesión, estando involucrada en la formación de biofilm y en la unión a las células uroepiteliales (Wurpel, 2016).

La capacidad de formar biofilm es uno de los factores de virulencia más importantes en *P. mirabilis* (Jacobsen, 2008). La producción de diversas fimbrias le permite a *P. mirabilis* iniciar el proceso de formación de biofilm, ya sea sobre la superficie del catéter o del uroepitelio. Las fimbrias MR/P, UCA, ATF y PMF son necesarias para el desarrollo y establecimiento del biofilm (Scavone, 2016).

1. 6 Dinámica de la pared bacteriana

En los últimos años, ha sido centro de atención el estudio de la pared bacteriana, tanto en bacterias gram-negativas como en gram-positivas. Esta observación ha permitido descubrir que la pared bacteriana presenta una gran flexibilidad, tanto en las funciones que cumple como en la dinámica de sus componentes. En el caso de los microorganismos gram-negativos, la envoltura bacteriana está conformada por una membrana citoplasmática o interna, una capa de peptidoglicano y por fuera una membrana externa (figura 3). El espacio entre ambas membranas se denomina espacio periplásmico. La composición particular de la pared bacteriana en gram-negativas permite a la bacteria la producción constante de vesículas de membrana externa (VME) (Beveridge, 1999).

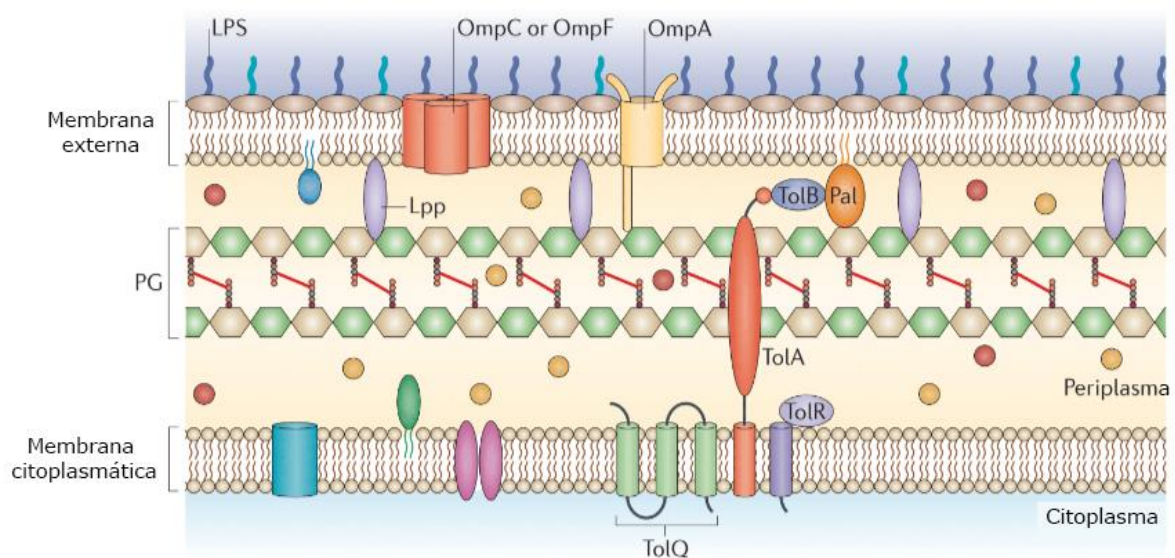


Figura 3. Composición de la envoltura bacteriana y las principales proteínas que interactúan con la misma. La envoltura celular de las bacterias Gram negativas consta de dos membranas, la membrana externa y la membrana citoplasmática. Entre las dos membranas se encuentra el espacio periplásmico, que contiene una capa de peptidoglicano y proteínas periplásmicas. Dentro de las proteínas que se encuentran en la envoltura, algunas participan en la estabilidad de la misma, como el complejo Tol-Pal, OmpA y Lpp. Modificado de Schwechheimer, 2015

1. 7 Vesículas de Membrana Externa

1.7. 1 Biogénesis y estructura

La producción de las VME se ha reportado a partir de cultivo de planctónicas, biofilms, dentro de hospederos mamíferos, incluso dentro de células eucariotas. También se han observado en una gran diversidad de ambientes, incluyendo en agua dulce y salada (Beveridge 1997; Beveridge, 1999; Hellman, 2000; Biller, 2014). La particularidad de estas vesículas es que brotan de la superficie de la envoltura bacteriana midiendo entre 20 y 300 nm de diámetro y contienen componentes del espacio periplásmico (Kulp, 2010).

La formación de VME puede ser activada gracias a diversos mecanismos regulatorios que poseen las bacterias. Entre estos mecanismos regulatorios se encuentran los relacionados a la respuesta al estrés en la envoltura bacteriana, estrés químico y pérdida de la integridad (sistema Tol-Pal), la alteración en la estructura de los peptidoglicanos, entre otros (McBroom, 2007; Moon, 2012; Schwechheimer, 2014). La generación de vesículas puede darse por dos

vías, la primera es por brotamiento de la membrana externa (Figura 4), lo que implica una selección diferencial del contenido de las VME; la segunda es por lisis celular, donde el material citoplasmático es contenido por la recircularización de fragmentos de la pared bacteriana (figura 5).

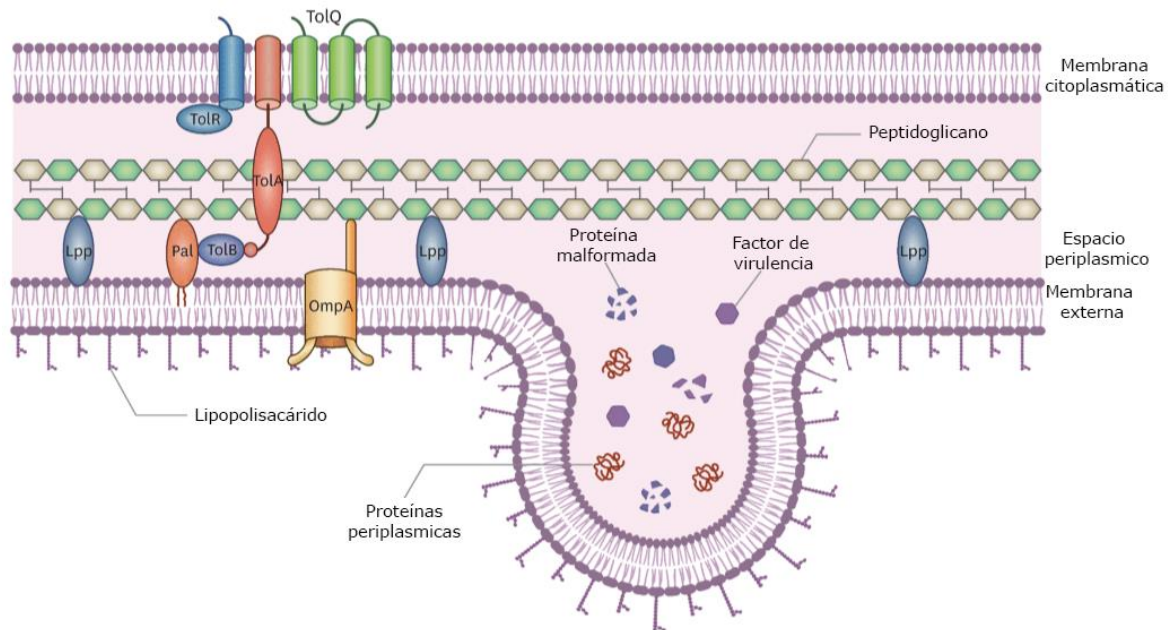


Figura 4. Mecanismo de producción de VME a partir del brotamiento de la membrana externa en bacterias gram-negativas. Para estabilizar la integridad de la membrana, la lipoproteína de Braun (Lpp) modula la membrana externa y el peptidoglicano (PG). También la proteína membrana externa A se une de forma no covalente a la capa de PG. El complejo Tol-Pal formado por proteínas citoplasmáticas, la proteína periplásmica (TolB) y la lipoproteína de la membrana externa (Pal, lipoproteína asociada al peptidoglicano) une la envoltura de la pared celular. La VME se genera a partir de la membrana externa mediante varios mecanismos, entre los que se incluyen la reducción de los enlaces cruzados de la envoltura de la pared celular, la remodelación del LPS, y un modelo de bicapas de lípidos mediante el aumento de la fluidez de la membrana externa. Las proteínas periplásmicas, incluidos varios factores de virulencia y desechos celulares como proteínas mal plegadas se empaquetan en las VME como carga y se secretan. Modificado de Yeon Kim, 2022

Si bien en gram-negativas la producción es principalmente de VME, pueden producirse también vesículas de membrana externa-interna (VME-I) y vesículas de membrana citoplasmática (VMC) (Toyofuku, 2019; Nagakubo, 2020). La producción de VME ocurre en todas las etapas de crecimiento bacteriano, tanto *in vitro* como *in vivo*, (Kuehn, 2005) pero son más abundantes en respuesta al estrés (McBroom y Kuehn, 2007; Maredia, 2012; Macdonald y Kuehn, 2013). A pesar de seguir sin descifrarse los mecanismos por los cuales la bacteria desencadena la producción de VME, varios autores consideran que existe una

base genética detrás del mecanismo de producción y su regulación (McBroom y Kuehn, 2007; Macdonald y Kuehn, 2013). Las vesículas protruyen desde la superficie conteniendo material periplásmico, LPS, fosfolípidos, proteínas de membrana externa, ADN, ARN, señales de quorum sensing y factores de virulencia (Mashburn, 2005). La producción y la selección de la carga también estarían determinadas según el ambiente en el cual la bacteria se encuentre (Orench-Rivera y Kuehn, 2016).

Las vesículas que se generan por la segunda vía, se forman a partir de la lisis celular y generalmente poseen membrana interna y un enriquecimiento en componentes del citoplasma (Kato, 2002; McBroom, 2006).

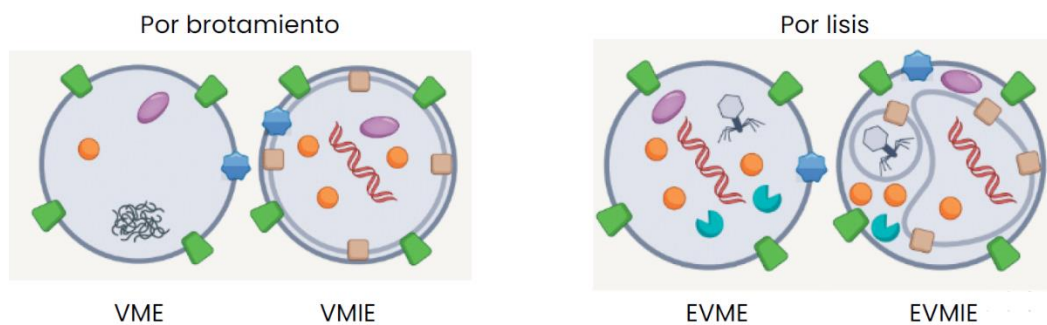


Figura 5. Tipos de vesículas de membrana según su biogénesis en bacterias gram-negativas. Las vesículas que se producen en forma de brote pueden ser a partir de membrana externa (VME) o presentar ambas membranas, interna y externa (VMIE). El brote de la membrana externa es resultado de alteraciones de la envoltura celular como una biosíntesis desequilibrada de peptidoglicanos, la acumulación de proteínas desnaturalizadas o la intercalación de moléculas hidrófobas en la membrana externa que lleva a la producción de VME. Las VME con membrana interna-externa (VMIE) se forman por un mecanismo de brotamiento que comienza con el debilitamiento de la capa de peptidoglicano por una autolisina y la posterior protrusión de la membrana interna en el periplasma. Las vesículas que se producen por lisis bacteriana pueden tener similar envoltura, pero la carga de las mismas es más similar a lo que hay en el citoplasma bacteriano. Por este motivo pueden tener membrana externa (EVME) o ambas membranas (EVMIE). Modificado de Toyofuku, 2023

1.7. 2 Funciones biológicas

Las VME actúan en las bacterias de forma similar a los sistemas de secreción y *delivery*, lo que le brinda a la bacteria la capacidad de secretar diversos compuestos insolubles como lípidos, proteínas de membrana, entre otros. Uno de los ejemplos más claros son las adhesinas, que su secreción mediante vesículas facilita la coadherencia y coagregación de

las bacterias entre sí o con diversas superficies (Kulp, 2010). Por otro lado, las proteínas solubles pueden ser liberadas en un complejo que las proteja de la degradación, lo cual permite su acción a una mayor distancia y por más tiempo. También las VME permiten que las proteínas sean liberadas a altas concentraciones y en gran proximidad a los objetivos (Kulp, 2010).

Las VME secretadas por la bacteria son capaces de ser diseminadas lejos de la bacteria y participar en diversas funciones biológicas, tanto en el ambiente como en otras células, incluyendo el desarrollo de biofilms, virulencia, quorum sensing, adquisición de nutrientes, resistencia a fagos y transferencia horizontal de genes (Tashiro, 2012). Los microorganismos interactúan en las comunidades microbianas o biofilms y estas interacciones incluyen funciones tanto cooperativas como ofensivas (Tashiro, 2013). Las VME tienen un papel relevante en las interacciones microbianas dado que pueden transferir su contenido a otros microorganismos, inclusive a larga distancia (Tashiro, 2017). Incluso, las VME estarían involucradas en la transferencia de ADN, como un mecanismo más de la transferencia horizontal de genes (Fulsundar, 2014; Ho, 2015). Algunos estudios sugieren que la presencia de VME estaría relacionada con la capacidad de formación del biofilm. Yonesawa y colaboradores encuentran en su trabajo que *Helicobacter pylori* presenta mayor capacidad de formar biofilm cuando hay presencia de VME en el mismo (Yonezawa, 2009). La presencia de VME ha sido detectada en biofilms microbianos en interacción con ADN extracelular (ADNe) en los componentes de la matriz, posiblemente para aumentar la integridad estructural y para actuar como inactivadores de antibióticos (Schooling, 2006). Manning y colaboradores observaron que a pesar de que la tasa de liberación de VME por bacterias gram negativas como *Escherichia coli* y *Pseudomonas aeruginosa*, ocurre en ausencia de estrés por la presencia de antibióticos, esta se incrementa significativamente en respuesta a colistina y polimixina B. La liberación de VME actúa como señuelo para estos antimicrobianos, permitiendo a la bacteria sobrevivir a concentraciones de antibióticos que normalmente serían letales. Esto se debe en parte a que la superficie de las vesículas es muy similar a la membrana externa de las bacterias, por lo que hay más blancos de acción a los cuales antibióticos cuyo blanco es la pared bacteriana (como la polimixina o la colistina) pueden unirse (Manning, 2011). En el caso de *Vibrio cholerae*, las VME inhibieron la infección por bacteriófagos, lo que indica que las VME actuarían también como blanco, desviando a los bacteriófagos de la bacteria (Reyes-Robles, 2018). Este podría ser un mecanismo de defensa de las bacterias frente a agentes antimicrobianos y bacteriófagos. En el caso de *E. coli*, Kim y colaboradores encontraron que las VME proveniente de *E. coli* resistente a antibióticos betalactámicos permite la supervivencia de *E. coli* susceptible frente a éste antibiótico. Esto podría explicarse porque las VME podrían cargar con betalactamasas, las cuales son

liberadas brindando protección a las cepas sensibles y por el efecto de señuelo donde las VME aumentan el blanco de acción (Kim, 2018).

Por lo tanto, se ha descrito a las VME como mecanismos de patogenicidad y defensa. Son capaces de actuar sobre los tejidos del hospedero y sobre las células en una infección, pero también pueden actuar de forma defensiva contra ATB y bacteriófagos (MacDonald, 2012).

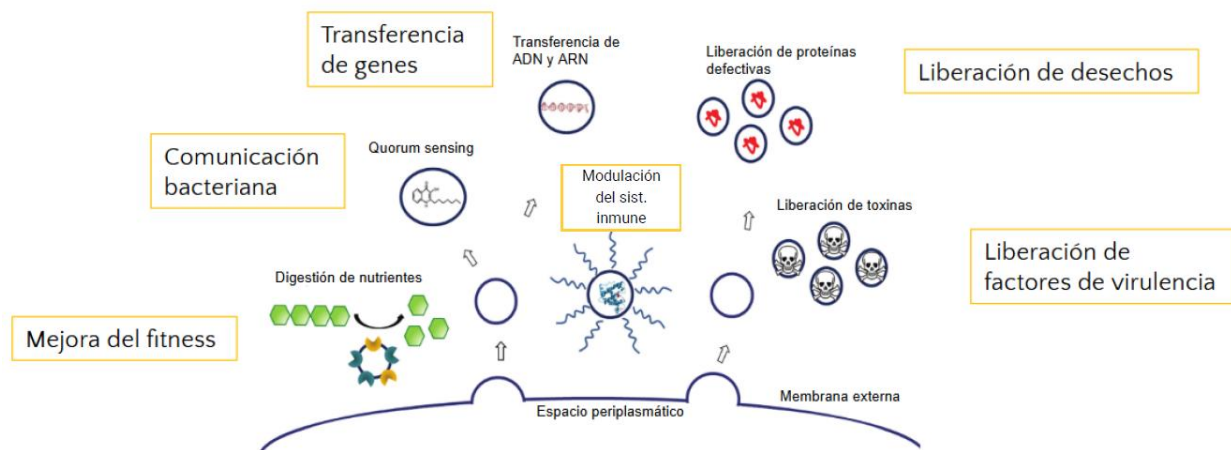


Figura 6. Las diferentes funciones biológicas en las que están implicadas las VME. Modificado de Haurat, 2015

1.7. 3 VME en Uropatógenos

La capacidad natural de producir VME en bacterias uropatógenas, podría implicar un nuevo mecanismo de virulencia. Ya existen reportes que describen la producción de VME en *Escherichia coli* uropatógena (Davis, 2006; Blenkiron, 2016). Blenkiron y colaboradores demostraron la capacidad de la cepa *E. coli* 536 de liberar VME, publicando por primera vez que las VME contienen ARN y que éstas son internalizadas en cultivo de células. A su vez, otros autores encontraron que además del ARN, las vesículas podrían actuar como *delivery* de diferentes toxinas como el factor citotóxico necrotizante CNF-1, la alfa-hemolisina y la toxina tipo shiga (Kouokam, 2006; Bielaszewaska, 2013; Blenkiron, 2016). Estas toxinas actúan sobre las células epiteliales promoviendo la apoptosis de las células y causando daño tisular.

En cuanto a *P. mirabilis* y la producción de VME, hay pocos reportes sobre la producción de VME y menos sobre su posible función en la patogenia de *P. mirabilis* en el tracto urinario. Las VME de *P. mirabilis* son capaces de actuar de forma negativa en la calidad del esperma de cerdo, afectando la función de los espermatozoides (Gao, 2018). En estudios sobre la osteoporosis, determinaron que las VME de *P. mirabilis* son capaces de inhibir la formación

de nuevos osteoclastos, lo que impide la pérdida ósea (Wang, 2022). No existen hasta el momento trabajos sobre la composición de las VME de *P. mirabilis* y su contenido proteico. Por otro lado, estudios realizados por nuestro grupo de investigación empleando microscopía electrónica de barrido (MEB) para el estudio de *E. coli* uropatogénica y de biofilms de *P. mirabilis* mostraron la presencia de potenciales VME (figura 7). En la figura 7 superior se observa una imagen de *E. coli* a distintas magnificaciones en donde se observa la presencia de VME. En los paneles inferiores se muestran imágenes de un biofilm de *P. mirabilis* de 3 y 6 días de formación. En el centro de la imagen se observa la presencia de varias vesículas sobre la superficie bacteriana. En la última imagen se observa un grupo de vesículas rodeadas por bacterias.

Cabe destacar que la superficie de las bacterias se encuentra alterada posiblemente por el estadio del biofilm en el que se encuentran (día 6) que corresponde a la etapa de dispersión y se puede observar muerte bacteriana. A pesar de esto las vesículas se observan en perfecto estado.

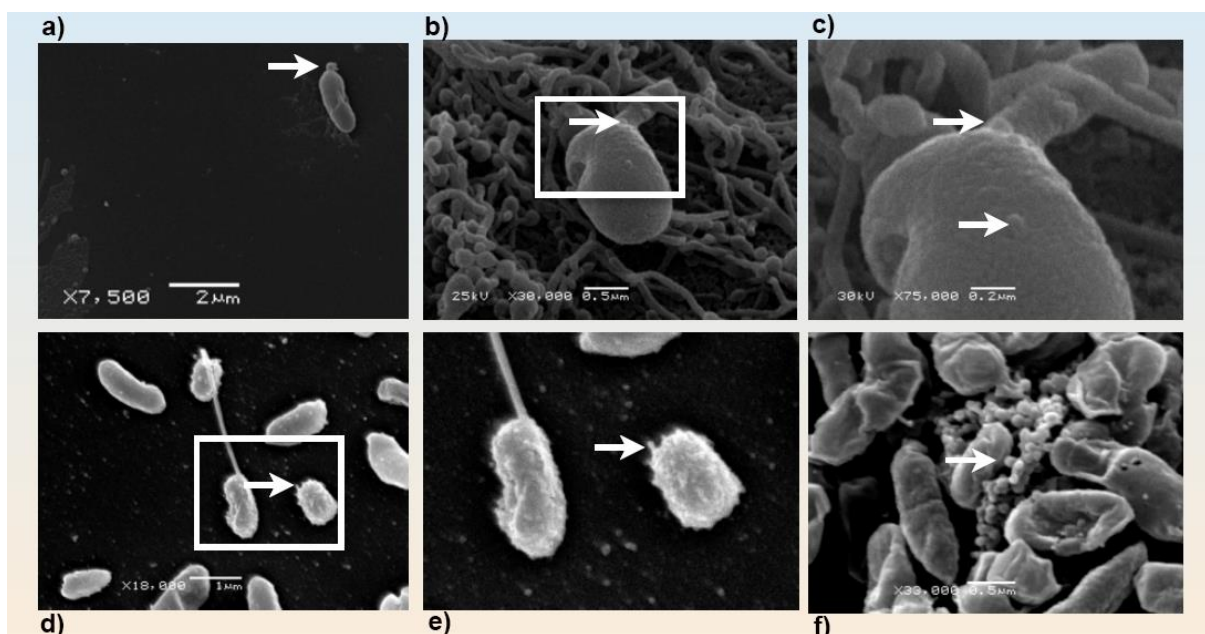


Figura 7. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de a) cultivo de *E. coli*, b y c) *E. coli* en cultivo de células eucariotas y zoom de la zona marcada, d) biofilm de *P. mirabilis* de 3 días de formación, e) zoom de la zona marcada y f) biofilm de *P. mirabilis* de 6 días de duración. Las flechas indican las vesículas de membrana.

Un mejor entendimiento del rol que cumplen las VME en la patogenia de las bacterias uropatogénicas permitirá profundizar en el estudio de nuevas estrategias de prevención y tratamiento contra las ITU.

2. Hipótesis del trabajo

Las bacterias uropatógenas, como *Escherichia coli* y *Proteus mirabilis*, producen vesículas de membrana externa (VME) cuya carga y función varían según las condiciones ambientales. Las VME median la comunicación tanto intraespecie como interespecie entre las bacterias.

3. Objetivos

El presente trabajo tiene como objetivo general evaluar la producción y composición de las vesículas de membrana externa de *E. coli* y *P. mirabilis* uropatógenas, así como su posible función en la comunicación bacteriana.

3.1 Objetivos específicos

Obtener vesículas de membrana externa de bacterias uropatógenas, a partir de cultivos en medio Luria-Bertani y orina artificial.

Caracterizar las vesículas de membrana externa producidas en ambos medios de cultivo.

Identificar y analizar el contenido proteico de las vesículas de membrana externa.

Analizar el papel de las vesículas en la comunicación bacteria-bacteria intra e interespecie.

4. Materiales y métodos

4. 1 Cepas bacterianas.

Las cepas uropatógenas empleadas en este trabajo provienen de aislamientos clínicos de ITU, fuertes formadoras de biofilm: *E. coli* U144 y *P. mirabilis* 2921. Ambas cepas han sido ampliamente caracterizadas previamente por nuestro grupo de trabajo (Robino, 2014a; Zunino, 2000). Para los ensayos de comunicación se emplearon además las cepas de *E. coli* U7 y ATCC 8739 (Robino, 2013).

4. 2 Condiciones de cultivo

Las cepas fueron conservadas en caldo Luria-Bertani y glicerol (20%) a -80°C y recuperadas en Luria-Bertani agar e incubadas a 37°C.

Los medios de cultivo empleados para la obtención de VME fueron caldo de Luria Bertani (LB) y orina artificial (OA) compuesta por 0.49 g/L de CaCl₂, 0.65 g/L de MgCl₂, 4.6 g/L de NaCl, 2.3 g/L de Na₂SO₄, 0.65 g/L de citrato de sodio, 0.02 g/L de oxalato de sodio, 2.8 g/L de KH₂PO₄, 1.6 g/L de KCl, 1.0 g/L de NH₄Cl, 25 g/L de urea, y 1.0 g/L de caldo de tripticasa de soya. Posteriormente se ajusta el pH a 6.2. La OA fue esterilizada empleando filtros de membrana Millipore de 0.45 µm (Soriano, 2009).

Los recuentos bacterianos realizados luego de los cultivos overnight, se realizaron a partir de diluciones de las bacterias planctónicas, en medio Luria-Bertani agar en el caso de *E. coli*, y en agar nutritivo, para *P. mirabilis*. La única excepción es el recuento de *P. mirabilis* a partir de OA, donde se siembran 100 µl de forma incorporada.

4. 3 Obtención de VME nativas

Las vesículas fueron obtenidas siguiendo el protocolo descrito previamente (Tahiro, 2017) con algunas modificaciones. El procedimiento consistió en obtener las VME a partir de un cultivo bacteriano en 100 ml de medio LB o OA incubado durante 24 hs a 37°C, en agitación a 200 rpm. Luego, el cultivo fue centrifugado por 15 min a 6000 x g a 4°C para remover las bacterias. El pellet bacteriano se descartó y el sobrenadante se filtró por 0,45 µm y posteriormente por 0,22 µm para eliminar cualquier resto bacteriano. El sobrenadante con las VME fue ultracentrifugado por 2 hs a 100.000 x g a 4°C, usando un rotor de ángulo fijo (90 Ti, Beckman). De esta manera se concentran las VME dispersas en el medio de cultivo. Las vesículas se encuentran en el pellet obtenido que posteriormente se dejó secar a temperatura

ambiente y se resuspendió en HEPES 50 mM y 0,85% de Cloruro de Sodio (buffer HEPES-NaCl).

4. 4 Purificación de las VMEs

Para purificar las VMEs obtenidas y eliminar cualquier resto de proteínas solubles que pueda haber quedado en el medio de cultivo, se realizó una purificación mediante separación por gradiente. Para esto se utilizó la solución comercial OptiPprep™ (Sigma) que consiste en una solución de iodixanol en agua con una densidad de 1.32 g/ml. Las muestras de VME se ajustaron a 1 ml de iodixanol al 45% (p/v) en HEPES-NaCl, y se transfirieron al fondo de los tubos de ultracentrífuga. Posteriormente, la muestra fue cubierta con capas de iodixanol-HEPES-NaCl de 2 ml cada una, al 40, 35, 30, 25, y 20% generando un gradiente de densidad. Las muestras fueron ultracentrifugadas durante 3 hs a 100,000 x g a 4°C en un rotor swing (sw 40 Ti, Beckman). Luego se tomaron fracciones de 1 ml de cada gradiente. Para confirmar las fracciones donde se encuentran las VME, se cuantificó la cantidad de proteínas mediante el método de cuantificación de Bradford y la absorbancia en UV-Vis a 280 nm. Las fracciones que contienen las VMEs fueron utracentrifugadas por 2 hs a 100.000 x g a 4°C y resuspendidas en HEPES-NaCl.

4. 5 Marcado de las vesículas con fluoróforo

Para el marcado de las VME se empleó el fluoróforo FM4-64 (Invitrogen) el cual es específico para vesículas de membrana ya que es un fluoróforo lipofílico empleado para la visualización de dichas estructuras. Para marcar las VME se incubaron las mismas (200 µg/ml de proteínas) con 5 µg/ml de FM4-64 durante 30 min y posteriormente se ultracentrifugaron por 2 hs a 100.000 x g a 4°C y resuspendieron en PBS (buffer fosfato salino) dos veces. Posteriormente, se resuspendieron en buffer HEPES-NaCl y se conservaron a -20 °C hasta su uso.

4. 6 Caracterización de las VME

4. 6. 1 Dispersión por luz dinámica (DLS)

Con el fin de caracterizar el tamaño y la carga superficial de las VME, se empleó la técnica de dispersión de luz dinámica (DLS), donde se determinó el radio hidrodinámico y el índice de polidispersidad (Pdl). Por otro lado, el potencial zeta se midió mediante electroforesis láser doppler en un Zetasizer ZS (Malvern Instruments), con una fuente luminosa de láser He-Ne a una longitud de onda de 633 nm con un ángulo de dispersión fijo de 175°. Las muestras de

VME fueron diluidas en agua ultrapura milli-Q y las medidas se realizaron en una cuba DTS1070.

4. 6. 2 Análisis de seguimiento de nanopartículas (NTA)

La concentración de las VME se determinó mediante la técnica de NTA. Todas las determinaciones fueron realizadas por triplicado a 25°C, a partir de las capturas de vídeo para cada muestra. El equipo empleado fue un Nanosight NS300 (Malvern Instruments). La dispersión de la luz fue capturada por una cámara sCMOS. Las muestras se diluyeron 1/100 y filtradas en agua ultrapura Milli-Q. El radio hidrodinámico, la concentración y el desvío estándar obtenido corresponde a los valores aritméticos de todas las partículas analizadas de la muestra por el software del NTA.

4. 6. 3 Microscopía electrónica de transmisión (TEM)

Para la visualización mediante TEM las muestras primero fueron diluidas en un factor 1/100. Se colocaron 20 µL sobre una rejilla de cobre para TEM durante 2 minutos. Luego se retiró todo lo que no se adhirió a la rejilla mediante un lavado con agua. Por último, se le agregó 20 µL de ácido fosfotúngstico a la muestra y se incubó 2 minutos a temperatura ambiente, se retiró el ácido y se dejó secar. La visualización se realizó con el microscopio electrónico de transmisión de barrido Inspect F50 con un voltaje de 10.00 kV (FEI, Hillsboro, OR, USA).

4. 7 Proteómica de las VME

4. 7. 1 Perfil proteico

Las muestras de VMEs para proteómica se resuspendieron en buffer de almacenamiento conteniendo: inhibidores de proteasas 1X (Pierce), BME (beta-mercaptoetanol) al 5 % y Tween 20 al 0,1%. Con el fin de asegurar la extracción de las proteínas, le agregamos al buffer de almacenamiento NaCl 150 mM; Tris 150 mM, pH 6,8 y HEPES 10X. Por último, se congeló y descongeló 2 veces, vortexeando durante 5 min.

Para observar el perfil proteico de las VME en las dos condiciones de cultivo se realizó un gel SDS-PAGE. Con este propósito, se añadieron 6 µl de buffer de carga 4X (250 mM Tris.Cl, 8% SDS, 40% glicerol, 0.04% bromofenol blue y 10% BME) a 18 µl de cada muestra y se calentaron durante 10 min a 100 °C. Luego, las muestras se cargan en el gel comercial prefabricado (NuPAGE™ 4–12%, Bis-Tris, 1.0 mm, Mini Protein Gel, 10 pocillos, Invitrogen). Como marcador estándar de peso molecular se empleó el LMW-SDS Marker Kit (Cytiva), cargándose al gel 5 y 2.5 µl del mismo. El gel se corrió a 150 V durante 45 min. Posteriormente, el gel se fijó con EtOH al 50% y ácido acético al 10%, durante 20 min a

temperatura ambiente, con agitación suave y luego fue teñido con azul brillante de Coomassie (40 ml de solución stock 5X y 10 ml de EtOH 95%). Con el fin de poder observar las bandas, se procedió a desteñir el gel con agua ultrapura y a escanear el mismo con el equipo UMAX Power-Look 1120 (GE Healthcare), empleando el software LabScan 5.0 para digitalizar las imágenes.

4. 7. 2 Análisis de espectrometría de masas por digestión en gel.

Con el fin de analizar el proteoma de las VME se realizaron 4 réplicas biológicas de VME obtenidas de forma independiente. Para el procesamiento de las muestras, en primer lugar, se concentraron las proteínas en el SpeedVac (Thermo Fisher) a temperatura ambiente. Luego, se resuspendieron en 50 µl de buffer de carga y se incubaron durante 10 min a 95°C. Una vez prontas las muestras de proteínas concentradas, se corrieron 24 µl de cada una en gel de poliacrilamida 12,5% a 10 mA por gel, hasta que las muestras avanzaron hasta 1 cm del gel separador. Una vez finalizada la corrida, el gel fue fijado, teñido y desteñido como se menciona anteriormente. Luego se cortan, con un bisturí estéril, cada carril del gel en 4 fragmentos y se transfieren a tubos Eppendorf estériles y libres de proteasas. Cada carril fragmentado es desteñido al incubarlos con 0,2 M de bicarbonato de amonio y acetonitrilo (1:1) durante 1 hora a 30°C y en agitación.

4. 7. 3 Digestión proteolítica en gel y extracción de péptidos.

Una vez desteñido el gel, se agregaron 200 µl de DTT (ditiotreitól) 10 mM en 0.2 M de bicarbonato de amonio y se incubaron a 56°C por una hora en agitación. Luego de descartar la solución, se agregó 55 mM de iodoacetamida en 0.2 M de bicarbonato de amonio y se incubó a 25°C durante 45 min en agitación protegido de la luz. Para lavar el gel, se agregó dos pasos de incubación con 0.2 M de bicarbonato de amonio a 25°C por 5 min en agitación. Por último, se agregó acetonitrilo puro por 5 min a 25°C en agitación, hasta observar el gel bien seco y de color blanco.

Una vez que el gel estuvo listo para la digestión, se agregaron 10 µl de solución de tripsina (0.1 µg/ml de tripsina en bicarbonato de amonio 50 mM) a cada banda. Esto corresponde a una relación enzima/proteínas de 1:20. Se rehidrató el gel y se incubó overnight a 37°C. Para la extracción de péptidos, se agregó la solución de acetonitrilo 60%/TFA (Ácido trifluoroacético) 0,1% y se incubó durante una hora a 30°C en agitación. El sobrenadante fue transferido a un nuevo tubo y secado en el SpeedVac por 45 minutos a la misma temperatura.

4. 7. 4 Limpieza y preparación de muestras.

Para resuspender los péptidos se le añadió 20 µl de fase A (ácido fórmico 0.1% en agua ultrapura calidad MS) a cada tubo y se sonicó por 15 min en un baño de ultrasonido. Para concentrar y purificar las muestras para la espectrometría de masas, se emplearon los ZipTip® Pipette Tips (Millipore) comerciales C18. El proceso para cada muestra constó de 5 pasos: 1) La activación de la resina, aspirando y descartando 20 µl de la solución de acetonitrilo 50% en agua. 2) la equilibración, pasando la solución de fase A por la resina. 3) La toma de muestra pipeteando 10 veces. 4) El lavado con solución de fase A nuevamente. 5) La elución de los péptidos, pasando por la resina 20 µl de fase B (ácido fórmico 0.1% en acetonitrilo), eluyendo directamente en el tubo vial. Por último, se secaron las muestras en el SpeedVac y se resuspendieron las muestras con fase A.

Para estandarizar la concentración de péptidos a cargar en el LC-MS/MS, se escanearon previamente los geles y se realizó una cuantificación relativa entre las distintas muestras, tomando como estándar la muestra con menor concentración. Esta cuantificación se realizó usando el software ImageQuant TL (v8.1), con el módulo de análisis 1D. En función de lo obtenido, se resuspendieron las muestras con diferentes volúmenes de fase A, para obtener la misma concentración de péptidos.

4. 7. 5 Carga de muestras al espectrómetro de masas.

Las muestras fueron analizadas en un nano-LC MS/MS usando la estrategia de shotgun en un nano-HPLC UltiMate 3000 acoplado en línea a un espectrómetro de masas Q-Exactive Plus (Q-Orbitrap). 5 µl de los péptidos extraídos son inyectados en una nano columna Acclaim PepMapTM 100 C18 (75 µm x 2 cm, tamaño de partícula de 3 µm, Thermo) y se separaron utilizando una columna analítica PepMapTMRSLC C18 de 75 µm x 50 cm (2 µm de tamaño de partícula, 100 Å) a un flujo constante de 250 nL/min y 40 °C. La columna se equilibró al 1% de fase móvil B (A: ácido fórmico al 0,1%; B: ácido fórmico al 0,1% en acetonitrilo) seguida de un gradiente de elución del 1% al 35% de B durante 90 min y del 35-99% de B durante 20 min.

4. 7. 5 Identificación y análisis de proteínas

La identificación de los péptidos y proteínas se realizó con el software PatternLab for Proteomics (versión 4.0) (<http://www.patternlabforproteomics.org>). Los datos espectrales MS/MS analizados se consultaron con la base de datos de los proteomas de referencia en UniProt de *E. coli* CFT073 y *P. mirabilis* HI4320. Los análisis estadísticos posteriores se realizaron con las proteínas obtenidas de XIC (Extracted Ion Current). Las proteínas identificadas fueron analizadas por el método de máxima parsimonia. Con el Módulo Buzios

de PatternLab se realizó un análisis de componentes principales (PCA) con el fin de evaluar las réplicas biológicas, eligiendo las tres mejores. Para comparar las proteínas identificadas en los medios LB y OA se utilizó el módulo Diagrama de Venn de Área Aproximadamente Proporcional de PatternLab, que determinó que proteínas se detectaron únicamente en cada muestra usando un p-valor de 0.05. Para determinar una diferencia significativa en la abundancia de las proteínas compartidas en los dos medios de cultivo se empleó el módulo Volcano Plot, empleando el estadístico PWC (Pairwise comparison).

Para evaluar la posible localización subcelular de las proteínas encontradas en las VME, se analizó *in silico* el origen subcelular de las mismas mediante el algoritmo PSORTb v3.0 (Yu, 2010).

4. 8 VME en la Comunicación entre bacterias

El grado de asociación de las vesículas fue determinado por la capacidad de las bacterias de asociar a su pared bacteriana las vesículas. Las bacterias sin marcar son incubadas con VME fluorescentes, y si son capaces de asociar las VME a su pared celular, la fluorescencia se transfiere a las bacterias. Para esto se partió de cultivos overnight de *E. coli* 144, *P. mirabilis* 2921 y *E. coli* ATCC, resuspendiendo los mismos en PBS a una DO de 0,5. Se repartieron las suspensiones en tubos Eppendorf con 1 ml, donde se agregaron 20 ug/ml de VME marcadas con FM4-64 y se incubaron durante 30 minutos, 1, 3 y 5 horas a 37°C. Cada aislamiento fue incubado con las VME producidas tanto en LB como en orina. Además, *E. coli* se incubó con las VME de *P. mirabilis* producidas en LB y viceversa. La cepa de *E. coli* ATCC fue incubada con las VME producidas en medio LB, tanto de *E. coli* 144, como de *P. mirabilis*. Luego de cumplido el tiempo de incubación se realizaron 3 lavados con PBS, centrifugando 15 min a 10000 rpm para eliminar las VME que no se asociaron. La fluorescencia se midió en el lector de placas Varioskan donde la excitación es a 515 nm y la emisión a 640 nm. La fluorescencia fue relativizada respecto al control de las bacterias sin incubar con las VME.

4. 9 Rol de las VME en la formación de biofilm

Con el fin de evaluar si las VME participan en la formación del biofilm, en este ensayo las bacterias son incubadas con las VME durante el tiempo en el que forman el mismo. Si existe alguna participación de las VME en este proceso, se podrá evaluar en un aumento o disminución de la biomasa del biofilm. La cuantificación de biomasa del biofilm de cada cepa se realizó por la técnica de cuantificación por cristal violeta en placas de microtitulación de 96 pocillos. Este procedimiento consiste en cultivar una suspensión de las cepas en las placas con LB a 37°C por 48 hs, para permitir la formación del biofilm, que se da en la superficie del

pocillo. El inóculo bacteriano empleado fue el mismo para todas las cepas con el fin de poder comparar y clasificar las mismas. Al momento de colocar el inóculo, se colocó también la suspensión de VME correspondiente a 20 µg/ml. *E. coli* 144, *P. mirabilis* 2921 y *E. coli* U7 fueron incubadas con las VME obtenidas de *E. coli*, *P. mirabilis* y la mezcla de ambas (ver tabla 1). A las 48 hs se eliminan las bacterias planctónicas y las VME, retirando el medio y lavando con PBS. Luego se procede a agregar cristal violeta durante 15 minutos y se lava posteriormente con PBS de forma de retirar el exceso del mismo. El CV que queda retenido en el biofilm y en la matriz extracelular es solubilizado mediante el agregado de etanol 95%. La cuantificación se realiza a través de la medida de la densidad óptica a 590 nm (DO) por espectrofotometría, esto permite obtener una medida semicuantitativa de la cantidad de biomasa del biofilm. Cada ensayo se realizó por triplicado y dos veces de manera independiente. Los resultados se compararon usando el test estadístico de Kruskal-Wallis y se consideró significativo cuando el p valor $\leq 0,05$.

Tabla 1. Cepas empleadas para el ensayo de comunicación bacteriana (Com) y para la formación de biofilm (BF) y con qué muestras de VME fueron incubadas

Bacterias/VME	<i>E. coli</i> 144 (VME en LB)	<i>E. coli</i> 144 (VME en OA)	<i>P. mirabilis</i> 2921 (VME en LB)	<i>P. mirabilis</i> 2921 (VME en OA)
<i>E. coli</i> 144	Com y BF	Com	Com y BF	
<i>P. mirabilis</i> 2921	Com y BF		Com y BF	Com
<i>E. coli</i> ATCC	Com		Com	
<i>E. coli</i> U7	BF		BF	

Com: ensayo de asociación de las VME con las bacterias; BF: ensayo de formación de biofilm.

5. Resultados

5. 1 Caracterización de las VME de *E. coli* 144 y *P. mirabilis* 2921 en medio LB y OA

Una vez realizado el protocolo de obtención y purificación de las VME de *E. coli* en medio LB (EcLB) y orina artificial (EcOA) y las VME de *P. mirabilis* en medio LB (PmLB) y orina artificial (PmOA), se obtuvo una suspensión concentrada de cada condición. Para determinar la presencia de VME se realizó la caracterización completa de las mismas empleando diversas técnicas.

5. 1. 1 Visualización de las VME por Microscopía Láser Confocal.

Con el fin de realizar una visualización exploratoria de las VME obtenidas, se marcaron con el fluoróforo lipofílico FM4-64, para observarlas en el Microscopio Láser Confocal (MLC) empleando el sistema de súper resolución AiryScan V1. Si bien es imposible cuantificar la cantidad o medir el tamaño de las VME, podemos determinar la presencia y correcta marcación del fluoróforo de las mismas al finalizar el protocolo de obtención. En la figura 8 se pueden observar algunas acumulaciones de vesículas.

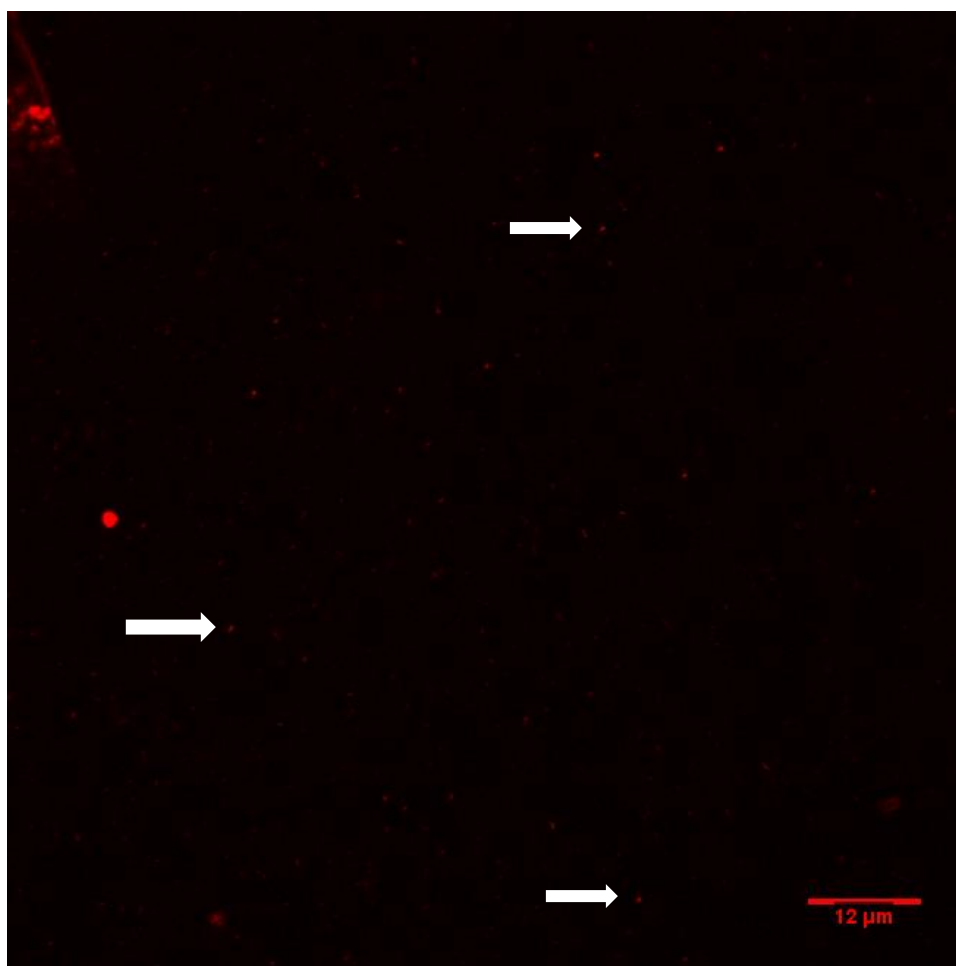


Figura 8. Observación por MLC de las VME obtenidas. En color rojo se pueden observar las VME obtenidas de EcLB marcadas con el fluoróforo FM4-64. Los puntos señalados con flechas serían VME que incorporaron el fluoróforo lipofílico.

5. 1. 2 Radio hidrodinámico, carga superficial de las VME e índice de polidispersidad.

El radio hidrodinámico y el índice de polidispersidad se determinaron mediante la técnica de DLS, mientras que el potencial zeta se midió mediante electroforesis de láser Doppler, en un equipo Zetasizer ZS.

El radio hidrodinámico brinda una idea del tamaño de las vesículas mientras que el índice de polidispersidad informa la variabilidad de tamaños que tiene la muestra. Cuanto más cercano a 0 es el índice, las muestras son más monodispersas y cuanto más cercano a 1, hay una mayor polidispersidad. El potencial zeta indica la carga que hay en la superficie.

El tamaño de las VME de *E. coli* en LB fue de 185.5 ± 25.9 nm y en OA 257.6 ± 3.8 nm. Las VME de EcLB fueron significativamente más pequeñas que el resto (figura 9). Respecto a las

VME de *P. mirabilis*, las producidas en LB tuvieron un tamaño de 267.6 ± 29.7 nm, mientras que las producidas en OA fueron las de mayor tamaño, midiendo 320.4 ± 32.2 nm.

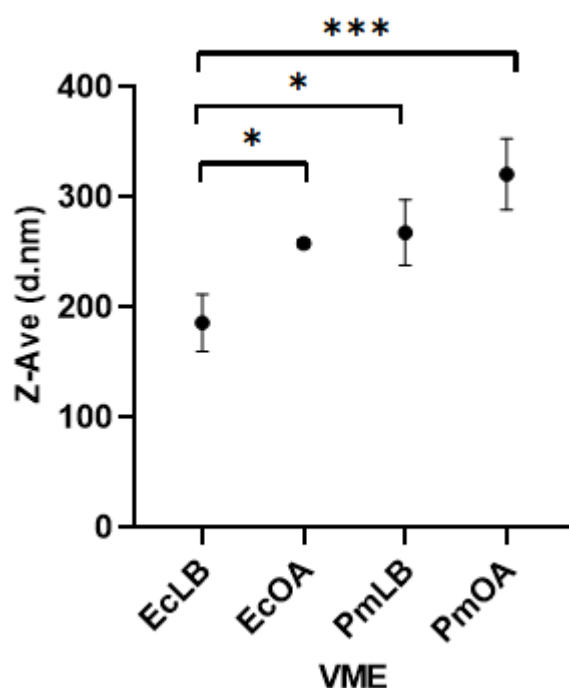


Figura 9. Radio hidrodinámico de las VME obtenidas.

Todas las VME obtenidas presentaron una carga superficial negativa, en el caso de las producidas en LB la carga fue mayor, siendo para EcLB -36 mV y para PmLB -37 mV. Las VME producidas en OA tuvieron una carga negativa menor siendo para EcOA de -7.5 mV y para PmOA -15 mV.

Las VME de *E. coli* fueron las más homogéneas en tamaño, por lo que presentaron un Pdl menor. En las VME producidas en LB, el índice fue de 0.263 mientras que en las de OA fue de 0.219. Para las VME de *P. mirabilis*, en LB fue de 0.355 y en OA de 0.344.

5. 1. 3 Cuantificación de las VME

La cuantificación de las VME se realizó por NTA, que permite tener una aproximación al tamaño de las VME y al mismo tiempo cuantificar el número de VME por volumen de muestra (figura 10). La concentración obtenida de VME en EcLB fue de 1.28×10^{11} VME/ml, mientras que en EcOA la concentración es similar siendo 1.12×10^{11} VME/ml.

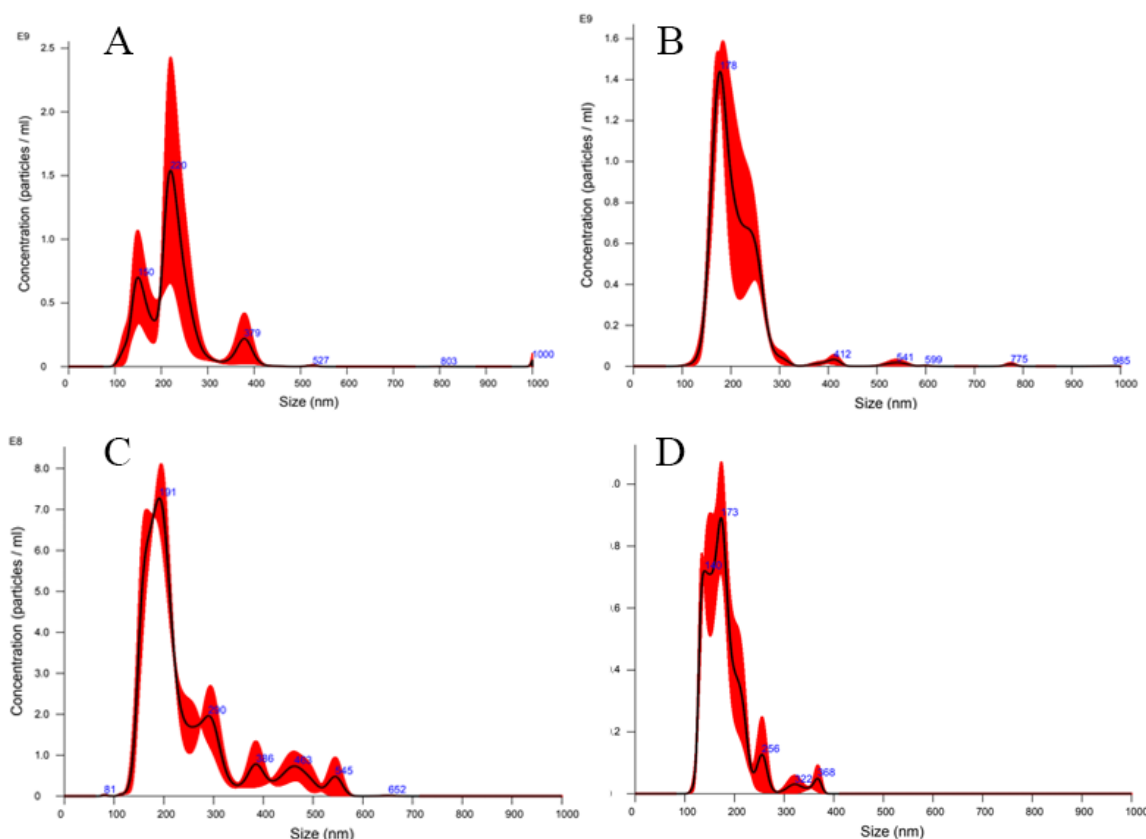


Figura 10. Concentración de las VME según el tamaño de las mismas. A) VME de *E. coli* en LB. B) VME de *E. coli* en OA. C) VME en *P. mirabilis* en LB. D) VME en *P. mirabilis* en OA.

Si se considera que al momento de obtener las VME, la concentración de bacterias de *E. coli* en cada cultivo fue de 2.8×10^8 UFC/ml y 3.4×10^8 UFC/ml respectivamente, se encontró una concentración de 457 VME por bacteria en LB y 329 VME en OA. En cuanto a *P. mirabilis*, la concentración de VME fue de 7.61×10^{10} VME/ml en LB y 6.67×10^{10} VME/ml en OA. Considerando que en el cultivo 24 hs la carga bacteriana fue de 4.1×10^{10} UFC/ml en LB y 1.8×10^2 UFC/ml en OA, se obtuvo 2 VME por bacteria en LB y 3.7×10^8 VME por bacteria en OA.

5. 1. 4 Visualización de las VME

La evaluación de la forma y el tamaño de las VME, se realizó mediante visualización por microscopía electrónica de transmisión (TEM) como se puede observar en las siguientes imágenes (figuras 11-14). En general, todas las VME presentaron una forma esférica y fueron similares en forma. Al cuantificar el tamaño de las VME, se observó que las de EcLB midieron 174.2 ± 89.1 nm y las de EcOA 206.8 ± 6.7 nm. Las VME de *P. mirabilis* presentaron un tamaño de 139.7 ± 14.3 nm en LB y 186.7 ± 69.8 nm en OA.

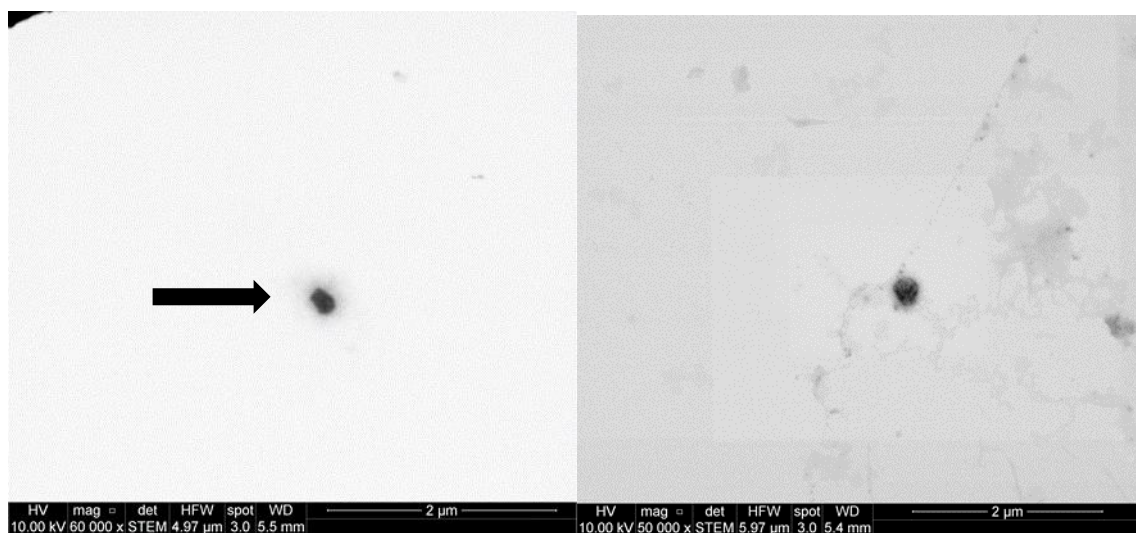


Figura 11. Imágenes de TEM de las VME de EcLB.

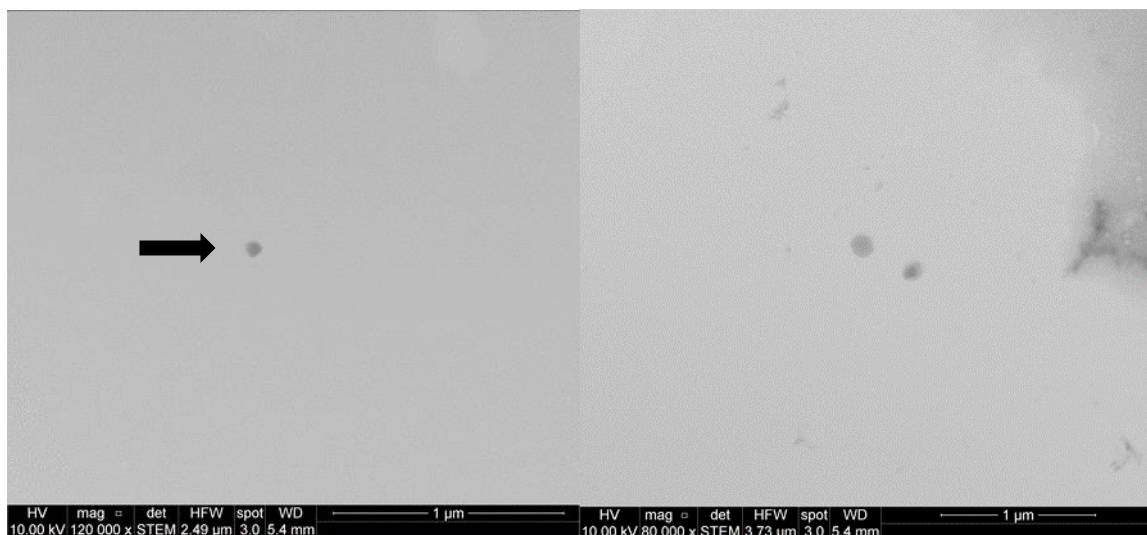


Figura 12. Imágenes de TEM de las VME de EcOA

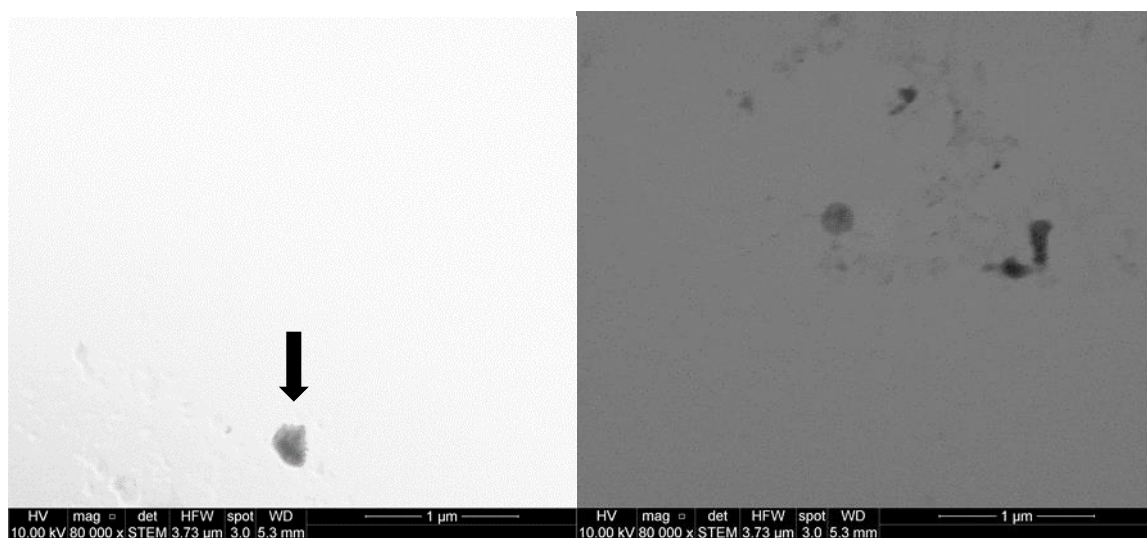


Figura 13. Imágenes de TEM de las VME de PmLB

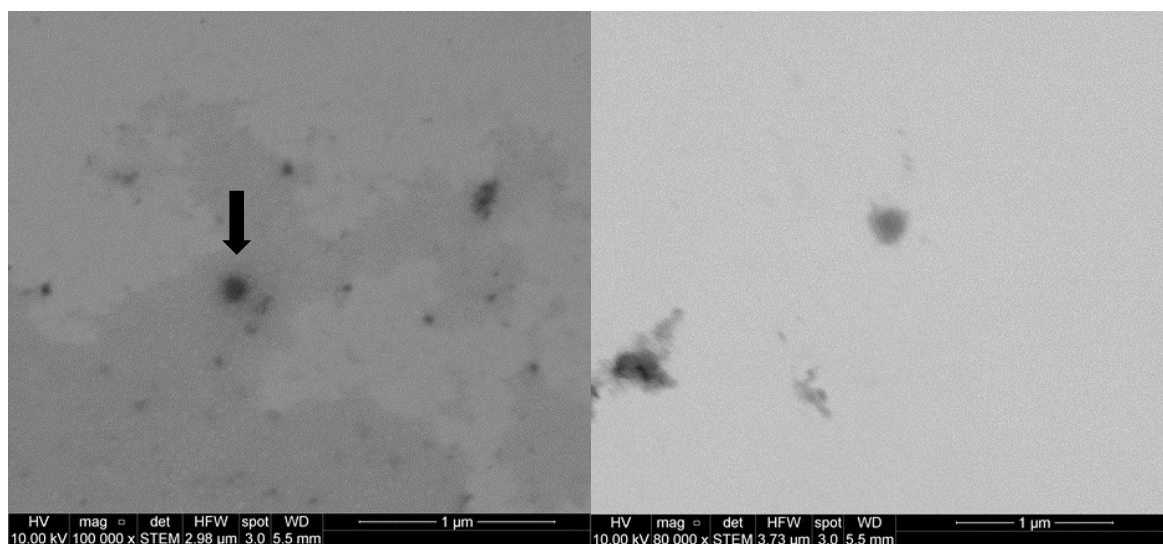


Figura 14. Imágenes de TEM de las VME de PmOA

En la observación se confirmó la presencia de VME con una sola membrana (monocapa), pero también se observó la presencia de VME con dos membranas (bi-capa) lo que indica la presencia de la membrana interna y la externa. Las vesículas de membrana interna y externa (VMIE) fueron observadas solamente en las muestras de PmOA, como se observa en la figura 15.

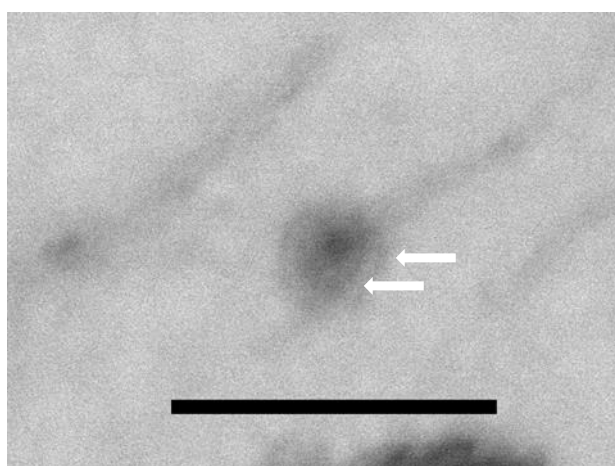


Figura 15. Presencia de VMIE en la muestra de vesículas obtenidas a partir de PmOA. Se puede observar las dos membranas: interna y externa. Tamaño de la escala: 500nm.

5. 1. 5 Resumen de resultados

En suma, en la siguiente tabla se muestran los resultados de la caracterización obtenidos.

Tabla 2. Caracterización de VME de *E. coli* y *P. mirabilis*

	EcLB	EcOA	PmLB	PmOA
Tamaño (DLS, d.nm)	185,5±25,9	257,6±3,80	267,6±29,7	320,4±32,2
Tamaño (TEM, d.nm)	174,2±89,1	206,9±6,7	139,7±14,3	186,7±69,8
Potencial Z (mV)	-36,5±1,3	-7,5±1,7	-37,4±1,5	-15,1±0,5
PdI	0,263	0,219	0,355	0,344
Concentración (NTA, VME/ml)	1,28E+11	1,12E+11	7,61E+10	6,67E+10

EcLB: VME de *E. coli* en LB. EcOA: VME de *E. coli* en OA. PmLB: VME de *P. mirabilis* en LB.

PmOA: VME de *P. mirabilis* en OA. DLS: Dispersión de luz dinámica. PdI: Índice de polidispersión. TEM: Microscopía electrónica de transmisión. NTA: Análisis de seguimiento de nanopartículas

5. 2 Proteómica de las VME

El contenido proteico de las VME fue analizado en primer lugar mediante gel de poliacrilamida para visualizar el perfil proteico. En segundo lugar, se analizó el contenido mediante espectrometría de masas por digestión en gel.

5. 2. 1 Perfil proteico de las VME

Para la observación del perfil proteómico de las VME, el contenido de las VME se corrió en un SDS-PAGE posteriormente teñido con azul de Coomassie (figura 16). La misma cantidad de VME fue cargada con el fin de comparar su contenido proteico. En el gel se pudo observar que las preparaciones de VME presentaron diferentes perfiles, así como diferencias en su concentración, según la cepa y el medio de cultivo.

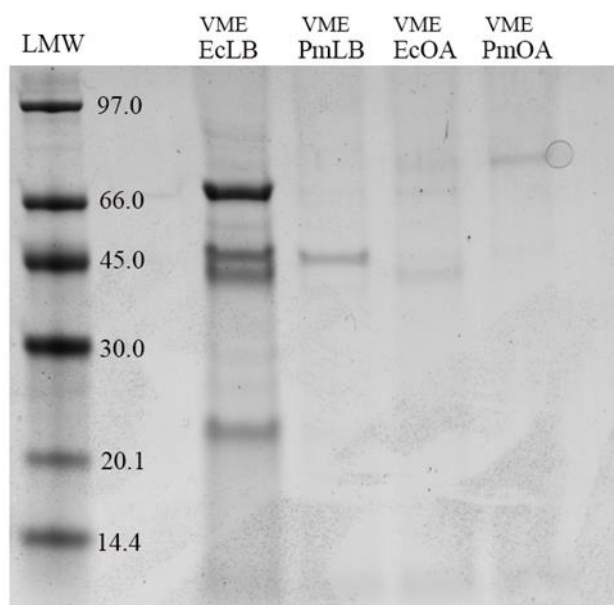


Figura 16. Perfil proteico de las VME de *E. coli* y *P. mirabilis*. LMW: Marcador de peso molecular.

5. 2. 2 Caracterización proteómica de VME de *E. coli* en LB y OA.

El análisis de tres réplicas biológicas por nano LC-MS/MS permitió la identificación de un total de 412 proteínas de las VME de EcLB (figura 17). De estas, 282 proteínas se detectaron estadísticamente en al menos dos de las tres réplicas (material suplementario 1).

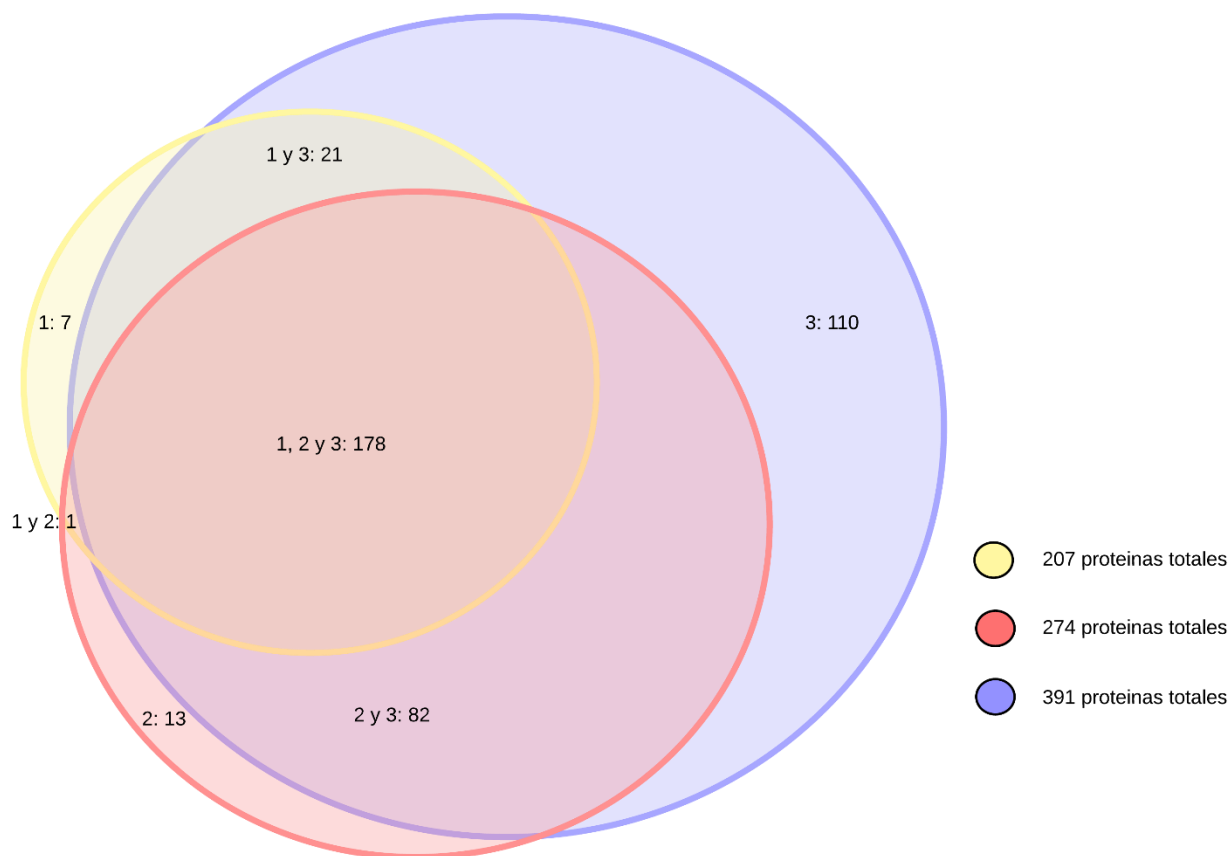


Figura 17. Diagrama de Venn de proteínas identificadas de las tres réplicas biológicas de VME de EcLB.

Respecto a las proteínas identificadas en EcOA, el total fue de 337 proteínas (figura 18). Las proteínas estadísticamente detectadas en al menos dos réplicas fueron 215 (material suplementario 1).

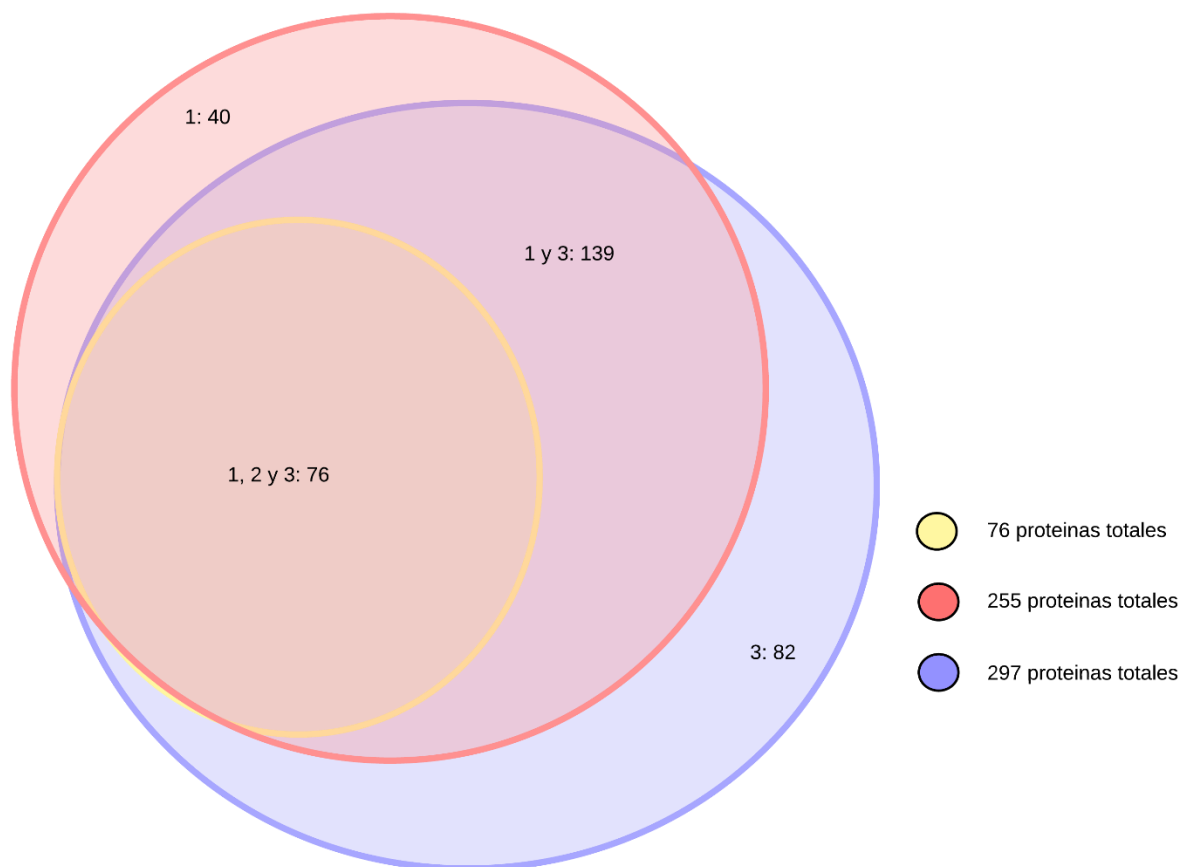


Figura 18. Diagrama de Venn de proteínas identificadas de las tres réplicas biológicas de VME de EcOA.

Las proteínas identificadas que al menos están en dos réplicas, fueron clasificadas según su posible localización subcelular mediante el algoritmo PSORTb. Dentro de las 282 proteínas encontradas en las VME de EcLB, la gran mayoría son parte de la pared bacteriana, encontrando un 17.4% de la membrana interna, 14.9% de la membrana externa y 11.7% del espacio periplásmico. Por otro lado, un 36.9% fueron clasificadas como proteínas citoplasmáticas y solo un 2.5% como extracelulares. El 16.6% fueron clasificadas como de localización desconocida (figura 19).

De manera similar fue la distribución de las proteínas de las VME obtenidas en EcOA. La mayoría pertenecen a la pared bacteriana: el 21.4% de la membrana interna, el 17.7% de la membrana externa y 9.8% del espacio periplásmico. El resto de las proteínas fueron clasificadas en el 37.2% del citoplasma y 0.5% extracelular. El porcentaje de las proteínas sin clasificar fue de 13.5% (figura 19).

A pesar de la similitud de la distribución de proteínas, se observaron algunas diferencias en el porcentaje de los componentes de la pared bacteriana, principalmente en las membranas

internas y externa de las VME, según fueron obtenidas en OA en comparación con las obtenidas en LB.

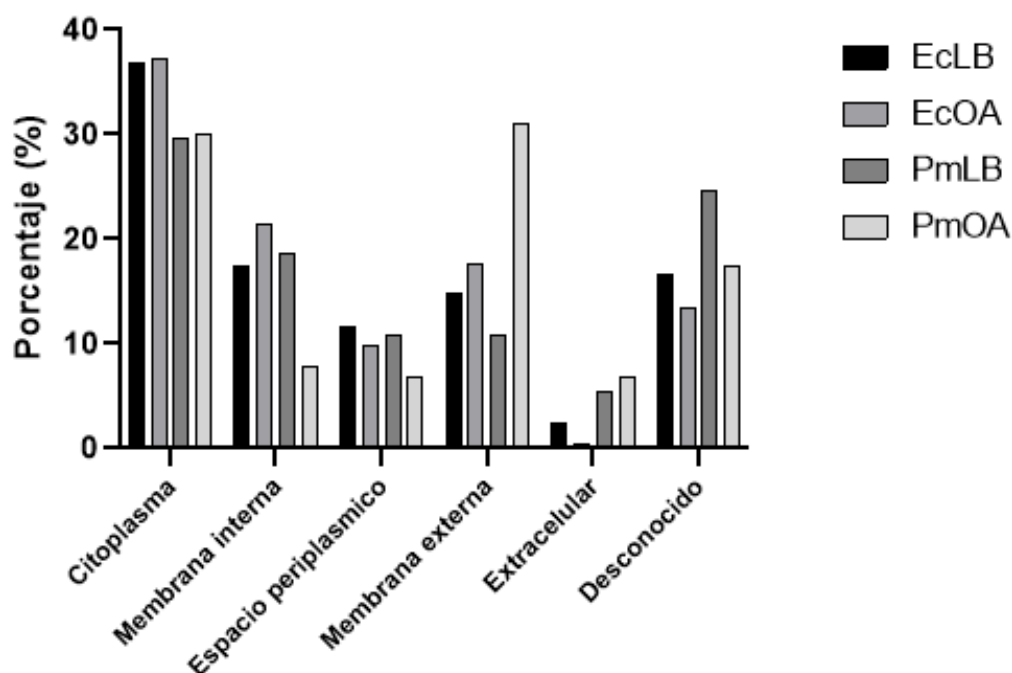


Figura 19. Distribución de las proteínas vesiculares según su localización subcelular de *E. coli* en LB y OA (EcLB y EcOA) y *P. mirabilis* en LB y OA (PmLB y PmOA).

Entre todas las proteínas identificadas de las VME de *E. coli* en ambos medios de cultivo, las proteínas de la membrana externa fueron las más abundantes, según determinó el recuento de espectros (spectral count). Las porinas de membrana externa OmpA, OmpC, OmpF, OmpX, NmpC, y Maltoporina, exhibieron la mayor abundancia. Estas porinas fueron reportadas previamente como marcadores de vesículas. También se encontraron otros componentes de la membrana externa considerados marcadores de vesículas, como TolC, Lpp, Pal, Tsx, FhuA y LamB. A su vez, TolB y Acra, que se encuentran en el espacio periplásmico y la membrana interna respectivamente, también fueron encontradas en las VME producidas en LB y OA.

Tabla 3. Las 20 proteínas más abundantes en las VME de EcLB

Acceso (uniprot)	Proteína	Descripción/anotación	RHV score	Réplicas	Localización subcelular*
A0A0H2VB85	c3168	Putative capsid protein of prophage	0,85	3/3	NC
A0A0H2V8X7	NmpC	Outer membrane porin protein nmpC	0,862	3/3	ME
A0A0H2V859	c2348	Outer membrane porin protein nmpC	0,862	3/3	ME
P69777	Lpp	Major outer membrane lipoprotein Lpp	0,846	3/3	ME
A0A0H2V5V4	OmpA	Outer membrane protein A	0,856	3/3	ME
Q8CVW1	OmpC	Outer membrane porin C	0,855	3/3	ME
P0A856	TolB	Tol-Pal system protein TolB	0,846	3/3	P
P0A6N2	TufA	Elongation factor Tu	0,831	3/3	C
Q8CVI4	LamB	Maltoporin	0,846	3/3	ME
A0A0H2V5Q9	OmpF	Outer membrane protein F	0,831	3/3	ME
P0A6F6	GroEL	Chaperonin GroEL	0,834	3/3	C
A0A0H2VAE3	FlhC	Flagellin	0,846	3/3	E
P0A918	OmpX	Outer membrane protein X	0,854	3/3	ME
Q8FDA1	LpoA	Penicillin-binding protein activator LpoA	0,818	3/3	NC
A0A0H2V558	RlpA	Endolytic peptidoglycan transglycosylase RlpA	0,821	3/3	NC
A0A0H2VDL3	TolC	Outer membrane protein tolC	0,807	3/3	ME
A0A0H2V7T2	OsmE	Osmotically inducible lipoprotein E	0,814	3/3	NC
A0A0H2V9U3	YfdQ	DUF2303 family protein	0,807	3/3	C
A0A0H2V4W4	YbaY	Glycoprotein/polysaccharide metabolism	0,826	3/3	P
A0A0H2V7I8	SlyB	Outer membrane lipoprotein slyB	0,817	3/3	ME

NC: No clasificada ME: Membrana externa P: Espacio periplasmico C: Citoplasma E: Extracelular *La localización subcelular fue determinada con el programa PSORTb v3.0

Tabla 4. Las 20 proteínas más abundantes en las VME de EcOA

Acceso (uniprot)	Proteína	Descripción/anotación	RHV score	Réplicas	Localización subcelular*
A0A0H2VB85	c3168	Putative capsid protein of prophage	0,869	3/3	NC
A0A0H2V8X7	NmpC	Outer membrane porin protein nmpC	0,862	3/3	ME
A0A0H2V859	c2348	Outer membrane porin protein nmpC	0,861	3/3	ME
P69777	Lpp	Major outer membrane lipoprotein Lpp	0,844	3/3	ME
A0A0H2V5V4	OmpA	Outer membrane protein A	0,845	3/3	ME
P0A6N2	TufA	Elongation factor Tu	0,832	3/3	C
Q8CVW1	OmpC	Outer membrane porin C	0,825	3/3	ME
A0A0H2V922	CirA	Colicin I receptor	0,820	3/3	ME
P60423	RplB	Large ribosomal subunit protein uL2	0,801	3/3	C
P0A6F6	GroEL	Chaperonin GroEL	0,803	3/3	C

A0A0H2V5Q9	OmpF	Outer membrane protein F	0,796	3/3	ME
		Outer membrane protein assembly	0,794	3/3	ME
P0A941	BamA	factor BamA		3/3	ME
A0A0H2V524	FepA	Ferrienterobactin receptor	0,795	3/3	ME
P0A856	TolB	Tol-Pal system protein TolB	0,773	3/3	C
A0A0H2V4T4	FhuA	Ferrichrome-iron receptor	0,765	3/3	ME
A0A0H2V4Y7	AcrA	Acriflavine resistance protein A	0,749	3/3	MI
Q8CVI4	LamB	Maltoporin	0,758	3/3	ME
P0A918	OmpX	Outer membrane protein X	0,748	3/3	ME
Q8CWE6	LptD	LPS-assembly protein LptD	0,743	3/3	ME
A0A0H2V7I8	RplC	Large ribosomal subunit protein uL3	0,750	3/3	C

NC: No clasificada ME: Membrana externa MI: Membrana interna C: Citoplasma E: Extracelular *La localización subcelular fue determinada con el programa PSORTb v3.0

5. 2. 3 Análisis cuantitativo comparativo de proteínas de VME de EcLB y EcOA

Las proteínas identificadas fueron analizadas empleando el módulo estadístico del diagrama de Venn del software PatternLab V. Del total de proteínas evaluadas (332 con p-valor < 0.05), 47 fueron exclusivas de EcLB y 14 de EcOA (Figura 20, tabla 3).

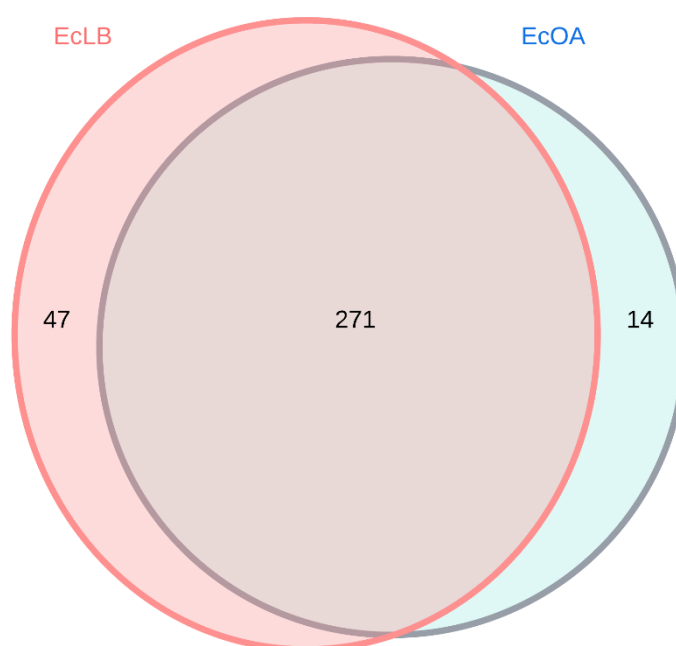


Figura 20. Diagrama de Venn de las proteínas encontradas en VME de LB y OA. Del total de proteínas, 271 se encontraron en las VME de ambos medios, 47 fueron exclusivas de LB y 14 de OA.

Con el fin de analizar las proteínas compartidas en las VME de ambas condiciones de cultivo, se realizó un estudio comparativo que determina la abundancia relativa de las mismas, con el módulo Pairwise Comparison del software PatternLab V. Con esta herramienta se identificaron 22 y 12 proteínas cuya abundancia fue mayor significativamente en LB y OA respectivamente (p -valor < 0.05) (figura 21 y tabla 5).

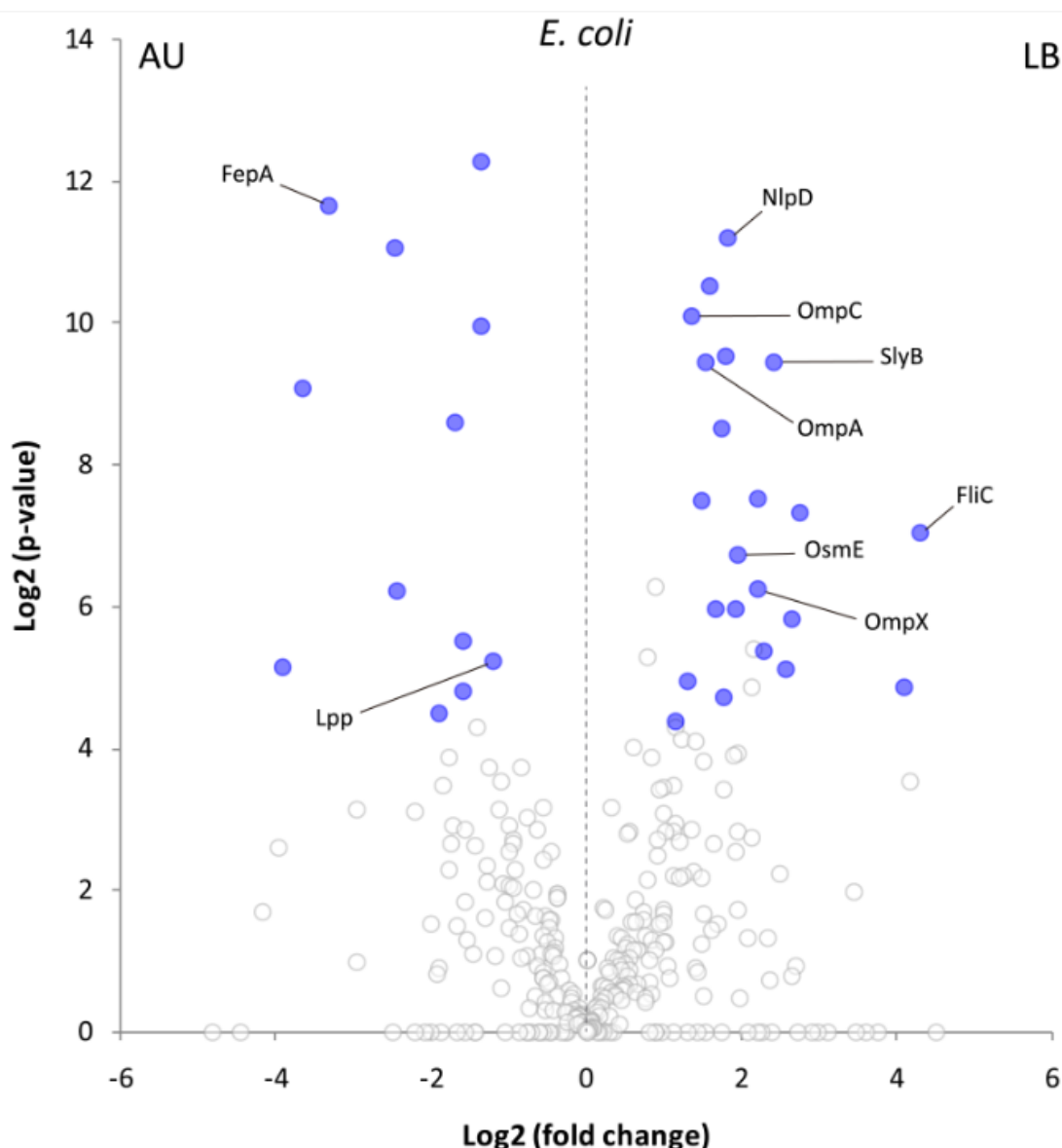


Figura 21. Proteínas diferencialmente abundantes entre las VME de *E. coli* obtenidas de OA (AU) y LB. El volcano plot muestra el Log_2 (valor- p) en el eje y y el Log_2 (cambio relativo) en el eje x. Las proteínas identificadas como comunes a ambas condiciones se representan con un punto en el gráfico. Los puntos azules indican proteínas que cumplen con todos los criterios estadísticos y, por lo tanto, se consideran diferencialmente abundantes entre las condiciones de cultivo. Algunas de las proteínas diferenciales seleccionadas discutidas en el texto están etiquetadas. La información completa sobre todas las proteínas diferenciales se presenta en el material suplementario 2.

Tabla 5. Proteínas identificadas en VME de *E. coli* exclusivas y con mayor abundancia relativa en LB y OA

Acceso (uniprot)	Proteína	Descripción/anotación	Fold change	p-valor	Medio de cultivo	Localización subcelular*
Movilidad/Flagelo						
A0A0H2V8D2	FlgE	Flagellar hook protein FlgE			LB	E
A0A0H2V6D5	FlgL	Flagellar hook-associated protein 3			LB	E
A0A0H2V863	FlfF	Flagellar M-ring protein			LB	MI
A0A0H2V692	FlgK	Flagellar hook-associated protein 1			LB	E
Q8CW55	FlgH	Flagellar L-ring protein			LB	ME
P0ABX6	FlgG	Flagellar basal-body rod protein FlgG			LB	E
A0A0H2VAE3	FliC	Flagellin	4,30	0,0075	LB	E
Adhesión/Fimbrias						
A0A0H2VGH2	FimG	FimG protein			LB	E
A0A0H2VDU7	FimH	FimH protein			LB	NC
Quimiotaxis						
A0A0H2VDS4	Tsr	Methyl-accepting chemotaxis protein I			LB	MI
A0A0H2VAC1	Tar	Methyl-accepting chemotaxis protein II			LB	MI
A0A0H2V832	CheA	Chemotaxis protein CheA			LB	C
Respuesta a estrés						
A0A0H2VF34	Blc	Outer membrane lipoprotein Blc			LB	ME
A0A0H2V5V1	PutA	Bifunctional protein PutA			LB	C
P0A9M1	Lon	Lon protease			LB	C
Q8FJP8	UvrB	UvrABC system protein B			LB	C
Regulación ADN/Transcripción						
P0ACJ1	Lrp	Leucine-responsive regulatory protein			LB	C
P0ACJ9	Crp	cAMP-activated global transcriptional regulator CRP			LB	C
A0A0H2V7T2	OsmE	Osmotically inducible lipoprotein E	1,94	0,0094	LB	NC
Q8FB83	RpoC	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	1,74	0,0027	LB	P
P0A7Z5	RpoA	DNA-directed RNA polymerase subunit alpha	1,70	0,0026	OA	C
ADN replicación						
Q8FD82	Obg	GTPase Obg			LB	C
A0A0H2V977	NrdA	Ribonucleoside-diphosphate reductase			LB	C
Metabolismo						

A0A0H2VAM1	AnsB	L-asparaginase II			LB	P
A0A0H2V9B9	AcnA	Aconitate hydratase			LB	C
A0A0H2V6X0	NarH	Respiratory nitrate reductase 1 beta chain			LB	MI
A0A0H2VEI6	YhjN	Cyclic di-GMP-binding protein			LB	MI
A0A0H2V8S7	BglX	Periplasmic beta-glucosidase			LB	P
P0AC54	Zwf	Glucose-6-phosphate 1-dehydrogenase			LB	C
Q8CVW4	NapA	Periplasmic nitrate reductase			LB	P
P0A9P1	LpdA	Dihydrolipoyl dehydrogenase			LB	C
P0A868	TalA	Transaldolase A			LB	C
Q8FL03	AccA	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha			LB	C
A0A0H2VEQ0	c5034	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex			LB	C
P0AFG4	SucA	2-oxoglutarate dehydrogenase E1 component	2,74	0,0062	LB	C
Q8FLD1	TalB	Transaldolase B	2,20	0,0131	LB	C
P0A7E6	PyrG	CTP synthase	1,77	0,0380	LB	C
P61890	Mdh	Malate dehydrogenase	1,49	0,0055	LB	NC
Q8FBC3	GlpK	Glycerol kinase	1,31	0,0322	LB	C
Transporte/chaperonas						
A0A0H2VC64	DppA	Periplasmic dipeptide transport protein			LB	P
Q8CVL9	UgpB	sn-glycerol-3-phosphate-binding periplasmic protein UgpB			LB	P
P0AC60	GrxB	Glutaredoxin 2			LB	C
P0A9V2	LptB	Lipopolysaccharide export system ATP-binding protein LptB			LB	MI
P0A6Z4	HtpG	Chaperone protein HtpG			OA	C
P0A6Y9	DnaK	Chaperone protein DnaK			OA	C
A0A0H2VA26	SdaC	Serine transporter			OA	MI
A0A0H2VDD0	MalM	Maltose operon periplasmic protein	2,27	0,0244	LB	P
A0A0H2VCY6	MalE	Maltodextrin-binding protein	1,66	0,0160	LB	P
Pared celular/membrana biogénesis						
A0A0H2VDU9	Slt	peptidoglycan lytic exotransglycosylase			LB	P
Q8FHZ8	KdsA	2-dehydro-3-deoxyphosphooctonate aldolase			LB	C
A0A0H2V7I8	SlyB	Outer membrane lipoprotein slyB	2,40	0,0014	LB	ME
P0A918	OmpX	Outer membrane protein X	2,20	0,0055	LB	NC
A0A0H2VCF4	NlpD	Lipoprotein nlpD	1,81	0,0004	LB	NC

A0A0H2V558	RlpA	Endolytic peptidoglycan transglycosylase RlpA	1,79	0,0014	LB	C
A0A0H2V5V4	OmpA	Outer membrane protein A	1,52	0,0014	LB	ME
Q8CVW1	OmpC	Outer membrane porin C	1,36	0,0009	LB	ME
P69777	Lpp	Major outer membrane lipoprotein Lpp	1,20	0,0265	OA	ME
Recombinación del ADN						
Q8FKD5	RdgC	Recombination-associated protein RdgC			LB	C
Traducción/Síntesis de proteínas						
P68766	PepA	Cytosol aminopeptidase			OA	C
P0A6M9	FusA	Elongation factor G			OA	C
Traducción/Ribosomales						
P0A4D0	RpsF	Small ribosomal subunit protein bS6			OA	C
P0A7L9	RpmA	Large ribosomal subunit protein bL27			OA	C
P0A7V1	RpsB	Small ribosomal subunit protein uS2	1,14	0,0480	LB	C
P0A7K7	RplS	Large ribosomal subunit protein bL19	3,92	0,0283	OA	C
P0A7R2	RplI	Large ribosomal subunit protein bL9	3,65	0,0018	OA	C
P0AA11	RplM	Large ribosomal subunit protein uL13	2,47	0,0005	OA	C
P60724	RplD	Large ribosomal subunit protein uL4	2,45	0,0134	OA	C
P62400	RplE	Large ribosomal subunit protein uL5	1,58	0,0356	OA	C
P66071	RplO	Large ribosomal subunit protein uL15	1,58	0,0221	OA	C
P60423	RplB	Large ribosomal subunit protein uL2	1,35	0,0010	OA	C
Metabolismo energético						
P0AFC8	NuoB	NADH-quinone oxidoreductase subunit B			OA	MI
A0A0H2V7Q9	PntA	NAD(P) transhydrogenase subunit alpha			OA	MI
P0AB68	PntB	NAD(P) transhydrogenase subunit beta			OA	MI
P0ABI9	CyoB	Cytochrome bo(3) ubiquinol oxidase subunit 1			OA	MI
Bomba de eflujo						
A0A0H2V4W9	AcrB	Efflux pump membrane transporter			OA	MI
División celular						
P0A856	TolB	Tol-Pal system protein TolB	1,59	0,0007	LB	P
A0A0H2VE44	DamX	Cell division protein DamX	1,89	0,0445	OA	NC
Transporte inorgánico/Iones y metales						
A0A0H2V524	FepA	Ferrienterobactin receptor	3,33	0,0003	OA	ME
A0A0H2V922	CirA	Colicin I receptor	1,35	0,0002	OA	ME
Biosíntesis						
A0A0H2VCB0	Kbl	2-amino-3-ketobutyrate coenzyme A ligase	2,65	0,0177	LB	C
Función sin determinar						
P0AFH9	OsmY	Osmotically-inducible protein Y			LB	P
P65293	YgdI	Uncharacterized lipoprotein YgdI			LB	NC

A0A0H2V5U5	Agp	Glucose-1-phosphatase			LB	P
A0A0H2V9W8	c1360	Putative tail component of prophage			LB	NC
A0A0H2VB11	YgiW	Protein ygiW			LB	NC
A0A0H2V6N9	YbcU	Bor protein homolog from lambdoid prophage DLP12			LB	NC
A0A0H2VDF5	HybC	Hydrogenase-2 large chain			LB	MI
A0A0H2VC87	YmFL	Protein YmFL			LB	C
A0A0H2V6Q8	c1555	Putative DNA N-6-adenine-methyltransferase of bacteriophage			LB	NC
A0A0H2V4U4	YajI	Hypothetical lipoprotein yajI			LB	NC
A0A0H2VA16	YdjN	Hypothetical symporter ydjN			OA	MI
A0A0H2VES0	Yjch	Inner membrane protein Yjch			OA	MI
P0AEH6	ElaB	Protein ElaB	4,08	0,0345	LB	NC
A0A0H2V7F1	c0823	Putative conserved protein	2,57	0,0290	LB	P
P64582	YqjD	Uncharacterized protein YqjD	1,92	0,0160	LB	ME

NC: No clasificada ME: Membrana externa MI: Membrana interna C: Citoplasma E: Extracelular P: Espacio periplásmico *La localización subcelular fue determinada con el programa PSORTb v3.0

5. 2. 4 Caracterización proteómica de VME de *P. mirabilis* en LB y OA.

El análisis del proteoma por nano LC-MS/MS permitió identificar un total de 705 proteínas de VME de *P. mirabilis*. Considerando únicamente aquellas proteínas que fueron detectadas estadísticamente en al menos dos de las réplicas biológicas, se identificaron 353 proteínas de VME de PmLB (figura 22 y material suplementario 1).

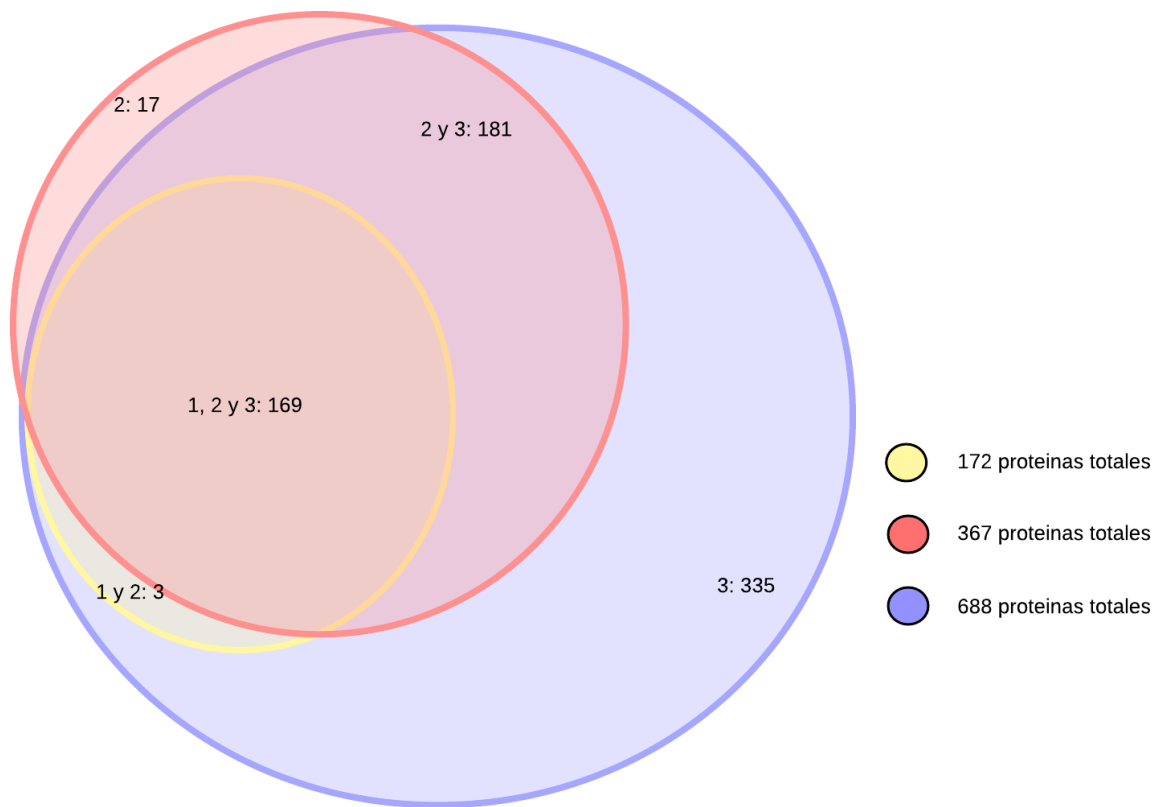


Figura 22. Diagrama de Venn de proteínas identificadas de las tres réplicas biológicas de VME de PmLB.

Respecto a las proteínas identificadas en PmOA, el total fue de 267 proteínas (figura 23). Las proteínas estadísticamente detectadas en al menos dos réplicas fueron 103 (material suplementario 1).

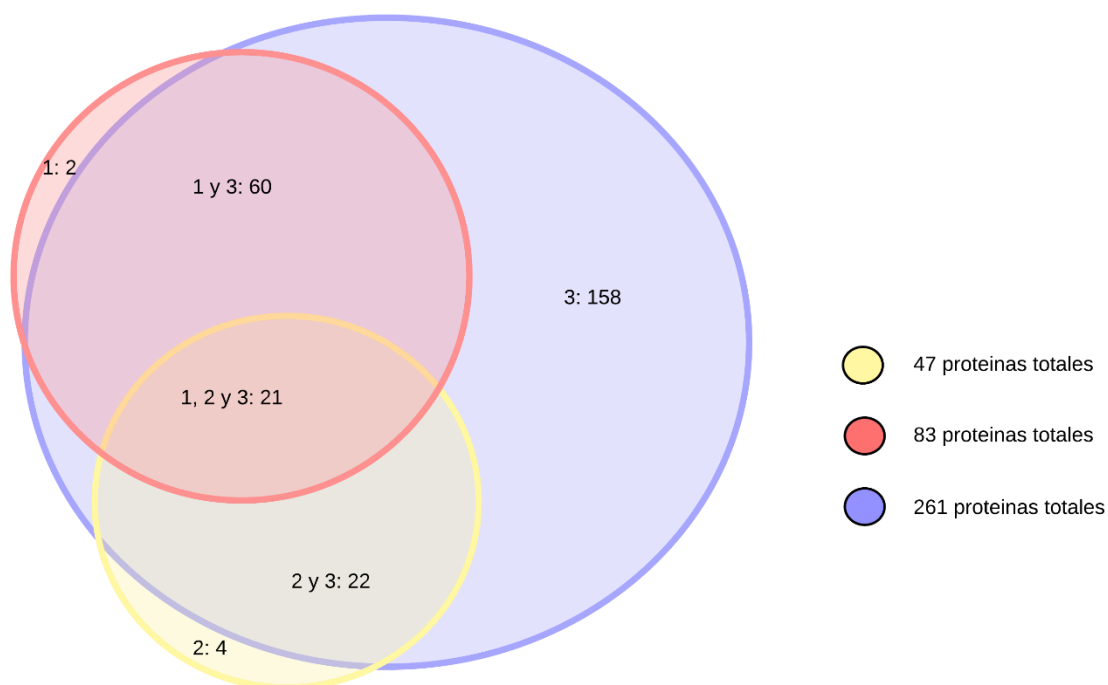


Figura 23. Diagrama de Venn de proteínas identificadas de las tres réplicas biológicas de VME de PmOA.

El análisis de la localización subcelular de las 353 proteínas identificadas de las VME de PmLB fueron clasificadas de la siguiente manera: 29.7% del citoplasma, 24.6% con localización desconocida, 18.7% de la membrana interna, 10.8% del espacio periplásmico, 10.8% de la membrana externa y 5.4% extracelulares (figura 19).

Por otro lado, la localización subcelular de las proteínas identificadas de las VME de PmOA mostraron la siguiente distribución: 31.1% de la membrana externa, 30.1% del citoplasma, 7.8% de la membrana interna, 6.8% del espacio periplásmico y 6.8% extracelulares. El 17.5% no pudo clasificarse en ninguna de las categorías anteriores (figura 19).

Basándonos en estos análisis, se pudo observar que el porcentaje de proteínas de membrana interna de las VME era menor en OA que en LB. La tendencia opuesta se observó en el porcentaje de proteínas de membrana externa.

Entre todas las proteínas identificadas en ambos medios de cultivo, se encontraron entre las proteínas más abundantes algunos marcadores característicos de vesículas, entre ellos OmpA, OmpF, OmpW, TolC, TolB, AcrA, TufB, Pal y Lpp. Además, varias proteínas de la membrana externa, como el receptor TonB-dependiente (IreA), YaeT, MipA, NlpD y FadL, resultaron ser muy abundantes en este conjunto de datos. También se encontró la hemolisina HpmA.

Tabla 6. Las 20 proteínas más abundantes en las VME de PmLB

Acceso (uniprot)	Proteína	Descripción/anotación	RHV score	Réplica	Localización subcelular*
B4EYK5	FliC1	Flagellin	0,866	3/3	E
B4EVB8	OmpF	Outer membrane porin	0,878	3/3	ME
B4EVD6	OmpA	Outer membrane protein A	0,87	3/3	ME
B4EZ18	PMI1721	Phage protein	0,85	3/3	NC
B4ETB0	PMI0842	TonB-dependent receptor	0,851	3/3	ME
B4EYK4	FliC2	Flagellin	0,852	3/3	E
B4EWI0	OmpW	Outer membrane protein	0,875	3/3	ME
B4F2Y3	PMI0047	Secreted 5'-nucleotidase	0,855	3/3	P
B4ESS4	TolB	Tol-Pal system protein TolB	0,85	3/3	P
B4EZ17	PMI1720	Phage protein	0,854	3/3	NC
		TonB-dependent ferric siderophore receptor			
B4F0A2	IreA		0,834	3/3	ME
B4EW37	TolC	Outer membrane protein TolC	0,842	3/3	ME
B4EXE2	GroEL	Chaperonin GroEL	0,851	3/3	C
B4ETI9	PMI1017	Exported protein	0,833	3/3	ME
B4ESS5	Pal	Peptidoglycan-associated lipoprotein	0,833	3/3	ME
B4EXT9	MipA	MltA-interacting protein	0,842	3/3	ME
		Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase			
B4EWY9	GlqQ		0,849	3/3	P
B4F222	NlpD	Lipoprotein	0,82	3/3	ME
B4EXP2	PMI3692	Lipoprotein	0,826	3/3	MI
B4EZH7	FadL	Long-chain fatty acid transport protein	0,826	3/3	ME

NC: No clasificada; MI: Membrana interna; ME: Membrana externa; P: Espacio periplasmico; C: Citoplasma; E: Extracelular. *La localización subcelular fue determinada con el programa PSORTb

v3.0

Tabla 7. Las 20 proteínas más abundantes en las VME de PmOA

Acceso (uniprot)	Proteína	Descripción/anotación	RHV score	Réplica	Localización subcelular*
B4EYK5	FliC1	Flagellin	0,898	3/3	E
B4ETB0	PMI0842	TonB-dependent receptor	0,88	3/3	ME
B4EVB8	OmpF	Outer membrane porin	0,853	3/3	ME
B4EVD6	OmpA	Outer membrane protein A	0,838	3/3	ME
B4ESS4	TolB	Tol-Pal system protein TolB	0,81	3/3	P
B4EYK4	FliC2	Flagellin	0,801	3/3	E
B4EZ18	PMI1721	Phage protein	0,739	3/3	NC
		Outer membrane protein assembly factor			
B4F262	YaeT	BamA	0,735	3/3	ME
B4F1I0	TufB	Elongation factor Tu	0,721	3/3	C
B4EYV6	TufB	Elongation factor Tu	0,72	3/3	C

B4EW37	TolC	Outer membrane protein TolC	0,694	3/3	ME
Q03011	MrpA	Major MR/P fimbria protein	0,651	3/3	E
B4ESS5	Pal	Peptidoglycan-associated lipoprotein	0,672	3/3	ME
B4F012	PMI3002	Common pilus major fimbriin subunit EcpA	0,621	3/3	NC
B4F0E5	AtpA	ATP synthase subunit alpha	0,608	3/3	C
B4EZ07	PMI1710	Phage protein	0,588	3/3	NC
B4F1J0	RpsC	Small ribosomal subunit protein uS3	0,593	3/3	C
B4F1K8	RpsD	Small ribosomal subunit protein uS4	0,567	3/3	C
B4EWN9	Lpp	Major outer membrane lipoprotein Lpp	0,574	3/3	ME
B4F278	RplI	Large ribosomal subunit protein bL9	0,543	3/3	C

NC: No clasificada; ME: Membrana externa; P: Espacio periplasmico; C: Citoplasma; E: Extracelular.

*La localización subcelular fue determinada con el programa PSORTb v3.0

5. 2. 5 Análisis cuantitativo comparativo de proteínas de VME de PmLB y PmOA

Las proteínas identificadas también fueron analizadas empleando el módulo estadístico del diagrama de Venn del software PatternLab V. Del total de proteínas evaluadas (350 con p-valor < 0.05), 105 fueron exclusivas de PmLB y 5 de PmOA (figura 24, tabla 8).

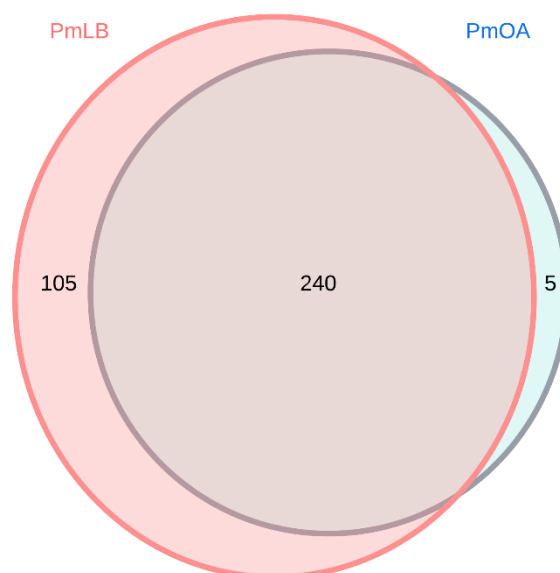


Figura 24. Diagrama de Venn de las proteínas encontradas en VME de LB y OA. Del total de proteínas, 240 se encontraron en las VME de ambos medios, 105 fueron exclusivas de LB y 5 de OA.

Al analizar las proteínas que fueron identificadas tanto en LB como en OA, se encontraron 118 y 5 proteínas cuya abundancia fue mayor significativamente en LB y OA respectivamente (p-valor < 0.05) (figura 25 y tabla 8).

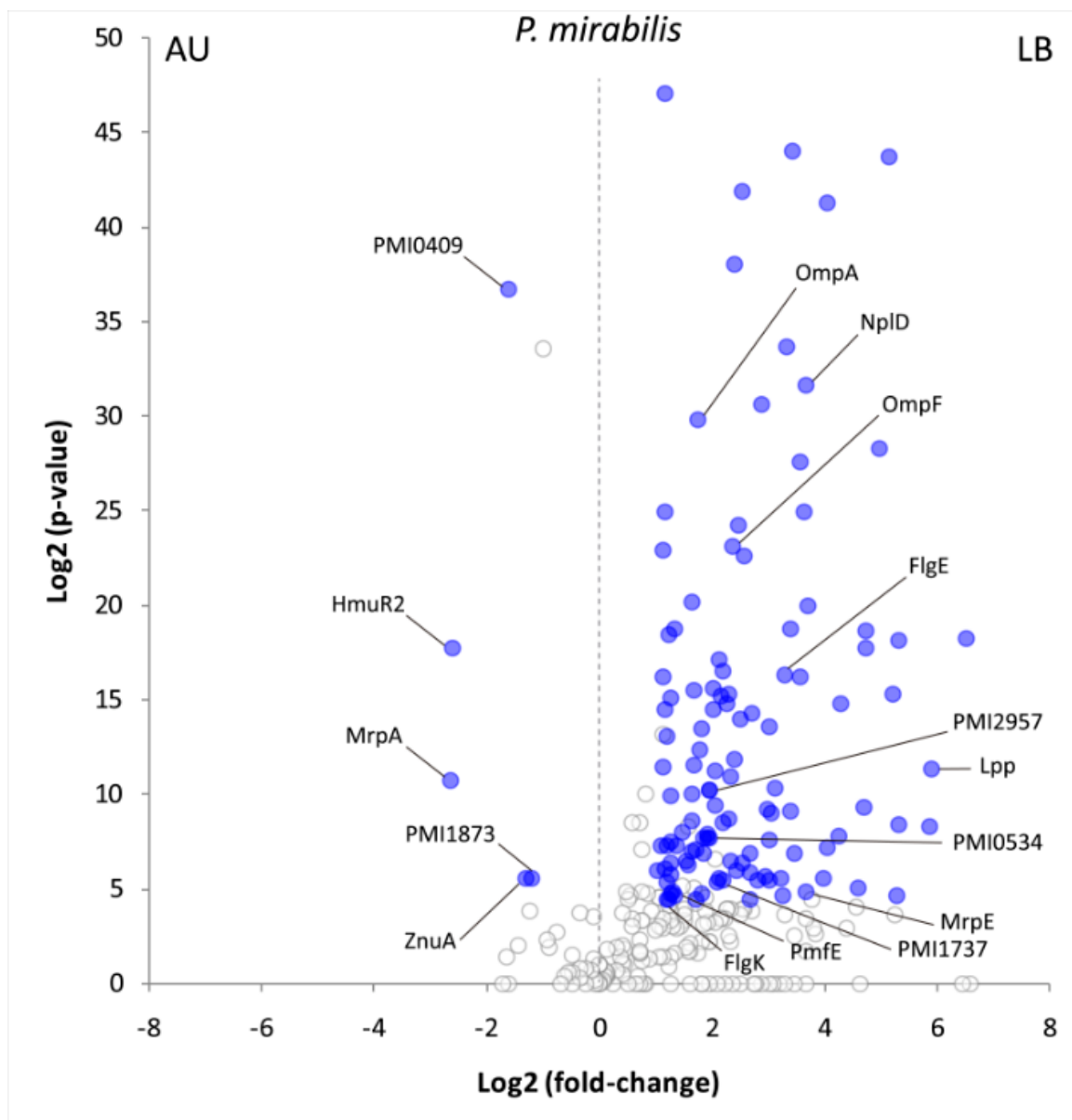


Figura 25. Proteínas diferencialmente abundantes entre las VME de *P. mirabilis* obtenidas de OA (AU) y LB. Los puntos azules indican proteínas que cumplen con todos los criterios estadísticos y, por lo tanto, se consideran diferencialmente abundantes entre las condiciones de cultivo. Algunas de las proteínas diferenciales seleccionadas discutidas en el texto están etiquetadas. La información completa sobre todas las proteínas diferenciales se presenta en el material suplementario 3.

Tabla 8. Proteínas identificadas en VME de *P. mirabilis* exclusivas y con mayor abundancia relativa en LB y OA

Acceso (uniprot)	Proteína	Descripción/ anotación	Fold change	p-valor	Medio de cultivo	Localización subcelular
Movilidad/Flagelo						
B4EYL5	FlIF	Flagellar M-ring protein			LB	MI
B4EYN3	FlgH	Flagellar L-ring protein			LB	ME
B4EYN6	FlgE	Flagellar hook protein FlgE	3,30	0,0000	LB	E
B4EYK4	Flc2	Flagellin	2,16	0,0000	LB	E
B4EV66	PMI0534	Fimbrial usher protein	1,94	0,0050	LB	ME
B4EYN0	FlgK	Flagellar hook-associated protein 1	1,25	0,0373	LB	E
B4EYK5	Flc1	Flagellin	1,15	0,0000	LB	E
Adhesión/Fimbrias						
B4EUK6	MrpH	Fimbrial adhesin			LB	NC
P53521	PmfF	Putative minor fimbrial subunit PmfF			LB	E
B4EUK0	MrpB	Fimbrial subunit			LB	E
B4EUK3	MrpE	Fimbrial subunit	3,99	0,0210	LB	E
P53522	PmfE	Putative minor fimbrial subunit PmfE	1,33	0,0411	LB	E
Q03011	MrpA	Major MR/P fimbria protein	2,66	0,0006	OA	E
Quimiotaxis						
B4EYQ0	PMI1665	Methyl-accepting chemotaxis protein			LB	MI
B4EYQ3	CheA	Chemotaxis protein CheA			LB	C
B4EYQ2	CheW	Chemotaxis protein CheW			LB	C
B4EW68	PMI2380	Methyl-accepting chemotaxis protein			LB	MI
Respuesta al estrés/Resistencias						
B4ETU3	AhpC	Alkyl hydroperoxide reductase C			LB	C
B4EW74	TerB	Tellurite resistance protein			LB	C
B4ETL6	ArnC	Undecaprenyl-phosphate 4-deoxy-4-formamido-L-arabinose transferase			LB	MI
B4ETL7	ArnA	Bifunctional polymyxin resistance protein ArnA			LB	C
B4EW24	SodC	Superoxide dismutase [Cu-Zn]			LB	P
B4EZ37	KatA	Catalase	4,05	0,0069	LB	P
B4EWM7	SodB	Superoxide dismutase	3,13	0,0008	LB	P
B4EU70	AcrA	Multidrug efflux protein	2,48	0,0000	LB	NC
B4EWH9	PMI1349	Lipoprotein	2,41	0,0003	LB	P
B4EU10	AhpC	Thioredoxin peroxidase	2,31	0,0024	LB	C
B4F0Q4	PMI2036	Exported protein	2,26	0,0000	LB	P
B4EXK8	PMI3658	Toluene tolerance protein	1,92	0,0048	LB	NC
B4EXN9	PMI3689	Phospholipid-binding lipoprotein	1,65	0,0078	LB	P

B4F1Q3	HtpG	Chaperone protein HtpG	1,56	0,0131	LB	C
Regulación ADN/Transcripción						
B4EYU8	RpoC	DNA-directed RNA polymerase subunit beta'	1,19	0,0460	LB	C
Metabolismo						
B4F1Z5	Psd	Phosphatidylserine decarboxylase proenzyme			LB	MI
B4EZN2	GlpD	Glycerol-3-phosphate dehydrogenase			LB	C
B4EZI4	GlnA	Glutamine synthetase			LB	C
B4EYR5	PlsB	Glycerol-3-phosphate acyltransferase			LB	MI
B4F254	AccA	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit alpha			LB	C
B4EWZ2	GlpB	Anaerobic glycerol-3-phosphate dehydrogenase subunit B			LB	MI
B4EU27	RbsB	D-ribose ABC transporter, substrate-binding periplasmic protein			LB	P
B4EWY9	GlpQ	Glycerophosphoryl diester phosphodiesterase	5,32	0,0000	LB	P
B4F2Y1	CdpB	2',3'-cyclic-nucleotide 2'-phosphodiesterase	5,23	0,0000	LB	P
B4EVA1	AnsB	L-asparaginase II	4,28	0,0000	LB	P
B4F1V4	TrxA	Thioredoxin	3,26	0,0398	LB	C
B4EVY7	FumC	Fumarate hydratase class II	3,23	0,0205	LB	C
B4EVB7	AspC	Aminotransferase	3,03	0,0001	LB	C
B4ETV2	PMI1222	Exported L-asparaginase	3,01	0,0222	LB	P
B4F1Y5	PldA	Phospholipase A1	3,00	0,0054	LB	ME
B4F166	GlpK	Glycerol kinase	2,99	0,0017	LB	C
B4ESR0	SucB	Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex	2,81	0,0223	LB	C
B4EZF5	AccD	Acetyl-coenzyme A carboxylase carboxyl transferase subunit beta	2,69	0,0171	LB	C
B4ESQ9	SucA	oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	2,43	0,0164	LB	C
B4EUF7	Eno	Enolase	2,33	0,0005	LB	C
B4ET20	ArtI	Arginine ABC transporter, substrate-binding protein	2,19	0,0228	LB	P
B4F2A1	Mdh	Malate dehydrogenase	2,18	0,0000	LB	NC
B4F0Y8	AceE	Pyruvate dehydrogenase E1 component	1,80	0,0001	LB	C
B4EZ73	PMI2833	Endoribonuclease	1,69	0,0003	LB	NC
B4EXT7	GapA	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	1,28	0,0182	LB	C
B4EV18	GltI	Glutamate/aspartate ABC transporter, substrate-binding protein	1,27	0,0010	LB	P
B4EVG5	Icd	Isocitrate dehydrogenase [NADP]	1,27	0,0123	LB	C
B4ESR2	SucD	Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit alpha	1,22	0,0459	LB	C
Transporte/chaperonas						
B4EUT6	NqrC	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit C			LB	NC
B4EZ87	DppA	Dipeptide ABC transporter, substrate-binding protein			LB	P

B4EUT4	NqrA	Na(+)-translocating NADH-quinone reductase subunit A			LB	C
B4FOY1	PMI2038	Small-conductance mechanosensitive channel			LB	MI
B4EZR8	Crr	PTS family enzyme IIA component			LB	C
B4EXK0	LptA	Lipopolysaccharide export system protein LptA			LB	NC
B4F2Y0	PMI0044	Outer membrane protein	5,14	0,0000	LB	ME
B4EXB0	OppA	Oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein	4,04	0,0000	LB	P
B4EZH7	FadL	Long-chain fatty acid transport protein	2,89	0,0000	LB	ME
B4EZH8	VacJ	VacJ lipoprotein	2,53	0,0124	LB	ME
B4F1H5	BtuB	Vitamin B12 transporter BtuB	2,02	0,0000	LB	ME
B4EXB5	YntA	Nickel/di-oligopeptide ABC transporter, substrate-binding protein	2,04	0,0004	LB	P
B4EVD6	OmpA	Outer membrane protein A	1,75	0,0000	LB	ME
B4EXB1	OppA	Oligopeptide ABC transporter, oligopeptide-binding protein	1,66	0,0010	LB	P
B4F2H9	Imp	LPS-assembly protein LptD	1,34	0,0000	LB	ME
Pared celular/ biogénesis de membrana						
B4EWI0	OmpW	Outer membrane protein			LB	ME
B4EUE0	MrcB	Penicillin-binding protein 1B			LB	MI
B4ET08	DacC	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase			LB	MI
B4ESS1	TolQ	Tol-Pal system protein TolQ			LB	MI
B4ESS2	TolR	Tol-Pal system protein TolR			LB	MI
B4F031	MrcA	Penicillin-binding protein 1A			LB	MI
B4EY49	Slt	peptidoglycan lytic exotransglycosylase			LB	P
B4EV04	DacA	serine-type D-Ala-D-Ala carboxypeptidase			LB	MI
B4ETI8	Prc	Tail-specific protease (C-terminal-processing peptidase)			LB	MI
B4ESS3	TolA	TolA protein			LB	NC
B4F202	AmiB	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase			LB	NC
B4EV67	PMI0535	Fimbrial chaperone			LB	P
B4EWN9	Lpp	Major outer membrane lipoprotein Lpp	5,91	0,0004	LB	ME
B4EXT9	MipA	MltA-interacting protein	4,75	0,0000	LB	ME
B4F2F3	MltA	Membrane-bound lytic murein transglycosylase A	4,61	0,0309	LB	ME
B4ESS5	Pal	Peptidoglycan-associated lipoprotein	3,71	0,0000	LB	ME
B4EUI6	PMI0250	Lipoprotein	3,68	0,0353	LB	NC
B4F222	NlpD	Lipoprotein	3,66	0,0000	LB	ME
B4EUQ6	MltC	peptidoglycan lytic exotransglycosylase	3,04	0,0020	LB	NC
B4EV05	RplA	Rare lipoprotein A	2,56	0,0000	LB	NC
B4EW37	TolC	Outer membrane protein TolC	2,40	0,0000	LB	ME

B4EVB8	OmpF	Outer membrane porin	2,36	0,0000	LB	ME
B4EVB9	PMI1172	Lipoprotein	1,66	0,0000	LB	MI
B4EZE2	PMI1774	Broad specificity amino-acid racemase	1,54	0,0113	LB	C
B4EWL9	SlyB	Outer membrane lipoprotein	1,46	0,0040	LB	ME
B4F2N4	AmpH	Penicillin-binding protein	1,18	0,0001	LB	MI
B4F262	YaeT	Outer membrane protein assembly factor BamA	1,15	0,0000	LB	ME
B4EUX3	BamD	Outer membrane protein assembly factor BamD	1,15	0,0000	LB	ME
B4EZT0	BamB	Outer membrane protein assembly factor BamB	1,12	0,0000	LB	ME
Traducción/Síntesis de proteínas						
B4EYV7	FusA	Elongation factor G	1,96	0,0008	LB	C
B4F2D2	Tsf	Elongation factor Ts	1,71	0,0072	LB	C
B4EYV6	TufB	Elongation factor Tu	1,20	0,0063	LB	C
B4F1I0	TufB	Elongation factor Tu	1,11	0,0066	LB	C
Traducción/Ribosomales						
B4ETK9	RplT	Large ribosomal subunit protein bL20			LB	C
B4F1K6	RpsM	Small ribosomal subunit protein uS13			LB	C
B4F2C2	RpsO	Small ribosomal subunit protein uS15			LB	C
B4F1J1	RplP	Large ribosomal subunit protein uL16			LB	C
B4EYV8	RpsG	Small ribosomal subunit protein uS7	2,51	0,0001	LB	C
B4F1K1	RpsE	Small ribosomal subunit protein uS5	2,13	0,0216	LB	C
B4F1J8	RpsH	Small ribosomal subunit protein uS8	2,09	0,0238	LB	C
B4F277	RpsR	Small ribosomal subunit protein bS18	2,05	0,0014	LB	C
B4F1I5	RplD	Large ribosomal subunit protein uL4	1,93	0,0043	LB	C
B4F1J6	RplE	Large ribosomal subunit protein uL5	1,86	0,0047	LB	C
B4F1L0	RplQ	Large ribosomal subunit protein bL17	1,84	0,0084	LB	C
B4F1J9	RplF	Large ribosomal subunit protein uL6	1,71	0,0445	LB	C
B4F1K7	RpsK	Small ribosomal subunit protein uS11	1,17	0,0149	LB	C
B4F1K3	RplO	Large ribosomal subunit protein uL15	1,02	0,0164	LB	C
Metabolismo energético						
B4F0E6	AtpG	ATP synthase gamma chain			LB	C
B4ESR3	CydA	Cytochrome D ubiquinol oxidase subunit I			LB	C
B4EZ74	Aad	Amino acid deaminase			LB	C
B4EU46	CyoA	Ubiquinol oxidase subunit 2			LB	MI
B4EZC8	NuoC	NADH-quinone oxidoreductase subunit C/D			LB	C
B4F0E4	AtpH	ATP synthase subunit delta			LB	C
B4EWG4	NarH	Respiratory nitrate reductase 1 beta chain			LB	MI
B4F0E1	AtpB	ATP synthase subunit a			LB	MI
B4EWC9	UbiE	Ubiquinone/menaquinone biosynthesis C-methyltransferase UbiE			LB	C

B4F0E2	AtpE	ATP synthase subunit c	5,27	0,0410	LB	MI
B4F0E5	AtpA	ATP synthase subunit alpha	3,62	0,0000	LB	C
B4F0E7	AtpD	ATP synthase subunit beta	3,39	0,0000	LB	C
B4EUH8	Pgk	Phosphoglycerate kinase	1,19	0,0240	LB	C
División celular/Ciclo celular						
B4EX05	FtsE	Cell division ATP-binding protein FtsE			LB	MI
B4F0B2	DamX	Cell division protein DamX			LB	NC
B4F108	FtsQ	Cell division protein FtsQ			LB	NC
B4ET39	MukB	Chromosome partition protein			LB	C
B4EXL7	PMI3667	Z-ring associated protein G			LB	MI
B4EV90	FtsK	DNA translocase FtsK			LB	MI
B4F106	FtsZ	Cell division protein FtsZ			LB	C
B4EZF3	DedD	Cell division protein DedD			LB	NC
B4F118	FtsL	Cell division protein FtsL			LB	C
B4ESS6	CpoB	Cell division coordinator CpoB	1,12	0,0003	LB	NC
Transporte inorgánico/Iones y metales						
B4F1I2	Bfr	Bacterioferritin			LB	C
B4EY62	PMI1548	TonB-dependent receptor			OA	ME
B4EUU5	PMI0363	TonB-dependent ferric siderophore receptor			OA	ME
B4EXJ5	PMI2596	Siderophore TonB-dependent receptor			OA	ME
B4EUG9	PMI0233	TonB-dependent siderophore receptor			OA	ME
B4EZW8	PMI2957	Iron ABC transporter, substrate-binding protein	1,96	0,0008	LB	MI
B4F250	CutF	Copper homeostasis lipoprotein	1,25	0,0055	LB	ME
B4EUZ0	PMI0409	TonB-dependent receptor	1,62	0,0000	OA	ME
B4EX61	HmuR2	Hemin receptor	2,62	0,0000	OA	ME
B4EVT9	ZnuA	High-affinity zinc uptake system protein ZnuA	1,30	0,0205	OA	P
Biosíntesis						
B4EZI4	GlnA	Glutamine synthetase			LB	C
B4EYA9	PagP	Lipid A acyltransferase PagP			LB	ME
B4F1X0	HemY	Porphyrin biosynthesis protein			LB	MI
B4EVC3	PyrD	Dihydroorotate dehydrogenase (quinone)			LB	MI
Proteasas						
B4F269	HflC	Protein HflC			LB	NC
B4F048	LepB	Signal peptidase I			LB	MI
B4EX12	PMI3613	Peptidase			LB	E

B4F2F4	AmiC	N-acetylmuramoyl-L-alanine amidase			LB	NC
B4ETM2	NlpC	Lipoprotein			LB	NC
B4EZU1	PepB	Peptidase B			LB	C
B4F1N8	PMI2170	Protein QmcA			LB	C
B4F2B3	FtsH	ATP-dependent zinc metalloprotease FtsH			LB	MI
B4ETJ0	HtpX	Protease HtpX			LB	MI
B4EXQ4	PMI3704	Probable exported protease			OA	MI
B4F2Y3	PMI0047	Secreted 5'-nucleotidase	3,44	0,0000	LB	P
B4F2Y2	PMI0046	Lipoprotein	2,34	0,0112	LB	C
B4F2I9	PMI2341	Autotransporter (Serine protease)	2,14	0,0000	LB	ME
B4EZ80	PMI2840	Insulinase (Peptidase family M16)	1,26	0,0000	LB	NC
B4EXL6	DegQ	Protease	1,12	0,0000	LB	P
Inhibidor de Proteasas						
B4EZT9	PMI1851	Alpha-2-macroglobulin			LB	NC
Toxinas						
B4EZF2	CvpA	Colicin V production protein			LB	MI
Chaperonas						
B4EZ68	DsdA	Thiol:disulfide interchange protein			LB	P
B4EZ63	PpiA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	2,66	0,0450	LB	P
B4EXE2	GroEL	Chaperonin GroEL	2,53	0,0000	LB	C
B4F2V5	DnaK	Chaperone protein DnaK	2,31	0,0000	LB	C
B4EYW5	FkpA	Peptidyl-prolyl cis-trans isomerase	1,22	0,0000	LB	P
Función sin determinar						
B4EVY8	PMI1297	Exported protein			LB	NC
B4F1X1	HemX	Uroporphyrin-III C-methyltransferase			LB	MI
B4EU14	YajC	Sec translocon accessory complex subunit YajC			LB	MI
B4EY33	PMI2665	Exported protein			LB	ME
B4EXP9	PMI3699	Membrane protein			LB	NC
B4F1Q0	Wzz	O-antigen chain length determinant			LB	MI
B4F2U7	PMI1259	Probable amidohydrolase			LB	NC
B4ESV8	PMI0618	HlyD-family secretion protein			LB	MI
B4F1F9	PMI2149	Exported amino acid deaminase			LB	C
B4ESZ0	AsmA	Outer membrane assembly protein			LB	NC
B4EZS6	PMI1838	GNAT-family acetyltransferase			LB	C
B4EY68	PMI1554	Exported protein			LB	NC

B4EUU0	ApbE	FAD:protein FMN transferase			LB	NC
B4F2V3	PMI0007	Exported protein			LB	E
B4EY34	PMI2666	Lipoprotein			LB	NC
B4F291	PMI3390	Translocation and assembly module subunit TamA			LB	ME
B4F2Z1	Hyb0	hydrogenase (acceptor)			LB	MI
B4F0Q7	PMI3093	Exported protein	5,85	0,0033	LB	NC
B4EZ36	PMI1739	Exported protein	4,73	0,0000	LB	NC
B4ET41	AphA	Class B acid phosphatase	4,27	0,0044	LB	NC
B4ETI9	PMI1017	Exported protein	3,58	0,0000	LB	ME
B4F1P5	UshA	Protein UshA [includes: UDP-sugar hydrolase and 5'-nucleotidase]	3,55	0,0000	LB	P
B4EY32	PMI2664	Exported protein	3,45	0,0087	LB	ME
B4F246	MetQ	Lipoprotein	3,40	0,0018	LB	MI
B4EUM3	RafY	Glycoporin	3,34	0,0000	LB	NC
B4EX84	UspG1	Universal stress protein	2,94	0,0193	LB	NC
B4F0H3	Eco	Ecotin	2,71	0,0000	LB	P
B4ETS9	PMI1199	Exported protein	2,68	0,0083	LB	NC
B4EZ34	PMI1737	Lipoprotein	2,19	0,0027	LB	NC
B4EVV2	PMI1165	Lipoprotein	2,02	0,0000	LB	ME
B4EWA1	DeoD	Purine nucleoside phosphorylase DeoD-type	1,80	0,0378	LB	C
B4EZN9	PMI2937	Exported protein	1,79	0,0002	LB	P
B4EY38	PMI2670	Lipoprotein	1,67	0,0000	LB	NC
B4EU50	OMI0112	Lipoprotein	1,64	0,0027	LB	NC
B4EVD0	PMI0778	Lipoprotein protein	1,38	0,0064	LB	NC
B4EX89	PMI1454	Exported protein	1,30	0,0355	LB	NC
B4EZW1	PMI1873	Lipoprotein	1,21	0,0207	OA	NC

LB: medio Luria-Bertani; OA: Orina artificial; NC: No clasificada; ME: Membrana externa; MI: Membrana interna; C: Citoplasma; E: Extracelular; P: Espacio periplasmico

Dentro de las proteínas encontradas en las VME de *P. mirabilis*, se identificaron varias proteínas fágicas, de las cuales 11 aparecen exclusivamente en las VME de PmLB y 5 proteínas, si bien se encuentran en ambos medios, su abundancia relativa es mayor en PmLB.

5. 3 VME como mecanismo de comunicación bacteriana

5. 3. 1 Asociación de las VME a la superficie bacteriana

Con el fin de evaluar el rol de las VME en la comunicación bacteriana, se estudió en primer lugar la capacidad de las VME de asociarse a la membrana de la bacteria, por lo tanto, la capacidad de liberar su contenido en la bacteria receptora. La bacteria receptora puede ser

de la misma cepa, de otra cepa de la misma especie (comunicación intraespecie), o de otra especie bacteriana (comunicación interespecie).

Para *E. coli*, se observó una rápida asociación de las VME obtenidas en medio LB, tanto las producidas por la misma cepa, como las producidas por *P. mirabilis* (figura 26). En cuanto a las VME obtenidas en OA, son capaces de asociarse a la membrana, pero recién luego de una hora de incubación.

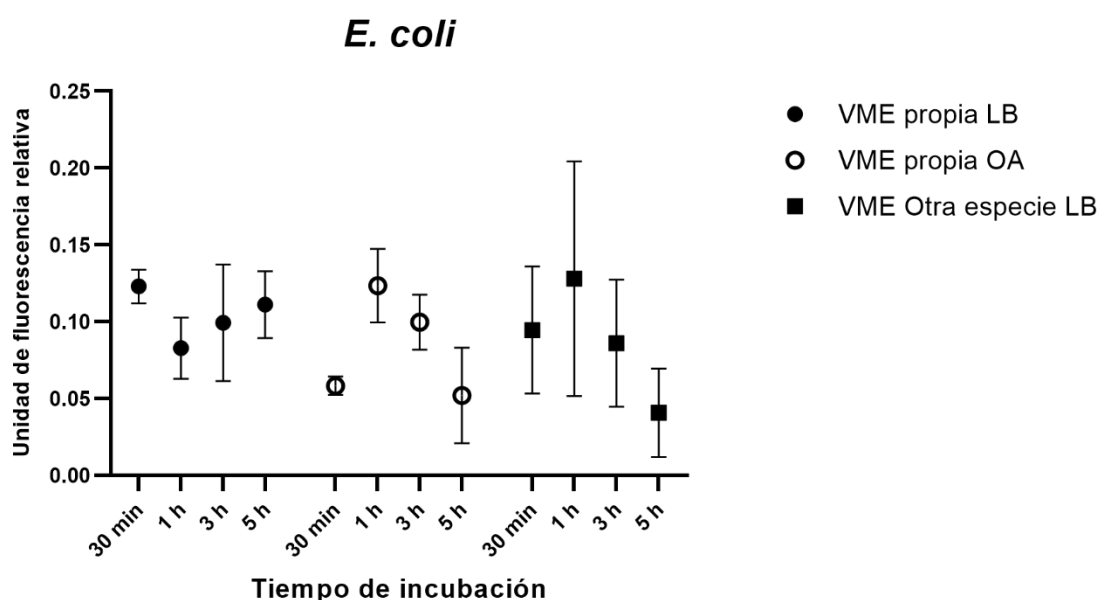


Figura 26. Capacidad de asociación a la pared bacteriana de las VME producidas por *E. coli*. Las VME marcadas con fluoróforo lipofílico que son capaces de asociarse a la membrana externa de la bacteria, transfieren la fluorescencia a la misma, que es lo que se cuantifica. *E. coli* 144 fue incubada con las VME producidas por sí misma en LB y OA, y también con las producidas por *P. mirabilis* 2921 en LB. Los tiempos de incubación fueron 30 min, 1, 3 y 5 horas.

En cuanto a *P. mirabilis*, la tendencia observada fue tiempo dependiente, donde se observó un aumento de la asociación de las VME obtenidas en LB, a medida que el tiempo de incubación fue mayor (figura 27). Las VME obtenidas en OA presentaron una mayor asociación a las 3 horas.

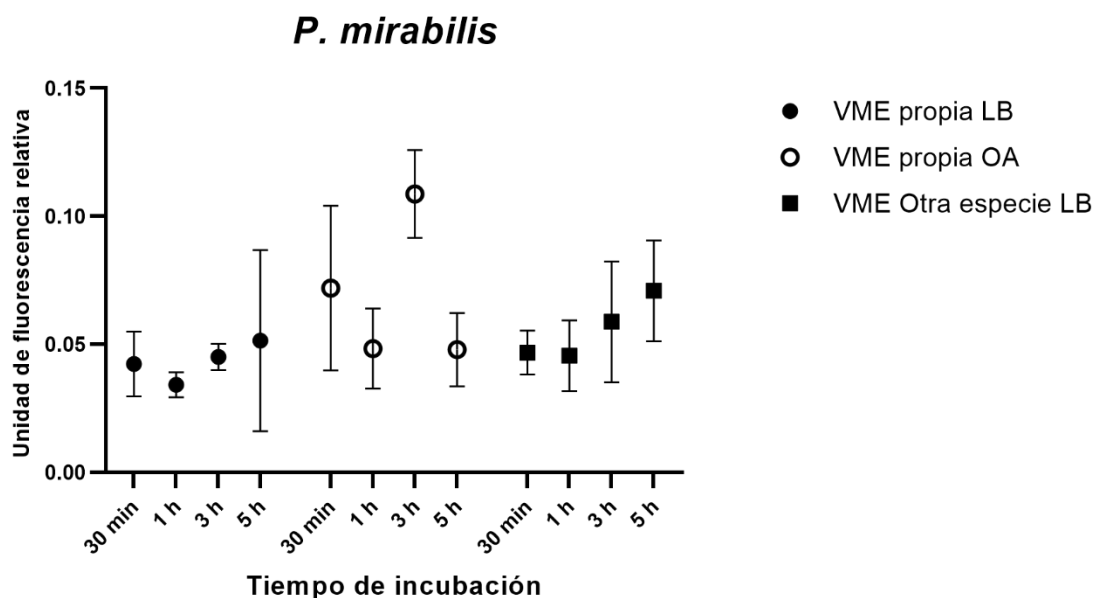


Figura 27. Capacidad de asociación a la pared bacteriana de las VME producidas por *P. mirabilis*. Las VME marcadas con fluoróforo lipofílico que son capaces de asociarse a la membrana externa de la bacteria, transfieren la fluorescencia a la misma, que es lo que se cuantifica. *P. mirabilis* 2921 fue incubada con las VME producidas por sí misma en LB y OA, y también con las producidas por *E. coli* 144 en LB. Los tiempos de incubación fueron 30 min, 1, 3 y 5 horas.

La comunicación intra e inter especie fue evaluada empleando un aislamiento de *E. coli* ATCC. Este se incubó con las VME obtenidas en LB, tanto de *E. coli* 144 como de *P. mirabilis* 2921. La asociación es más rápida cuando las VME son de la misma especie, presentando a la hora la fluorescencia más elevada. Cuando la asociación es con las VME de otra especie, la misma aumenta dependiendo del tiempo, por lo que se da más lentamente, pero también la variabilidad es mayor (figura 28).

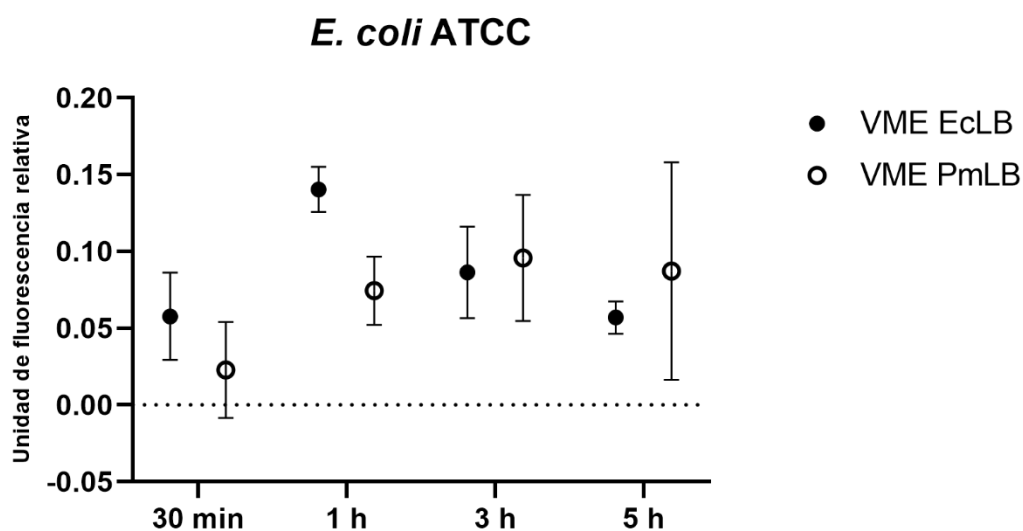


Figura 28. Capacidad de asociación a la pared bacteriana de *E. coli* ATCC de las VME producidas por *E. coli* y *P. mirabilis*.

5. 3. 2 Formación de biofilms.

La cuantificación de la biomasa del biofilm de *E. coli* 144, *P. mirabilis* 2921 y *E. coli* U7 (no formadora) se realizó por la técnica de cuantificación por cristal violeta. Al agregar el inóculo bacteriano inicial, se añadió también la misma concentración de VME (20 µg/ml) de EcLB, de PmLB y la combinación de ambas VME.

Al incubar las bacterias con las VME se pudo observar que existe una ligera tendencia a aumentar la biomasa del biofilm respecto al control tanto de *E. coli* como de *P. mirabilis*. Este aumento solo es significativo estadísticamente cuando las bacterias fueron incubadas con sus propias VME producidas en medio LB (figura 29). En el caso de *E. coli*, el p-valor fue de 0.0043 mientras que para *P. mirabilis* fue de 0.0087.

Al incubar a la cepa *E. coli* 7 (no formadora de biofilm), no se observaron diferencias significativas respecto al control.

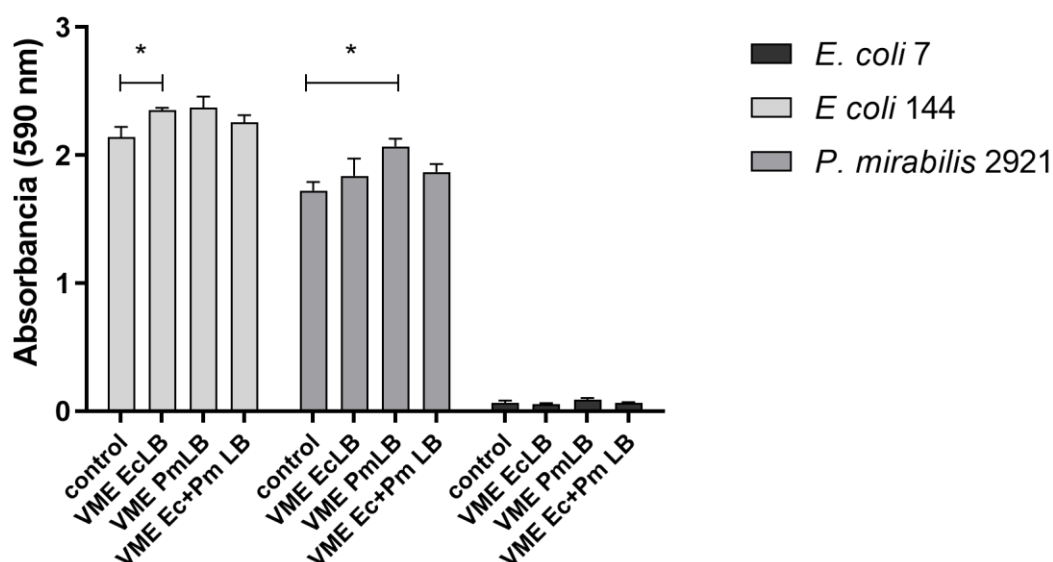


Figura 29. Cuantificación de la biomasa del biofilm de los diferentes aislamientos incubados con las VME. *E. coli* 144 y *P. mirabilis* 2921 fueron incubados con las VME propias, las de la otra especie y con una mezcla de ambas. En el caso de *E. coli* 7, también fueron incubadas con las VME de EcLB, PmLB y una mezcla de ambas. *Diferencias significativas con p-valor < 0.05

6. Discusión

Las vesículas de membrana externa son partículas esféricas liberadas desde la membrana externa de bacterias gram-negativas (Beveridge, 1999). La producción de VME constituye no solo un mecanismo fisiológico habitual en la bacteria, sino que está principalmente relacionado a una respuesta al estrés ambiental (Kulp, 2010). En otros trabajos, las VME han sido asociadas con la supervivencia de la bacteria, jugando un rol fundamental en la adquisición de nutrientes, la comunicación bacteriana intra e interespecífica, la formación de biofilms, la persistencia, defensa de la bacteria y la patogenicidad (Kulp, 2010). La composición, función y cantidad de VME producida depende de las vías de biogénesis. Previamente, se ha demostrado que las VME presentan diferentes estructuras y características dependiendo del modo de producción y de las condiciones del entorno de la bacteria (Kulp, 2010). El principal mecanismo por el cual las bacterias gram-negativas producen VME es por brotamiento de la membrana externa de la envoltura bacteriana. Por lo tanto, las VME producidas de esta forma están enriquecidas con proteínas de membrana externa (OMPs), presentan cierta composición lipídica específica y difieren en la cantidad y el contenido de moléculas en relación a otro tipo de vesículas extracelulares (Orench-Rivera, 2016).

Hasta el momento no hay reportado un único procedimiento para la obtención de vesículas de membrana externa. Al contrario, existen diversas estrategias que van desde el uso de diversos medios de cultivo, hasta la forma de concentrar y purificar las VME (Klimentova, 2015). La estrategia de obtención es necesaria tenerla en cuenta al comparar el tamaño y la cantidad de VME con otros trabajos. A diferencia de algunos trabajos previos de otros autores, la producción de VME se realizó en medio LB en las condiciones tradicionales de laboratorio, sin añadir ninguna inducción de estrés y compararlo con la producción de VME en un medio más restrictivo, como la orina artificial. La OA es un medio que brinda un entorno a la bacteria uropatógena más similar al encontrado en la vejiga en la orina humana. De esta manera, las VME obtenidas se aproximan a las producidas de forma natural que en los medios de cultivo tradicionalmente empleados. Por lo mencionado anteriormente, en este trabajo se aisló, caracterizó y comparó la producción de VME por *E. coli* y *P. mirabilis* cultivadas en medio LB y OA. A partir de las VME obtenidas, se determinó y comparó el perfil proteico para ambos patógenos. Por último, el rol de las VME en la comunicación bacteriana se evaluó mediante ensayos de asociación de las VME a las bacterias y de formación de biofilm.

6.1 Tamaño de las VME

Las VME son nanopartículas que presentan un tamaño en el rango de 20 a 400 nm de diámetro (Pin, 2023). Si bien su composición es heterogénea, en gram-negativas están compuestas de una única membrana lipídica, que presenta LPS, proteínas de membrana y material del espacio periplásmico. Las VME pueden contener toxinas, factores de virulencia y material genético (Pin, 2023). Debido al pequeño tamaño, en la escala nanométrica, se ha propuesto que las VME son capaces de llegar a las células eucariotas en las capas más profundas dentro de los tejidos, que usualmente son inaccesibles para las bacterias (Khuen, 2005). La diferencia en los tamaños podría estar asociada con las potenciales rutas de internalización en las células eucariotas. Las VME más pequeñas, con tamaños entre 20 y 100 nm, entran a la célula por la vía de la endocitosis mediada por caveolina, mientras que las vesículas que miden entre 20 y 250 nm se internalizan por la vía de la endocitosis mediada por clatrina. Las VME de mayor tamaño, entre 90 y 450 nm se internalizan en la célula eucariota por macropinocitosis (O'Donoghue, 2016; Turner et al, 2018; Wang, 2023). Zavan y colaboradores encontraron que una única población de *Helicobacter pylori* presentaba variaciones en el tamaño de las VME producidas (Zavan, 2018). También se han reportado que existen diferencias de tamaño según el contenido de las VME, donde una misma población de bacterias produce una distribución bimodal de tamaños según si contienen o no una toxina (Balsalobre, 2006; Singh, 2023). En este trabajo se obtuvieron VME de *E. coli* y *P. mirabilis*. Las VME obtenidas presentan una variación en su tamaño que depende de las condiciones en las cuales fueron producidas. Las VME de *P. mirabilis* presentaron un mayor tamaño que las de *E. coli*, con una media de la longitud del diámetro mayor de 250 nm de acuerdo a lo medido por DLS. En el caso de *E. coli*, el diámetro de las VME fue menor de 250 nm. Estas diferencias podrían explicarse por la estrategia que emplean estas bacterias para invadir las células eucariotas, y por lo tanto, por cual vía usan para ser internalizadas las VME. Específicamente para *E. coli*, estos dos fenómenos también podrían estar relacionados con la forma en que este patógeno invade las células uroepiteliales de la vejiga y su capacidad para formar CBI, ya que su forma de internalización se da vía clatrina (Eto, 2008; Flores, 2023). La internalización de las VME podría generar una permeabilidad en la membrana de las células, lo que facilitaría la entrada de la bacteria. El mecanismo de internalización de *P. mirabilis* varía según la cepa bacteriana y según la línea celular (Oelschlaeger, 1996). En todo caso, el tamaño también facilita la translocación de las VME a través de diversas barreras, como es el caso de las VME de *E. coli* O157 a través del epitelio intestinal (Krsek, 2023).

E. coli 144 es un aislamiento que presenta sólo algunos de los factores de virulencia característicos de UPEC, ya que no posee los genes para la hemolisina *hlyA*, la toxina *CNF-1a*, los sideróforos *iutA* (aerobactina) y *fyuA*, la isla de patogenicidad *PAI*, entre otros (González et al., 2020). Behrouzi y colaboradores compararon las VME de aislamientos de *E. coli* patógenos y no patógenos encontrando una diferencia en los tamaños de las mismas, donde las VME de la cepa patógena mide entre 20-75 nm de diámetro, y entre 45-270 nm las VME de la cepa no patógena (Behrouzi, 2018). La cepa patógena fue capaz de producir VME mucho más pequeñas que la cepa no patógena (Behrouzi, 2018). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente, esto implicaría una estrategia diferente en la internalización de las VME, también dependiendo de la patogenicidad. En este trabajo, las VME son de un tamaño mayor a 75 nm, siendo más similares en tamaño a las VME producidas por *E. coli* no patógena.

Por otro lado, en relación al tamaño, también se encontraron diferencias de tamaño en las VME de cada cepa, según el medio en el cual fueron producidas, siendo las VME en OA de mayor tamaño que las producidas en LB.

Si bien todas las VME obtenidas presentaron una variación en el tamaño, presentaron bajos índices de polidispersidad, lo que significa que las VME obtenidas a partir de una misma población de bacterias son muy similares entre sí de tamaño o incluso homogéneas. A pesar del bajo índice de polidispersidad, se puede ver que hay una dispersión en los tamaños, que se hace evidente al emplear diferentes formas de medición (DLS, NTA y TEM).

En relación a la concentración de VME obtenidas, cada cepa alcanzó una similar concentración en ambos medios de cultivo empleados. En el caso de *E. coli* en el rango de 10^{11} VME/ml mientras que para *P. mirabilis* fue de 10^{10} VME/ml. Sin embargo, la producción de VME por bacteria calculada, nos puede indicar que en el caso de *P. mirabilis*, hay una diferencia según el medio en el cual la bacteria fue cultivada. En este caso, a un medio más restrictivo y estresante, una mayor producción de VME. Sin embargo, que el recuento bacteriano de *P. mirabilis* en OA sea bajo puede tener otra explicación. *P. mirabilis* en orina produce grandes biofilms, siendo incluso capaz de formar biofilms sobre los cristales que se producen como resultado de la degradación de la urea. Por lo que es sumamente probable que haya muy pocas bacterias planctónicas y la mayoría estén en el biofilm adherido al vidrio del matraz. Es por esto que la cantidad calculada de VME por bacteria puede estar sobreestimada. Por otro lado, también es probable que las VME obtenidas en esa condición, sean las producidas en el biofilm de *Proteus* principalmente.

6.2 Composición de las VME

La composición específica de las VME determina sus propiedades biofísicas y, por lo tanto, su habilidad de fusionarse con otras membranas, como las membranas de los endosomas y lisosomas. Mediante este proceso de fusión, las VME comparten su contenido (Sartorio, 2021). Por lo tanto, pueden desencadenarse diferentes vías de señalización con la activación concomitante de respuestas pro o anti inflamatorias (O'Donoghue, 2016).

La VME contienen un número importante de proteínas de membrana externa y periplásmicas, dentro de las cuales se han definido algunas como marcadores de vesículas. Entre estas proteínas se encuentran las proteínas de membrana externa (OMPs) OmpA, OmpC y OmpF y la proteína del espacio periplásmico AcrA, reportada en *E. coli* no patogénica (Lee, 2007; Sartorio, 2021; Flores, 2023). Las proteínas FepA y LpoA también pueden servir como marcadores proteicos ubicuos de las VME de *E. coli* (Hong, 2019). En este trabajo, todas las proteínas marcadoras mencionadas fueron identificadas en las VME de *E. coli*. En las VME de *P. mirabilis* se identificó de estas proteínas únicamente OmpA, OmpF y AcrA. Principalmente para *E. coli*, estos resultados apoyan que existe un conjunto básico de proteínas asociadas a las VME que se espera que estén presentes. Por este motivo, su presencia puede indicar que las VME fueron obtenidas correctamente.

Adicionalmente, en este trabajo se identificaron otras proteínas reportadas previamente en VME como TolB, Lpp y Pal. La lipoproteína de Braun (Lpp) de la membrana externa, junto con las interacciones no covalentes entre el peptidoglicano y la proteína A de la membrana externa (OmpA), contribuyen a la estabilidad de la envoltura bacteriana (Schwechheimer y Kuehn, 2015). Moon y colaboradores reportaron previamente que OmpA de *Acinetobacter baumannii* puede influenciar en la distribución de otras proteínas de la pared, que a su vez regulan la carga proteica de las VME (Moon, 2012). En este trabajo se encontró que OmpA tiene una abundancia relativa mayor en las VME obtenidas en medio LB. Esta diferencia en la abundancia puede ser asociada con su rol en la distribución de las proteínas en la envoltura bacteriana, en respuesta a la composición del medio de cultivo.

Por otro lado, se encontró que la lipoproteína Lpp presenta una mayor abundancia relativa en las VME obtenidas de *E. coli* en OA y de *P. mirabilis* cultivada en LB. Lpp regula las propiedades mecánicas de la envoltura celular conectando de forma covalente la membrana externa al peptidoglicano, y controlando el tamaño del espacio periplásmico (Mathelié-Guinlet, 2020). Lpp puede localizarse tanto en la membrana como en el espacio periplásmico (Cowles, 2011). En resumen, se observó una diferencia en la composición de lipoproteínas y porinas de las superficies de las VME en relación con el medio de cultivo. Esto ocurre tanto

en las OMV derivadas de *E. coli* como en las derivadas de *P. mirabilis*, pero con resultados opuestos.

En un trabajo previo se encontró que mutantes de *Salmonella typhimurium* que no tienen OmpA, LppAB, Pal y TolB incrementan la producción de VME. Incluso, las vesículas liberadas por la mutante *lppAB* fueron más pequeñas en tamaño, mientras que las mutantes en *pal*, *tolB* y *tolA* produjeron VME significativamente más grandes que las producidas por la cepa WT (Deatherage, 2009). El trabajo de Deatherage brinda evidencia de que el tamaño de las VME está relacionado con las proteínas que carga, principalmente las que son componentes de la envoltura bacteriana, algo que también observamos en este trabajo.

Generalmente las VME están enriquecidas en proteínas de membrana externa y del espacio periplásmico, sin embargo, no hay consenso en si deben o no estar libres de contenido citosólico (Toyofuku, 2023). Algunos autores han reportado que las VME producidas por bacterias gram-negativas efectivamente contienen material citoplasmático. En este sentido, se demostró que las OMV de *E. coli* Nissle 1917 y *E. coli* DH5α presentaban aproximadamente un 40% de proteínas citoplasmáticas (Kulp y Kuehn, 2010; Aguilera, 2014). Los resultados de este trabajo coinciden con estas observaciones. Aunque en las VME aisladas en este trabajo se identificaron altos porcentajes de proteínas de membrana externa y periplásmicas, alrededor del 50% de las proteínas identificadas se clasificaron como citoplasmáticas. Esto podría explicarse por un posible empaquetamiento aleatorio de proteínas citoplasmáticas, o la producción de otros tipos de vesículas de membrana, como las VM interna-externa (VMIE) o las VM producidas por lisis bacteriana (Toyofuku, 2023). Si bien en las imágenes de TEM se observó la presencia de VMIE, la gran mayoría de las vesículas observadas presentan una sola bicapa lipídica. A su vez, las VMIE representan menos del 1% del total de vesículas secretadas (Pérez-Cruz, 2015). Por lo tanto, un 50% de proteínas citoplasmáticas debe implicar un proceso específico que explique mejor la presencia de las mismas, que solamente la formación de VMIE. Queda saber si estas proteínas son empaquetadas de forma azarosa o existen mecanismos que direccionen a las proteínas a las VME. Por ejemplo, McBroom y Kuehn encontraron que el estrés a temperaturas altas en *E. coli* lleva a una acumulación de proteínas mal plegadas que finalmente son removidas al ser empaquetadas en VME (McBroom y Kuehn, 2007). Si consideramos que las VME son un mecanismo de excreción de proteínas defectuosas, deberían existir estos mecanismos de empaquetamiento o direccionamiento de forma habitual.

6.3 Perfil proteómico de las VME

El perfil proteómico de las VME se realizó mediante la digestión en gel, seguido de un análisis por nano LC-MS/MS. Las proteínas obtenidas de las VME de UPEC y de *P. mirabilis* obtenidas en dos condiciones de cultivo (LB y OA) fueron analizadas.

En contraste a un medio nutricionalmente rico como el LB, la orina en la vejiga presenta un ambiente de alta osmolaridad, oxígeno moderado y limitado en hierro que contiene principalmente aminoácidos y mini péptidos (Brooks y Keevil, 1997). Además, en la vejiga también hay un flujo constante causado por la micción que supone un desafío constante a las bacterias (Asscher, 1966; Stammey y Mihara, 1980). Al comparar el contenido proteómico de las VME producidas en LB y OA se puede evidenciar la presencia de proteínas requeridas por los uropatógenos en el contexto de las infecciones del tracto urinario.

Existen trabajos previos que estudian el contenido proteómico de las VME en patógenos. En uropatógenos, solo hay reportes de UPEC, pero no se ha reportado hasta el momento una caracterización proteómica de las VME de *P. mirabilis*.

Wurpel y colaboradores estudiaron las VME de 54 cepas de UPEC, incluyendo entre estos 4 aislamientos de UPEC de referencia: 536, CFT073, UMN026 y UTI89. Los aislamientos fueron incubados en medio mínimo M9 (Wurpel, 2015). En ese trabajo identificaron 619 proteínas únicas dentro de las VME. Luego, en otro trabajo, analizaron el proteoma de 5 UPEC de referencia, sumando la cepa F11, a partir de VME producidas en orina humana, donde encontraron un set de 173 proteínas no redundantes (Wurpel, 2016). La principal diferencia con este trabajo es la evaluación indirecta de la composición de la membrana externa en UPEC, ya que emplean un método de inducción artificial de las VME con EDTA, a diferencia de la producción natural de las VME evaluadas en este trabajo. Nosotros pudimos identificar 282 y 215 proteínas en las VME de *E. coli* en medio LB y OA respectivamente. En el caso de *P. mirabilis*, se identificaron 353 y 103 proteínas en las VME producidas en LB y OA.

6.3.1 Proteínas en las VME de *E. coli* 144.

En el presente trabajo, se analizó el contenido proteico de las VME producidas por una *E. coli* patógena en LB y OA (Robino, 2014b). Esta cepa de UPEC es capaz de formar biofilms y de invadir las células uroteliales de la vejiga formando comunidades bacterianas intracelulares (González, 2017; González, 2020). A pesar de ser un aislamiento uropatógeno, esta cepa no tiene las típicas toxinas expresadas por UPEC como *hlyA* y *cnf1*. Tampoco presenta los genes de virulencia *iutA*, *ibeA*, PAI y *fyuA* (González, 2020). En otras cepas, se ha reportado a las

VME como mecanismo de *delivery* de las toxinas HlyA y CNF1 (Balsalobre, 2006; Kouokam, 2006). Como era esperable, no se identificaron estas toxinas en las VME de *E. coli* 144.

Las cepas de *E. coli* patogénica y *E. coli* comensal producen diferentes VME que poseen efectos diferentes. Mientras que las VME de *E. coli* patogénica incrementa la expresión de citoquinas proinflamatorias, las VME de *E. coli* comensal tienen un efecto anti inflamatorio (Behrouzi, 2018). Las proteínas OmpA, CirA y FepA, también encontradas en VME, son candidatas a desencadenar respuestas inflamatorias de los macrófagos mediadas por exosomas (Imamiya, 2023)

Las adhesinas son de gran importancia para la colonización del hospedero ya que median la adhesión y son un factor de virulencia en bacterias patógenas. La coadherencia y la coagregación de bacterias requieren adhesinas funcionalmente desplegadas y multivalentes. FimH es una adhesina que le permite a UPEC unirse a la uroplaquina que se encuentra en la superficie de las células uroteliales, siendo un importante factor de virulencia (Bezhadi y Bezhadi, 2016). Blackburn y colaboradores estudiaron las VME de una cepa de *E. coli* K 12, encontrando que la proteína dominante fue FimA. Además, pudieron determinar que FimA y FliC están co-reguladas (Blackburn, 2021). En nuestro trabajo detectamos como parte del contenido de las VME varias proteínas fimbriales, principalmente FimG y FimH, que varía su presencia según las condiciones del medio. Esto podría indicar que las VME actúan como un mecanismo de *delivery* de adhesinas, que no tienen solo una función de adhesión, sino que también pueden activar varios mecanismos en la célula eucariota.

El flagelo y las fimbrias de tipo 1 están co-regulados y ambos participan de la adhesión de *E. coli* y de la formación de biofilm (Blumer, 2005; Badea, 2009). La movilidad mediada por flagelos y la quimiotaxis son elementos que contribuyen a la virulencia, permitiendo que UPEC escape a la respuesta inmune y se disperse a nuevos sitios dentro del tracto urinario (Lane, 2005). En trabajos anteriores se demostró que varios genes relacionados al movimiento por flagelos se expresan menos *in vivo* en comparación a su expresión en medio de cultivo LB (Snyder, 2004). Encontramos que las proteínas FlgL y FlgK, codificadas por algunos de los genes mencionados anteriormente, fueron detectadas solamente en las VME obtenidas en medio LB, mientras que FliC presentó una mayor abundancia en este mismo medio. Tanto las fimbrias tipo 1 (FimH) como la flagelina (FliC) son capaces de activar el sistema inmune celular, en particular los receptores TLR4 y TLR5 (Mossman, 2008; Alteri y Mobley, 2015). Por lo mencionado antes, la presencia de estas proteínas en las VME puede estar asociada con la inducción de citoquinas proinflamatorias.

En la orina, el mayor grupo de genes y proteínas regulados de forma similar e inducidos, son los que intervienen en la adquisición de hierro, en respuesta a un ambiente restrictivo en

hierro en el cual la bacteria debe adaptarse (Alteri y Mobley, 2015). Los sistemas de adquisición de hierro son un importante factor de virulencia en UPEC (Alteri y Mobley, 2015). En estudios previos se reportó la presencia de proteínas de captación de hierro en VME de *E. coli*, como el receptor Fiu que reconoce el sideróforo catecolato; componentes del sistema de captación de hierro EfeO y el receptor FhuA que reconoce al sideróforo ferrocromo-hierro (Moeck, 1997; Rajasekaran, 2010; Grinter et al., 2019). Las VME podrían tener un rol en la recolección de sideróforos unidos a moléculas de hierro a través de los receptores específicos de la membrana externa mencionados. En particular, en este trabajo observamos un aumento significativo en la abundancia relativa del receptor de ferrienterobactina FepA en las VME obtenidas de UPEC cultivadas en OA. Por otro lado, a pesar de que los receptores TonB-dependientes están enriquecidos en UPEC durante su crecimiento en orina humana (Alteri y Mobley, 2007), no encontramos proteínas TonB en las VME de *E. coli*.

6. 3. 2 Proteínas en las VME de *P. mirabilis* 2921.

Si bien los roles potenciales de las VME se han estudiado desde hace años, poco se conoce sobre la producción, *delivery* y los procesos en los cuales participan las VME de *P. mirabilis*. En este sentido, este trabajo representa un aporte significativo reportando por primera vez la composición proteica de las VME producidas por *P. mirabilis* en dos condiciones de cultivo diferentes (LB y OA). Para llevar a cabo este estudio, utilizamos una cepa de *P. mirabilis* aislada de un paciente con ITU sintomática (Zunino, 2000), que tiene la particularidad de ser capaz de producir fuertes biofilm (Schlapp, 2011; Scavone, 2023).

La diferencia en el número de proteínas detectadas exclusivamente en LB y que presentan una mayor abundancia en medio LB es sustancialmente más alto, en comparación con las encontradas en OA. Este fenómeno fue observado en ambos patógenos estudiados, pero se hizo más evidente en el caso del proteoma de las VME de *P. mirabilis*. Es probable que las diferencias observadas puedan ser explicadas por la composición y complejidad del medio. La orina artificial es un medio restrictivo y desafiante para la bacteria, pudiendo ser de especial importancia para *P. mirabilis*. Es necesario destacar que, a pesar del menor número de proteínas, las proteínas sobre representadas en OA de *P. mirabilis* son de alta relevancia biológica, así como pertenecen casi exclusivamente a procesos de adquisición de hierro. Esto se condice con la respuesta bacteriana a la depleción de hierro en la OA, también observada en la orina natural.

En este trabajo pudimos identificar varios marcadores de VME en las muestras obtenidas a partir del cultivo de *P. mirabilis* tanto en LB como en OA. Entre estas proteínas se encuentran OmpA, OmpF, OmpW (solo en LB), TolC, TolB, AcrA, TufB, Pal y Lpp. Estos resultados confirman la correcta obtención de las VME de *P. mirabilis*.

Las formas de movilidad swimming y swarming son características de este uropatógeno, donde los flagelos juegan un papel fundamental en ambos procesos (Scavone et al 2023). La presencia de flagelo en la superficie de *P. mirabilis* ayudaría en la colonización y difusión desde el sitio de adhesión (Schaffer y Pearson, 2017). Así como en las VME de *E. coli*, se encontraron proteínas flagelares y fimbriales en las VME de *P. mirabilis* obtenidas en LB.

P. mirabilis contiene en su genoma la mayor cantidad de fimbrias observadas en un único genoma bacteriano (Kuan, 2014). La fimbria MR/P es hasta ahora la más estudiada en *P. mirabilis* y se ha propuesto que participa en la adhesión al urotelio y contribuye a la bacteria a establecer la infección en el tracto urinario (Al-Hamdani, 2020). Varios componentes de la fimbria MR/P fueron identificados en este trabajo, entre ellos MrpH, MrpB, MrpE, MrpF y MrpG. Estas proteínas fimbriales presentaron una mayor abundancia en las VME obtenidas en LB, mientras que en OA se observó una mayor abundancia relativa de la subunidad fimbrial MrpA. La aparición de estas proteínas en las VME, se relaciona con la función de la fimbria, ya que MR/P es relevante en la colonización y la adhesión en la vejiga. Por otro lado, la subunidad estructural MrpA que aparece solo en las VME de OA, tiene de por sí propiedades inmunogénicas (Lane, 2009). Que estas proteínas se presenten de forma diferencial según el medio de cultivo, puede indicar la existencia de funciones específicas de cada parte de la fimbria.

La fimbria UCA/NAF es responsable por la adhesión de *P. mirabilis* a las células uroepiteliales exfoliadas en la orina, así como un factor importante en la patogenicidad (Pellegrino, 2013; Jiang, 2018). Las proteínas PMI0535 (chaperona fimbrial) y PMI0534 (proteína fimbrial usher) fueron detectadas en las VME de *P. mirabilis* en ambas condiciones, y pertenecen al operón fimbrial UCA. También se identificaron varias proteínas fimbriales relevantes, pertenecientes a las fimbrias PMF de *P. mirabilis*. Las proteínas encontradas fueron PmfA, PmfE y PmfF. Fue reportado previamente que estas fimbrias son importantes para la colonización de la vejiga y los riñones (Zunino et al., 2003).

D'Alessandro y colaboradores llevaron a cabo un análisis comparativo de las proteínas de membrana externa de *P. mirabilis* tanto *in vitro* como *in vivo*, usando varios aislamientos clínicos, que incluyen la cepa de *P. mirabilis* 2921. En ese trabajo encontraron que las bacterias habían reducido la expresión de las proteínas OmpA y OmpF en la infección *in vivo*, siendo más abundantes en un medio rico nutritivamente (D'Alessandro, 2011). Ese resultado fue consistente con lo observado por nosotros, donde estas proteínas fueron más abundantes en LB, y menos abundante en OA, que es más similar a la condición real en la orina. Incluso, ellos encontraron que varios receptores de membrana dependientes de TonB fueron expresados por la bacteria cultivada en condiciones de restricción de hierro, incluyendo las

proteínas PMI2596 e IreA (D'Alessandro, 2011). Nuestros resultados concuerdan con esas observaciones, ya que también identificamos el mismo conjunto de proteínas en OA, un medio restringido en hierro. Las proteínas que fueron detectadas exclusivamente o con una mayor abundancia relativa en las VME de *P. mirabilis* producidas en OA fueron: PMI2596, PMI1548, PMI0363, PMI0233 and PMI0409, que son todas receptores de sideróforos dependientes de TonB. Una hipótesis es que este efecto estaría asociado a una respuesta al estrés debido a la deficiencia de hierro. En parte se puede explicar por el aumento de estos receptores en toda la membrana externa de la bacteria, pero además existe una mayor producción de estas vesículas por bacteria en este medio.

La producción de toxinas como factores de virulencia está bien descrita para varios patógenos de humanos. En el caso de *P. mirabilis*, están descritas tres toxinas o enzimas que son parte de la patogenia en el tracto urinario: la aglutinina tóxica de Proteus (Proteus toxic agglutinin, PTA), la ureasa y la hemolisina (HmpA). HmpA es una toxina capaz de formar poros en la membrana de las células eucariotas, desencadenando el flujo de iones y la consecuente lisis celular (Cabezas, 2019). Esta toxina fue la única proteína de este grupo de factores encontrada en las VME de *P. mirabilis* producidas tanto en OA como en LB. Considerando este hallazgo, es posible que las VME sean un potencial mecanismo por el cual la hemolisina es secretada. Esto sería similar a la secreción de toxinas por VME de otras bacterias patógenas, como la STX en *E. coli* enterohemorrágica (Kim, 2011) y de CNF1 y la HlyA en UPEC (Kouokam, 2003; Balsalobre, 2006). La proteína HmpB que activa HmpA fue detectada también, pero de forma exclusiva en las VME obtenidas en OA, por lo que es probable que la activación de esta hemolisina se de en las condiciones más restrictivas. Por lo que la liberación de la hemolisina sería constitutiva, pero la activación específica se daría según la necesidad de la bacteria.

6.4 Producción de VME como mecanismo de comunicación entre bacterias

Si bien se han reportado a las VME en diversos artículos y revisiones como un mecanismo más de comunicación bacteriana, pocos son los que han demostrado esta función. A pesar de esto, existe un consenso general en que las VME son participantes activos en la comunicación intercelular entre bacteria-bacteria y bacteria-hospedero (Jan, 2017; Gao, 2018). Para que las VME produzcan un efecto sobre otra bacteria o sobre una célula eucariota, deben de poder liberar su contenido cerca o incluso, fusionarse con otra membrana liberando su contenido al interior. Mashburn y cols. encontraron que *Pseudomonas aeruginosa* empaqueta en VME a la molécula de señalización 2-heptil-3-hidroxi-4-quinolona (PQS). Esta molécula es parte del sistema de quorum sensing de esta bacteria, y cuando

eliminan las VME cargadas, se detiene la comunicación célula-célula inhibiendo el comportamiento en grupo de las bacterias (Mashburn y Whiteley, 2005). Un estudio publicado por Lin y cols. revelaron un vínculo entre el sistema de secreción H3-T6SS y la señalización célula-célula en *P. aeruginosa*. El compuesto de señalización célula-célula PQS contribuye a la formación de VME y se asocia con las membranas de las vesículas. El PQS de las VME además puede capturar hierro del medio extracelular. Paralelamente, secretan la proteína TseF que al asociarse a las VME permite la entrega del PQS asociado al hierro a las células bacterianas, lo que demuestra la importancia de las VME en la comunicación (Lin, 2017).

La presencia de moléculas de QS dentro de las VME es una señal de que actúan como un sistema de comunicación, pero además es necesario evaluar si las bacterias son capaces de aceptar en su envoltura bacteriana a las VME. Por un lado, se encontraron proteínas de QS en las VME de *E. coli* y de *P. mirabilis*. Entre estas proteínas relacionadas a la quimiotaxis, se encontraron en las VME de *E. coli* las proteínas Tsr, Tar y CheA, exclusivamente en las obtenidas en medio LB. En el caso de *P. mirabilis*, se identificaron en las VME producidas en LB las proteínas CheA, CheW, PMI1665 y PMI2380 (proteínas de quimiotaxis metilo-aceptoras). En el caso de algunas de estas proteínas como CheA y CheW, actúan en la movilidad bacteriana, sobre el funcionamiento del flagelo (Muok., 2020). Esto afirma nuestra hipótesis de que las VME participan en la comunicación.

Con el fin de confirmar si existe una asociación entre las VME y las bacterias, es necesario evaluar si existe un intercambio del contenido de las VME con las células bacterianas. En este trabajo encontramos que existe un grado de asociación que varía según las cepas y según si este es intra o inter especie. *E. coli* es capaz de aceptar las VME mucho más rápidamente que *P. mirabilis*, que es más dependiente del tiempo. A su vez, las VME producidas en LB son aceptadas más rápido en *E. coli*, lo que podría explicarse por un tipo de comunicación o de producción de VME más constitutivo, donde produce y acepta las VME de forma constante. En el caso de *P. mirabilis* que la asociación es más lenta, es probable que las VME actúen más a distancia, o cuando hay una mayor cantidad en el ambiente. También puede que estén cargando nutrientes o compuestos del medio (como el hierro) para luego incorporarlos a la propia bacteria. *P. mirabilis* presentó una mayor asociación a las 3 hs con las VME de OA, que seguramente son las más cargadas en moléculas de hierro, y presentan una batería de receptores de captación de hierro.

La asociación de las VME de una especie con bacterias de otra especie fue confirmada en este trabajo, ya que todas las cepas, incluyendo *E. coli* ATCC fueron capaces de incorporar las VME “ajenas”. Algo similar fue observado por Tashiro y cols. que prueba la asociación de las VME de *P. aeruginosa* PAO1 y *Buttiauxella agrestis* (Enterobacteria). Ellos encuentran

que las VME de *P. aeruginosa* se asocia con todas las cepas probadas, aunque en diferentes medidas, pero las de *B. agrestis* solo se asocia con la cepa parental (Tashiro, 2017). *E. coli* y *P. mirabilis* presentan un comportamiento más similar a *P. aeruginosa*, por lo que esto podría ser algo exclusivo de los patógenos, en tanto cepas como *B. agrestis* que no son patógenas, no lo presentan.

6.5 La formación de biofilms y el rol de las VME

Debido a la gran importancia en la virulencia que representa la capacidad de formar biofilms, existen trabajos previos que han estudiado la posible relación entre la formación de biofilms y la producción de VME. Las VME de *P. aeruginosa* PAO1 son importantes para la estructura tridimensional y la formación del biofilm maduro (Murphy, 2014), mientras que en *P. putida* DOT-T1E, las VME aumentan la hidrofobicidad de la superficie de las células, lo que mejora su capacidad para formar biopelículas (Baumgarten, 2012). Además, se ha reportado la importancia de las VME en la formación del biofilm de *Helicobacter pylori*, *Francisella* y *Vibrio cholerae* (Yonesawa, 2011; Van Hoeck, 2013; Altindis, 2014). En este trabajo, encontramos una tendencia similar, pero que es especie específica, ya que solo se observó aumento de la biomasa del biofilm al incubar con las VME producidas por la propia bacteria. Es necesario destacar que el efecto observado es el aumento de la biomasa y no la disminución, como se ha observado en algunos trabajos previos (Wang, 2021). Esto implica que las VME tienen un efecto positivo en la formación del biofilm, similar a lo mencionado anteriormente para otras bacterias. Si bien era esperable que existiera esta tendencia en estas cepas que son grandes formadoras de biofilm, es interesante que solo las VME de LB hayan tenido un efecto significativo y no las producidas en OA, que como pudimos comprobar, se especializan en la captación de hierro. La captación de hierro es uno de los factores importantes en la supervivencia en las condiciones limitadas del tracto urinario, así como también en la capacidad de formación del biofilm (Iribernagaray, 2021).

7. Conclusión

En el presente trabajo, obtuvimos vesículas de membrana externa (VME) producidas de manera natural por *E. coli* y *P. mirabilis* bajo dos condiciones diferentes: un medio de cultivo rico como el caldo LB y uno restringido como OA. Las VME difirieron en cantidad, tamaño y composición según la cepa y el medio de cultivo, lo que sugiere diferencias en la función de las mismas. Las VME producidas en LB son más pequeñas, permiten la comunicación entre bacterias de una misma población y parecen ser producidas de forma constitutiva, presentando diversas proteínas. Las VME producidas en OA, son de mayor tamaño, y se

producen principalmente como respuesta al estrés por un medio más restrictivo. Por su composición proteica, tienen una función relacionada con los sistemas de captación de zinc y hierro, por lo que su participación en la comunicación bacteriana implica tiempos de asociación mayores, con el fin de cargar el hierro disponible del medio. Por otro lado, las VME contienen diversos factores de virulencia, desde proteasas, proteínas del quorum sensing y toxinas que favorecen a la bacteria en su infección al tracto urinario.

8. Referencias bibliográficas

- Adeolu, M., Alnajjar, S., Naushad, S., & S. Gupta, R. (2016). Genome-based phylogeny and taxonomy of the 'Enterobacteriales': proposal for Enterobacterales ord. nov. divided into the families Enterobacteriaceae, Erwiniaceae fam. nov., Pectobacteriaceae fam. nov., Yersiniaceae fam. nov., Hafniaceae fam. nov., Morganellaceae fam. nov., and Budviciaceae fam. nov. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, 66(12), 5575-5599.
- Aguilera, L., Toloza, L., Gimenez, R., Odena, A., Oliveira, E., Aguilar, J., et al. (2014). Proteomic analysis of outer membrane vesicles from the probiotic strain *Escherichia coli* Nissle 1917. *Proteomics*, 14(2-3), 222-229. <https://doi.org/10.1002/pmic.201300328>
- Al-Hamdani, H., & Al-Hashimy, A. (2020). Molecular detection of UREC, HPMA, RSBA AND MRPA genes of *Proteus Mirabilis* urinary tract infection in patient with rheumatoid arthritis. *The Iraqi Journal of Agricultural Science*, 51, 245-251.
- Alamuri, P., & Mobley, H. L. (2008). A novel autotransporter of uropathogenic *Proteus mirabilis* is both a cytotoxin and an agglutinin. *Molecular microbiology*, 68(4), 997-1017. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2008.06199.x>
- Alonso, B., Bernadà, M., Pereda, M., Traversa, M., Lechini, R., MARIÑO, S., et al. (2001). Infección urinaria en niños: agentes patógenos y sensibilidad antibiótica. *Archivos de Pediatría del Uruguay*, 72(4), 270-275.
- Alteri, C. J., & Mobley, H. L. (2007). Quantitative profile of the uropathogenic *Escherichia coli* outer membrane proteome during growth in human urine. *Infection and immunity*, 75(6), 2679-2688. <https://doi.org/10.1128/iai.00076-07>
- Alteri, C. J., & Mobley, H. L. (2015). Metabolism and fitness of urinary tract pathogens. *Metabolism and Bacterial Pathogenesis*, 215-230. <https://doi.org/10.1128/9781555818883.ch10>
- Altindis, E., Fu, Y., & Mekalanos, J. J. (2014). Proteomic analysis of *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 111(15), E1548-E1556. <https://doi.org/10.1073/pnas.1403683111>
- Anderson, G. G., Palermo, J. J., Schilling, J. D., Roth, R., Heuser, J., & Hultgren, S. J. (2003). Intracellular bacterial biofilm-like pods in urinary tract infections. *Science*, 301(5629), 105-107. DOI: [10.1126/science.1084550](https://doi.org/10.1126/science.1084550)
- Ashkar, A. A., Mossman, K. L., Coombes, B. K., Gyles, C. L., & Mackenzie, R. (2008). FimH adhesin of type 1 fimbriae is a potent inducer of innate antimicrobial responses which requires TLR4 and type 1 interferon signalling. *PLoS pathogens*, 4(12), e1000233. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1000233>
- Asscher, A. W., Sussman, M., Waters, W. E., Davis, R. H., & Chick, S. (1966). Urine as a medium for bacterial growth.
- Badea, L., Beatson, S. A., Kaparakis, M., Ferrero, R. L., & Hartland, E. L. (2009). Secretion of flagellin by the LEE-encoded type III secretion system of enteropathogenic *Escherichia coli*. *BMC microbiology*, 9, 1-10. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-30>
- Bahrani, F. K., & Mobley, H. L. (1994). *Proteus mirabilis* MR/P fimbrial operon: genetic organization, nucleotide sequence, and conditions for expression. *Journal of bacteriology*, 176(11), 3412-3419. <https://doi.org/10.1128/jb.176.11.3412-3419.1994>
- Balsalobre, C., Silván, J. M., Berglund, S., Mizunoe, Y., Uhlin, B. E., & Wai, S. N. (2006). Release of the type I secreted α -haemolysin via outer membrane vesicles from *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 59(1), 99-112. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2005.04938.x>

- Barber, A. E., Norton, J. P., Wiles, T. J., & Mulvey, M. A. (2016). Strengths and limitations of model systems for the study of urinary tract infections and related pathologies. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 80(2), 351-367. <https://doi.org/10.1128/mnbr.00067-15>
- Baumgarten, T., Sperling, S., Seifert, J., Von Bergen, M., Steiniger, F., Wick, L. Y., et al. (2012). Membrane vesicle formation as a multiple-stress response mechanism enhances *Pseudomonas putida* DOT-T1E cell surface hydrophobicity and biofilm formation. *Applied and environmental microbiology*, 78(17), 6217-6224. <https://doi.org/10.1128/AEM.01525-12>
- Behrouzi, A., Vaziri, F., Riazi Rad, F., Amanzadeh, A., Fateh, A., Moshiri, A., et al. (2018). Comparative study of pathogenic and non-pathogenic *Escherichia coli* outer membrane vesicles and prediction of host-interactions with TLR signaling pathways. *BMC research notes*, 11, 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3648-3>
- Beveridge, T. J., Makin, S. A., Kadurugamuwa, J. L., & Li, Z. (1997). Interactions between biofilms and the environment. *FEMS Microbiology reviews*, 20(3-4), 291-303. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.1997.tb00315.x>
- Beveridge, T. J. (1999). Structures of gram-negative cell walls and their derived membrane vesicles. *Journal of bacteriology*, 181(16), 4725-4733. <https://doi.org/10.1128/jb.181.16.4725-4733.1999>
- Behzadi, E., & Behzadi, P. (2016). The role of toll-like receptors (TLRs) in urinary tract infections (UTIs). *Central European journal of urology*, 69(4), 404. <https://doi.org/10.5173%2Fceju.2016.871>
- Bielaszewska, M., Rüter, C., Kunsmann, L., Greune, L., Bauwens, A., Zhang, W., et al. (2013). Enterohemorrhagic *Escherichia coli* hemolysin employs outer membrane vesicles to target mitochondria and cause endothelial and epithelial apoptosis. *PLoS pathogens*, 9(12), e1003797. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1003797>
- Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. (2012). Role of uropathogenic *Escherichia coli* virulence factors in development of urinary tract infection and kidney damage. *International journal of nephrology*, 2012(1), 681473. <https://doi.org/10.1155/2012/681473>
- Biller, S. J., Schubotz, F., Roggensack, S. E., Thompson, A. W., Summons, R. E., & Chisholm, S. W. (2014). Bacterial vesicles in marine ecosystems. *Science*, 343(6167), 183-186. DOI: [10.1126/science.1243457](https://doi.org/10.1126/science.1243457)
- Billips, B. K., Forrestal, S. G., Rycyk, M. T., Johnson, J. R., Klumpp, D. J., & Schaeffer, A. J. (2007). Modulation of host innate immune response in the bladder by uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 75(11), 5353-5360. <https://doi.org/10.1128/iai.00922-07>
- Blackburn, S. A., Shepherd, M., & Robinson, G. K. (2021). Reciprocal packaging of the main structural proteins of type 1 fimbriae and flagella in the outer membrane vesicles of “wild type” *Escherichia coli* strains. *Frontiers in microbiology*, 12, 557455. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.557455>
- Blango, M. G., Ott, E. M., Erman, A., Veranic, P., & Mulvey, M. A. (2014). Forced resurgence and targeting of intracellular uropathogenic *Escherichia coli* reservoirs. *PloS one*, 9(3), e93327. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0093327>
- Blenkiron, C., Simonov, D., Muthukaruppan, A., Tsai, P., Dauros, P., Green, S., et al. (2016). Uropathogenic *Escherichia coli* releases extracellular vesicles that are associated with RNA. *PloS one*, 11(8), e0160440. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0160440>
- Blumer, C., Kleefeld, A., Lehnen, D., Heintz, M., Dobrindt, U., Nagy, G., et al. (2005). Regulation of type 1 fimbriae synthesis and biofilm formation by the transcriptional regulator LrhA of *Escherichia coli*. *Microbiology*, 151(10), 3287-3298. <https://doi.org/10.1099/mic.0.28098-0>

Brooks, T., & Keevil, C. (1997). A simple artificial urine for the growth of urinary pathogens. *Letters in applied microbiology*, 24(3), 203-206. <https://doi.org/10.1046/j.1472-765X.1997.00378.x>

Cabezas, S., Ho, S., Ros, U., Lanio, M. E., Alvarez, C., & Van Der Goot, F. G. (2017). Damage of eukaryotic cells by the pore-forming toxin sticholysin II: Consequences of the potassium efflux. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1859 (5), 982-992. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.02.001>

Cassat, J. E., & Skaar, E. P. (2013). Iron in infection and immunity. *Cell host & microbe*, 13(5), 509-519. [10.1016/j.chom.2013.04.010](https://doi.org/10.1016/j.chom.2013.04.010)

Caza, M., & Kronstad, J. W. (2013). Shared and distinct mechanisms of iron acquisition by bacterial and fungal pathogens of humans. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 3, 80. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2013.00080>

Cestari, S. E., Ludovico, M. S., Martins, F. H., da Rocha, S. P. D., Elias, W. P., & Pelayo, J. S. (2013). Molecular detection of HpmA and HlyA hemolysin of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Current microbiology*, 67, 703-707. <https://doi.org/10.1007/s00284-013-0423-5>

Chahales, P., & Thanassi, D. G. (2017). Structure, function, and assembly of adhesive organelles by uropathogenic bacteria. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*, 277-329. <https://doi.org/10.1128/9781555817404.ch14>

Chakkour, M., Hammoud, Z., Farhat, S., El Roz, A., Ezzeddine, Z., & Ghssein, G. (2024). Overview of *Proteus mirabilis* pathogenicity and virulence. Insights into the role of metals. *Frontiers in Microbiology*, 15, 1383618. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2024.1383618>

Clemmer, K. M., & Rather, P. N. (2008). The Lon protease regulates swarming motility and virulence gene expression in *Proteus mirabilis*. *Journal of medical microbiology*, 57(8), 931-937. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47778-0>

Cowles, C. E., Li, Y., Semmelhack, M. F., Cristea, I. M., & Silhavy, T. J. (2011). The free and bound forms of Lpp occupy distinct subcellular locations in *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*, 79(5), 1168-1181. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2011.07539.x>

D'Alessandro, B., Lery, L. M., von Krüger, W. M., Lima, A., Piccini, C., & Zunino, P. (2011). Proteomic analysis of *Proteus mirabilis* outer membrane proteins reveals differential expression in vivo vs. in vitro conditions. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 63(2), 174-182. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00839.x>

Davis, J. M., Carvalho, H. M., Rasmussen, S. B., & O'Brien, A. D. (2006). Cytotoxic necrotizing factor type 1 delivered by outer membrane vesicles of uropathogenic *Escherichia coli* attenuates polymorphonuclear leukocyte antimicrobial activity and chemotaxis. *Infection and immunity*, 74(8), 4401-4408.

Deatherage, B. L., Lara, J. C., Bergsbaken, T., Barrett, S. L. R., Lara, S., & Cookson, B. T. (2009). Biogenesis of bacterial membrane vesicles. *Molecular microbiology*, 72(6), 1395-1407. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2009.06731.x>

Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: survival mechanisms of clinically relevant microorganisms. *Clinical microbiology reviews*, 15(2), 167-193. <https://doi.org/10.1128/cmr.15.2.167-193.2002>

Donnenberg MS, Welch RA. 1996. Virulence determinants of uropathogenic *Escherichia coli*. In Mobley HL and Warren JW (ed), *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. ASM Press, Washington, DC.

Eto, D. S., Jones, T. A., Sundsbak, J. L., & Mulvey, M. A. (2007). Integrin-mediated host cell invasion by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *PLoS pathogens*, 3(7), e100. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030100>

Eto, D. S., Gordon, H. B., Dhakal, B. K., Jones, T. A., & Mulvey, M. A. (2008). Clathrin, AP-2, and the NPXY-binding subset of alternate endocytic adaptors facilitate FimH-mediated bacterial invasion of host cells. *Cellular microbiology*, 10(12), 2553-2567.

Flores, C., Ling, J., Loh, A., Maset, R. G., Aw, A., White, I. J., et al. (2023). A human urothelial microtissue model reveals shared colonization and survival strategies between uropathogens and commensals. *Science Advances*, 9(45), eadi9834. <https://doi.org/10.1126/sciadv.adi9834>

Flores-Mireles, A. L., Walker, J. N., Caparon, M., & Hultgren, S. J. (2015). Urinary tract infections: epidemiology, mechanisms of infection and treatment options. *Nature reviews microbiology*, 13(5), 269-284. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3432>

Foxman, B. (2010). The epidemiology of urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(12), 653-660. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.190>

Foxman, B. (2002). Epidemiology of urinary tract infections: incidence, morbidity, and economic costs. *The American journal of medicine*, 113(1), 5-13. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01054-9](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01054-9)

Foxman, B. (2014). Urinary tract infection syndromes: occurrence, recurrence, bacteriology, risk factors, and disease burden. *Infectious Disease Clinics*, 28(1), 1-13. [10.1016/j.idc.2013.09.003](https://doi.org/10.1016/j.idc.2013.09.003)

Fulsundar, S., Harms, K., Flaten, G. E., Johnsen, P. J., Chopade, B. A., & Nielsen, K. M. (2014). Gene transfer potential of outer membrane vesicles of *Acinetobacter baylyi* and effects of stress on vesiculation. *Applied and environmental microbiology*, 80(11), 3469-3483. <https://doi.org/10.1128/AEM.04248-13>

Gao, H., Gao, Y., Yang, C., Dong, D., Yang, J., Peng, G., et al. (2018). Influence of outer membrane vesicles of *Proteus mirabilis* isolated from boar semen on sperm function. *Veterinary microbiology*, 224, 34-42. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.017>

Garcia, E. C., Brumbaugh, A. R., & Mobley, H. L. (2011). Redundancy and specificity of *Escherichia coli* iron acquisition systems during urinary tract infection. *Infection and immunity*, 79(3), 1225-1235. <https://doi.org/10.1016/j.vetmic.2018.08.017>

González, M. J., Robino, L., Iribarnegaray, V., Zunino, P., & Scavone, P. (2017). Effect of different antibiotics on biofilm produced by uropathogenic *Escherichia coli* isolated from children with urinary tract infection. *Pathogens and disease*, 75(4), ftx053. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftx053>

González, M. J., Zunino, P., Scavone, P., & Robino, L. (2020). Selection of effective antibiotics for uropathogenic *Escherichia coli* intracellular bacteria reduction. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 10, 542755. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2020.542755>

Grinter, R., & Lithgow, T. (2019). The structure of the bacterial iron-catecholate transporter Fiu suggests that it imports substrates via a two-step mechanism. *Journal of Biological Chemistry*, 294(51), 19523-19534. <https://doi.org/10.1074/jbc.RA119.011018>

Gottesman, S. (1996). Proteases and their targets in *Escherichia coli*. *Annual review of genetics*, 30(1), 465-506. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.30.1.465>

Hall-Stoodley, L., & Stoodley, P. (2009). Evolving concepts in biofilm infections. *Cellular microbiology*, 11(7), 1034-1043. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01323.x>

- Hang, L., Frendéus, B., Godaly, G., & Svanborg, C. (2000). Interleukin-8 receptor knockout mice have subepithelial neutrophil entrapment and renal scarring following acute pyelonephritis. *The Journal of infectious diseases*, 182(6), 1738-1748. <https://doi.org/10.1086/317599>
- Hellman, J., Loisel, P. M., Zanzot, E. M., Allaire, J. E., Tehan, M. M., Boyle, L. A., et al. (2000). Release of Gram-Negative Outer-Membrane Proteins into Human Serum and Septic Rat Blood and Their Interactions with Immunoglobulin in Antiserum to *Escherichia coli* J5. *The Journal of infectious diseases*, 181(3), 1034-1043. <https://doi.org/10.1086/315302>
- Himpsl, S. D., Pearson, M. M., Arewång, C. J., Nusca, T. D., Sherman, D. H., & Mobley, H. L. (2010). Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. *Molecular microbiology*, 78(1), 138-157. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2010.07317.x>
- Ho, M. H., Chen, C. H., Goodwin, J. S., Wang, B. Y., & Xie, H. (2015). Functional advantages of *Porphyromonas gingivalis* vesicles. *PloS one*, 10(4), e0123448. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0123448>
- Holden, N. J., & Gally, D. L. (2004). Switches, cross-talk and memory in *Escherichia coli* adherence. *Journal of medical microbiology*, 53(7), 585-593. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.05491-0>
- Holden, N., Totsika, M., Dixon, L., Catherwood, K., & Gally, D. L. (2007). Regulation of P-fimbrial phase variation frequencies in *Escherichia coli* CFT073. *Infection and immunity*, 75(7), 3325-3334. <https://doi.org/10.1128/iai.01989-06>
- Hong, J., Dauros-Singorenko, P., Whitcombe, A., Payne, L., Blenkiron, C., Phillips, A., et al. (2019). Analysis of the *Escherichia coli* extracellular vesicle proteome identifies markers of purity and culture conditions. *Journal of extracellular vesicles*, 8(1), 1632099. <https://doi.org/10.1080/20013078.2019.1632099>
- Hooton, T. M., Bradley, S. F., Cardenas, D. D., Colgan, R., Geerlings, S. E., Rice, J. C., et al. (2010). Diagnosis, prevention, and treatment of catheter-associated urinary tract infection in adults: 2009 International Clinical Practice Guidelines from the Infectious Diseases Society of America. *Clinical infectious diseases*, 50(5), 625-663. <https://doi.org/10.1086/650482>
- Hooton, T. M. (2012). Uncomplicated urinary tract infection. *New England Journal of Medicine*, 366(11), 1028-1037. [10.1056/NEJMc1104429](https://doi.org/10.1056/NEJMc1104429)
- Hultgren, S. J., Porter, T. N., Schaeffer, A. J., & Duncan, J. L. (1985). Role of type 1 pili and effects of phase variation on lower urinary tract infections produced by *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 50(2), 370-377. <https://doi.org/10.1128/iai.50.2.370-377.1985>
- Hunstad, D. A., & Justice, S. S. (2010). Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annual review of microbiology*, 64(1), 203-221. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.112408.134258>
- Imamiya, R., Shinohara, A., Yakura, D., Yamaguchi, T., Ueda, K., Oguro, A., et al. (2023). *Escherichia coli*-derived outer membrane vesicles relay inflammatory responses to macrophage-derived exosomes. *MBio*, 14(1), e03051-22. <https://doi.org/10.1128/mbio.03051-22>
- Iribarnegaray, V., González, M. J., Caetano, A. L., Platero, R., Zunino, P., & Scavone, P. (2021). Relevance of iron metabolic genes in biofilm and infection in uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Current Research in Microbial Sciences*, 2, 100060. <https://doi.org/10.1016/j.crmicr.2021.100060>
- Jacobsen, S. M., Stickler, D. J., Mobley, H. L. T., & Shirliff, M. E. (2008). Complicated catheter associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*, 21(1), 26-59. <https://doi.org/10.1128/cmr.00019-07>

- Jan, A. T. (2017). Outer membrane vesicles (OMVs) of gram-negative bacteria: a perspective update. *Frontiers in microbiology*, 8, 1053. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01053>
- Jeannin, P., Magistrelli, G., Goetsch, L., Haeuw, J. F., Thieblemont, N., Bonnefoy, J. Y., *et al.* (2002). Outer membrane protein A (OmpA): a new pathogen-associated molecular pattern that interacts with antigen presenting cells—impact on vaccine strategies. *Vaccine*, 20, A23-A27. [https://doi.org/10.1016/S0264-410X\(02\)00383-3](https://doi.org/10.1016/S0264-410X(02)00383-3)
- Jiang, W., Ubhayasekera, W., Pearson, M. M., & Knight, S. D. (2018). Structures of two fimbrial adhesins, AtfE and UcaD, from the uropathogen *Proteus mirabilis*. *Acta Crystallographica Section D: Structural Biology*, 74(11), 1053-1062. <https://doi.org/10.1107/S2059798318012391>
- Justice, S. S., Hung, C., Theriot, J. A., Fletcher, D. A., Anderson, G. G., Footer, M. J., *et al.* (2004). Differentiation and developmental pathways of uropathogenic *Escherichia coli* in urinary tract pathogenesis. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 101(5), 1333-1338. <https://doi.org/10.1073/pnas.0308125100>
- Kaper, J. B., Nataro, J. P., & Mobley, H. L. (2004). Pathogenic *Escherichia coli*. *Nature reviews microbiology*, 2(2), 123-140. <https://doi.org/10.1038/nrmicro818>
- Kato, S., Kowashi, Y., & Demuth, D. R. (2002). Outer membrane-like vesicles secreted by *Actinobacillus actinomycetemcomitans* are enriched in leukotoxin. *Microbial pathogenesis*, 32(1), 1-13. <https://doi.org/10.1006/mpat.2001.0474>
- Kim, S. H., Lee, Y. H., Lee, S. H., Lee, S. R., Huh, J. W., Kim, S. U., *et al.* (2011). Mouse model for hemolytic uremic syndrome induced by outer membrane vesicles of *Escherichia coli* O157: H7. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 63(3), 427-434. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2011.00869.x>
- Kim, S. W., Park, S. B., Im, S. P., Lee, J. S., Jung, J. W., Gong, T. W., *et al.* (2018). Outer membrane vesicles from β -lactam-resistant *Escherichia coli* enable the survival of β -lactam-susceptible *E. coli* in the presence of β -lactam antibiotics. *Scientific reports*, 8(1), 5402. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-23656-0>
- Klimentová, J., & Stulík, J. (2015). Methods of isolation and purification of outer membrane vesicles from gram-negative bacteria. *Microbiological research*, 170, 1-9. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2014.09.006>
- Kline, K. A., Dodson, K. W., Caparon, M. G., & Hultgren, S. J. (2010). A tale of two pili: assembly and function of pili in bacteria. *Trends in microbiology*, 18(5), 224-232. [10.1016/j.tim.2010.03.002](https://doi.org/10.1016/j.tim.2010.03.002)
- Kouokam, J. C., Wai, S. N., Fällman, M., Dobrindt, U., Hacker, J., & Uhlin, B. E. (2006). Active cytotoxic necrotizing factor 1 associated with outer membrane vesicles from uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 74(4), 2022-2030. <https://doi.org/10.1128/iai.74.4.2022-2030.2006>
- Krsek, D., Yara, D. A., Hrbáčková, H., Daniel, O., Mančíková, A., Schüller, S., & Bielaszewska, M. (2023). Translocation of outer membrane vesicles from enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157 across the intestinal epithelial barrier. *Frontiers in Microbiology*, 14, 1198945.
- Kuan, L., Schaffer, J. N., Zouzias, C. D., & Pearson, M. M. (2014). Characterization of 17 chaperone-usher fimbriae encoded by *Proteus mirabilis* reveals strong conservation. *Journal of medical microbiology*, 63(7), 911-922. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.069971-0>
- Kuehn, M. J., & Kesty, N. C. (2005). Bacterial outer membrane vesicles and the host–pathogen interaction. *Genes & development*, 19(22), 2645-2655. [10.1101/gad.1299905](https://doi.org/10.1101/gad.1299905)

Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2010). Biological functions and biogenesis of secreted bacterial outer membrane vesicles. *Annual review of microbiology*, 64(1), 163-184. <https://doi.org/10.1146/annurev.micro.091208.073413>

Lane, M. C., Lockatell, V., Monterosso, G., Lamphier, D., Weinert, J., Hebel, J. R., et al. (2005). Role of motility in the colonization of uropathogenic *Escherichia coli* in the urinary tract. *Infection and immunity*, 73(11), 7644-7656. <https://doi.org/10.1128/iai.73.11.7644-7656.2005>

Lane, M. C., Li, X., Pearson, M. M., Simms, A. N., & Mobley, H. L. (2009). Oxygen-limiting conditions enrich for fimbriate cells of uropathogenic *Proteus mirabilis* and *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*, 191(5), 1382-1392. <https://doi.org/10.1128/jb.01550-08>

Lee, E. Y., Bang, J. Y., Park, G. W., Choi, D. S., Kang, J. S., Kim, H. J., et al. (2007). Global proteomic profiling of native outer membrane vesicles derived from *Escherichia coli*. *Proteomics*, 7(17), 3143-3153. <https://doi.org/10.1002/pmic.200700196>

Levison, M. E., & Kaye, D. (2013). Treatment of complicated urinary tract infections with an emphasis on drug-resistant gram-negative uropathogens. *Current infectious disease reports*, 15, 109-115. <https://doi.org/10.1007/s11908-013-0315-7>

Li, X., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., & Mobley, H. L. (2002). Identification of MrpI as the sole recombinase that regulates the phase variation of MR/P fimbria, a bladder colonization factor of uropathogenic *Proteus mirabilis*. *Molecular microbiology*, 45(3), 865-874. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.2002.03067.x>

Lichtenberger, P., & Hooton, T. M. (2008). Complicated urinary tract infections. *Current infectious disease reports*, 10(6), 499-504. <https://doi.org/10.1007/s11908-008-0081-0>

Lin, J., Zhang, W., Cheng, J., Yang, X., Zhu, K., Wang, Y., et al. (2017). A *Pseudomonas* T6SS effector recruits PQS-containing outer membrane vesicles for iron acquisition. *Nature communications*, 8(1), 14888. <https://doi.org/10.1038/ncomms14888>

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. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.47395-0>

MacDonald, I. A., & Kuehn, M. J. (2012). Offense and defense: microbial membrane vesicles play both ways. *Research in microbiology*, 163(9-10), 607-618. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2012.10.020>

MacDonald, I. A., & Kuehn, M. J. (2013). Stress-induced outer membrane vesicle production by *Pseudomonas aeruginosa*. *Journal of bacteriology*, 195(13), 2971-2981. <https://doi.org/10.1128/jb.02267-12>

Manning, A. J., & Kuehn, M. J. (2011). Contribution of bacterial outer membrane vesicles to innate bacterial defense. *BMC microbiology*, 11, 1-15. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-11-258>

Maredia, R., Devineni, N., Lentz, P., Dallo, S. F., Yu, J., Guentzel, N., et al. (2012). Vesiculation from *Pseudomonas aeruginosa* under SOS. *The Scientific World Journal*, 2012(1), 402919. <https://doi.org/10.1100/2012/402919>

Martinez, J. J., & Hultgren, S. J. (2002). Requirement of Rho-family GTPases in the invasion of Type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Cellular microbiology*, 4(1), 19-28. <https://doi.org/10.1046/j.1462-5822.2002.00166.x>

Mashburn, L. M., & Whiteley, M. (2005). Membrane vesicles traffic signals and facilitate group activities in a prokaryote. *Nature*, 437(7057), 422-425. <https://doi.org/10.1038/nature03925>

Mathelié-Guinlet, M., Asmar, A. T., Collet, J. F., & Dufrêne, Y. F. (2020). Lipoprotein Lpp regulates the mechanical properties of the *E. coli* cell envelope. *Nature communications*, 11(1), 1789. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-15489-1>

McBroom, A. J., Johnson, A. P., Vemulapalli, S., & Kuehn, M. J. (2006). Outer membrane vesicle production by *Escherichia coli* is independent of membrane instability. *Journal of bacteriology*, 188(15), 5385-5392. <https://doi.org/10.1128/jb.00498-06>

McBroom, A. J., & Kuehn, M. J. (2007). Release of outer membrane vesicles by Gram-negative bacteria is a novel envelope stress response. *Molecular microbiology*, 63(2), 545-558. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2958.2006.05522.x>

Michaelis, C., & Grohmann, E. (2023). Horizontal gene transfer of antibiotic resistance genes in biofilms. *Antibiotics*, 12(2), 328. <https://doi.org/10.3390/antibiotics12020328>

Moeck, G. S., Coulton, J. W., & Postle, K. (1997). Cell envelope signaling in *Escherichia coli*: Ligand binding to the ferrichrome-iron receptor FhuA promotes interaction with the energy-transducing protein TonB. *Journal of Biological Chemistry*, 272(45), 28391-28397. <https://doi.org/10.1074/jbc.272.45.28391>

Moon, D. C., Choi, C. H., Lee, J. H., Choi, C. W., Kim, H. Y., Park, J. S., et al. (2012). *Acinetobacter baumannii* outer membrane protein A modulates the biogenesis of outer membrane vesicles. *The Journal of Microbiology*, 50, 155-160. <https://doi.org/10.1007/s12275-012-1589-4>

Mossman, K. L., Mian, M. F., Lauzon, N. M., Gyles, C. L., Lichty, B., Mackenzie, R., et al. (2008). Cutting edge: FimH adhesin of type 1 fimbriae is a novel TLR4 ligand. *The Journal of Immunology*, 181(10), 6702-6706. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.10.6702>

Mulvey, M. A., Lopez-Boado, Y. S., Wilson, C. L., Roth, R., Parks, W. C., Heuser, J., et al. (1998). Induction and evasion of host defenses by type 1-piliated uropathogenic *Escherichia coli*. *Science*, 282(5393), 1494-1497. DOI: 10.1126/science.282.5393.1

Mulvey, M. A., Schilling, J. D., & Hultgren, S. J. (2001). Establishment of a persistent *Escherichia coli* reservoir during the acute phase of a bladder infection. *Infection and immunity*, 69(7), 4572-4579. <https://doi.org/10.1128/iai.69.7.4572-4579.2001>

Muok, A. R., Briegel, A., & Crane, B. R. (2020). Regulation of the chemotaxis histidine kinase CheA: A structural perspective. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1862(1), 183030. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2019.183030>

Murphy, K., Park, A. J., Hao, Y., Brewer, D., Lam, J. S., & Khursigara, C. M. (2014). Influence of O polysaccharides on biofilm development and outer membrane vesicle biogenesis in *Pseudomonas aeruginosa* PAO1. *Journal of bacteriology*, 196(7), 1306-1317. <https://doi.org/10.1128/jb.01463-13>

- Nagakubo, T., Nomura, N., & Toyofuku, M. (2020). Cracking open bacterial membrane vesicles. *Frontiers in Microbiology*, 10, 3026. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.03026>
- Nicolle, L. E. (2002). Resistant pathogens in urinary tract infections. *Journal of the American geriatrics society*, 50, 230-235. <https://doi.org/10.1046/j.1532-5415.50.7s.3.x>
- Nielubowicz, G. R., & Mobley, H. L. (2010). Host–pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Reviews Urology*, 7(8), 430-441. <https://doi.org/10.1038/nrurol.2010.101>
- Niveditha, S., Pramodhini, S., Umadevi, S., Kumar, S., & Stephen, S. (2012). The isolation and the biofilm formation of uropathogens in the patients with catheter associated urinary tract infections (UTIs). *Journal of clinical and diagnostic research: JCDR*, 6(9), 1478. [10.7860/JCDR/2012/4367.2537](https://doi.org/10.7860/JCDR/2012/4367.2537)
- O'donoghue, E. J., & Krachler, A. M. (2016). Mechanisms of outer membrane vesicle entry into host cells. *Cellular microbiology*, 18(11), 1508-1517. <https://doi.org/10.1111/cmi.12655>
- O'HANLEY, P. (1996). Prospects for urinary tract infection vaccines. *Urinary tract infection: molecular pathogenesis and clinical management*, 405-425.
- Old, D. C., & Adegbola, R. (1982). Haemagglutinins and fimbriae of *Morganella*, *Proteus* and *Providencia*. *Journal of Medical Microbiology*, 15(4), 551-564. <https://doi.org/10.1099/00222615-15-4-551>
- Orench-Rivera, N., & Kuehn, M. J. (2016). Environmentally controlled bacterial vesicle-mediated export. *Cellular microbiology*, 18(11), 1525-1536. <https://doi.org/10.1111/cmi.12676>
- Pearson, M. M., Sebaihia, M., Churcher, C., Quail, M. A., Seshasayee, A. S., Luscombe, N. M., et al. (2008). Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *Journal of bacteriology*, 190(11), 4027-4037. <https://doi.org/10.1128/jb.01981-07>
- Pellegrino, R., Scavone, P., Umpiérrez, A., Maskell, D. J., & Zunino, P. (2013). *Proteus mirabilis* uroepithelial cell adhesin (UCA) fimbria plays a role in the colonization of the urinary tract. *Pathogens and disease*, 67(2), 104-107. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12027>
- Pérez-Cruz, C., Delgado, L., López-Iglesias, C., & Mercade, E. (2015). Outer-inner membrane vesicles naturally secreted by gram-negative pathogenic bacteria. *PLoS one*, 10(1), e0116896. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0116896>
- Pin, C., David, L., & Oswald, E. (2023). Modulation of Autophagy and Cell Death by Bacterial Outer-Membrane Vesicles. *Toxins*, 15(8), 502. <https://doi.org/10.3390/toxins15080502>
- Rahman, M. M., Guard-Petter, J., Asokan, K., Hughes, C., & Carlson, R. W. (1999). The structure of the colony migration factor from pathogenic *Proteus mirabilis*: A capsular polysaccharide that facilitates swarming. *Journal of Biological Chemistry*, 274(33), 22993-22998. [10.1074/jbc.274.33.22993](https://doi.org/10.1074/jbc.274.33.22993)
- Rajasekaran, M. B., Nilapwar, S., Andrews, S. C., & Watson, K. A. (2010). EfeO-cupredoxins: major new members of the cupredoxin superfamily with roles in bacterial iron transport. *Biometals*, 23, 1-17. <https://doi.org/10.1007/s10534-009-9262-z>
- Reyes-Robles, T., Dillard, R. S., Cairns, L. S., Silva-Valenzuela, C. A., Housman, M., Ali, A., et al. (2018). *Vibrio cholerae* outer membrane vesicles inhibit bacteriophage infection. *Journal of bacteriology*, 200(15), 10-1128. <https://doi.org/10.1128/jb.00792-17>
- Robino, L., Scavone, P., Araujo, L., Algorta, G., Zunino, P., & Vignoli, R. (2013). Detection of intracellular bacterial communities in a child with *Escherichia coli* recurrent urinary tract infections. *Pathogens and disease*, 68(3), 78-81. <https://doi.org/10.1111/2049-632X.12047>

- Robino, L., Scavone, P., Araujo, L., Algorta, G., Zunino, P., Pérez, M. C., *et al.* (2014b). Intracellular bacteria in the pathogenesis of *Escherichia coli* urinary tract infection in children. *Clinical Infectious Diseases*, 59(11), e158-e164. <https://doi.org/10.1093/cid/ciu634>
- Ronald, A. (2002). The etiology of urinary tract infection: traditional and emerging pathogens. *The American journal of medicine*, 113(1), 14-19. [https://doi.org/10.1016/S0002-9343\(02\)01055-0](https://doi.org/10.1016/S0002-9343(02)01055-0)
- Russo, T. A., & Johnson, J. R. (2000). Proposal for a new inclusive designation for extraintestinal pathogenic isolates of *Escherichia coli*: ExPEC. *The Journal of infectious diseases*, 181(5), 1753-1754. <https://doi.org/10.1086/315418>
- Russo, T. A., Carlino, U. B., & Johnson, J. R. (2001). Identification of a new iron-regulated virulence gene, *ireA*, in an extraintestinal pathogenic isolate of *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 69(10), 6209-6216. <https://doi.org/10.1128/iai.69.10.6209-6216.2001>
- Sartorio, M. G., Pardue, E. J., Feldman, M. F., & Haurat, M. F. (2021). Bacterial outer membrane vesicles: from discovery to applications. *Annual review of microbiology*, 75(1), 609-630. <https://doi.org/10.1146/annurev-micro-052821-031444>
- Sauer, K., Stoodley, P., Goeres, D. M., Hall-Stoodley, L., Burmølle, M., Stewart, P. S., *et al.* (2022). The biofilm life cycle: expanding the conceptual model of biofilm formation. *Nature Reviews Microbiology*, 20(10), 608-620. <https://doi.org/10.1038/s41579-022-00767-0>
- Scavone, P., Iribarnegaray, V., Caetano, A. L., Schlapp, G., HÄrtel, S., & Zunino, P. (2016). Fimbriae have distinguishable roles in *Proteus mirabilis* biofilm formation. *FEMS Pathogens and Disease*, 74(5), ftw033. <https://doi.org/10.1093/femspd/ftw033>
- Scavone, P., Iribarnegaray, V., González, M. J., Navarro, N., Caneles-Huerta, N., Jara-Wilde, J., *et al.* (2023). Role of *Proteus mirabilis* flagella in biofilm formation. *Revista Argentina de Microbiología*, 55(3), 226-234. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2023.01.005>
- Schaffer, J. N., & Pearson, M. M. (2017). *Proteus mirabilis* and urinary tract infections. *Urinary tract infections: Molecular pathogenesis and clinical management*, 383-433. <https://doi.org/10.1128/9781555817404.ch17>
- Schilling, J. D., Mulvey, M. A., & Hultgren, S. J. (2001). Structure and function of *Escherichia coli* type 1 pili: new insight into the pathogenesis of urinary tract infections. *The Journal of infectious diseases*, 183(Supplement_1), S36-S40. <https://doi.org/10.1086/318855>
- Schilling, J. D., Lorenz, R. G., & Hultgren, S. J. (2002). Effect of trimethoprim-sulfamethoxazole on recurrent bacteriuria and bacterial persistence in mice infected with uropathogenic *Escherichia coli*. *Infection and immunity*, 70(12), 7042-7049. <https://doi.org/10.1128/iai.70.12.7042-7049.2002>
- 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. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2011.07.021>
- Schooling, S. R., & Beveridge, T. J. (2006). Membrane vesicles: an overlooked component of the matrices of biofilms. *Journal of bacteriology*, 188(16), 5945-5957. <https://doi.org/10.1128/jb.00257-06>
- Schwechheimer, C., Kulp, A., & Kuehn, M. J. (2014). Modulation of bacterial outer membrane vesicle production by envelope structure and content. *BMC microbiology*, 14, 1-13. <https://doi.org/10.1186/s12866-014-0324-1>

- Schwechheimer, C., & Kuehn, M. J. (2015). Outer-membrane vesicles from Gram-negative bacteria: biogenesis and functions. *Nature reviews microbiology*, 13(10), 605-619. <https://doi.org/10.1038/nrmicro3525>
- Sharma, V. K., Kudva, I. T., Bearson, B. L., & Stasko, J. A. (2016). Contributions of EspA filaments and curli fimbriae in cellular adherence and biofilm formation of enterohemorrhagic *Escherichia coli* O157: H7. *PLoS One*, 11(2), e0149745. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0149745>
- Singh, A. N., Nice, J. B., Brown, A. C., & Wittenberg, N. J. (2023). Identifying size-dependent toxin sorting in bacterial outer membrane vesicles. *bioRxiv*. [Preprint]. 10.1101/2023.05.03.539273.
- Snyder, J. A., Haugen, B. J., Buckles, E. L., Lockatell, C. V., Johnson, D. E., Donnenberg, et al. (2004). Transcriptome of uropathogenic *Escherichia coli* during urinary tract infection. *Infection and immunity*, 72(11), 6373-6381.
- Soriano, F., Huelves, L., Naves, P., Rodríguez-Cerrato, V., del Prado, G., Ruiz, V., et al. (2009). In vitro activity of ciprofloxacin, moxifloxacin, vancomycin and erythromycin against planktonic and biofilm forms of *Corynebacterium urealyticum*. *Journal of antimicrobial chemotherapy*, 63(2), 353-356. <https://doi.org/10.1093/jac/dkn491>
- Song, J., Duncan, M. J., Li, G., Chan, C., Grady, R., Stapleton, A., et al. (2007). A novel TLR4-mediated signaling pathway leading to IL-6 responses in human bladder epithelial cells. *PLoS pathogens*, 3(4), e60. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.0030060>
- Stamey, T. A., & Mihara, G. (1980). Observations on the growth of urethral and vaginal bacteria in sterile urine. *The Journal of urology*, 124(4), 461-463. [https://doi.org/10.1016/S0022-5347\(17\)55496-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5347(17)55496-8)
- Stickler, D. J., & Feneley, R. C. L. (2010). The encrustation and blockage of long-term indwelling bladder catheters: a way forward in prevention and control. *Spinal cord*, 48(11), 784-790. <https://doi.org/10.1038/sc.2010.32>
- Stumpe, S., Schmid, R., Stephens, D. L., Georgiou, G. & Bakker, E. P. (1998). Identification of OmpT as the protease that hydrolyzes the antimicrobial peptide protamine before it enters growing cells of *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology* 180, 4002–6. <https://doi.org/10.1128/jb.180.15.4002-4006.1998>
- Tashiro, Y., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2012). Multifunctional membrane vesicles in *Pseudomonas aeruginosa*. *Environmental microbiology*, 14(6), 1349-1362. <https://doi.org/10.1111/j.1462-2920.2011.02632.x>
- Tashiro, Y., Yawata, Y., Toyofuku, M., Uchiyama, H., & Nomura, N. (2013). Interspecies interaction between *Pseudomonas aeruginosa* and other microorganisms. *Microbes and environments*, 28(1), 13-24. <https://doi.org/10.1264/jsme2.ME12167>
- Tashiro, Y., Hasegawa, Y., Shintani, M., Takaki, K., Ohkuma, M., Kimbara, K., et al. (2017). Interaction of bacterial membrane vesicles with specific species and their potential for delivery to target cells. *Frontiers in microbiology*, 8, 571. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00571>
- Toyofuku, M., Nomura, N., & Eberl, L. (2019). Types and origins of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 17(1), 13-24. <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0112-2>
- Toyofuku, M., Schild, S., Kaparakis-Liaskos, M., & Eberl, L. (2023). Composition and functions of bacterial membrane vesicles. *Nature Reviews Microbiology*, 21(7), 415-430. <https://doi.org/10.1038/s41579-023-00875-5>

- Turner, L., Bitto, N. J., Steer, D. L., Lo, C., D'Costa, K., Ramm, G., *et al.* (2018). *Helicobacter pylori* outer membrane vesicle size determines their mechanisms of host cell entry and protein content. *Frontiers in immunology*, 9, 1466. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01466>
- Van Hoek, M. L. (2013). Biofilms: an advancement in our understanding of *Francisella* species. *Virulence*, 4(8), 833-846. <https://doi.org/10.4161/viru.27023>
- Vasudevan, R., Kennedy, A. J., Merritt, M., Crocker, F. H., & Baney, R. H. (2014). Microscale patterned surfaces reduce bacterial fouling-microscopic and theoretical analysis. *Colloids and Surfaces. Biointerfaces*, 117, 225-232. <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2014.02.037>
- Vallet, I., Olson, J. W., Lory, S., Lazdunski, A., & Filloux, A. (2001). The chaperone/usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *Proceedings of the national academy of sciences*, 98(12), 6911-6916. <https://doi.org/10.1073/pnas.111551898>
- Wright, K. J., & Hultgren, S. J. (2006). Sticky Fibers and Uropathogenesis: Bacterial Adhesins in the Urinary Tract. *Future Microbiology*, 1(1), 75–87. <https://doi.org/10.2217/17460913.1.1.75>
- Wang, Y., Hoffmann, J. P., Baker, S. M., Bentrup, K. H. Z., Wimley, W. C., Fuselier, J. A., *et al.* (2021). Inhibition of *Streptococcus mutans* biofilms with bacterial-derived outer membrane vesicles. *BMC microbiology*, 21(1), 234. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02296-x>
- Wang, T., Mo, L., Ou, J., Fang, Q., Wu, H., Wu, Y., & Nandakumar, K. S. (2022). *Proteus mirabilis* vesicles induce mitochondrial apoptosis by regulating miR96-5p/abca1 to inhibit osteoclastogenesis and bone loss. *Frontiers in Immunology*, 13, 833040. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.833040>
- Wang, X., Lin, S., Wang, L., Cao, Z., Zhang, M., Zhang, Y., *et al.* (2023). Versatility of bacterial outer membrane vesicles in regulating intestinal homeostasis. *Science advances*, 9(11), eade5079. <https://doi.org/10.1126/sciadv.ade5079>
- Wurpel, D. J., Beatson, S. A., Totsika, M., Petty, N. K., & Schembri, M. A. (2013). Chaperone-usher fimbriae of *Escherichia coli*. *PloS one*, 8(1), e52835. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0052835>
- Wurpel, D. J., Moriel, D. G., Totsika, M., Easton, D. M., Schembri, M. A. Comparative analysis of the uropathogenic *Escherichia coli* surface proteome by tandem mass-spectrometry of artificially induced outer membrane vesicles. *J proteomics*, (2015), 115, 93-106. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.12.00>
- Wurpel, D. J., Totsika, M., Allsopp, L. P., Webb, R. I., Moriel, D. G., & Schembri, M. A. (2016). Comparative proteomics of uropathogenic *Escherichia coli* during growth in human urine identify UCA-like (UCL) fimbriae as an adherence factor involved in biofilm formation and binding to uroepithelial cells. *Journal of proteomics*, 131, 177-189. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2015.11.001>
- Yamamoto, S., Tsukamoto, T., Terai, A., Kurazono, H., Takeda, Y., & Yoshida, O. (1995). Distribution of virulence factors in *Escherichia coli* isolated from urine of cystitis patients. *Microbiology and immunology*, 39(6), 401-404. <https://doi.org/10.1111/j.1348-0421.1995.tb02219.x>
- Yonezawa, H., Osaki, T., Kurata, S., Fukuda, M., Kawakami, H., Ochiai, K., *et al.* (2009). Outer membrane vesicles of *Helicobacter pylori* TK1402 are involved in biofilm formation. *BMC microbiology*, 9, 1-12. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-9-197>
- Yonezawa, H., Osaki, T., Woo, T., Kurata, S., Zaman, C., Hojo, F., *et al.* (2011). Analysis of outer membrane vesicle protein involved in biofilm formation of *Helicobacter pylori*. *Anaerobe*, 17(6), 388-390. <https://doi.org/10.1016/j.anaerobe.2011.03.020>
- Yu, N. Y., Wagner, J. R., Laird, M. R., Melli, G., Rey, S., Lo, R., *et al.* (2010). PSORTb 3.0: improved protein subcellular localization prediction with refined localization subcategories and predictive

capabilities for all prokaryotes. *Bioinformatics*, 26(13), 1608-1615. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq249>

Zavan, L., Bitto, N. J., Johnston, E. L., Greening, D. W., & Kaparakis-Liaskos, M. (2019). *Helicobacter pylori* growth stage determines the size, protein composition, and preferential cargo packaging of outer membrane vesicles. *Proteomics*, 19(1-2), 1800209. 10.1002/pmic.201800209.

Zhao, H., Li, X., Johnson, D. E., Blomfield, I., & Mobley, H. L. (1997). In vivo phase variation of MR/P fimbrial gene expression in *Proteus mirabilis* infecting the urinary tract. *Molecular microbiology*, 23(5), 1009-1019. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2958.1997.2791645.x>

Zeng, Z., Zhan, J., Zhang, K., Chen, H., & Cheng, S. (2022). Global, regional, and national burden of urinary tract infections from 1990 to 2019: an analysis of the global burden of disease study 2019. *World Journal of Urology*, 40(3), 755-763. <https://doi.org/10.1007/s00345-021-03913-0>

Zunino, P., Geymonat, L., Allen, A. G., Legnani-Fajardo, C., & Maskell, D. J. (2000). Virulence of a *Proteus mirabilis* ATF isogenic mutant is not impaired in a mouse model of ascending urinary tract infection. *FEMS Immunology & Medical Microbiology*, 29(2), 137-143. <https://doi.org/10.1111/j.1574-695X.2000.tb01516.x>

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(11), 3231-3237. <https://doi.org/10.1099/mic.0.26534-0>

9. Anexo

Material suplementario 1. Listado completo de proteínas identificadas en las VME, para cada cepa en LB y OA

LINK:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1JiCWmHIMkhhb_cDYLw8vY-92CvoVB60Uf/edit?usp=sharing&ouid=100198213284204895506&rtpof=true&sd=true

Material suplementario 2. Proteínas exclusivas y con abundancia diferencial de *E. coli* en LB y OA.

LINK:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1EV__97i52Qiohq2bJahO35ochWUMCHYG/edit?usp=sharing&ouid=100198213284204895506&rtpof=true&sd=true

Material suplementario 3. Proteínas exclusivas y con abundancia diferencial de *P. mirabilis* en LB y OA.

LINK:

https://docs.google.com/spreadsheets/d/1EvLq_fCkTmU-bFYC9xIHwNMDXYiQtqGJ/edit?usp=sharing&ouid=100198213284204895506&rtpof=true&sd=true