



Identificación de genes involucrados en la formación de *biofilms* de *Proteus mirabilis*

Tesina de grado

Licenciatura en Bioquímica
Facultad de Ciencias – Universidad de la República

Bach. Alejandro Tuja

Orientadora: Dra. Paola Scavone

Departamento de Microbiología
Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable

Montevideo, diciembre de 2015

AGRADECIMIENTOS

A mi orientadora Dra. Paola Scavone, al Dr. Pablo Zunino y a todos mis compañeros del Departamento de Microbiología del Instituto de Investigaciones Biológicas Clemente Estable (IIBCE).

A la Sociedad Uruguaya de Microbiología (SUM) por haber apoyado mi proyecto de investigación como estudiante de grado (APIPE).

A los colegas y el equipo de dirección del Instituto Juan XXIII.

A mi familia y amigos.

ÍNDICE

Abreviaturas	4
Resumen	5
Introducción	6
La formación de <i>biofilms</i> como respuesta adaptativa a ambientes hostiles.....	8
La tendencia a formar <i>biofilms</i> está pautada por numerosas señales ambientales.....	9
Relevancia clínica de los <i>biofilms</i> de <i>Proteus mirabilis</i>	11
Factores de virulencia de <i>Proteus mirabilis</i>	12
Hipótesis	14
Objetivo general.....	14
Objetivos específicos.....	14
Materiales y métodos.....	15
Colección de mutantes de <i>Proteus mirabilis</i>	15
Capacidad de formación de <i>biofilms</i> de las cepas mutantes	16
Verificación de una única inserción del transposón en el genoma	17
Identificación de los genes interrumpidos	17
Resultados	20
Discusión.....	23
Péptido sintasa no ribosomal (PMI_RS12835)	23
Isocorismatasa (PMI_RS10855).....	24
Receptor dependiente de TonB (PMI_RS18440).....	25
Ferritina (PMI_RS04890).....	26
Proteína de bomba de eflujo (PMI_RS04890)	27
Acomodador molecular fimbrial de membrana externa (PMI_RS10945)	28
Subunidad fimbrial principal (PMI_RS02650)	28
Conclusiones y perspectivas.....	30
Referencias	31

ABREVIATURAS

Abs	Absorbancia
EDTA	Ácido etildiaminotetraacético
EPS	Sustancia polimérica extracelular
ITU	Infecciones de tracto urinario
ME	Elemento mosaico
PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
TBE	Tris/Borato/EDTA

RESUMEN

Las infecciones de tracto urinario (ITU) causadas por *Proteus mirabilis* son difíciles de tratar e incluso pueden llegar a ser fatales. Comprometen el cuidado de los pacientes cateterizados por períodos prolongados, ya que pueden formar *biofilms* cristalinos en el catéter, provocando bloqueo del flujo de orina, incontinencia y distensión de la vejiga debido a la retención urinaria. Los *biofilms* microbianos se describen actualmente como comunidades formadas por microorganismos adheridos unos a otros y a diversas superficies de manera irreversible, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia y que exhiben un fenotipo particular con relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes. El objetivo del presente trabajo, consistió en identificar genes involucrados en la biogénesis de *biofilms* de *P. mirabilis*. Para ello se empleó una colección de mutantes generadas por mutagénesis al azar de una cepa parental de origen clínico. Los mutantes seleccionados fueron aquellos que exhibieron una significativa disminución o incremento en la capacidad para formar *biofilms* con respecto a la cepa salvaje. La formación de *biofilms* se evaluó mediante la técnica de adhesión a placas de microtitulación y posterior tinción con cristal violeta. La presencia de una única inserción del transposón, fue verificada mediante *Southern Blot*. Para la identificación de los genes interrumpidos en las cepas seleccionadas, se empleó una variante de la técnica de PCR llamada PCR arbitraria, y posteriormente se procedió a la secuenciación de los productos obtenidos. La técnica de PCR permitió amplificar las regiones contiguas al sitio de inserción del transposón en los clones transconjugantes seleccionados. Comparando las secuencias flanqueantes al sitio de inserción con las de *P. mirabilis* HI4320, se determinó que los mutantes presentaron interrupciones en genes asociados a diversas funciones, tales como: péptido sintasa no ribosomal, ferritina, proteína de bomba de eflujo, acomodador molecular fimbrial de membrana externa, hidrolasa hipotética de Carbono-Nitrógeno, subunidad fimbrial principal, isocorismatasa, receptor dependiente de TonB, asparagina sintetasa, y glicerol-3-fosfato deshidrogenasa. Estos resultados contribuyen con la dilucidación de las bases moleculares de la biogénesis de los *biofilms* de *P. mirabilis*, lo cual colaboraría con el control y prevención de las ITU asociadas a catéteres.

Palabras clave: *biofilms*, *Proteus mirabilis*, infecciones de tracto urinario.

I. Introducción

Si bien los microorganismos se han definido y caracterizado históricamente como células planctónicas de vida libre, su forma de vida predominante en cualquier sistema biológico hidratado es una comunidad cooperativa microbiana denominada *biofilm* (Trautner & Darouiche, 2004).

Los *biofilms* microbianos se describen actualmente como comunidades formadas por microorganismos adheridos unos a otros y a diversas superficies de manera irreversible, embebidas en una matriz de polímeros extracelulares de producción propia y que exhiben un fenotipo particular con relación a las tasas de crecimiento y expresión de genes (R. M. Donlan & Costerton, 2002).

Aunque los *biofilms* microbianos fueron descriptos por primera vez por Antonie van Leeuwenhoek en 1708, la investigación sobre su biogénesis comenzó a ser significativa en los últimos 15 a 20 años, la cual crece de manera exponencial (Römling et al., 2014).

El desarrollo de un *biofilm* bacteriano se ha definido como un proceso secuencial compuesto por cinco etapas (Figura 1): (1) aproximación y adhesión reversible de las bacterias a la superficie, (2) adhesión irreversible y comienzo de producción de exopolisacáridos (EPS), (3) formación de microcolonias, (4) maduración del biofilm; (5) dispersión celular (W. Costerton et al., 2003; Davey & O'toole, 2000).

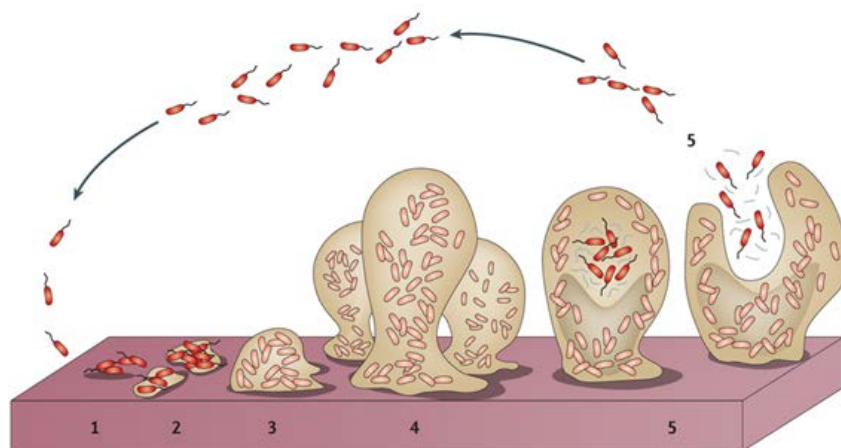


Figura 1. El esquema muestra un modelo conceptual de la formación de un *biofilm* como un proceso de desarrollo. El mismo consta de cinco etapas: (1) adhesión reversible; (2) adhesión irreversible y comienzo de la producción de exopolisacáridos; (3) formación de microcolonias; (4) maduración; (5) dispersión celular. Tomado y adaptado de (Lappin-Scott, Burton, & Stoodley, 2014).

La **adhesión inicial** puede ser activa o pasiva, dependiendo de la motilidad de la bacteria o del transporte gravitacional que tenga su forma de vida libre, de la difusión o del esfuerzo normal o cortante que ejerza el fluido circundante sobre la superficie bacteriana. Este proceso depende fuertemente de las propiedades fisicoquímicas de la superficie celular bacteriana (Ferreira, Pereira, Melo, & Simões, 2010). Al comienzo, aquellas células que se adhirieron y que por lo tanto originaron la formación de un *biofilm* en una superficie, producen una pequeña cantidad de sustancia polimérica extracelular (EPS) y muchas de ellas son capaces de moverse de manera independiente por motilidad *twitching* (movimiento pulsante) mediada por fimbrias, o por motilidad *gliding* (movimiento deslizante) (G. A. O'Toole & Kolter, 1998a). En esta etapa, la adhesión es reversible debido a que los microorganismos adheridos no han realizado el proceso de diferenciación que dirige la formación del *biofilm*, y por lo tanto muchos de ellos vuelven a la forma planctónica de vida libre (Stoodley, Sauer, Davies, & Costerton, 2002). Las propiedades fisicoquímicas de la superficie también juegan un rol importante en la adhesión bacteriana, tales como la textura (rugosa o lisa) (Rodney M Donlan, 2002), la carga superficial (Abdallah, Chaieb, Zmantar, Kallel, & Bakhrouf, 2009), la hidrofobicidad (Rodney M Donlan, 2002), el pH, la temperatura (Nilsson, Ross, & Bowman, 2011) y la composición de nutrientes del medio (Rodney M Donlan, 2002; Gerstel & Römling, 2001).

El cambio de adhesión reversible a irreversible, se debe a que la interacción débil de las bacterias con el sustrato, se transforma en un enlace permanente con la presencia de EPS (Stoodley et al., 2002). Para remover el *biofilm* luego de la **adhesión irreversible**, es necesario un fuerte esfuerzo cortante o la ruptura química de las fuerzas de adhesión por enzimas, detergentes, surfactantes, sanitizantes y/o calor (Augustin, Ali-Vehmas, & Atroshi, 2004; Maukonen et al., 2003; Sinde & Carballo, 2000).

La **formación de microcolonias** resulta de la acumulación concurrente y crecimiento de los microorganismos y se encuentra asociada con la producción de EPS (Chmielewski & Frank, 2006), la cual ayuda a fortalecer el enlace entre las bacterias y el sustrato, protegiendo la colonia de cualquier estrés ambiental (Rodney M Donlan, 2002).

La **maduración** del *biofilm* es el paso donde este se desarrolla en una estructura organizada la cual puede ser plana o con forma de hongo, dependiendo de la fuente de

nutrientes (Chmielewski & Frank, 2006; Klausen et al., 2003). Las bacterias crecen en su forma sésil en microcolonias heterogéneas, en las que se encuentran dispersos canales abiertos de agua (Davey & O'toole, 2000).

La **dispersión** es el último paso en el ciclo de formación del *biofilm*, el cual permite a las células revertir a su forma planctónica (Sauer, Camper, Ehrlich, Costerton, & Davies, 2002). Las perturbaciones externas, como el incremento del esfuerzo cortante por parte del fluido (Stoodley et al., 2002), o bien procesos internos del *biofilm*, como la degradación enzimática endógena o la liberación de EPS o de proteínas de unión a la superficie, son posibles causas de la remoción del *biofilm* (Kaplan, Ragunath, Ramasubbu, & Fine, 2003; Kaplan, Ragunath, Velliyagounder, Fine, & Ramasubbu, 2004). La dispersión parece ser un proceso activo que permite la colonización de nuevos nichos (Sauer et al., 2002). Asimismo, la falta de nutrientes es considerada también como una causa de la remoción del *biofilm*, lo cual les permite a las bacterias buscar un ambiente rico en nutrientes (G. O'Toole, Kaplan, & Kolter, 2000).

La formación de *biofilms* como respuesta adaptativa a ambientes hostiles

Los registros fósiles indican que los *biofilms* aparecieron hace 3250 millones de años (Hall-Stoodley, Costerton, & Stoodley, 2004). El surgimiento de estos *biofilms* primitivos parece haber coincidido con la primera evidencia de transición evolutiva desde la organización unicelular a la multicelular. El origen profundamente evolutivo de esta adaptación, sugiere que fue una ventaja para la supervivencia en el ambiente hostil de la Tierra primitiva. De hecho, un número creciente de estudios, indican que la formación de *biofilms* está estrechamente vinculada con respuestas al estrés (de la Fuente-Núñez, Reffuveille, Fernández, & Hancock, 2013).

La transición desde el estado planctónico hacia la formación del *biofilm* ocurre como consecuencia de cambios ambientales que desencadenan una alteración de múltiples vías regulatorias (J. W. Costerton, 1999; Hall-Stoodley et al., 2004; G. O'Toole et al., 2000). De esta manera, luego de reconocer una señal de estrés, las bacterias planctónicas iniciarán la adhesión a una superficie que conducirá a la formación de un *biofilm* que tendrá una mayor habilidad de soportar situaciones ambientales adversas (G. O'Toole et al., 2000).

Antes de que pueda evidenciarse un *biofilm* estructurado, un “programa de formación de *biofilm*” debe activarse, como consecuencia de la expresión diferencial de un importante número de genes (de la Fuente-Núñez et al., 2013). Dicho programa incluye la producción de los componentes de la matriz así como enzimas extracelulares, incremento de los mecanismos de secreción de compuestos tóxicos, y cambios en los procesos metabólicos, especialmente una reducción del metabolismo de aquellas bacterias que se alojan en la estructura del *biofilm* (J. W. Costerton, 1999; Flemming & Wingender, 2010; Hall-Stoodley et al., 2004; G. O’Toole et al., 2000). El 19,4% del genoma de la cepa PAO1 de *Pseudomonas aeruginosa*, se expresa de manera diferencial, cuando se compara la expresión génica entre la fase logarítmica y la estacionaria de la forma de vida planctónica. Sin embargo, cuando se compara la expresión génica en la fase logarítmica de la forma de vida planctónica con respecto a un *biofilm* de 8 horas de desarrollo, solamente el 3,1% del genoma se expresa en forma diferencial (Waite, Papakonstantinou, Littler, & Curtis, 2005).

En el complejo proceso de formación de *biofilms*, pueden establecerse patrones generales en las etapas de adhesión a una superficie sólida, que puede ser tanto orgánica como inorgánica, así como en la de maduración y posterior dispersión del *biofilm*, que podrá dar lugar a la formación de nuevos agregados. Sin embargo, dichas etapas resultan ser específicas para cada microorganismo (J W Costerton, Lewandowski, Caldwell, Korber, & Lappin-Scott, 1995; Sauer et al., 2002; Tolker-Nielsen & Molin, 2000).

El *biofilm* maduro posee canales internos que permiten el flujo de nutrientes (Klausen et al., 2003). Dicha arquitectura, le confiere la posibilidad de intercambiar ADN extracromosómico así como de realizar conjugaciones entre las células que forman parte del *biofilm* con mayor frecuencia que las que ocurren entre células planctónicas (Hausner & Wuertz, 1999). De esta manera, estas formaciones muestran una extraordinaria resistencia a agentes antimicrobianos, bacteriófagos ambientales, amebas fagocíticas y a las defensas del huésped capaces de remover su contraparte planctónica. Esto implica una mayor adaptación al estrés ambiental, y por lo tanto, los *biofilms* representan un modo de vida protegido que favorece la supervivencia microbiana (R. M. Donlan & Costerton, 2002; Schembri & Klemm, 2001).

La tendencia a formar *biofilms* está pautada por numerosas señales ambientales

Las bacterias que se aproximan a una superficie, pueden encontrarse en forma sésil o libre. Esto sugiere que la superficie debe ser sensada para que un *biofilm* pueda formarse. Estudios de perfil transcripcional de una variedad de bacterias, sugieren que la expresión de flagelos y la síntesis de la matriz del *biofilm* están inversamente reguladas (Karatan & Watnick, 2009). Por ejemplo, en *Bacillus subtilis* el operón *eps* codifica para los componentes de la matriz del *biofilm*, en el cual también reside un inhibidor de la motilidad, EpsE. Este último inmoviliza al flagelo actuando de manera similar a un embrague molecular desconectándolo de su fuente de energía (Blair, Turner, Winkelman, Berg, & Kearns, 2008).

Las bacterias monitorean y responden a los tipos y cantidades de nutrientes disponibles en el ambiente. Quizás debido a los costos energéticos del ensamblado y dispersión del *biofilm*, el estado nutricional del ambiente tenga un alto impacto en la tendencia de las bacterias a formar *biofilms* (Karatan & Watnick, 2009). En algunos microorganismos como *Vibrio cholerae*, ambientes ricos en nutrientes promueven la formación de *biofilm* (Yildiz, Liu, Heydorn, & Schoolnik, 2004). Sin embargo, algunas bacterias como *Salmonella typhimurium*, forman un *biofilm* en respuesta a la limitación de nutrientes (Gerstel & Römling, 2001).

El hierro es un nutriente esencial para las bacterias. Como el hierro es un nutriente poco disponible, probablemente también sea un activador de la formación de *biofilms* bacterianos (Karatan & Watnick, 2009). En *P. aeruginosa* cantidades sub bacteriostáticas de lactoferrina inhiben la formación de *biofilms* de este microorganismo (Singh, Parsek, Greenberg, & Welsh, 2002). De manera similar, la formación de *biofilms* de *Vibrio cholerae* se reduce significativamente en medios deficientes en hierro (Mey, Craig, & Payne, 2005). Para *Actinomyces naeslundii* así como *Staphylococcus epidermis*, la limitación de hierro promueve un incremento en la capacidad para formar *biofilms* (Deighton & Borland, 1993; Moelling et al., 2007).

Los niveles de fosfato inorgánico extracelular también son una importante señal para la formación de *biofilms* (Karatan & Watnick, 2009). En *Pseudomonas aurofaciens* y en *Pseudomonas fluorescens*, la limitación de fosfato inhibe la formación de *biofilms* (R D Monds, Silby, & Mahanty, 2001; Russell D Monds, Newell, Gross, & O'Toole, 2007). En *P. fluorescens* esta inhibición resulta de la activación de la fosfodiesterasa RapA

bajo limitación de fosfato. La misma disminuye los niveles del segundo mensajero c-di-GMP, inhibiendo por consiguiente la secreción de la adhesina de superficie LapA, requerida para la formación de *biofilms* en estemicroorganismo (Russell D Monds et al., 2007). Sin embargo, la limitación de fosfato incrementa la formación de *biofilms* en *Agrobacterium tumefaciens* (Danhorn, Hentzer, Givskov, Parsek, & Fuqua, 2004).

La osmolaridad regula la formación de *biofilms* en diversas especies bacterianas. En muchos casos, la osmolaridad inhibe la formación de *biofilms*, aunque este efecto puede depender del tipo de osmolito (Karatan & Watnick, 2009). Por ejemplo, en *P. fluorescens* la formación de *biofilms* se encuentra inhibida en medios de elevada osmolaridad producida por adición de cloruro de sodio y/o sacarosa (G. A. O'Toole & Kolter, 1998b). De manera similar, en *S. typhimurium* el crecimiento en medios que contienen elevadas concentraciones de cloruro de sodio, suprime la transcripción de *csgD*, un regulador central en formación de *biofilms* de este microorganismo (Römling, Sierralta, Eriksson, & Normark, 1998). Sin embargo, 200mM de cloruro de sodio en *E. coli* activan la transcripción del operón *pga*, el cual codifica para las proteínas requeridas para la síntesis de poli-N-acetilglucosamina (PNAG) (Goller, Wang, Itoh, & Romeo, 2006).

Muchos microorganismos patógenos responden a moléculas provenientes del hospedero para formar un *biofilm* (Karatan & Watnick, 2009). Por ejemplo, *V. cholerae* incrementa su capacidad de formar *biofilms* en respuesta a sales biliares, las cuales son detergentes secretados en el intestino delgado a través del conducto biliar (Hung, Zhu, Sturtevant, & Mekalanos, 2006). De manera similar, *P. aeruginosa* responde al peróxido de hidrógeno producido por el estallido respiratorio que provocan los neutrófilos del hospedero, sintetizando el exopolisacárido alginato, el cual le confiere al *biofilm* mayor resistencia a los agentes antibióticos (Mathee et al., 1999).

Los agentes antimicrobianos también pueden inducir la formación de *biofilms* (Karatan & Watnick, 2009). Concentraciones subinhibitorias de tobramicina (antibiótico aminoglucósido), han mostrado inducir la formación de *biofilms* en *P. aeruginosa* (Hoffman et al., 2005). Otro antibiótico como el triclosan, incrementa la transcripción de genes que codifican para la síntesis de celulosa en *S. typhimurium*, la cual forma parte de la matriz del *biofilm* que forma este microorganismo (Tabak et al., 2007).

Relevancia clínica de los *biofilms* de *Proteus mirabilis*

Los *biofilms* pueden crecer en cualquier sistema hidratado, por lo que adquieren relevancia en distintos contextos, en particular, en la clínica médica, donde las infecciones asociadas a *biofilms* tienen un impacto significativo (Tenke, Kovacs, Jäckel, & Nagy, 2006).

Actualmente se sabe que en particular, las infecciones de tracto urinario asociadas a catéteres son persistentes y crónicas, y se correlacionan fuertemente con la formación de *biofilms*, cuya presencia ha sido demostrada en catéteres, bolsas de drenaje y en el uroepitelio. Entre uno y cinco de cada diez pacientes que se encuentran cateterizados durante lapsos breves (hasta 7 días), desarrollan una infección del tracto urinario (ITU), la cual se presenta en prácticamente todos aquellos pacientes que se encuentren cateterizados por períodos prolongados de más de 28 días. En estos pacientes, es común que luego de la administración de antibióticos contra ITUs, ocurra una reinfección por bacterias que sobreviven en el *biofilm* (J. W. Costerton, 1999; Reid, Denstedt, Kang, Lam, & Nause, 1992; John W. Warren, 2001).

Proteus mirabilis, es una bacteria Gram negativa y móvil que pertenece a la familia de las enterobacterias, la cual es uno de los microorganismos más comúnmente aislados en el caso de ITU complicadas, siendo el tercer agente con mayor frecuencia asociado a las mismas, luego de *Escherichia coli* y *Klebsiella pneumoniae* (H. L. T. Mobley, 1996; Roberts, Fussell, & Kaack, 1990; John W. Warren, 1996).

Las infecciones causadas por *P. mirabilis* son persistentes, difíciles de tratar e incluso pueden llegar a ser fatales. Compromete el cuidado de los pacientes cateterizados por períodos prolongados, ya que puede formar *biofilms* cristalinos en el catéter, provocando el bloqueo del flujo de orina y causando por consiguiente, incontinencia y una dolorosa distensión de la vejiga debido a la retención urinaria. Si el paciente no es tratado, el bloqueo del catéter puede producir pielonefritis y septicemia. A pesar de que el catéter se remplace, existan períodos sin cateterización o terapia antibiótica, ha sido demostrado que un mismo genotipo de *P. mirabilis* puede persistir en el tracto urinario (Sabbuba, Mahenthiralingam, & Stickler, 2003). Asimismo, se ha observado que presenta particular afinidad por el tracto urinario superior, donde puede provocar grave daño renal (Senior, 1979).

Factores de virulencia de *Proteus mirabilis*

En la colonización e invasión de *P. mirabilis* en el tracto urinario están implicados diversos factores de virulencia tales como la producción de hemolisinas, ureasa, secreción de proteasas que clivan inmunoglobulinas de isotipo A y G, sistemas de captación de hierro, movilidad mediada por flagelos así como la expresión de distintos tipos de fimbrias (Nielubowicz & Mobley, 2010). Estas últimas, son apéndices proteicos filamentosos que emergen de la superficie bacteriana, implicadas en la capacidad para adherirse a distintas superficies como el uroepitelio, lo que contribuye de forma relevante en la uropatogénesis (H. L. T. Mobley & Belas, 1995).

P. mirabilis se distingue también por la producción de altos niveles de ureasa, enzima que hidroliza la urea de la orina generando amoníaco, el cual eleva el pH local y puede conducir a la precipitación de minerales como fosfato de calcio y de magnesio (H. L. T. Mobley, 1996). Este fenómeno, tiene varias implicancias clínicas, como su asociación directa con la formación de cálculos en el tracto urinario (H. L. Mobley & Hausinger, 1989).

P. mirabilis presenta un comportamiento multicelular durante la migración en medios sólidos, denominado *swarming*, en la cual ocurre una diferenciación desde una forma unicelular vegetativa, típica de medios líquidos, a una forma multicelular elongada hiperflagelada denominada *swarmer* (Belas, 1996). Dicha característica distintiva dentro la familia de las enterobacterias, se ha vinculado con la habilidad del patógeno para colonizar las superficies de los catéteres (Sabbuba et al., 2003; D.J. Stickler, King, Winters, & Morris, 1993).

Se observó que determinados genes asociados a la adhesión, mediada por fimbrias y la movilidad *swarming*, podrían jugar un rol importante en la formación del *biofilm* tanto en sustratos bióticos como abióticos. Empleando mutantes isogénicas fimbriales y aflageladas de *P. mirabilis*, se ha demostrado que existe una variación significativa en los índices de hidrofobicidad, formación de biomasa, adhesión a superficies plásticas y en la capacidad de migrar sobre catéteres de los mutantes con relación a la cepa salvaje de *P. mirabilis*. Estos resultados indican que diferentes tipos de fimbrias podrían tener roles diversos en la formación del *biofilm*, y que la migración sobre catéteres podría estar facilitada por la presencia de flagelos (Schlapp, 2009).

II. Hipótesis

Una gran variedad de genes asociados a diversas funciones están involucrados en la biogénesis de los *biofilms* de *P. mirabilis*. La dilucidación de las bases moleculares de la misma, así como la identificación de los genes vinculados a la formación de los *biofilms*, contribuirá con el control de las ITU asociadas a catéteres.

III. Objetivo general

Identificar genes involucrados en la formación de *biofilms* de *P. mirabilis* uropatogénico.

IV. Objetivos específicos

- Selección de cepas mutantes de *P. mirabilis* que exhiban alteraciones significativas en la formación de *biofilms*, generadas mediante mutagénesis al azar.
- Caracterización genética de las mutantes.
- Identificación de los genes involucrados en la formación de *biofilms*.

V. Materiales y métodos

Colección de mutantes de *P. mirabilis*

Se empleó una colección de mutantes obtenida por mutagénesis al azar por transposición, previamente generada en el laboratorio. Para la obtención de los mutantes se realizó una conjugación por medio de la cual se insertó un transposón en el genoma de la cepa salvaje de *P. mirabilis* Pr2921 de origen clínico (Zunino, Geymonat, Allen, Legnani-Fajardo, & Maskell, 2000), a partir de una cepa donadora de *E. coli* S17-1 λ pir portadora del plásmido suicida pBAM1 (del Inglés: *born-again-mini-transposon*) (Martínez-García, Calles, Arévalo-rodríguez, & Lorenzo, 2011).

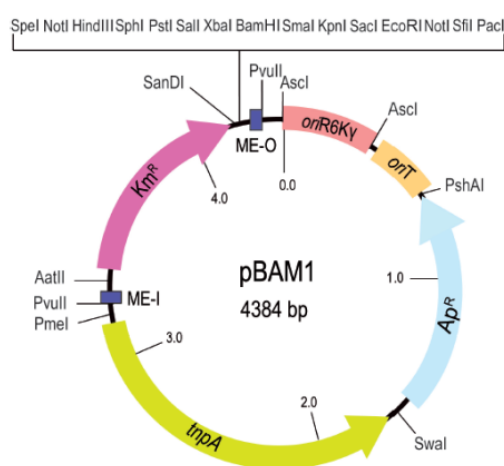


Figura 2. Mapa del plásmido pBAM1. Elementos funcionales del plásmido incluyen sitios de restricción relevantes, marcadores de resistencia a antibióticos (Ap, ampicilina; Km, kanamicina), transposasa (*tnpA*), origen de la región de transferencia (*oriT*) y elementos mosaico I (ME-I) y O (ME-O). Extraído de (Martínez-García et al., 2011).

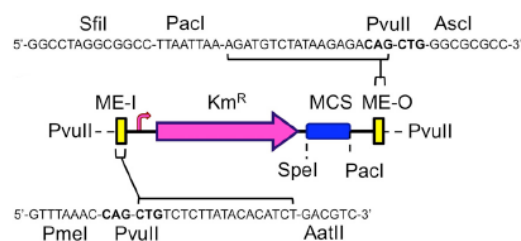


Figura 3. Organización estructural de los módulos del transposón. Se muestra la secuencia de los elementos mosaicos ME-I y ME-O. La flecha de color rosado, muestra la posición del promotor del gen *Km^R*. Extraído y adaptado de (Martínez-García et al., 2011).

El plásmido pBAM1 cuenta con 4384 pares de bases y su replicación depende de la proteína π , codificada por el gen *pir*, ausente en *P. mirabilis*. pBAM1 incluye un mini transposón derivado de Tn5, flanqueado por elementos mosaico (ME, del Inglés: *Mosaic Element*) de 19 pares de bases, denominadas ME-I y ME-O (Figura 2). Entre las mismas, se sitúa un gen de resistencia a kanamicina (*Km^R*) que se utiliza como marcador de selección, y un sitio de clonado múltiple (MCS, del Inglés: *Multiple Cloning Site*) con 15 sitios de corte para enzimas de restricción (Figura 3). También posee el gen de la transposasa *tnpA* que cataliza la inserción aleatoria del módulo móvil

en el genoma, y el gen *bla* que codifica para una β -lactamasa, otorgando resistencia a ampicilina (Martínez-García et al., 2011).

Se seleccionaron aquellas cepas transconjugantes que resultaron ser: kanamicina resistentes, debido al gen de resistencia que aporta el propio transposón; sensibles a ampicilina, ya que el gen que otorga resistencia a este antibiótico no se integra al genoma al localizarse fuera del transposón, y a su vez, el plásmido que lo contiene tampoco puede replicarse dentro de *P. mirabilis*; y tetraciclina resistentes, ya que *P. mirabilis* es intrínsecamente resistente a este antibiótico. Para ello, los mutantes fueron subcultivados en caldo LB¹ (triptona 1%, extracto de levadura 0,5%, NaCl 0,5%, pH 6,8) sin cloruro de sodio para evitar la movilidad *swarming*, y con una concentración de agar de 2%, suplementado además con los antibióticos kanamicina (concentración final de 40 μ g/mL) y tetraciclina (concentración final de 15 μ g/mL).

Capacidad de formación de *biofilms* de las cepas mutantes

Las cepas mutantes anteriormente seleccionadas, se cultivaron en placas de microtitulación de 96 pocillos empleando caldo LB, incubándolas a 37°C durante 48hs. Luego, las bacterias no adheridas se removieron mediante lavados con PBS 1X (1,7 g/L Na₂HPO₄; 0,4 g/L KH₂PO₄; 8,2 g/L NaCl) e inversión de las placas sobre papel absorbente. Las bacterias adheridas se tiñeron con una solución de cristal violeta al 1% durante 15 minutos, y el exceso de colorante también fue removido mediante lavados con PBS. El cristal violeta asociado a las bacterias se solubilizó mediante el agregado de etanol al 95%, el cual se cuantificó en forma indirecta midiendo la absorbancia a 540nm (en adelante, Abs_{540nm}) utilizando un espectrofotómetro de placas de microtitulación (VarioskanTM, ThermoScientific). Cada ensayo se realizó por duplicado, y como blanco (valor cero de absorbancia) se utilizó el medio de cultivo LB. Las medidas de absorbancia se relacionan de forma semi cuantitativa con la cantidad de bacterias adheridas, lo que permite visualizar de forma rápida la capacidad de adhesión de las cepas mutantes (G. A. O'Toole & Kolter, 1998a).

¹ “El acrónimo ha sido diversamente interpretado, quizás en forma halagadora, pero incorrectamente, como caldo de Luria, caldo de Lennox, o medio Luria-Bertani. Para la posteridad, la abreviatura LB tuvo la intención de hacer referencia al caldo de lisogenia (del Inglés: *lysogeny broth*)” (Bertani, 2004).

Los mutantes seleccionados fueron aquellos que exhibieron una significativa disminución o incremento en la capacidad para formar *biofilms* con respecto a la cepa salvaje Pr2921. La misma, presenta una Abs_{540nm} de 0,9 unidades en promedio luego de la tinción con cristal violeta. De esta manera, se clasificaron a las cepas mutantes con capacidad incrementada para formar *biofilms*, como aquellas cuyo valor de Abs_{540nm} fue superior a 1,2 unidades, y con capacidad disminuida a aquellas cuyo valor promedio fue inferior a 0,25 unidades (Villegas et al., 2013).

Verificación de una única inserción del transposón en el genoma

La presencia de una única inserción del transposón en el genoma, se evaluó mediante *Southern Blot*. Se extrajo el ADN genómico de los mutantes y luego se lo digirió con enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos de distintos tamaños, son separados en una electroforesis en gel de agarosa. Posteriormente, las distintas bandas obtenidas se transfirieron a una membrana. Luego, una sonda tomó contacto con las distintas bandas e hibridó en donde su secuencia es complementaria a una porción de la secuencia del transposón insertado. Finalmente, aquellos mutantes que presentaron una única banda en el revelado de esta técnica, fueron aquellos en los que el transposón se insertó una única vez en el genoma.

Identificación de los genes interrumpidos

Para la identificación de los genes interrumpidos en las cepas seleccionadas, se empleó una variante de la técnica de PCR (del Inglés: *Polymerase Chain Reaction*) llamada PCR arbitraria, y posteriormente se procedió a la secuenciación de los productos obtenidos. La técnica de PCR permitió amplificar las regiones contiguas al sitio de inserción del transposón en los clones transconjugantes seleccionados.

La PCR arbitraria consta de dos rondas de amplificación. En la primera, se utilizó el cebador ARB6 diseñado de forma arbitraria, que hibrida con secuencias arbitrarias de cualquier genoma, y el cebador ME-I-ExtR, el cual hibrida con una región cercana al extremo ME-I del transposón insertado (Tabla 1). Para obtener una mayor cantidad de amplicones, el producto de la primera ronda constituyó el ADN molde utilizado en la segunda. En esta última, se utilizó el cebador ARB2, diseñado de forma también arbitraria y el cebador ME-I-IntR, el cual hibrida con una región aún más cercana al extremo ME-I del transposón insertado (Tabla 1) (Martínez-García et al., 2011).

Tabla 1. Secuencias nucleotídicas de los cebadores utilizados para cada ronda de PCR

Nombre	Secuencia 5'→3'	Uso	Referencia
ARB6	GGCACGCGTCGACTAGTACNNNNNNNNNNA CGCC	1ª ronda	(Pratt & Kolter, 1998)
ME-I-ExtR	CTCGTTTCACGCTGAATATGGCTC	1ª ronda	(Martínez-García et al., 2011)
ARB2	GGCACGCGTCGACTAGTAC	2ª ronda	(Pratt & Kolter, 1998)
ME-I-IntR	CAGTTTTATTGTTTCATGATGATATA	2ª ronda	(Martínez-García et al., 2011)

Tabla 2. Características de los ciclos de amplificación empleados en ambas rondas.

Ronda	Nº ciclos	Etapas	T (°C)	Duración
1	6	Desnaturalización	95	30 s
		<i>Annealing</i>	30	30 s
		Extensión	72	90 s
	30	Desnaturalización	95	30 s
		<i>Annealing</i>	45	30 s
		Extensión	72	90 s
	–	Extensión extra	95	4 min
2	–	Etapas inicial	95	1 min
	30	Desnaturalización	95	30
		<i>Annealing</i>	52	30
		Extensión	72	90
	–	Extensión extra	72	4 min

En la Tabla 2, se encuentran en detalle las características de los ciclos de ambas rondas de amplificación. La primera ronda de amplificación constó de 36 ciclos en total, de los cuales los primeros seis, incluyeron una temperatura de *annealing* de 30°C y los siguientes treinta de 45°C. La segunda ronda, la cual consta de 30 ciclos, comienza con un 1 minuto a 95°C. Ambas rondas presentan un período de extensión extra de 4 minutos a 72°C.

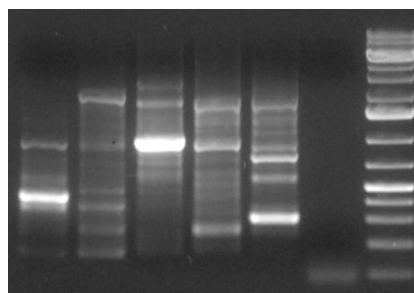
Los productos obtenidos en el segundo ciclo de PCR fueron visualizados mediante electroforesis en gel de agarosa, el cual se preparó al 0,8% en solución TBE 0,5X (54 g/L de Tris; 27,5 g/L de ácido bórico; 20 ml de 0,5 M EDTA; pH 8). Previo a la siembra las muestras se mezclaron con solución de carga 5X (*BioRad*). Una vez sembradas las muestras se realizó la corrida electroforética empleando como solución de corrida TBE 0,5X a 110 V durante 45 minutos aproximadamente. Para visualizar el ADN se tiñó el gel durante 30 minutos con el colorante GelRedTM (*Biotium*), y se lo observó en el transiluminador (*MacroVueUVis-20, HoeferInc*).

Los fragmentos de interés fueron enviados a secuenciar al servicio de *Macrogen Inc.* posteriormente las secuencias obtenidas se analizaron a través de herramientas informáticas de uso público, como *BioEditTM* (*Ibis Biosciences*) y *BLASTTM* (*NCBI: National Center for Biotechnology Information*). Así, las secuencias flanqueantes al sitio de inserción se compararon con las de *P. mirabilis* HI4320, cepa cuyo genoma se ha secuenciado de manera complete (Pearson et al., 2008), y de esta manera, se identificaron algunos de los genes involucrados en la formación de *biofilms*.

VI. Resultados

En total se evaluaron 5952 clones, de los cuales 69 (1,16%) presentaron una capacidad alterada para formar *biofilms*: 15 presentaron una capacidad significativamente aumentada (Tabla 3) y 54 mostraron una capacidad significativamente disminuida (Tabla 4).

Figura 4. PCR arbitraria. Revelado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos de la amplificación por PCR arbitraria. Orden de sembrado (de izquierda a derecha): clon 106, clon 109, clon 110, clon 113, clon 40 (control positivo), control negativo, y marcador de peso molecular.



De las 69 cepas mutantes seleccionadas, solamente en 24 se insertó el transposón una única vez. Entre ellas, 4 presentaron una capacidad significativamente aumentada para formar *biofilms* y 20 mostraron una capacidad significativamente disminuida.

Tabla 3. Valores de absorbancia promedio a 540nm para clones que presentaron una capacidad incrementada para formar *biofilms*. Los clones que se encuentran resaltados, incorporaron una única vez el transposón.

Clon	A _{540nm}	Clon	A _{540nm}	Clon	A _{540nm}	Clon	A _{540nm}
38	1,226	51	1,640	63	1,266	88	1,404
43	1,281	55	1,218	78	1,369	113	1,358
45	1,234	56	1,926	81	1,546	132	1,836
50	1,640	62	1,210	83	1,259		

Es posible que el transposón se pueda insertar más de una vez en aquellas cepas transconjugantes que presentaron una capacidad significativamente alterada de formar *biofilms* con respecto a la cepa salvaje Pr2921. Esto interrumpiría más de un gen, por lo que no se sabría a cuál atribuirle el fenotipo expresado.

Tabla 4. Valores de absorbancia promedio a 540nm para clones que presentaron una capacidad disminuida para formar *biofilms*. Los clones que se encuentran resaltados, incorporaron una única vez el transposón.

Clon	A _{540nm}	Clon	A _{540nm}	Clon	A _{540nm}	Clon	A _{540nm}
40	0,150	85	0,179	101	0,162	119	0,060
41	0,187	86	0,171	102	0,143	120	0,155
42	0,134	87	0,097	105	0,149	121	0,065
46	0,082	89	0,168	106	0,093	122	0,144
47	0,042	90	0,196	107	0,131	123	0,174
48	0,242	91	0,112	108	0,122	124	0,188
49	0,134	92	0,168	109	0,136	125	0,161
53	0,038	93	0,153	110	0,186	126	0,144
54	0,206	94	0,133	111	0,028	127	0,103
66	0,091	95	0,156	112	0,103	130	0,147
67	0,099	96	0,062	115	0,145	131	0,171
68	0,048	98	0,066	116	0,123	134	0,199
80	0,215	99	0,111	117	0,180		
82	0,246	100	0,069	118	0,016		

En aquellas cepas mutantes en las que el transposón se insertó una única vez en su genoma, se amplificó por PCR arbitraria la porción del ADN genómico adyacente al extremo ME-I del transposón insertado. En la Figura 4 se visualiza el revelado de la electroforesis en gel de agarosa de los productos obtenidos luego de la amplificación por PCR arbitraria de algunos de los clones seleccionados.

Los productos obtenidos por PCR arbitraria, se enviaron a secuenciar y posteriormente se identificaron los genes interrumpidos debido a la inserción del transposón en el genoma de las cepas mutantes. En la Tabla 5 y en la Tabla 6, se indican los productos que codifican los genes identificados más relevantes, los cuales se agrupan en función de la capacidad incrementada o disminuida para formar *biofilms* de los mutantes respectivamente.

Tabla 5. Productos codificados por el gen interrumpido en aquellos clones que presentaron una capacidad incrementada para formar *biofilms*. Se indica el locus (PMI_RS) del gen que codifica para el producto identificado. La referencia pertenece a la base de datos de proteínas del NCBI. Se indica el porcentaje de homología entre las secuencias obtenidas y las disponibles en la base de datos GenBank®.

Producto codificado por el gen interrumpido	Locus	Referencia	Homología
Péptido sintasa no ribosomal	PMI_RS12835	WP_012368439.1	99%
Ferritina	PMI_RS04890	WP_004242561.1	96%

Tabla 6. Productos codificados por el gen interrumpido en aquellos clones que presentaron una capacidad disminuida para formar *biofilms*. Se indica el locus (PMI_RS) del gen que codifica para el producto identificado. La referencia pertenece a la base de datos del NCBI. Se indica el porcentaje de homología entre las secuencias obtenidas y las disponibles en la base de datos GenBank®.

Producto codificado por el gen interrumpido	Locus	Referencia	Homología
Proteína de bomba de eflujo (familia de transportadores MFS)	PMI_RS14645	WP_004249028.1	95%
Acomodador molecular fimbrial de membrana externa	PMI_RS10945	WP_004248675.1	89%
Subunidad fimbrial principal	PMI_RS02650	WP_020946062.1	99%
Isocorismatasa	PMI_RS10855	WP_004244302.1	86%
Receptor dependiente de TonB	PMI_RS18440	WP_012368854.1	99%

VII. Discusión

Los *biofilms* revisten particular interés en la clínica, ya que pueden colonizar implantes médicos. Después de *E. coli*, *P. mirabilis* es el agente etiológico que más frecuentemente causa infecciones urinarias, especialmente en pacientes cateterizados o con anomalías estructurales del tracto urinario (H. L. T. Mobley & Belas, 1995; J. W. Warren, Tenney, Hoopes, Muncie, & Anthony, 1982). Por otra parte, presenta una importante habilidad para formar *biofilms* sobre distintas superficies, lo que se asocia con una alta incidencia de infecciones del tracto urinario asociadas a catéteres urinarios (David J Stickler, 2014).

Por esta razón, es importante dilucidar las bases moleculares en la formación de *biofilms* de *P. mirabilis*. En virtud de ello, planteamos la hipótesis de que existen diversos genes involucrados en dicho proceso. De esta manera, el objetivo general de este trabajo fue la identificación de genes que participan en la formación de *biofilms* de *P. mirabilis* uropatógeno.

Para ello, se generó una colección de mutantes de la cepa salvaje de *P. mirabilis* Pr2921 de origen clínico por mutagénesis al azar por transposición. Se seleccionaron aquellos mutantes que presentaron una capacidad significativamente incrementada o disminuida para formar *biofilms* con respecto a la cepa salvaje, y posteriormente, se procedió a la identificación de los genes que fueron interrumpidos.

Entre los genes más destacados cuya mutación afectó significativamente la capacidad para formar *biofilms* en *P. mirabilis*, se encuentra el gen ***nrpR*** perteneciente al operón *nrp* que codifica para una **péptido sintasa no ribosomal** (Figura 5).



Figura 5. Operón *nrp*. Organización transcripcional del operón *nrp*. Extraído y adaptado de (Himpsl et al., 2010).

El operón *nrp* se encuentra localizado en la isla genómica ICEPm1 (Flannery, Mody, & Mobley, 2009; Gaisser & Hughes, 1997) y sus genes presentan homología con aquellos que se encuentran involucrados con la síntesis del sideróforo yersiniabactina. A pesar de esta similitud, *P. mirabilis* no puede producir o utilizar yersiniabactinas, aunque pueda

utilizar enterobactinas producidas por otras especies (Himpsl et al., 2010). Las proteobactinas (sideróforos de síntesis no ribosomal), y los sideróforos codificados por el operón *nrp*, parecen ser los primeros mecanismos de quelación del hierro en *P. mirabilis* (Himpsl et al., 2010). Ambos sideróforos son importantes en la colonización de la vejiga, aunque aquellos similares a las yersiniabactinas proveen una mayor contribución al *fitness* global (Himpsl et al., 2010).

Algunos trabajos confirman el rol de las péptido sintasas no ribosomales en la formación de *biofilms*, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Cepas mutantes de *Streptococcus mutans* presentaron, bajo condiciones aeróbicas, una capacidad disminuida para formar *biofilms* con respecto a la cepa salvaje, luego de haber interrumpido el locus *mub* que codifica para péptido sintasas no ribosomales y polipéptido sintasas. Sin embargo, bajo condiciones anaeróbicas como las que se producen en la superficie dental, los *biofilms* desarrollados por los mutantes de *S. mutants*, no presentaron diferencias significativas con los formados por la cepa salvaje (Wu et al., 2010). Asimismo, cepas mutantes de *Pseudomonas putida* presentaron una capacidad disminuida en diez veces para formar *biofilms* con respecto a la cepa salvaje, luego de haber interrumpido un sistema de péptido sintasas no ribosomales que participa en la biosíntesis de un lipopéptido (Rokni-Zadeh et al., 2012).

El hecho de que la interrupción del gen *nprR* haya incrementado la capacidad de la cepa mutante para formar *biofilms*, es consistente con los trabajos anteriormente señalados. Sin embargo, se desconoce el rol preciso del gen *nprR* en la formación de *biofilms* de *P. mirabilis*.

Asimismo, se determinó que otro gen vinculado con la captación de hierro, se encuentra involucrado con la formación de *biofilms* de *P. mirabilis*. Dicho gen codifica para una enzima llamada **isocorismatasa**, la cual cataliza la hidrólisis de isocorismato a 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato (2,3-DHB) y piruvato, y pertenece a la superfamilia IHL (del Inglés: *isochorismatase-likehydrolases*), la cual ha sido bien caracterizada en organismos patógenos (Caruthers et al., 2005; Goral et al., 2012).

El isocorismato es una de las moléculas precursoras de muchos sideróforos, y a su vez, es un intermediario de la vía metabólica del ácido shikímico, la cual convierte glucosa en shikimato y posteriormente en ácido isocorísmico. Este último, es un intermediario

en la biosíntesis de muchas moléculas biológicamente relevantes como la fenilalanina, la tirosina, el triptófano, fenolatos, ubiquinonas, y vitamina K (Walsh, Liu, Rusnak, & Sakaitani, 1990).

La enzima isocorismatasa también se encuentra vinculada con la formación de *biofilms* en otros microorganismos. Cepas mutantes de *Streptococcus pneumoniae* con inserciones en genes que codificaban intermediarios de la vía del shikimato para la síntesis del isocorismato, presentaron una capacidad disminuida para formar *biofilms* con respecto a la cepa salvaje (Muñoz-Elías, Marcano, & Camilli, 2008).

A su vez, la enzima isocorismatasa EntB de *E. coli*, no solo produce 2,3-DHB necesario para sintetizar el sideróforo enterobactina, sino que a su vez participa de su ensamblaje (Gehring, Bradley, & Walsh, 1997).

En el presente trabajo, la cepa mutante de *P. mirabilis* que presentaba una interrupción en el gen que codifica para la enzima isocorismatasa, mostró una capacidad significativamente disminuida para formar *biofilms* con respecto a la cepa parental. Esto probablemente pueda atribuirse a la interrupción de distintas vías metabólicas como en el caso de *S. pneumoniae*, o bien a la incapacidad de la cepa mutante de sintetizar y ensamblar sideróforos como en el caso de *E. coli*.

En bacterias Gram negativas, la captación de hierro de alta afinidad, requiere proteínas localizadas en la membrana externa que unan quelatos de hierro a la superficie celular y promuevan su incorporación (Moeck & Coulton, 1998). El sistema de transducción de energía dependiente de **TonB** (Figura 6), utiliza la fuerza protón motriz de la membrana citoplasmática, para activar el transporte de hierro mediado por sideróforos a través de la membrana externa en bacterias Gram negativas (Higgs, Larsen, & Postle, 2002).

Una cepa mutante de TonB de *E. coli* uropatogénica, mostró una capacidad reducida de virulencia en un modelo animal de ITU. La capacidad de virulencia se reestableció una vez que el gen tonB fue introducido en un plásmido, lo cual indica el rol que cumplen los sistemas de captación de hierro dependientes de TonB en cepas de *E. coli* uropatogénicas (Torres, Redford, Welch, & Payne, 2001).

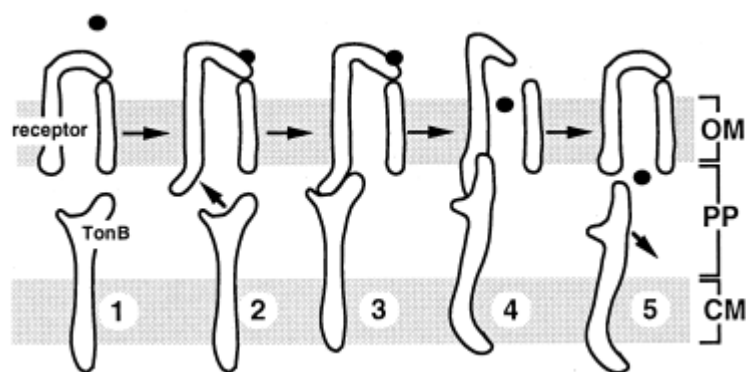


Figura 6. Translocación de quelatos de hierro férrico dependiente de TonB a través de la membrana externa. La unión del ligando a la proteína de membrana que actúa como receptora, induce un cambio conformacional de tal manera que esta expone unos bucles en el periplasma (**paso 1**). Estos cambios provocan que la proteína TonB contacte físicamente con el receptor, transduciéndose la energía desde la membrana citoplasmática hacia el receptor de la membrana externa (**paso 2 y 3**). Ello provoca un cambio conformacional en el receptor y como consecuencia se forma un poro en la membrana y se reduce la afinidad de este por el ligando (**paso 4**). De esta manera, el sustrato pasa a través del poro formado hacia el periplasma. Luego, la proteína TonB se disocia del receptor y es reciclada por el complejo ExbB-ExbD, mientras que la proteína de membrana adopta la misma estructura que tenía antes de su unión con el ligando (**paso 5**). Extraído y adaptado de (Moeck & Coulton, 1998).

Una cepa mutante de *P. aeruginosa* para el gen *tonB1*, fue incapaz de producir un *biofilm* maduro y mostró una capacidad reducida en las motilidades *swarming* y *twitching* con respecto a la cepa parental (Abbas, Adams, Scully, Glennon, & O’Gara, 2007).

En el presente trabajo, una cepa mutante de *P. mirabilis* que presentaba una interrupción en un gen que codifica para un **receptor dependiente de TonB**, presentó una capacidad significativamente disminuida para formar *biofilms* con respecto a la cepa parental. De esta manera, se confirma el rol que presenta el sistema de transducción de energía dependiente de TonB en la formación de *biofilms* de *P. mirabilis*, al igual que se ha confirmado en otras bacterias Gram negativas.

Se determinó que el gen *ftnA* también se encuentra involucrado en la formación de *biofilms* de *P. mirabilis*. El mismo codifica para una de los tres tipos de ferritinas que han sido caracterizadas en bacterias (Velayudhan, Castor, Richardson, Main-Hester, & Fang, 2007). Las proteínas de almacenamiento de hierro, conocidas genéricamente como ferritinas, son capaces de secuestrar reversiblemente el hierro en una forma mineral inerte. El hierro es potencialmente tóxico debido a su habilidad de catalizar la generación del radical hidroxilo a través de la reacción de Fenton, y a través de las ferritinas, puede ser movilizado al metabolismo intracelular cuando su disponibilidad

exógena se vuelve limitante. La naturaleza ubicua de las ferritinas, enfatiza su rol como actores principales de la homeostasis del hierro (Velayudhan et al., 2007).

En *E. coli*, FtnA es responsable del almacenamiento de hasta el 50% del hierro intracelular durante el crecimiento post exponencial en un medio rico en hierro, y asimismo constituye una fuente de hierro que compensa parcialmente su deficiencia cuando su disponibilidad es limitada (Abdul-tehrani et al., 1999). La ferritina en *Campylobacter jejuni* hace una contribución significativa tanto al almacenamiento del hierro como a la protección de la sobrecarga de hierro intracelular, la cual puede generar estrés oxidativo (Wai, Nakayama, Umene, Moriya, & Amako, 1996). Asimismo, se presume que el transporte activo de hierro quelado o el nivel intracelular de hierro, están relacionados en la formación de *biofilms* de *P. aeruginosa* (Banin, Vasil, & Greenberg, 2005).

La interrupción del gen *ftnA*, provocó un incremento en la capacidad para formar *biofilms*, lo cual creemos que pudo deberse a una alteración en la concentración intracelular de hierro (mecanismo desconocido).

A su vez, se identificó un gen que codifica para una **bomba de eflujo** perteneciente a la superfamilia de transportadores MFS, involucrado en la formación de *biofilms* de *P. mirabilis*.

El análisis de los genomas disponibles en varias bacterias, reveló que las bombas de eflujo tanto conocidas como presuntas, constituyen entre el 6% y 18% de todos los transportadores (Paulsen, Sliwinski, & Saier, 1998). El fenómeno de multiresistencia bacteriana se asocia a menudo con la sobreexpresión de los transportadores que reconocen y secretan eficientemente de las células, un amplio rango de compuestos estructuralmente no relacionados (Zgurskaya & Nikaido, 2000). Un número creciente de estudios demuestra que la resistencia a casi todos los antibióticos, pudo ser alcanzada a través de la actividad de las bombas de eflujo. De esta manera, la evolución ha dotado a las bacterias con enormes capacidades para sobrevivir en ambientes tóxicos (Saier, Milton H. et al., 1998).

En bacterias Gram negativas, la mayoría de las bombas de eflujo comparten una organización común de tres componentes: un transportador de localizado en la membrana interna, un canal de membrana externa y una proteína accesoria

periplásmica. En este arreglo, las bombas de eflujo atraviesan las membranas tanto interna como externa, y de esta manera, facilitan el pasaje directo del sustrato desde el citoplasma o desde la membrana citoplasmática hacia el medio externo (Zgurskaya & Nikaido, 2000).

Las bombas de eflujo trabajan sinérgicamente con la baja permeabilidad de la membrana externa, lo cual explica que las bacterias Gram negativas se vuelvan hipersusceptibles a varias drogas tanto por la inactivación de las bombas de eflujo como por la permeabilización de la membrana externa (Zgurskaya & Nikaido, 2000).

La interrupción de los sistemas de eflujo deriva en la reducción en la formación de *biofilms* cristalinos, o, lo cual se corresponde con estudios recientes que resaltan el rol de esos sistemas de exportación en la formación de *biofilms* bacterianos (Baugh, Ekanayaka, Piddock, & Webber, 2012; Kvist, Hancock, & Klemm, 2008; Matsumura, Furukawa, Ogihara, & Morinaga, 2011; Soto, 2013).

Las bombas de eflujo de células asociadas a *biofilms*, se expresan en niveles superiores con respecto a sus contrapartidas planctónicas. La inhibición de las bombas de eflujo, ha provocado la reducción o la abolición de la formación de *biofilms* en especies uropatógenicas como *Staphylococcus aureus*, *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae* y *P. aeruginosa* (Kvist et al., 2008; Matsumura et al., 2011; Zhang & Mah, 2008).

El hecho de que una cepa mutante de *P. mirabilis* haya presentado una capacidad disminuida para formar *biofilms* debido a la interrupción de un gen que codifica para una bomba de flujo, es consistente con el rol anteriormente expuesto de las bombas de eflujo en la formación de *biofilms* para distintas bacterias uropatógenicas.

En este trabajo también se identificaron, genes que participan en el ensamblaje de las fimbrias de *P. mirabilis*, cuya interrupción afectó su capacidad para formar *biofilms*.

P. mirabilis representa un caso particular en el cual varios tipos de fimbrias pueden ser expresadas simultáneamente (H. L. T. Mobley & Belas, 1995). Este microorganismo produce diversas fimbrias y hemaglutininas, incluyendo fimbrias MR/P (del Inglés: *mannose-resistant/Proteus-like*); fimbrias PMF (del Inglés: *Proteus mirabilis fimbriae*); UCA (del Inglés: *uroepithelialcelladhesin*), renombrada por algunos autores por NAF (del Inglés: *non agglutinating fimbriae*); y ATF (del Inglés: *ambient-temperature fimbriae*) (Rózalski, Sidorczyk, & Kotelko, 1997).

El ensamblaje de las fimbrias de *P. mirabilis* ocurre mayoritariamente a través de la vía chaperona/acomodador molecular. Los genes involucrados en la biosíntesis de fimbrias a través de esta vía, se encuentran muy conservados, estando localizados en operones. Estos codifican al menos tres proteínas diferentes: una subunidad fimbrial principal, una chaperona y un acomodador molecular. Los operones fimbriales contienen a menudo genes adicionales que codifican para proteínas estructurales, como por ejemplo, la subunidad menor fimbrial, proteínas de ensamblaje como las chaperonas, o proteínas regulatorias (Nuccio & Bäumler, 2007).

Algunos trabajos confirman el rol de las fimbrias en la formación de *biofilms*, tanto en bacterias Gram positivas como en Gram negativas. Cepas mutantes de *Pseudomonas aeruginosa* presentaron una capacidad drásticamente disminuida para formar *biofilms* con respecto a la cepa salvaje, luego de haber interrumpido el gen *cupA3* que codifica para un acomodador molecular fimbrial (Vallet, Filloux, Olson, & Lory, 2001). Cepas mutantes de *Enterococcus faecalis* mostraron ser deficientes en la formación de *biofilms* con respecto a la cepa salvaje, luego de haber interrumpido genes del operón *ebp* (del Inglés: *endocarditis and biofilm-associated pilus*) que codifica para subunidades fimbriales (Nallapareddy et al., 2006; Sillanpää et al., 2013).

En este trabajo, las cepas mutantes de *P. mirabilis* que presentaron una interrupción en el gen que codifica para un acomodador molecular fimbrial como para una subunidad fimbrial principal, mostraron una capacidad disminuida en la formación de *biofilms*, lo cual apoya el papel que juegan las fimbrias en la biogénesis de *biofilms* de este microorganismo.

VIII. Conclusiones y perspectivas

Los resultados obtenidos en el presente trabajo, confirmaron que existe una amplia variedad de genes asociados con la formación de *biofilms* de *P. mirabilis*. Esto ratifica la complejidad del proceso, ya que intervienen un número importante de genes asociados a funciones diversas.

Se deberá probar en el futuro que el fenotipo de cada cepa mutante, se debe únicamente a la interrupción del gen identificado, y que esta no altera la expresión de genes adyacentes. Asimismo, a los efectos de verificar que el transposón insertado interrumpe un único gen en los distintos mutantes, se realizará la identificación del gen interrumpido a partir del extremo ME-O.

En el futuro, se seguirá evaluando el papel de estos y otros genes de *P. mirabilis* en la biosíntesis de *biofilms*, así como en la virulencia en el tracto urinario.

IX. Referencias

- Abbas, A., Adams, C., Scully, N., Glennon, J., & O’Gara, F. (2007). A role for TonB1 in biofilm formation and quorum sensing in *Pseudomonas aeruginosa*. *FEMS Microbiology Letters*, 274(2), 269–278.
- Abdallah, F. Ben, Chaieb, K., Zmantar, T., Kallel, H., & Bakhrouf, A. (2009). Adherence assays and Slime production of *Vibrio alginolyticus* and *Vibrio parahaemolyticus*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 40(2), 394–398.
- Abdul-tehrani, H., Hudson, A. J., Chang, Y., Timms, A. R., Hawkins, C., Williams, J. M., ... Guest, J. R. (1999). Ferritin Mutants of *Escherichia coli* Are Iron Deficient and Growth Impaired , and fur Mutants are Iron Deficient. *Journal of Bacteriology*, 181(5), 1415–1428.
- Augustin, M., Ali-Vehmas, T., & Atroshi, F. (2004). Assessment of enzymatic cleaning agents and disinfectants against bacterial biofilms. Canadian Society for Pharmaceutical Sciences.
- Banin, E., Vasil, M. L., & Greenberg, E. P. (2005). Iron and *Pseudomonas aeruginosa* biofilm formation. *PNAS*, 102(31).
- Baugh, S., Ekanayaka, A. S., Piddock, L. J. V, & Webber, M. A. (2012). Loss of or inhibition of all multidrug resistance efflux pumps of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium results in impaired ability to form a biofilm. *The Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 67(10), 2409–17.
- Belas, R. (1996). *P. mirabilis* swarming and UTI. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. H.L.T. Mobley, Warren JW. Washington DC, ASM Press, 271–298.
- Bertani, G. (2004). Lysogeny at Mid-Twentieth Century: P1, P2, and Other Experimental Systems. *Journal of Bacteriology*, 186(3), 595–600.
- Blair, K. M., Turner, L., Winkelman, J. T., Berg, H. C., & Kearns, D. B. (2008). A molecular clutch disables flagella in the *Bacillus subtilis* biofilm. *Science (New York, N.Y.)*, 320(2008), 1636–1638.
- Caruthers, J., Zucker, F., Worthey, E., Myler, P. J., Buckner, F., Van Voorhuis, W., ... Merritt, E. A. (2005). Crystal structures and proposed structural/functional classification of three protozoan proteins from the isochorismatase superfamily. *Protein Science : A Publication of the Protein Society*, 14(11), 2887–94.
- Chmielewski, R. A. N., & Frank, J. F. (2006). A predictive model for heat inactivation of *Listeria monocytogenes* biofilm on buna-N rubber. *LWT - Food Science and Technology*, 39(1), 11–19.
- Costerton, J. W. (1999). Bacterial Biofilms: A Common Cause of Persistent Infections. *Science*, 284(5418), 1318–1322.
- Costerton, J. W., Lewandowski, Z., Caldwell, D. E., Korber, D. R., & Lappin-Scott, H. M. (1995). Microbial biofilms. *Annual Review of Microbiology*, 49, 711–45.
- Costerton, W., Veeh, R., Shirtliff, M., Pasmore, M., Post, C., & Ehrlich, G. (2003). The application of biofilm science to the study and control of chronic bacterial infections. *The Journal of Clinical Investigation*, 112(10), 1466–77.

- Danhorn, T., Hentzer, M., Givskov, M., Parsek, M. R., & Fuqua, C. (2004). Phosphorus limitation enhances biofilm formation of the plant pathogen *Agrobacterium tumefaciens* through the PhoR-PhoB regulatory system. *Journal of Bacteriology*, 186(14), 4492–501.
- Davey, M. E., & O’toole, G. A. (2000). Microbial biofilms: from ecology to molecular genetics. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 64(4), 847–67.
- de la Fuente-Núñez, C., Reffuveille, F., Fernández, L., & Hancock, R. E. W. (2013). Bacterial biofilm development as a multicellular adaptation: antibiotic resistance and new therapeutic strategies. *Current Opinion in Microbiology*, 16(5), 580–9.
- Deighton, M., & Borland, R. (1993). Regulation of slime production in *Staphylococcus epidermidis* by iron limitation. *Infection and Immunity*, 61(10), 4473–9.
- Donlan, R. M. (2002). Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging Infectious Diseases*, 8(9), 881–890.
- Donlan, R. M., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms: Survival Mechanisms of Clinically Relevant Microorganisms. *Clinical Microbiology Reviews*, 15(2), 167–193.
- Ferreira, C., Pereira, a M., Melo, L. F., & Simões, M. (2010). Advances in industrial biofilm control with micro-nanotechnology. *Applied Microbiology*, 845–854.
- Flannery, E. L., Mody, L., & Mobley, H. L. T. (2009). Identification of a modular pathogenicity island that is widespread among urease-producing uropathogens and shares features with a diverse group of mobile elements. *Infection and Immunity*, 77(11), 4887–94.
- Flemming, H.-C., & Wingender, J. (2010). The biofilm matrix. *Nature Reviews in Microbiology*, 8(9), 623–33.
- Gaisser, S., & Hughes, C. (1997). A locus coding for putative non-ribosomal peptide/polyketide synthase functions is mutated in a swarming-defective *Proteus mirabilis* strain. *Molecular and General Genetics*, 253(4), 415–27.
- Gehring, A. M., Bradley, K. A., & Walsh, C. T. (1997). Enterobactin biosynthesis in *Escherichia coli*: isochorismate lyase (EntB) is a bifunctional enzyme that is phosphopantetheinylated by EntD and then acylated by EntE using ATP and 2,3-dihydroxybenzoate. *Biochemistry*, 36(28), 8495–503.
- Gerstel, U., & Römling, U. (2001). Oxygen tension and nutrient starvation are major signals that regulate agfD promoter activity and expression of the multicellular morphotype in *Salmonella typhimurium*. *Environmental Microbiology*, 3(10), 638–48.
- Goller, C., Wang, X., Itoh, Y., & Romeo, T. (2006). The cation-responsive protein NhaR of *Escherichia coli* activates pgaABCD transcription, required for production of the biofilm adhesin poly-beta-1,6-N-acetyl-D-glucosamine. *Journal of Bacteriology*, 188(23), 8022–32.
- Goral, A. M., Tkaczuk, K. L., Chruszcz, M., Kagan, O., Savchenko, A., & Minor, W. (2012). Crystal structure of a putative isochorismatase hydrolase from *Oleispira antarctica*. *Journal of Structural and Functional Genomics*, 13(1), 27–36.

- Hall-Stoodley, L., Costerton, J. W., & Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the natural environment to infectious diseases. *Nature Reviews in Microbiology*, 2(2), 95–108.
- Hausner, M., & Wuertz, S. (1999). High Rates of Conjugation in Bacterial Biofilms as Determined by Quantitative In Situ Analysis. *Applied and Environmental Microbiology*, 65(8), 3710–3713.
- Higgs, P. I., Larsen, R. a., & Postle, K. (2002). Quantification of known components of the *Escherichia coli* TonB energy transduction system: TonB, ExbB, ExbD and FepA. *Molecular Microbiology*, 44, 271–281.
- Himpsl, S. D., Pearson, M. M., Arewång, C. J., Nusca, T. D., Sherman, D. H., & Mobley, H. L. T. (2010). Proteobactin and a yersiniabactin-related siderophore mediate iron acquisition in *Proteus mirabilis*. *Molecular Microbiology*, 78(1), 138–57.
- Hoffman, L. R., D'Argenio, D. A., MacCoss, M. J., Zhang, Z., Jones, R. A., & Miller, S. I. (2005). Aminoglycoside antibiotics induce bacterial biofilm formation. *Nature*, 436(7054), 1171–5.
- Hung, D. T., Zhu, J., Sturtevant, D., & Mekalanos, J. J. (2006). Bile acids stimulate biofilm formation in *Vibrio cholerae*. *Molecular Microbiology*, 59(1), 193–201.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Ramasubbu, N., & Fine, D. H. (2003). Detachment of *Actinobacillus actinomycetemcomitans* biofilm cells by an endogenous beta-hexosaminidase activity. *Journal of Bacteriology*, 185(16), 4693–8.
- Kaplan, J. B., Ragunath, C., Velliyagounder, K., Fine, D. H., & Ramasubbu, N. (2004). Enzymatic detachment of *Staphylococcus epidermidis* biofilms. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 48(7), 2633–6.
- Karatan, E., & Watnick, P. (2009). Signals, regulatory networks, and materials that build and break bacterial biofilms. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 73(2), 310–347.
- Klausen, M., Heydorn, A., Ragas, P., Lambertsen, L., Aaes-Jørgensen, A., Molin, S., & Tolker-Nielsen, T. (2003). Biofilm formation by *Pseudomonas aeruginosa* wild type, flagella and type IV pili mutants. *Molecular Microbiology*, 48(6), 1511–1524.
- Kvist, M., Hancock, V., & Klemm, P. (2008). Inactivation of efflux pumps abolishes bacterial biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*, 74(23), 7376–82.
- Lappin-Scott, H., Burton, S., & Stoodley, P. (2014). Revealing a world of biofilms - the pioneering research of Bill Costerton. *Nature Reviews. Microbiology*, 12(11), 781–7.
- Martínez-García, E., Calles, B., Arévalo-rodríguez, M., & Lorenzo, V. De. (2011). pBAM1 : an all-synthetic genetic tool for analysis and construction of complex bacterial phenotypes. *BMC Microbiology*, 1–13.
- Mathee, K., Ciofu, O., Sternberg, C., Lindum, P. W., Campbell, J. I., Jensen, P., ... Kharazmi, A. (1999). Mucoïd conversion of *Pseudomonas aeruginosa* by hydrogen peroxide: a mechanism for virulence activation in the cystic fibrosis lung. *Microbiology (Reading, England)*, 145 (Pt 6, 1349–57.

- Matsumura, K., Furukawa, S., Ogihara, H., & Morinaga, Y. (2011). Roles of multidrug efflux pumps on the biofilm formation of *Escherichia coli* K-12. *Biocontrol Science*.
- Maukonen, J., Mättö, J., Wirtanen, G., Raaska, L., Mattila-Sandholm, T., & Saarela, M. (2003). Methodologies for the characterization of microbes in industrial environments: a review. *Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 30(6), 327–56.
- Mey, A. R., Craig, S. A., & Payne, S. M. (2005). Characterization of *Vibrio cholerae* RyhB: the RyhB regulon and role of ryhB in biofilm formation. *Infection and Immunity*, 73(9), 5706–19.
- Mobley, H. L., & Hausinger, R. P. (1989). Microbial ureases: significance, regulation, and molecular characterization. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 53(1), 85–108.
- Mobley, H. L. T. (1996). Virulence of *Proteus mirabilis*. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. H.L.T. Mobley, Warren JW. Washington DC, ASM Press, 245–269.
- Mobley, H. L. T., & Belas, R. (1995). Swarming and pathogenicity of *Proteus mirabilis* in the urinary tract. *Trends in Microbiology*, 3(7), 280–284.
- Moeck, G. S., & Coulton, J. W. (1998). TonB-dependent iron acquisition: Mechanisms of siderophore-mediated active transport. *Molecular Microbiology*, 28, 675–681.
- Moelling, C., Oberschlacke, R., Ward, P., Karijovich, J., Borisova, K., Bjelos, N., & Bergeron, L. (2007). Metal-dependent repression of siderophore and biofilm formation in *Actinomyces naeslundii*. *FEMS Microbiology Letters*, 275(2), 214–20.
- Monds, R. D., Newell, P. D., Gross, R. H., & O'Toole, G. A. (2007). Phosphate-dependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Molecular Microbiology*, 63(3), 656–79.
- Monds, R. D., Silby, M. W., & Mahanty, H. K. (2001). Expression of the Pho regulon negatively regulates biofilm formation by *Pseudomonas aureofaciens* PA147-2. *Molecular Microbiology*, 42(2), 415–26.
- Muñoz-Elías, E. J., Marcano, J., & Camilli, A. (2008). Isolation of *Streptococcus pneumoniae* biofilm mutants and their characterization during nasopharyngeal colonization. *Infection and Immunity*, 76(11), 5049–5061.
- Nallapareddy, S. R., Singh, K. V., Sillanpää, J., Garsin, D. A., Höök, M., Erlandsen, S. L., & Murray, B. E. (2006). Endocarditis and biofilm-associated pili of *Enterococcus faecalis*. *The Journal of Clinical Investigation*, 116(10).
- Nielubowicz, G. R., & Mobley, H. L. T. (2010). Host-pathogen interactions in urinary tract infection. *Nature Reviews in Urology*, 7(8), 430–41.
- Nilsson, R. E., Ross, T., & Bowman, J. P. (2011). Variability in biofilm production by *Listeria monocytogenes* correlated to strain origin and growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 150(1), 14–24.

- Nuccio, S.-P., & Bäumler, A. J. (2007). Evolution of the chaperone/usher assembly pathway: fimbrial classification goes Greek. *Microbiology and Molecular Biology Reviews: MMBR*, 71(4), 551–75.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998a). Flagellar and twitching motility are necessary for *Pseudomonas aeruginosa* biofilm development. *Molecular Microbiology*, 30(2), 295–304.
- O'Toole, G. A., & Kolter, R. (1998b). Initiation of biofilm formation in *Pseudomonas fluorescens* WCS365 proceeds via multiple, convergent signalling pathways: a genetic analysis. *Molecular Microbiology*, 28(3), 449–461.
- O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. (2000). Biofilm formation as microbial development. *Annual Review of Microbiology*, 54, 49–79.
- Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., & Saier, M. H. (1998). Microbial genome analyses: global comparisons of transport capabilities based on phylogenies, bioenergetics and substrate specificities. *Journal of Molecular Biology*, 277(3), 573–92.
- Pearson, M. M., Sebaihia, M., Churcher, C., Quail, M. A., Seshasayee, A. S., Luscombe, N. M., ... Mobley, H. L. T. (2008). Complete genome sequence of uropathogenic *Proteus mirabilis*, a master of both adherence and motility. *Journal of Bacteriology*, 190(11), 4027–37.
- Pratt, L. A., & Kolter, R. (1998). Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular Microbiology*, 30(2), 285–93.
- Reid, G., Denstedt, J. D., Kang, Y. S., Lam, D., & Nause, C. (1992). Microbial adhesion and biofilm formation on ureteral stents in vitro and in vivo. *The Journal of Urology*, 148(5), 1592–4.
- Roberts, J. A., Fussell, E. N., & Kaack, M. B. (1990). Bacterial adherence to urethral catheters. *The Journal of Urology*, 144(2 Pt 1), 264–9.
- Rokni-Zadeh, H., Li, W., Sanchez-Rodriguez, A., Sinnaeve, D., Rozenski, J., Martins, J. C., & De Mot, R. (2012). Genetic and functional characterization of cyclic lipopeptide white-line-inducing principle (WLIP) production by rice rhizosphere isolate *Pseudomonas putida* RW10S2. *Applied and Environmental Microbiology*, 78(14), 4826–34.
- Römling, U., Kjelleberg, S., Normark, S., Nyman, L., Uhlin, B. E., & Akerlund, B. (2014). Microbial biofilm formation: a need to act. *Journal of Internal Medicine*, 276(2), 98–110.
- Römling, U., Sierralta, W. D., Eriksson, K., & Normark, S. (1998). Multicellular and aggregative behaviour of *Salmonella typhimurium* strains is controlled by mutations in the agfD promoter. *Molecular Microbiology*, 28(2), 249–64.
- Rózalski, A., Sidorczyk, Z., & Kotełko, K. (1997). Potential virulence factors of *Proteus bacilli*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews : MMBR*, 61(1), 65–89.
- Sabbuba, N. A., Mahenthiralingam, E., & Stickler, D. J. (2003). Molecular Epidemiology of *Proteus mirabilis* Infections of the Catheterized Urinary Tract. *Journal of Clinical Microbiology*, 41(11), 4961–4965.

- Saier, Milton H., J., Paulsen, I. T., Sliwinski, M. K., Pao, S. S., Skurray, R. A., & Nikaido, H. (1998). Evolutionary origins of multidrug and drug-specific efflux pumps in bacteria. *The Journal of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 12(3), 265–274.
- Sauer, K., Camper, A. K., Ehrlich, G. D., Costerton, J. W., & Davies, D. G. (2002). *Pseudomonas aeruginosa* Displays Multiple Phenotypes during Development as a Biofilm. *Journal of Bacteriology*, 184(4), 1140–1154.
- Schembri, M. A., & Klemm, P. (2001). Biofilm formation in a hydrodynamic environment by novel fimh variants and ramifications for virulence. *Infection and Immunity*, 69(3), 1322–8.
- Schlapp, G. (2009). *Biofilms de Proteus mirabilis uropatogénico: etapas de formación y papel de flagelos y fimbrias*. Tesis de Maestría. PEDECIBA, Uruguay.
- Senior, B. W. (1979). The special affinity of particular types of *Proteus mirabilis* for the urinary tract. *Journal of Medical Microbiology*, 12(1), 1–8.
- Sillanpää, J., Chang, C., Singh, K. V, Montealegre, M. C., Nallapareddy, S. R., Harvey, B. R., ... Murray, B. E. (2013). Contribution of individual Ebp Pilus subunits of *Enterococcus faecalis* OG1RF to pilus biogenesis, biofilm formation and urinary tract infection. *PloS One*, 8(7), e68813.
- Sinde, E., & Carballo, J. (2000). Attachment of *Salmonella spp.* and *Listeria monocytogenes* to stainless steel, rubber and polytetrafluorethylene: the influence of free energy and the effect of commercial sanitizers. *Food Microbiology*, 17(4), 439–447.
- Singh, P. K., Parsek, M. R., Greenberg, E. P., & Welsh, M. J. (2002). A component of innate immunity prevents bacterial biofilm development. *Nature*, 417(6888), 552–5.
- Soto, S. M. (2013). Role of efflux pumps in the antibiotic resistance of bacteria embedded in a biofilm. *Virulence*, 4(3), 223–9.
- Stickler, D. J. (2014). Clinical complications of urinary catheters caused by crystalline biofilms: something needs to be done. *Journal of Internal Medicine*, 276(2), 120–9.
- Stickler, D. J., King, J. B., Winters, C., & Morris, S. L. (1993). Blockage of urethral catheters by bacterial biofilms. *Journal of Infection*, 27(2), 133–135.
- Stoodley, P., Sauer, K., Davies, D. G., & Costerton, J. W. (2002). Biofilms as complex differentiated communities. *Annual Review of Microbiology*, 56, 187–209.
- Tabak, M., Scher, K., Hartog, E., Romling, U., Matthews, K. R., Chikindas, M. L., & Yaron, S. (2007). Effect of triclosan on *Salmonella typhimurium* at different growth stages and in biofilms. *FEMS Microbiology Letters*, 267(2), 200–6.
- Tenke, P., Kovacs, B., Jäckel, M., & Nagy, E. (2006). The role of biofilm infection in urology. *World Journal of Urology*, 24(1), 13–20.
- Tolker-Nielsen, T., & Molin, S. (2000). Spatial Organization of Microbial Biofilm Communities. *Microbial Ecology*, 40(2), 75–84.
- Torres, A. G., Redford, P., Welch, R. A., & Payne, S. M. (2001). TonB-dependent systems of uropathogenic *Escherichia coli*: Aerobactin and heme transport and

- TonB are required for virulence in the mouse. *Infection and Immunity*, 69(10), 6179–6185.
- Trautner, B. W., & Darouiche, R. O. (2004). Role of biofilm in catheter-associated urinary tract infection. *American Journal of Infection Control*, 32(3), 177–83.
- Vallet, I., Filloux, A., Olson, J. W., & Lory, S. (2001). The chaperone-usher pathways of *Pseudomonas aeruginosa*: Identification of fimbrial gene clusters (cup) and their involvement in biofilm formation. *PNAS*, 98(12).
- Velayudhan, J., Castor, M., Richardson, A., Main-Hester, K. L., & Fang, F. C. (2007). The role of ferritins in the physiology of *Salmonella enterica* sv. *Typhimurium*: a unique role for ferritin B in iron-sulphur cluster repair and virulence. *Molecular Microbiology*, 63(5), 1495–507.
- Villegas, N. A., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverría, A., ... Paraje, M. (2013). Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *The Scientific World Journal*, 2013(2013), 607258.
- Wai, S. N., Nakayama, K., Umene, K., Moriya, T., & Amako, K. (1996). Construction of a ferritin-deficient mutant of *Campylobacter jejuni*: contribution of ferritin to iron storage and protection against oxidative stress. *Molecular Microbiology*, 20(6), 1127–1134.
- Waite, R. D., Papakonstantinou, A., Littler, E., & Curtis, M. a. (2005). Transcriptome Analysis of *Pseudomonas aeruginosa* Growth: Comparison of Gene Expression in Planktonic Cultures and Developing and Mature Biofilms. *Society*, 187(18), 6571–6576.
- Walsh, C. T., Liu, J., Rusnak, F., & Sakaitani, M. (1990). Molecular studies on enzymes in chorismate metabolism and the enterobactin biosynthetic pathway. *Chemical Reviews*, 90(7), 1105–1129.
- Warren, J. W. (1996). Clinical presentation and epidemiology of urinary tract infections. *Urinary Tract Infections: Molecular Pathogenesis and Clinical Management*. H.L.T. Mobley, Warren JW. Washington DC, ASM Press, 3–28.
- Warren, J. W. (2001). Catheter-associated urinary tract infections. *International Journal of Antimicrobial Agents*, 17(4), 299–303.
- Warren, J. W., Tenney, J. H., Hoopes, J. M., Muncie, H. L., & Anthony, W. C. (1982). A Prospective Microbiologic Study of Bacteriuria in Patients with Chronic Indwelling Urethral Catheters. *Journal of Infectious Diseases*, 146(6), 719–723.
- Wu, C., Cichewicz, R., Li, Y., Liu, J., Roe, B., Ferretti, J., ... Qi, F. (2010). Genomic island TnSmu2 of *Streptococcus mutans* harbors a nonribosomal peptide synthetase-polyketide synthase gene cluster responsible for the biosynthesis of pigments involved in oxygen and H₂O₂ tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, 76(17), 5815–26.
- Yildiz, F. H., Liu, X. S., Heydorn, A., & Schoolnik, G. K. (2004). Molecular analysis of rugosity in a *Vibrio cholerae* O1 El Tor phase variant. *Molecular Microbiology*, 53(2), 497–515.
- Zgurskaya, H. I., & Nikaido, H. (2000). MicroReview Multidrug resistance mechanisms: drug efflux across two membranes. *Molecular Microbiology*, 37.

- Zhang, L., & Mah, T.-F. (2008). Involvement of a novel efflux system in biofilm-specific resistance to antibiotics. *Journal of Bacteriology*, 190(13), 4447–52.
- 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 and Medical Microbiology*, 29(2), 137–43.