



UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSGRADO  
PROGRAMAS DE GRADOS ACADÉMICOS

***“Caracterización de la formación de biopelículas de una cepa de E. coli uropatógena (UPEC ST 12 OD65) fenotípicamente inmóvil”***

**NICOLE CANALES HUERTA**

**TESIS PARA OPTAR AL GRADO DE MAGÍSTER EN MICROBIOLOGÍA**

Prof. María Teresa Ulloa

Directora de Tesis

Prof. Dr. Steffen Härtel G.

Firma

Director de Tesis

**UNIVERSIDAD DE CHILE  
FACULTAD DE MEDICINA  
ESCUELA DE POSTGRADO**

**INFORME DE APROBACIÓN TESIS/AFE DE MAGÍSTER**

**Se informa a la Comisión de Grados Académicos de la Facultad de Medicina, que la Tesis de Magíster presentada por la candidata**

**NICOLE CATALINA CANALES HUERTA**

**ha sido aprobada por la Comisión Informante de Tesis como requisito para optar al Grado de Magíster en Microbiología en el Examen de Defensa de Tesis rendido el día 05 de diciembre de 2022.**

**Prof. María Teresa Ulloa F.**

**Director de Tesis  
Programa de Microbiología y Micología,  
ICBM  
Facultad de Medicina, Universidad de  
Chile**

**Prof. Dr. Steffen Härtel G.**

**Director de Tesis  
Programa de Biología Integrativa,  
ICBM  
Facultad de Medicina, Universidad de  
Chile**

**COMISIÓN INFORMANTE DE TESIS**

**Prof. Dr. Nicolás Guiliani.**

**Prof. Dra. Gloria Levicán**

**Prof. Dra. Claudia Lefimil**

**Prof. Dr. Víctor García**

**Presidente Comisión**

*A Maritza, Sonia y Lidia  
que me enseñaron,  
enseñan  
y enseñarán siempre  
el amor incondicional*

## Agradecimientos

En primer lugar, quiero agradecer a mis tutores, Steffen Härtel y María Teresa Ulloa, por confiar en mí trabajo y entregarme las herramientas necesarias para poder ejecutar esta tesis, además de guiarme y apoyarme en un periodo que de una u otra forma, fue complejo para todos.

A Paola Scavone, María José González y a Nicolás Navarro, por enseñarme “un montón” sobre biofilms y abrirme las puertas de su laboratorio, sus casas y sus vidas, que junto al “West coast” con Dani y Joaco, hicieron que Uruguay se sienta como mi otra casa.

A los integrantes de SCIAN-Lab, especialmente a Karina Palma y Jorge Jara por su ayuda en la elaboración del escrito, figuras y procesamiento de imágenes de esta tesis. También a Martín Cádiz, que llegó en el momento preciso para procesar las imágenes de cultivo dinámico, por el compromiso e interés mostrado en mi trabajo. Por último, a Malcolm por ser el mejor soporte y por la paciencia cuando no entendía cómo hacer modificaciones en el sistema informático para reabrir el servidor.

A Fabrizio Cuevas, amigo mío gracias por "apañar" y apoyar con los cafés, té chai con leche de avena del nocciola, por todos los pancitos con huevos de gallina feliz, las cervezas en el Santa tu segunda casa, por acompañarme en los experimentos de 24 horas y teñir, cortar los tubos mientras dormía un rato, las conversaciones y por estar sobre todo en los momentos frustrantes y complejos, además de los felices por supuesto.

A Karla Chandía, iniciamos este camino juntas, postulamos y ganamos ese proyecto que, a mí, personalmente, expandió tanto profesional, académica e individualmente.

A Jorge Toledo, por todas las conversaciones científicas y de la vida, por la creatividad, la imaginación y las ideas, además de abrirme las puertas de REDECA y dejarme hacer estos lindos experimentos dinámicos de 37 horas continuas.

A mis “amigues”, familia que uno escoge: Valentina comadre mía, a Javi Javi Javiera “chiquita”, a Fabi, a Kathy, a Pablo, a los Seba’s (“grande”, Triviño y Sepulveda) y a Jorge, por aguantar mis desapariciones, por confiar siempre en mí y en mis capacidades, más que yo misma por lo general, por subirme el ánimo, escuchar o leer las frustraciones y por alegrarse también de mis logros y de ver mi crecimiento, académico y personal.

A mi compañero, ¡Álvaro... ya son dos tesis en que caminamos juntos, pero ah! esta sí que te la viviste a mi lado, gracias eternas por tanta paciencia y el aguante, sobre todo. Por todos los “animo, vamos que queda poco, ya se termina”. Eres grande también, ya va siendo hora de que lo veas <3.

Por último, a mi madre Maritza y a mi abuela Sonia, no logro expresar con palabra hablada ni escrita lo agradecida y lo importantes que son para mí. A ambas gracias eternas por siempre querer lo mejor para mí, dejarme volar y por sobre todo soñar.

Esta tesis se financió con fondos de los proyectos FONDECYT 1181823 (2018 – 2021) y 1211988 (2021-2025), además de “Capacitaciones en Biofilm: una respuesta para superar las bacterias multirresistentes”, proyecto financiado por Agcid Chile, del Ministerio de Relaciones Exteriores de Chile, en marco de una Cooperación Sur-Sur Chile-Uruguay (2019-2022).

## Índice de Materias

Agradecimientos.....	4
Índice de Materias.....	6
Índice de Figuras.....	8
Índice de Tablas.....	9
Lista de abreviaturas.....	9
Resumen.....	11
Abstract.....	12
<b>1. Introducción.....</b>	<b>13</b>
1.1 Biopelículas bacterianas.....	13
1.2 Etapas de formación de biopelículas bacterianas.....	14
1.3 Adherencia bacteriana a las superficies abióticas: factores que intervienen en el proceso.....	17
1.4 Nutrición e Hidrodinámica: Factores que influyen en la formación de biopelículas.....	20
1.5 Motilidad flagelar y formación de biopelículas bacterianas.....	22
1.6 Biopelículas bacterianas en entornos médicos: Infección del tracto urinario asociada a la instalación de catéter urinario permanente.....	23
1.7 <i>Escherichia coli</i> uropatógena (UPEC).....	25
1.8 Motilidad flagelar y formación de biopelículas en UPEC.....	28
1.9 Métodos de cultivo y técnicas de microscopía para la visualización de las biopelículas bacterianas.....	29
<b>2. Presentación del problema.....</b>	<b>31</b>
<b>Hipótesis.....</b>	<b>33</b>
<b>Objetivo general.....</b>	<b>33</b>
<b>Objetivos específicos.....</b>	<b>33</b>
<b>3. Materiales y métodos.....</b>	<b>34</b>
3.1 Cepas.....	34
3.2 Reactivos.....	34
3.3 Materiales.....	35
3.4 Equipos.....	35
3.5 Software.....	36

3.6 Caracterización fenotípica de la cepa de <i>E. coli</i> UPEC ST12 OD65 y detección de la formación de biopelículas	36
3. 6. 1 Estudio del fenotipo de motilidad.....	37
3.7 Detección de biopelícula de UPEC ST12 OD65.....	38
3.8 Detección, cinética de formación y caracterización morfológica de biopelículas en cultivo estático de la cepa UPEC ST12 OD65 y la cepa control UPEC CFT073, en caldo LB.....	39
3.9 Determinación de la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa UPEC ST12 y la cepa control UPEC CFT073 en cultivo dinámico, con caldo LB.....	41
3.10 Comparación de la formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cuanto a su cinética y características morfológicas, en condiciones de cultivo estático vs dinámico.....	43
<b>4. Resultados</b>	<b>43</b>
4.1 Caracterización fenotípica de la cepa de <i>E. coli</i> UPEC ST12 OD65 y detección de la formación de biopelículas.....	43
4.2 Detección, cinética de formación y caracterización morfológica de biopelículas en cultivo estático de la cepa UPEC ST 12 OD65 y la cepa control UPEC CFT073.....	44
4.2.1 Detección, cinética de formación y caracterización morfológica de biopelículas en cultivo estático de la cepa control UPEC CFT073.....	45
4.2.2 Detección, cinética de formación y caracterización morfológica de biopelículas en cultivo estático de la cepa UPEC ST 12 OD65 en caldo LB.....	48
4.3 Determinación de la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa UPEC ST12 OD65 y la cepa control UPEC CFT073 en cultivo dinámico.....	51
4.3.1 Determinación de la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa control UPEC CFT073 en cultivo dinámico.....	52
4.3.2 Determinación de la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa UPEC ST12 OD65 en cultivo dinámico.....	54
4.4 Comparación de la formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cuanto a su cinética y características morfológicas, en condiciones de cultivo estático vs dinámico.....	57
<b>5. Discusión</b> .....	<b>59</b>
<b>6. Conclusiones</b> .....	<b>74</b>
<b>7. Bibliografía</b> .....	<b>75</b>

## Índice de Figuras

Figura 1- Esquema de las etapas de formación de biopelículas.....	14
Figura 2- Esquema de la estructura flagelar.....	19
Figura 3- Esquema representativo del ensayo de Cristal Violeta.....	38
Figura 4- Esquema representativo del desarrollo experimental del estudio de biopelículas de <i>E. coli</i> mediante cultivo estático.....	40
Figura 5- Parámetros morfológicos definidos para la caracterización de biopelículas de UPEC formadas en cultivo estático.....	40
Figura 6- Esquema representativo del desarrollo experimental del estudio de biopelículas de <i>E. coli</i> mediante cultivo dinámico.....	42
Figura 7- Procesamiento de imágenes obtenidas en LSM de biopelículas de UPEC en modelo dinámico.....	42
Figura 8.- A. Cultivo de cepas de <i>E. coli</i> en agar en medio movilidad - indol- ornitina (MIO), B. Cultivo de cepas de <i>E. coli</i> en agar blando, C. Prueba de movilidad a través de catéter en agar TSA.....	44
Figura 9 - Gráfico de valores promedio y error estándar para Superficie colonizada ( $\mu\text{m}^2$ ) y Volumen de la biopelícula ( $\mu\text{m}^3$ ) de UPEC CFT073.....	46
Figura 10- Panel representativo de la cinética de formación de biopelículas de UPEC CFT073, en cultivo estático.....	47, 48
Figura 11- Gráfico de valores promedio y error estándar para Superficie colonizada ( $\mu\text{m}^2$ ) y Volumen de la biopelícula ( $\mu\text{m}^3$ ) de UPEC ST12 OD65.....	49
Figura 12- Panel representativo de la cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65, en cultivo estático.....	50, 51
Figura 13- Cinética de formación de biopelículas de UPEC CFT073 en cultivo dinámico.....	53
Figura 14- Gráfico de Volumen total ( $\mu\text{m}^3$ ) de la biopelícula formada por UPEC CFT073 en el tubo FEP, en cultivo dinámico.....	54
Figura 15- Cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 en cultivo dinámico.....	56



Figura 16- Gráfico de Volumen total ( $\mu\text{m}^3$ ) de la biopelícula formada por UPEC ST12 OD65 en el tubo FEP, en cultivo dinámico.....	57
Figura 17- Cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cultivo estático y dinámico.....	58

## Índice de Tablas

Tabla 1- Criterios de clasificación para la evaluación de la formación de biopelículas en ensayo CV.....	38
Tabla 2- Media de las DO obtenidas en el ensayo de Cristal Violeta.....	44

## Lista de abreviaturas

- $\mu\text{m}$ : micrómetro.
- 2D: Bidimensional.
- SDCs: Sistema de señalización de dos componentes.
- 3D: Tridimensional.
- ADN: Ácido Desoxirribonucleico.
- Afa: Adhesinas afimbriales.
- Agn 43: Antígeno 43.
- AHL: N-acil Homoserina Lactona.
- AI: Autoinductor.
- AI-2: Autoinductor 2.
- AN: Apertura Numérica.
- AMPc: Monofosfato de Adenosina cíclico.
- c-di-GMP: bis-(3'-5')-cíclico.
- CAUTI: Infección Urinaria Asociada a Catéter Urinario.
- CBI: Comunidades Bacterianas Intracelulares.
- CLSM: Microscopio Confocal de Escaneo Láser, del inglés Confocal Laser Scanning Microscopy
- cm: centímetro.
- CU: Catéter Urinario.
- CUP: Catéter Urinario Permanente.

- CV: Cristal Violeta.
- EPS: Sustancias Poliméricas Extracelulares; del inglés Extracellular polymeric substances.
- ExPEC: *Escherichia coli* Patógenas Extraintestinales.
- FEP: Etileno Propileno Fluorado.
- FC: del inglés “Flow Cells”.
- IAAS: Infecciones Asociadas a la Atención en Salud.
- ITU: Infección del Tracto Urinario.
- IP: Ioduro de Propidio.
- LB: Luria Bertani (“caldo” o medio de cultivo).
- LSFM: Microscopía de Fluorescencia Light Sheet, del inglés Light Sheet Fluorescence Microscopy.
- NMEC: *Escherichia coli* Meningitis Neonatal.
- NIH: Instituto Nacional de la Salud de Estados Unidos.
- nm: nanómetro.
- OMP: Proteínas de Membrana Externa.
- PBS: del inglés Phosphate Buffered Saline.
- PFA: Paraformaldehído.
- PVC: Policloruro de Vinilo.
- RDI(s): Región(es) de interés (en referencia a región(es) de píxeles en una imagen digital).
- RM: Región Metropolitana.
- RT: Temperatura ambiente, del inglés Room Temperature.
- SAM: S-adenosilmetionina.
- SEPEC: *Escherichia coli* asociada a sepsis.
- SEM: del inglés Standard Error of the Mean.
- TSA: Agar tripton de soya; del inglés Tryptic soy agar.
- T3SS: Sistema de secreción flagelar tipo III.
- UPEC: *Escherichia coli* uropatógena.
- UP1A: Uroplaquina 1A.
- UV: Ultravioleta.

## Resumen

**Introducción.** Las biopelículas son comunidades bacterianas asociadas comúnmente a infecciones en dispositivos médicos como el Catéter Urinario Permanente, frecuentemente implicado en Infecciones del Tracto Urinario (ITU). *Escherichia coli* uropatógena (UPEC) es el principal agente etiológico de estas infecciones. UPEC se caracteriza por su motilidad mediada por la presencia de flagelos, que son importantes para las primeras etapas de la formación de biopelículas. Sin embargo, se ha comprobado experimentalmente la formación de dichas comunidades por parte de cepas inmóviles. En este contexto, un estudio de vigilancia epidemiológica de ITU evidenció cepas pertenecientes al clon ST12 de UPEC aisladas de pacientes con ITU que se comportan fenotípicamente inmóviles. Para comprender cómo se originan este tipo de infecciones, es necesario realizar estudios funcionales de formación de biopelículas en dispositivos médicos como catéteres, utilizando equipos que permitan visualizar la arquitectura y dinámica de manera poco invasiva. **Hipótesis:** La cepa UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil aislada de ITU es capaz de formar biopelículas, tanto en condiciones de cultivo estático como dinámico. **Objetivo:** Detectar y caracterizar la formación de biopelículas en la cepa fenotípicamente inmóvil UPEC ST12 OD65, respecto de una cepa control de UPEC móvil, en condiciones de cultivo estático y dinámico. **Materiales y métodos:** Se evaluó la capacidad de la cepa UPEC ST12 OD65 de formar biopelículas y su dinámica de formación en comparación con una cepa control UPEC CFT073, en condiciones de cultivo estático y dinámico. **Resultados:** La cepa de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, es capaz de formar biopelícula en cultivo estático y dinámico, sin embargo; evidencia un retraso en la fase de adhesión reversible, respecto de la cepa control. La arquitectura de la biopelícula formada por UPEC ST12 OD65 presenta características distintas a la cepa control, siendo más gruesa, densa, irregular e inestable, tanto en el cultivo estático, como en el dinámico. **Conclusiones:** La cepa de UPEC ST 12 OD65, fenotípicamente inmóvil es capaz de formar biopelículas en cultivo estático y dinámico, caracterizadas por la formación de agrupaciones tridimensionales densas, irregulares e inestables.

**Palabras clave:** *Escherichia coli*, biopelículas, flagelo, Microscopía Light Sheet.

## Abstract

**Introduction.** Biofilms are bacterial communities commonly associated with infections in medical devices such as the indwelling urinary catheter, frequently implicated in urinary tract infections (UTI). Uropathogenic *Escherichia coli* (UPEC) is the main etiological agent of these infections. UPEC is characterized by its motility mediated by the presence of flagella, which are important for the early stages of biofilm formation. However, the formation of such communities by immotile strains has been experimentally proven. In this context, a UTI epidemiological surveillance study evidenced strains belonging to UPEC clone ST12 isolated from UTI patients that behave phenotypically immotile. To understand how these types of infections originate, it is necessary to perform functional studies of biofilm formation in medical devices such as catheters, using equipment that allows visualization of the architecture and dynamics in a minimally invasive manner. **Hypothesis:** The phenotypically immobile UPEC ST12 OD65 strain isolated from UTI can form biofilms under both static and dynamic culture conditions. **Objective:** To detect and characterize biofilm formation in the phenotypically immotile UPEC ST12 OD65 strain, with respect to a mobile UPEC control strain, under static and dynamic culture conditions. **Materials and methods:** The ability of UPEC ST12 OD65 strain to form biofilms and its biofilm formation dynamics were evaluated in comparison to a control UPEC CFT073 strain, under static and dynamic culture conditions. **Results:** The phenotypically immobile UPEC ST12 OD65 strain can form biofilm in static and dynamic culture, however, it shows a delay in the reversible adhesion phase, compared to the control strain. The architecture of the biofilm formed by UPEC ST12 OD65 presents different characteristics from the control strain, being thicker, denser, irregular, and unstable, both in static and dynamic culture. **Conclusions:** The phenotypically immobile UPEC ST 12 OD65 strain can form biofilms in static and dynamic culture, characterized by the formation of dense, irregular, and unstable three-dimensional clusters.

**Keywords:** *Escherichia coli*, biofilms, flagellum, Light Sheet Microscopy.

## **1. Introducción**

### **1.1 Biopelículas bacterianas**

La formación de biopelículas es el tipo de crecimiento predominante de los microorganismos en entornos industriales, naturales y médicos (1). J.W. Costerton las define como una “comunidad estructurada formada por microorganismos adheridos irreversiblemente a un sustrato o interfase, embebidos en una matriz polimérica de producción propia, que exhiben un fenotipo particular con relación a tasas de crecimiento y expresión génica” (2).

Estas comunidades tridimensionales, compuestas por una o más especies de microorganismos, funcionan como un organismo vivo y organizado según sus características fisiológicas y diferencias en la expresión génica (3-5). Las biopelículas están recubiertas por una Matriz Extracelular Polimérica (EPS) de aspecto gelatinoso (6,7), compuesta por un conglomerado de ácidos nucleicos, polisacáridos, proteínas y lípidos. La función de la EPS es proteger a la comunidad del ambiente, previniendo su desecación, oxidación, acción de los rayos UV, entre otros (8,9). Si bien, algunos atributos de las biopelículas son generales, su estructura es dinámica y posee características particulares según las condiciones ambientales (10).

La prevalencia de las biopelículas es mayor en entornos hospitalarios o nosocomiales, siendo responsables del 80% de las infecciones microbianas. Estas biopelículas, además de desarrollarse principalmente en la superficie de catéteres, implantes, marcapasos y prótesis, pueden encontrarse asociadas a superficies corporales como la piel y mucosas, donde causan enfermedades como infección del tracto urinario, heridas crónicas, etc (11,12). Su formación se asocia a infecciones graves asociadas a la atención en salud (IAAS), especialmente en pacientes con inmunosupresión y comorbilidades, pues la matriz de EPS crea un entorno protector que dificulta los tratamientos (interfiriendo en el acceso del antimicrobiano al sitio blanco), lo que propicia el desarrollo de resistencia a estos y otros antisépticos (12,13). Entre los microorganismos que frecuentemente causan infecciones asociadas a la atención en salud (IAAS), encontramos especies bacterianas

cocáceas Gram positivas como: *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus agalactiae* y también, especies de bacilos Gram negativos como: *Escherichia coli*, *Proteus mirabilis* y *Pseudomonas aeruginosa* (12).

Por otra parte, los tratamientos se realizan en base a los estudios de susceptibilidad antimicrobiana del microorganismo de fenotipo planctónico, la cual puede diferir en las bacterias sésiles formadores de biopelículas (7, 12, 14).

## **1.2 Etapas de formación de biopelículas bacterianas**

Las biopelículas pueden generarse sobre superficies bióticas (piel, células uroteliales, etc.) o abióticas (vidrio, plástico, implantes médicos, etc.). En las etapas iniciales de formación sobre superficies bióticas, la adherencia bacteriana se origina a través de la interacción de sus proteínas de superficie con las proteínas o carbohidratos extracelulares (15), mientras que en las superficies abióticas ocurren una serie de interacciones electrostáticas entre el sustrato y las adhesinas bacterianas. Entre estas últimas encontramos fuerzas hidrodinámicas que derivan de la viscosidad del medio, disponibilidad de nutrientes, etc.; además de las propiedades de la superficie como su carga, hidrofobicidad y rugosidad (15, 16).

El desarrollo de las biopelículas corresponde a un ciclo biológico definido que incluye etapas iniciales, de maduración, mantenimiento y luego disolución, en respuesta a señales ambientales determinadas (17). Tanto en superficies bióticas como abióticas se distinguen cinco etapas en la formación de biopelículas: *(i)* adherencia reversible, *(ii)* adherencia irreversible, *(iii)* maduración I, *(iv)* maduración II y *(v)* dispersión (Fig. 1) (17, 18).

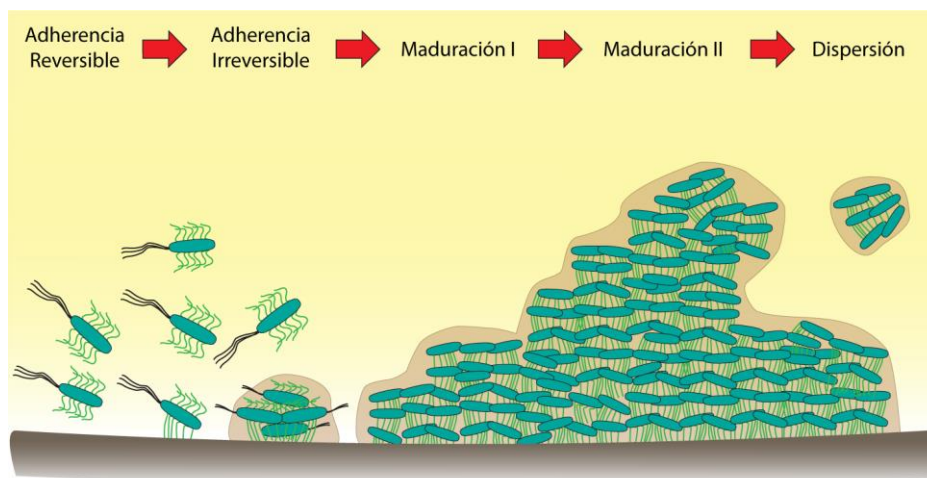


Figura 1. Esquema de las etapas de formación de biopelículas. (FONDECYT 1211988, S Härtel).

La etapa de (i) adherencia *reversible* contempla la migración de bacterias planctónicas que interactúan y se adhieren a una superficie a través de la unión a receptores específicos, interacciones fisicoquímicas y apéndices bacterianos (19). Esta etapa se inicia como respuesta al aumento del nivel intracelular de los segundos mensajeros bacterianos, AMPc y monofosfato de guanosa dimérico bis-(3'-5')-cíclico (c-di-GMP), que reprimen su motilidad, inducen la producción de adhesinas y regulan al alza la elaboración de EPS, desencadenando el cambio de fenotipo planctónico a sésil (10,20,21).

Una vez adheridas al sustrato, las bacterias experimentan una serie de cambios que permiten su adaptación a este nuevo estilo de vida. En la etapa de (ii) adherencia *irreversible*, las bacterias reprimen su motilidad mediada por flagelos y fortalecen las interacciones intercelulares a través de la acción de diferentes adhesinas fimbriales (9,13,22,23). Simultáneamente, comienzan a multiplicarse y a producir mayor cantidad de EPS, originando pequeños agregados bacterianos denominados “microcolonias”. Estas agrupaciones, conformadas por 4 a 8 bacterias, son consideradas la unidad estructural básica de las biopelículas. En fases tempranas de su formación, las microcolonias tienen forma de montículos cónicos simples (con forma de hongo o pilar) rodeados de matriz, cuyo grosor alcanza los 100  $\mu\text{m}$  (4,13,24). La conformación de estas estructuras irregulares deja espacios sin cubrir sobre la superficie colonizada, lo que da lugar a canales de agua y poros que facilitan la nutrición de la comunidad y el acceso a oxígeno, además de permitir la eliminación de productos metabólicos de desecho (10, 25-27).

Al comienzo de la etapa de **(iii) maduración I**, la biopelícula es una capa delgada orientada de forma horizontal (2D) respecto de la superficie. No obstante, cuando las bacterias aumentan su tasa de división, ésta comienza a expandirse, aumentando la tensión mecánica entre células bacterianas adyacentes, las cuales resisten el empuje debido a que están fuertemente adheridas, sin embargo, en algún punto dicha tensión supera la fuerza adhesiva, induciendo un reordenamiento vertical de las bacterias respecto del sustrato. Posteriormente, estas células se dividen y las células hijas también son proyectadas en esa dirección, facilitando la conformación de una estructura tridimensional (3D) (6,9,26,28).

En la siguiente etapa de, **(iv) maduración II**, la biopelícula alcanza su mayor densidad bacteriana, por lo que su organización y diferenciación dependen de la comunicación célula- célula. Para ello, utilizan un sistema de comunicación denominado “Quorum sensing” (QS), basado en la producción, detección y respuesta a diversas moléculas de señalización extracelular o Autoinductores (AI). La concentración de AI es proporcional a la biomasa de la biopelícula, por lo que cuando esta alcanza un nivel umbral, es reconocida por receptores situados en la membrana o citoplasma bacteriano, activando la expresión de genes diana que controlan a la comunidad (29-31). Este mecanismo regula la expresión de genes de virulencia, patogenicidad y resistencia a diversos antimicrobianos, además de facilitar procesos metabólicos que evitan la destrucción de la biopelícula cuando los nutrientes escasean y/o se acumulan productos de desecho (10,11,32). En las bacterias Gram negativas, los AI corresponden al N-acil homoserina lactona (AHL) y otros derivados de la S-adenosilmetionina (SAM), como el Autoinductor-2 (AI-2). En bacterias Gram positivas esta función es realizada por péptidos pequeños (10,15). En *E. coli* se han descrito y clasificado 5 sistemas principales de QS [1] señalización AI-2 inducida por LuxS, [2] señalización SdiA regulador transcripcional de LuxR para homoserina lactona, [3] vía de señalización AI-3/epinefrina/norepinefrina, [4] señalización indol mediada por la autoproducción de este y [5] señalización del factor de muerte extracelular (EDF), que desencadena la activación de los sistemas de toxina-antitoxina (35,37). Además, el QS de *E. coli* participa en la regulación de genes de virulencia relacionados con la producción de biopelículas, la movilidad, el sistema de secreción de tipo III (T3SS) y por lo tanto la síntesis de flagelo, toxicidad y la síntesis de fimbrias curli (2,35,36).



Finalmente, en respuesta a cambios nutricionales y del ambiente, la biopelícula entra en la etapa de (v) *dispersión*, liberando células planctónicas que buscan nuevas superficies a las cuales adherirse (31,32). Esta fase, considerada el inicio de un nuevo ciclo de vida, puede darse de forma activa o pasiva. La dispersión activa se da en respuesta a la detección de cambios en la concentración de nutrientes, disminución de oxígeno y acumulación de productos metabólicos de desecho, favoreciendo la migración bacteriana a través de la regulación positiva de los genes implicados en la motilidad y degradación de la matriz de EPS (4,10). La dispersión pasiva en cambio, está dada por factores físicos como el cizallamiento en condiciones de flujo y se observa fundamentalmente en 3 situaciones: (a) *erosión*, que corresponde a la eliminación constante de pequeñas secciones de la biopelícula, incrementándose a medida que aumenta su grosor y también la fuerza del flujo, (b) *desprendimiento*, cuya eliminación rápida y masiva resultaría del agotamiento de nutrientes y oxígeno al interior de la estructura y, (c) *abrasión*, generada por la colisión de partículas del fluido contra la biopelícula (4,10).

### **1.3 Adherencia bacteriana a las superficies abióticas: factores que intervienen en el proceso**

La adherencia bacteriana a los sustratos depende de interacciones no específicas entre las estructuras de la superficie bacteriana y moléculas de la superficie del sustrato. En este proceso, la movilidad bacteriana es fundamental para acercarse a la superficie, detectarla y finalmente establecer contacto. Las bacterias sensan y responden a las señales involucradas en la detección de las superficies mediante un sistema de señalización de dos componentes (SDCs), que consiste en una histidina quinasa unida a la membrana que percibe el estímulo y modula la respuesta celular, activando un regulador de respuesta a nivel citoplasmático (21). La señalización involucrada en dicha interacción implica: (i) cambios fisicoquímicos, (ii) contacto y fijación del cuerpo celular y (iii) fijación de apéndices bacterianos (8,21).

Primero, encontramos las interacciones de tipo fuerzas de Lifshitz-van der Waals, el movimiento Browniano y fuerzas electrostáticas. Las fuerzas de Van der Waals y el movimiento browniano tienen un mayor alcance y favorecen la adherencia, en cambio, las fuerzas electrostáticas pueden atraer o repeler a los microorganismos (21,26). Además, cerca de la superficie se genera un microambiente (influenciado por fuerzas iónicas, pH, distribución de nutrientes, etc), por lo que, para interactuar con superficies de carga aniónica, la bacteria debe superar la repulsión

electrostática generada por su superficie de igual carga. Para esto utiliza enlaces de hidrógeno, atracciones electrostáticas con cationes presentes bajo la envoltura celular, interacciones hidrofóbicas con sectores de la membrana externa y, por último, unión a receptores específicos. Por el contrario, la adherencia bacteriana a las superficies catiónicas se caracteriza por una rápida cinética de adherencia intrínseca y una firme adherencia irreversible (19,26).

Se ha demostrado que, además de los factores mencionados, la rugosidad influye en la capacidad bacteriana de adherirse a la superficie del sustrato. En general, las superficies no son perfectamente homogéneas y presentan una microtopografía que puede originar cambios en la forma en que las bacterias adheridas interaccionan con estas, generando microambientes heterogéneos (28). Dado que la forma y la escala de las grietas del sustrato inciden en la adherencia y el desprendimiento (26), las células bacterianas “alineadas” con la abertura de la superficie, tienen una mayor área de contacto y con ello, mayor fuerza adhesiva (37,38). Esta última corresponde a la capacidad de la biopelícula de resistir el desprendimiento bajo fuerzas externas y, depende de la fuerza con la que el microorganismo se une a la superficie y su cohesión (39,19). Recientemente se ha demostrado que, tanto la orientación como la fuerza adhesiva influyen en los patrones de crecimiento de las microcolonias, pues facilitan el reordenamiento y reorganización celular (19). Una vez adherida, la interacción bacteria-superficie se fortalece a través de la eliminación de agua y la producción de adhesinas, lo que genera un reordenamiento en la interfaz entre la envoltura bacteriana y la superficie, maximizando su unión (21).

Por otra parte, estructuras como flagelos, fimbrias y la matriz de EPS, facilitan la formación de biopelículas. En primera instancia, la motilidad flagelar permite a la bacteria superar las diferentes fuerzas de repulsión provenientes de la superficie y, posteriormente, las fimbrias y la producción de EPS, logran una adherencia estable con la superficie y también entre bacterias (26).

Los flagelos actúan como mecano sensores del entorno celular, favoreciendo la motilidad y adherencia, promoviendo la formación de biopelículas (43). Su estructura completa puede medir hasta 60 nm de ancho y 10  $\mu\text{m}$  de largo (44) y consta de 3 partes: cuerpo basal, gancho y filamento o hélice. El cuerpo basal posee un motor rotatorio reversible que ancla la estructura a la membrana, mientras que el gancho se extiende desde la parte superior del cuerpo basal, conectando el motor y

el filamento, formado por la polimerización de monómeros de flagelina, que gira en forma de hélice. La flagelina es la principal proteína estructural del flagelo y está conformada por cuatro dominios conectados, dos dominios del núcleo del filamento (D0 y D1), y dos dominios con regiones hipervariables (D2 y D3). Su ensamblaje es coordinado por el sistema de secreción flagelar tipo III (T3SS), que recluta, despliega y exporta proteínas a través de su estructura axial, para ensamblar la varilla que se extiende desde el periplasma y que, junto al anillo MS de la membrana citoplasmática y el anillo C, configuran el andamio para el ensamblaje de todos los componentes (Fig. 2) (40-42).

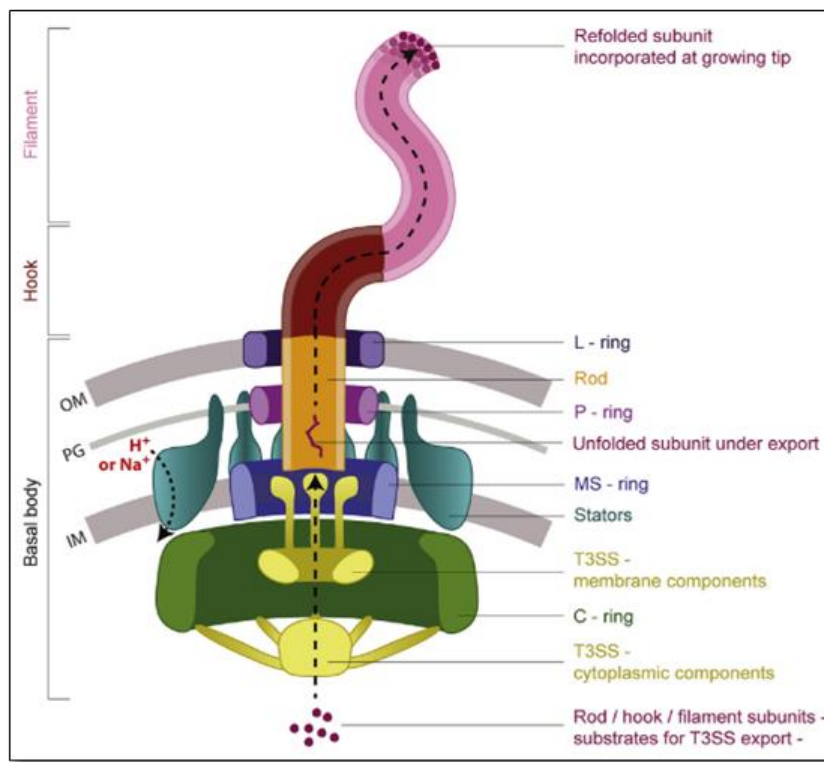


Figura 2. Esquema de la estructura flagelar (Chaban, B. et al, 2015).

La síntesis del flagelo en *E. coli* comienza con la expresión del operón *flhDC*, que codifica los factores de transcripción FlhD y FlhC. Estos factores homodímeros combinados forman el complejo FlhD<sub>4</sub>C<sub>2</sub>, que activa la transcripción de los genes necesarios para la construcción del aparato flagelar (43). Estos genes se organizan en un regulón, que divide los operones en 3 clases: los genes de clase 1 que codifican para el regulador principal del flagelo, *flhDC*, quien activa los genes de clase 2 denominados *flgM* y *fliA*, encargados de codificar la estructura y ensamblaje del

gancho. Por último, los genes de clase 3 codifican los componentes estructurales distales del flagelo, *fliC* y el operón *motA*, regulados a su vez por *fliA* (19).

Aparte de los flagelos, el control de la adherencia a las superficies y a otras células bacterianas está mediado por la síntesis de las fimbrias o Pili, las cuales son esenciales para lograr el cambio de un estilo de vida planctónico a sésil en las primeras fases de la formación de biopelículas. Las fimbrias miden unos 7 nm de diámetro y 1 µm de largo aproximadamente (44) y participan de la detección de superficies, adherencia y captura (19). Se ha descrito en *E. coli* que el anclaje de la fimbria al sustrato favorece su retracción, facilitando el acercamiento bacteriano a la superficie (26). La fimbria tipo IV, por ejemplo, participa de un proceso continuo de extensión y retracción que facilita la movilidad bacteriana a través de la superficie (21). También se ha demostrado que c-di-GMP regula la producción de fimbrias en *E. coli*, junto al SDCs EnvZ/OmpR y BasSR, que activa la síntesis de fimbrias, mientras que CpxAR y RcsCDB la reprime (21). Conjuntamente, estudios en *P. aeruginosa* han reportado que la adherencia fimbrial modifica la expresión génica, activando vías de señalización que lleva a la síntesis del segundo mensajero AMPc, iniciando la formación de biopelícula (21).

Por último, la producción de polisacáridos es otro de los mecanismos utilizados por las bacterias formadoras de biopelículas para mejorar su capacidad adhesiva, especialmente en ambientes con altos niveles de estrés. El estrés asociado al cizallamiento o roce de los fluidos puede regular la expresión génica y la producción de EPS, en función de soportar la deformación originada por el aumento de las fuerzas otorgadas por el flujo, permitiendo que las bacterias se mantengan unidas y protegidas de las influencias físicas externas (45). En condiciones estáticas, el transporte de solutos se realiza mediante difusión, por lo que hay una exposición limitada a los nutrientes presentes en el medio adyacente a la biopelícula, especialmente en las secciones inferiores, por lo que se genera una biopelícula de gran rugosidad y con protuberancias filamentosas en forma de pilar, perpendiculares al sustrato (37,46).

#### **1.4 Nutrición e Hidrodinámica: Factores que influyen en la formación de biopelículas**

Dado que las bacterias se mueven a través del flujo circundante e interactúan con las superficies cercanas, la formación de biopelículas involucra una serie de procesos hidrodinámicos y de crecimiento rápido. En entornos ricos en nutrientes, las biopelículas son más heterogéneas a

diferencia de las formadas bajo limitaciones nutricionales, caracterizadas por desarrollar una monocapa homogénea de agrupaciones bacterianas más pequeñas (38). Peyton *et al*, demostraron que las biopelículas formadas por *P. aeruginosa* en un entorno rico en nutrientes son más gruesas, rugosas y poseen una mayor densidad celular (35,38). De igual forma, la concentración de oxígeno disuelto influye en la adherencia bacteriana y la producción de EPS (13,17), por lo que un gradiente de nutrientes y oxígeno, que fluctúa desde el núcleo exterior al interior, produce bacterias con variabilidad fisiológica y metabólica, y también, favorece su adherencia a los sustratos (15).

Además de la nutrición y el oxígeno, el flujo del medio circundante tiene grandes implicancias en la formación de biopelículas, afectando su desarrollo, morfología y distribución celular en su interior (38,39). El principal mecanismo de transporte bacteriano a lo largo de una superficie está dado por el movimiento de los fluidos, cuya dinámica puede ser estática, laminar o turbulenta. El flujo de fluidos o flujo volumétrico influye de dos formas en el desarrollo y actividad de la biopelícula bacteriana: (i) en el transporte de solutos disueltos dentro y fuera de la estructura y (ii) en la aplicación de fuerzas que provocan movimiento y desprendimiento (37,46). En las diferentes condiciones hidrodinámicas, el flujo ejerce un esfuerzo cortante que influye tanto en el grosor como en la estructura de la biopelícula. Bajo condiciones de flujo laminar se han descrito biopelículas más gruesas, pero menos densas y con microcolonias circulares separadas por canales de agua (38). Las biopelículas cultivadas bajo flujo turbulento en cambio suelen ser más densas, fuertes y estables, que además forman serpentinas filamentosas que se estrechan en dirección al flujo (4,7, 35,37).

La morfología de las biopelículas cultivadas en interfaz líquido-líquido varía notablemente según la fuerza de cizallamiento. Esta fuerza es ejercida en la misma dirección que el flujo por unidad de área del sustrato y es proporcional a la velocidad del flujo del fluido. Las biopelículas desarrolladas en entornos con altas tensiones mecánicas de cizallamiento son más heterogéneas, delgadas, con estructuras en forma de cúpula y de menor área. Por el contrario, las biopelículas formadas en entornos con tensiones menores alcanzan el doble del grosor de una formada en cultivo estático, con múltiples capas y una mayor tasa de proliferación (17,37,38). Las fuerzas de cizallamiento también impactan en la orientación bacteriana, pues influyen su comportamiento natatorio. Si

bien las bacterias pueden nadar en contra del flujo, estas pueden quedar “atrapadas” en regiones donde esta fuerza es mayor, alterando su trayectoria y frenando su progresión (47).

La matriz de EPS juega un rol decisivo al aminorar los efectos de la compresión y relajación de la biopelícula, así como también de movimientos y estiramientos, a través de la entrada y salida de EPS y agua, permitiendo su recuperación (46). El aumento en la producción de EPS por unidad de volumen es proporcional a las tensiones de cizallamiento y tendría por objetivo reforzar la estructura (37).

### **1.5 Motilidad flagelar y formación de biopelículas bacterianas**

Existe una relación importante entre la capacidad mótil de una bacteria y su efectividad en la producción de biopelículas. La motilidad flagelar es considerada un factor de virulencia entre las bacterias patógenas, que facilita los procesos de detección de las superficies promoviendo el contacto inicial entre estas (2,26,40). Sin embargo, las bacterias inmóviles o sin apéndices, dependen en mayor medida del flujo circundante para adherirse a las superficies, afectando significativamente tanto la formación como la arquitectura de estas comunidades (37,48).

La motilidad también puede estar implicada en la expansión lateral de biomasa adherida y su posterior acumulación (49). Por lo tanto, la motilidad flagelar facilita las interacciones iniciales entre las células, permitiendo la formación de microcolonias y también la expresión de fimbrias, matriz de EPS y otras proteínas que participan del proceso adhesivo (50).

No obstante, existen estudios que indican que los flagelos si bien son importantes, no serían esenciales para la formación de biopelículas en cepas de *E. coli*, *P. aeruginosa* y *Pseudomonas fluorescens* (40). El trabajo realizado por Kim, T. *et al*, 2008 demostró que mutaciones en los genes reguladores de los flagelos en cepas de *Yersinia enterocolitica* resultaban en la formación de biopelículas defectuosas y de volumen reducido en crecimiento estático; y que las cepas que carecen completamente de flagelos exhiben un retraso en la adherencia inicial y en la formación de microcolonias (51). En experimentos desarrollados por Alonso, AN. *et al*, 2014, se evidenció una notoria reducción del grosor de las biopelículas formadas por cepas de *Listeria monocytogenes* mutantes para varios genes de motilidad flagelar (52).

Si bien el flagelo ejerce un papel importante en la adhesión, su función parece estar más enfocada en superar las fuerzas repulsivas del sustrato, en lugar de actuar como adsorbente o adhesivo (26).

### **1.6 Biopelículas bacterianas en entornos médicos: Infección del tracto urinario asociada a la instalación de catéter urinario permanente.**

El desarrollo de biopelículas bacterianas se ha transformado en un tema relevante en salud pública, ya que un número considerable de infecciones graves y complejas son producidas por este tipo de formaciones, principalmente porque se originan en lugares de difícil acceso (53). Estas infecciones, denominadas nosocomiales, son adquiridas durante la estancia hospitalaria de los pacientes (4) y están fuertemente relacionadas con procedimientos asistenciales invasivos, como la instalación de catéter urinario permanente (95%) o dispositivos de ventilación mecánica (86%), entre otros, contribuyendo al aumento de la resistencia a los antimicrobianos, además de la morbilidad y mortalidad de los pacientes (54,55).

El tracto urinario es un espacio estéril que posee un pH ácido, dado por la presencia de microbiota que participa en la prevención de las infecciones bacterianas (12). Sin embargo, la Infección del Tracto Urinario (ITU) es la patología más común dentro de las infecciones nosocomiales, siendo el uso de Catéter Urinario Permanente (CUP) la principal causa asociada a su desarrollo. Esta ITU afecta entre un 9,40% a un 13,57% de los pacientes hospitalizados en Chile (56).

La ITU se define por la presencia, multiplicación y colonización del urotelio por parte de microorganismos que desencadena una respuesta inflamatoria, afectando tanto al tracto urinario superior como inferior. Según la anatomía del paciente y sus comorbilidades, podemos clasificarlas en complicadas o no complicadas (57). Las ITU no complicadas suelen manifestarse como cistitis de origen comunitario, presentándose con mayor frecuencia en la atención ambulatoria y en mujeres sin factores de riesgo, cuya prevalencia es del 81% entre los 16 y 35 años. Las ITU complicadas en cambio, afectan a pacientes comprometidos urodinámicamente, con insuficiencia renal o que cuentan con la instalación de CUP, alcanzando hasta un 40% de todas las IAAS. El

cuadro clínico de esta infección puede variar entre una bacteriuria asintomática, cistitis o pielonefritis aguda y urosepsis grave (5,58-60).

Las ITU asociadas a la instalación de CUP, alcanzan una incidencia diaria de 3 a 10%. Entre el 10 y 25% de estos pacientes, desarrollan síntomas asociados a la infección local y el 5% de estos cursa con bacteriemia (14,25,61). Si bien la tasa de mortalidad asociada a la instalación de CU es baja, la ITU asociada a su uso es la causa más común de las bacteriemias nosocomiales (14).

La colonización del CU puede darse principalmente por dos vías: extraluminal e intraluminal. La vía extraluminal ocurre en el momento de la inserción del catéter o en horas posteriores, cuando las bacterias ascienden por una mucosidad generada entre el CU y la uretra. Por otra parte, la colonización intraluminal sucede cuando las bacterias acceden al lumen del sistema cerrado, mediante un reflujo urinario desde la bolsa de drenaje que suele estar contaminada, o cuando se produce una fisura en el sistema cerrado de drenaje (14). Mientras que el ascenso por la vía extraluminal demora entre 72 a 168 h, la colonización bacteriana por vía intraluminal es más rápida, tardando entre 32 a 48 h. Estudios realizados por Kass, *et al.* (62) revelaron que la bacteriuria se desarrolla casi en un 100% de los pacientes a los 4 días de la instalación del dispositivo (25). También, se ha demostrado mediante la microscopía electrónica de barrido que la mayoría de los catéteres retirados al 7mo día, ya cuentan con la formación de biopelículas bacterianas (25).

En un estado fisiológico normal y sin cateterización, el sistema urinario desarrolla sus mecanismos de defensa contra las infecciones, a través de la micción y la descamación de las células del urotelio. En la superficie abiótica en cambio, el catéter no posee estas “defensas intrínsecas”, por lo que el tratamiento con antibióticos no es capaz de eliminar la biopelícula formada, la cual favorece infecciones en otros sitios a partir de esta colonización. Es por esto por lo que se han obtenido mejores resultados al retirar o sustituir la sonda colonizada, previo al tratamiento con antimicrobianos (14,61).

El desarrollo de la biopelícula comienza con la formación de una película acondicionadora en el lumen del catéter, formada por proteínas, electrolitos y otras moléculas orgánicas provenientes de la orina. Esta película acondicionadora puede ocultar las características electrostáticas e



hidrofóbicas de la superficie, favoreciendo la adherencia microbiana. Entre las proteínas provenientes de la orina encontramos una glicoproteína denominada Tamm- Horsfall de origen renal, la cual facilita la adherencia de uropatógenos Gram negativos como *E. coli*, a través de la unión de sus fimbrias (14).

La inserción de un catéter provoca un grado de estasis urinario, promoviendo la colonización de microorganismos que provienen de la microbiota de la zona periuretral, principalmente Enterobacteriales como, *Klebsiella* sp, *Proteus* sp y *E. coli*, principalmente uropatógena (14).

### **1.7 Escherichia coli uropatógena (UPEC)**

*E. coli* es un bacilo Gram negativo, móvil, anaerobio facultativo que pertenece a la familia *Enterobacteriaceae*, y forma parte de la microbiota intestinal de los vertebrados (63). Sin embargo, algunas cepas de *E. coli* denominadas *E. coli* patógenas extraintestinales (ExPEC), se han adaptado para colonizar otras partes del cuerpo causando, además de ITU no complicada, bacteriemia, síndrome hemolítico urémico y sepsis (64). Estos patógenos, disponen de numerosos factores de virulencia, entre los que se encuentran fimbrias, flagelos, polisacáridos de superficie, cápsula y sistemas de adquisición de hierro, que aumentan tanto su virulencia como su capacidad para colonizar y sobrevivir en diferentes entornos. Este grupo se encuentra conformado por *E. coli* meningitis neonatal (NMEC), *E. coli* asociada a sepsis (SEPEC) y *E. coli* uropatógena (UPEC), entre otras (5,65-67).

*E. coli* uropatógena es el agente etiológico de ITU adquirida en la comunidad y en IAAS más frecuente, alcanzando hasta un 75-95% de las ITU no complicadas y entre el 40-50% de las complicadas (5).

Entre los factores de virulencia de UPEC encontramos diferentes adhesinas que favorecen el establecimiento de una infección. Las adhesinas tienen por función iniciar el contacto bacteriano con la superficie biótica o abiótica. Actualmente, se han descrito tres tipos principales de adhesinas: fimbrias, adhesinas afimbriales (Afa) y proteínas de membrana externa (OMP) (5). Las fimbrias tipo 1, P y S de UPEC son las encargadas de su adherencia a los receptores presentes en las células epiteliales de riñones y tracto urinario inferior. Estas se clasifican según su afinidad o resistencia a

las estructuras que poseen residuos de manosa. La fimbria tipo 1, que tiene afinidad por la manosa y cuya regulación depende de los genes *fimB*, *fimE* y *fimH*, está conformada por la repetición de subunidades de FimA que se ensamblan, formando una estructura fibrilar que posee la adhesina FimH en su extremo. Si bien los tres genes están implicados en la adhesión, la adhesina FimH en particular se une al receptor de Uroplaquina 1A (UP1A) presente en las células epiteliales de vejiga, propiciando su invasión y la posterior formación de comunidades bacterianas intracelulares (CBI) tipo biopelícula. De esta manera, UPEC evade la respuesta inmunitaria del hospedero y de antimicrobianos, estableciendo un nicho al interior de la célula urotelial, multiplicándose incluso sin inducir inflamación. Dentro de la CBI, este bacilo de 1-3  $\mu\text{m}$  se duplica sincrónicamente cada 30 minutos, acortando su longitud y dando lugar a células hijas de aspecto cocoide, de 1x1  $\mu\text{m}$ . Posteriormente, estas formas cocoides se empaquetan, formando una vaina que contiene aproximadamente  $10^5$  -  $10^6$  bacterias. Por último, la estructura de la comunidad cambia a una forma globular, y las bacterias ubicadas hacia la periferia recuperan su forma bacilar y también su movilidad, para finalmente salir de la célula epitelial a través de disrupciones en su membrana, a colonizar nuevas células (5,58,65). Asimismo, las fimbrias tipo 1 son fundamentales para la fase de adherencia irreversible en el desarrollo de una biopelícula, por lo tanto, las cepas que carecen de estas fimbrias muestran un deterioro importante en su formación (11). La fimbria tipo P, conformada por fibras compuestas de subunidades proteicas codificadas por el operón *papA-K*, participa en la patogénesis de las ITU ascendentes como pielonefritis, interactuando con los glicoesfingolípidos presentes en el epitelio renal. Por último, la fimbria S se une al receptor  $\alpha$ -sialyl-(2,3)- $\beta$ -Gal de las células del epitelio tubular renal o de los glomérulos renales, favoreciendo la invasión del epitelio y causando ITU ascendentes y sepsis (5,65).

La matriz de EPS de la biopelícula de *E. coli* está formada por dos polímeros principales: uno proteico llamado curli y un polisacárido denominado celulosa (69-72). La función adhesiva de la fimbria tipo curli facilita las interacciones iniciales entre las células y las superficies, favoreciendo la formación de biopelículas (69), mientras que la celulosa es necesaria para adherirse fuertemente a las superficies, contribuyendo a la agregación bacteriana (71). Estas forman una red de fibras en la superficie de la biopelícula, otorgándole resistencia estructural además de evitar su desecación (50).

Las fimbrias tipo curli, además de formar parte de la matriz extrapolimérica de la biopelícula de *E. coli*, participan en la adherencia bacteriana al sustrato en las fases iniciales de la formación de estas comunidades (11). Estas fimbrias son codificadas por dos operones de transcripción divergente, denominados *csgDEFG* y *csgBAC*. El operón *csgDEFG* codifica para el regulador CsgD y otras 3 proteínas accesorias de ensamblaje (CsgE, CsgF y CsgG). Mientras que *csgBAC* codifica para la subunidad mayor (CsgA) y subunidad menor (CsgB) del curli, las proteínas accesorias se disponen alrededor de estas (70). CsgD reprime los genes *fliE* y *fliF* involucrados en la síntesis de flagelo, e induce la expresión de curli al unirse al promotor *csgBAC* directamente, además de estimular la producción de celulosa mediante la regulación positiva de la diguanilato ciclasa AdrA (68). La expresión de CsgD es controlada por diversos reguladores transcripcionales y RNAs pequeños. Además, su actividad se ve estimulada por bajas temperaturas, baja salinidad y concentración de glucosa (0,2%), y es reprimida cuando el ambiente supera los 30°C, existe una alta osmolaridad y una gran concentración de glucosa (8-20 %). Por otra parte, el c-di-GMP también regula la actividad de CsgD, a través de un mecanismo que no se ha logrado dilucidar por completo (11,68).

Además de estos polímeros, la matriz extracelular también está compuesta por flagelos, ADN, ácido colánico, antígeno 43 (Agn 43), entre otros (50,68). Los flagelos de *E. coli* además de facilitar el transporte y la adherencia bacteriana a la superficie durante la colonización, también le permiten nadar contra el flujo de la orina, a través del uréter hasta el riñón y resistir las fuerzas electrostáticas e hidrodinámicas repulsivas que normalmente impedirían la formación de biopelículas (63,65,68,74). El movimiento de *E. coli* es unidireccional, y cuenta con pausas periódicas que implican una rotación activa, que reorienta la célula con relación a la superficie (48). A través de un mecanismo de “empuje”, un haz flagelar giratorio moviliza la bacteria hacia delante y el fluido hacia atrás, de tal forma que los costados de la célula bacteriana quedan paralelos a la superficie, estabilizando su desplazamiento (47). Durante la adhesión, el gen *fliC* involucrado en la síntesis flagelar es reprimido, mientras los genes *ompC* y el locus *wca*, encargados de la síntesis de ácido colánico se inducen (13). Si bien el ácido colánico no participa en la adherencia a la superficie en la formación de biopelículas de *E. coli* K-12, si sería necesario para el desarrollo de su arquitectura tridimensional (11,13). Por último, la proteína auto transportadora Ag 43 participa en la agregación bacteriana, influyendo en la capacidad de UPEC para formar biopelículas (5,11).

## 1.8 Motilidad flagelar y formación de biopelículas en UPEC

El desarrollo y formación de biopelículas por parte de UPEC requiere la expresión génica y regulación de una serie de distintos elementos u organelos bacterianos, como moléculas de la matriz de EPS, flagelos y fimbrias (75). Además, también está bajo el control de las condiciones ambientales, como las propiedades de las superficies, tensiones y las características del medio acuoso (17).

La motilidad bacteriana impulsada por flagelos, además de promover la adherencia bacteriana, afecta la velocidad con que estas se adhieren a las diferentes superficies. La motilidad flagelar en UPEC está dada por la expresión del operón *flhDC*, que codifica para sus factores de transcripción y cuya regulación depende de factores ambientales como la disponibilidad de nutrientes, pH y temperatura (76-78). La activación directa de la expresión de *flhDC* está dada por dos factores de transcripción. En primer lugar, la expresión *in vivo* depende de AMPc y su receptor, presente en el complejo proteico cAMP-CRP, que se une en una región río arriba del promotor de *flhDC* (27, 46). El segundo factor es QseB, parte del sistema de dos componentes (2CSTS) QseBC, donde QseB codifica un regulador de la respuesta y QseC codifica para un sensor tipo quinasa que detecta AI-2 (19). Esta regulación marca el avance entre el paso de (i) *adherencia reversible* a (ii) *adherencia irreversible* en la formación de biopelículas, en el cual se prioriza el estado bacteriano sésil y aumenta la expresión de fimbrias adhesivas como la fimbria tipo 1 y curli (63,69,78). Una vez iniciada la maduración, las células bacterianas firmemente adheridas comienzan a agregarse y a producir EPS.

McClaine, JW. *et al*, 2002 desarrollaron una serie de experimentos en *E. coli* móviles e inmóviles para caracterizar el papel de los flagelos en la adherencia bacteriana en sistemas dinámicos. Los resultados demostraron que, si bien las bacterias móviles y no móviles se adhieren con velocidades similares en procesos de transporte pasivo o difusión, las bacterias flageladas se adhieren más rápidamente en condiciones de flujo (79). Esto probablemente se deba a que la velocidad con la que las bacterias nadan hacia la superficie supera la velocidad del medio en el que son transportadas. Por otra parte, el transporte de las bacterias inmóviles en sistemas dinámicos está dominado por la sedimentación bacteriana a velocidades de flujo bajas (79).

Estudios realizados por Wood, T. *et al*, 2006 de *E. coli* en condiciones de cultivo dinámico, que permitieron relacionar la arquitectura de las biopelículas y la motilidad de UPEC, observaron que al aplicar los parámetros utilizados para describir la estructura formada (grosor, superficie colonizada, rugosidad y biomasa), las biopelículas de *E. coli* móviles forman estructuras verticales, que corresponden a la de una biopelícula madura. En cambio, las biopelículas formadas por cepas de *E. coli* no móviles, desarrollaron colonias más lisas, de grosor reducido y menor biomasa total. Por lo tanto, la motilidad y la presencia de flagelos afectan la arquitectura de la biopelícula de *E. coli* (80).

Como se ha mencionado en párrafos anteriores, una de las fimbrias adhesivas que podría favorecer la adherencia de UPEC a las diferentes superficies es la fimbria tipo curli. Esta fibra amiloide de 4-7 nm de ancho facilita las interacciones iniciales entre las células y las superficies, además de promover las interacciones célula-célula posteriores a la adherencia (70). En el año 2000, Prigent-Combaret, *et al.*, documentaron que la motilidad flagelar no es necesaria para la adherencia inicial y la formación de biopelículas, si la cepa en estudio sobreexpresa adhesinas de superficie tipo curli (2,81), mientras que otros estudios realizados en UPEC evidenciaron que la celulosa y los curli, serían esenciales para la formación de biopelículas y que, además, son una parte clave en la mantención estructural de la biopelícula (15,50).

### **1.9 Métodos de cultivo y técnicas de microscopía para la visualización de las biopelículas bacterianas.**

El conocimiento sobre las biopelículas ha aumentado en la última década, debido a los avances que se han logrado en la investigación, tanto a nivel molecular como de imagenología mediante microscopía. El desarrollo de la microscopía confocal de barrido láser ha permitido caracterizar la estructura de las biopelículas, revelando el importante rol que tendría la adherencia en la conformación y consolidación de la arquitectura de la biopelícula (4,6).

Para ejecutar un correcto análisis y evaluación de la formación de estas biopelículas, es necesario tener en cuenta la variabilidad de la arquitectura de esta comunidad y la complejidad de su desarrollo. Las técnicas de cultivo de biopelículas deben elegirse en función del objetivo de estudio,

permitiendo adaptar los diferentes dispositivos y procedimientos para lograr el reflejo del entorno real, asegurando la disponibilidad de recursos (82). Entre las técnicas de cultivo de biopelículas, encontramos métodos estáticos y dinámicos.

Los métodos de cultivo estáticos son fáciles de implementar, de costo reducido y altamente reproducibles. Estos permiten examinar en detalle los primeros acontecimientos en el desarrollo de estas biopelículas, identificando entre los 15 a 60 minutos las primeras bacterias adheridas, periodo que comprende el cambio de fenotipo planctónico a sésil. Sin embargo, estos modelos cerrados no permiten el flujo de medio de cultivo, lo que conlleva un cambio progresivo en las condiciones experimentales, debido al agotamiento de los nutrientes y acumulación de productos metabólicos de desecho. Esto último genera un crecimiento rápido de la biopelícula al inicio, lo que no es común en el entorno natural, por lo que sus características distan mucho de lo que acontece de forma natural (82).

Las condiciones de los sistemas de cultivo dinámicos en cambio se asemejan más a las condiciones *in vivo*, debido al control sobre el flujo que simula las fuerzas presentes, por ejemplo, en catéteres urinarios. Estos sistemas consideran el bombeo constante y controlado de nutrientes, induciendo condiciones de estrés y también, promoviendo el crecimiento de estas biopelículas. Un ejemplo de este modelo es el denominado “*Flow Cells*” (FC), el cual está diseñado para evaluar, sin invadir, los procesos de la formación de biopelículas directamente a través de microscopía y análisis de imágenes. La biopelícula es cultivada en una cámara encapsulada, acoplada a un sistema de flujo conectado a una fuente de nutrientes. Esta cámara de cultivo posee un cristal que permite, mediante un Microscopio Confocal de Escaneo Láser (CLSM), registrar directamente las imágenes durante el desarrollo de la biopelícula, cuyas células bacterianas o estructuras de interés están marcadas con sondas fluorescentes. La combinación dual de fluoróforos que se unen a ADN como Syto 9/ Ioduro de Propidio (IP), Hoechst/IP, Syto 61/YOYO-1, entre otras, permite estudiar las células bacterianas vivas y muertas, obteniendo una idea general de la fisiología microbiana. Por otra parte, el análisis de la matriz teñida con Calcofluor White o Tioflavina S, nos permite obtener información sobre la arquitectura general y la distribución de sus componentes (57,58).

A través de técnicas como, la microscopía electrónica de transmisión y de barrido, microscopía de fluorescencia y CLSM, es posible visualizar la compleja arquitectura de una biopelícula madura.

Particularmente, CLSM permite la visualización no invasiva de la estructura tridimensional, incluso en cámaras de flujo (33).

Otra técnica de microscopía avanzada con una detección rápida y sensible para experimentos *in vivo* es la Microscopía de Fluorescencia Light Sheet (LSFM). Esta cuenta con iluminación lateral y 4 objetivos de inmersión en agua, que permiten adquirir imágenes de muestras de tamaño milimétrico durante largos períodos de observación, evitando el deterioro de la imagen a mayor profundidad. Además, proporciona dos vistas opuestas desde un mismo plano focal, lo que mejora la velocidad de adquisición y minimiza los artefactos de rotación o las correcciones de registro de imágenes.

Hoy en día el análisis de las biopelículas puede realizarse utilizando parámetros cuantitativos (biomasa, biopelícula total, matriz de EPS) o mediante una evaluación de la estructura formada (estudios morfológicos y mecánicos), a través de softwares que permiten el análisis cuantitativo de las imágenes en 3D. Entre estos encontramos ImageJ (<https://imagej.nih.gov/ij/>), Ilastik (<https://www.ilastik.org/>) e IDL (SCIAN-Soft), entre otros.

## **2. Presentación del problema**

Las biopelículas son comunidades organizadas capaces de adherirse a diferentes superficies y producir una matriz extracelular que les permite protegerse de factores externos, como la radiación UV, temperaturas y pH extremos, sobrevivir ante la escasez de nutrientes e incluso, resistir la acción de numerosos antibióticos. El desarrollo de estas organizaciones bacterianas sigue un ciclo biológico definido de 5 etapas, que involucra una serie de interacciones entre la célula bacteriana y el sustrato, además de interacciones intercelulares que derivan en la organización de la comunidad.

Las interacciones bacteria - sustrato pueden variar según las características iónicas y micro topográficas de la superficie, así como también de acuerdo con la presencia o ausencia de apéndices bacterianos, como flagelos y fimbrias, que cumplen un importante rol en las fases iniciales de formación de las biopelículas. La motilidad flagelar, considerada un factor de virulencia en *E. coli*, promueve el contacto bacteriano inicial con la superficie, facilitando su detección y también el

desplazamiento celular, por lo que se relaciona la capacidad mótil de una bacteria y con la efectividad en el establecimiento de estas agrupaciones.

En el Programa de Microbiología y Micología, de la Facultad de Medicina de la Universidad de Chile, se realizó un estudio de vigilancia de la emergencia de nuevos clones de UPEC. Para lo cual se estudiaron 96 cepas de UPEC aisladas de pacientes con ITU sintomática (una cepa por paciente). En esa investigación se aislaron 16 cepas de *E. coli* que se comportaron fenotípicamente inmóviles. De este grupo se seleccionó la cepa de UPEC denominada ST12 OD65, la cual corresponde a uno de los 3 clones más relevantes en este estudio.

Dado que las biopelículas se desarrollan frecuentemente en entornos médicos, asociada a la instalación de dispositivos como el CU, el tratamiento de infecciones causadas por biopelículas es un problema de salud pública, debido a su complejidad y también, la resistencia antibiótica que generan. En particular, las ITU asociadas a CUP siguen siendo una de las patologías intrahospitalarias más frecuentes, afectando a una gran cantidad de pacientes durante su estancia, aumentando la morbilidad y mortalidad durante la hospitalización. El origen de estas infecciones es principalmente bacteriano, donde UPEC es responsable de hasta el 50% de los casos. Este patógeno, generalmente, móvil asciende por la uretra tras la inserción de la sonda, adhiriéndose a su superficie y formando biopelículas.

El conocimiento sobre el desarrollo y sobre las características morfológicas de las biopelículas, ha aumentado en la última década debido a los avances que se han logrado en la investigación, tanto a nivel molecular como de imagen, a través de la microscopía. Para caracterizar la cinética de formación o analizar la arquitectura de la biopelícula formada, además de establecer un sistema de cultivo que refleje las condiciones que permiten el desarrollo de estas comunidades, es necesario conocer qué tipo de herramienta microscópica se ajusta a los análisis planteados para nuestros experimentos. Por ejemplo, CLSM otorga la capacidad de visualizar la arquitectura de la biopelícula formada de manera poco invasiva, a partir de la cual es posible realizar una caracterización morfológica. Por otra parte, LSM permite adquirir imágenes 3D de la muestra y en diferentes ángulos, aumentando su resolución espacial.



En esta tesis, planteamos utilizar dos sistemas de cultivo, estático y dinámico, para caracterizar cinética y morfológicamente la formación de biopelículas. Si bien los métodos de cultivo estático están bien descritos en la literatura, en la actualidad es necesario conocer cómo se desarrolla la colonización en condiciones reales, por ejemplo, al interior de un catéter urinario. Para acercarnos más a esta condición, desarrollamos un sistema de cultivo dinámico basado en la conexión de un tubo FEP (sin intervenciones para facilitar la observación) a un sistema de perfusión cerrado, durante 24 horas, que simula las condiciones presentes en un catéter urinario. De esta manera, y a través de la adquisición de imágenes mediante LSM, es que podremos analizar y caracterizar la cinética de formación de la biopelícula en su interior.

Considerando los antecedentes antes mencionados nos planteamos: ¿Será UPEC ST12 OD65 capaz de formar biopelículas a pesar de comportarse fenotípicamente inmóvil?

Los antecedentes presentados en este proyecto han mostrado que bacterias que exhiben una motilidad defectuosa o carecen de flagelos son capaces de formar biopelículas. Por ello, este proyecto plantea la siguiente hipótesis:

### **Hipótesis**

La cepa UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, aislada de ITU es capaz de formar biopelículas, tanto en condiciones de cultivo estático como dinámico.

### **Objetivo general**

Detectar y caracterizar la formación de biopelículas en la cepa fenotípicamente inmóvil UPEC ST12 OD65, respecto de la cepa control UPEC CFT073 móvil, en condiciones de cultivo estático y dinámico.

### **Objetivos específicos**

1. Caracterizar fenotípicamente la cepa UPEC ST12 OD65 y detectar la formación de biopelículas mediante ensayo de cristal violeta

2. Comparar la cinética de formación y caracterizar morfológicamente las biopelículas formadas en cultivo estático de la cepa UPEC ST12 OD65 respecto de la cepa control UPEC CFT073
3. Determinar la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa UPEC ST12 OD65 respecto de la cepa control UPEC CFT073 en condiciones de cultivo dinámico
4. Comparar la formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cuanto a su cinética y características morfológicas, en condiciones de cultivo estático vs dinámico

### 3. Materiales y métodos

**Tipo de Estudio:** Observacional, descriptivo con componente analítico.

#### 3.1 Cepas

En este estudio se empleó una cepa patógena de *E. coli* UPEC ST12 OD65 aislada de un paciente con ITU sintomática (recuento  $>10^5$  UFC/mL), fenotípicamente inmóvil, proveniente de un centro de salud privado RM. Además, para los ensayos se utilizó como control la cepa UPEC CFT073, que exhibe un comportamiento móvil debido a sus flagelos y es formadora de biopelículas.

#### 3.2 Reactivos

- Agua doble destilada estéril (H<sub>2</sub>O<sub>dd</sub>).
- Agar triptona de soya (TSA; Sigma-Aldrich).
- Alcohol metílico, absoluto (Merck).
- Alcohol etílico, absoluto (Sigma-Aldrich).
- Base de caldo Luria Broth (base de caldo LB de Miller <sup>TM</sup>; Invitrogen).
- Cristal violeta (CV; Sigma-Aldrich).
- Glicerol (Merck).
- Medio de Montaje FluorSave® (Sigma-Aldrich).
- PBS 10X (Winkler).
- Paraformaldehído (PFA; Sigma).
- Solución de Yoduro YOYO-1 1 mM en DMSO (Thermo Fisher).
- Solución Syto 61 Red Fluorescent Nucleic Acid Stain- 5 mM en DMSO (Thermo Fisher).

### 3.3 Materiales

- Bajada De Suero Macrogoteo 20 Gotas/ml (Nipro)
- Botella Tapa Azul de Borosilicato 250, 500 y 1000 mL.
- Cinta para enmascarar 25 mm 50 m (Tesa)
- Cubreobjetos de vidrio de 24x50 mm (Laborgläser).
- Cuchillas quirúrgicas estériles desechables (Baistra).
- Filtros de jeringa, tamaño de poro de 0.22  $\mu\text{m}$  (Nipro).
- Jeringas de 1 mL (Nipro).
- Jeringas de 50 mL (Nipro).
- Llave 3 Pasos Cranberry Rotación 360° (Cranberry)
- Mechero Bunsen (VWR).
- Micropipetas P1000, P200, P100, P20 y P2 (Gilson).
- Papel Parafilm® (10cmx38m) (Bemis).
- Placas de Petri 90x15mm (Fisher Scientific).
- Placas para cultivo celular de 96 pocillos, de fondo plano, estériles (Falcon®).
- Pinzas metálicas (Electron Microscopy Sciences).
- Pipetas volumétricas de 5 mL (Pyrex).
- Portaobjetos (ISOLAB).
- Pro-pipeta (Brand).
- Punta de carga de gel, 10  $\mu\text{L}$ , plana, estéril (Eppendorf®).
- Puntas para micropipeta de 1000, 200 y 0.5-10  $\mu\text{L}$  (Gilson).
- Tubo Polipropileno 1.5, 2 mL (Eppendorf®).
- Tubo cónico de Polipropileno de 15 mL, tapa rosca, estéril (Falcon®).
- Tubo cónico de Polipropileno de 50 mL, tapa rosca, estéril (Falcon®).
- Tubería de Etileno Propileno Fluorado (FEP), 1,6 mm Diámetro externo, 0,8 mm Diámetro interno (Bola).

### 3.4 Equipos

- Autoclave vertical de carga superior Tuttnauer (Heidolph).

- Baño Termorregulado JB Nova Unstirred (Grant)
- Estufa microbiológica de protocolo general (Heratherm).
- Espectrofotómetro Visible 6300 / 6320 D (Jenway).
- Impresora 3D de fotolitografía SLA Printer Form 2 (Formlabs).
- Form Cure: heat and 405 nm light (Formlabs).
- Microscopio de Fluorescencia Light Sheet, objetivo 10X de inmersión en agua, AN de 0,3 (CFI Plan-Fluor, Nikon) líneas láser de excitación 488 y 594 nm (Omicron); Filtro: GFP/mcherry (Thorlabs); cámara CMOS (Hamamatsu ORCA-Flash4.0 LT+ Digital) y software de captura U. Bonn +SCIAN.
- pH-metro accumet AE150 (Fisherbrand).
- Sistema de disco giratorio Volocity ViewVox (Perkin Elmer) acoplado a un microscopio Zeiss Axiovert 200; objetivos: 100X de inmersión en aceite, AN de 1.3 (Plan-Neofluar, Zeiss); líneas láser de excitación 488 y 647 nm (Omicron); cámara CCD de 12 bit (Hamamatsu ORCA-ER) y software de captura Volocity 4.2 (Improvision).
- Ultrasonicador (Jeken)

### 3.5 Software

- Huygens essentials (versión 21.10; Scientific Volume Imaging).
- FIJI (versión 1.53q; National Institutes of Health)
- GraphPad Prism (versión 8.3.0, GraphPad Software).

### 3.6 Caracterización fenotípica de la cepa de *E. coli* UPEC ST12 OD65 y detección de la formación de biopelículas

La cepa de *E. coli* UPEC fue originalmente identificada a nivel de especie, en el laboratorio de origen mediante sistema automatizado VITEK 2 bioMérieux y mantenida en Caldo Trypticasa soya-glicerol al 20% v/v en el cepario del Programa de Microbiología y Micología, a 37°C en atmósfera normal y re identificada mediante características bioquímicas a través de una batería microbiológica clásica (TSI, LIA, MIO, citrato y urea) incubada en una estufa de cultivo durante 24 horas a 37°C. Para confirmar la identificación de la cepa control UPEC CFT073, también se le realizó la caracterización bioquímica en las mismas condiciones de cultivo que la cepa en estudio.

El secuenciotipo de la cepa fue determinado previamente mediante MLST (Katherine Nicole Ocares Lizama. Tesis profesional: “Prevalencia y caracterización molecular de las cepas de *Escherichia coli* no fermentadoras de lactosa aisladas de pacientes con infección urinaria ambulatoria de un centro de salud privado. Santiago. Chile”. Programa de Microbiología y Micología.; F. de Medicina, Universidad de Chile, 2019).

### **3. 6. 1 Estudio del fenotipo de motilidad**

Además de la caracterización fenotípica mediante cultivo de cepas de *E. coli* en agar en medio movilidad - indol- ornitina (MIO), se realizaron otras dos metodologías:

#### **Cultivo de cepas de *E. coli* en agar blando:**

Para determinar la movilidad de UPEC ST12 OD65, se cultivó la cepa en medio semisólido. Se inoculó la cepa en estudio al centro de una placa con Agar nutritivo al 0,7 % y luego se incubó a 37°C durante 24 horas.

#### **Prueba de movilidad a través de catéter en agar TSA.**

Para evaluar la capacidad migratoria de la cepa de UPEC ST12 OD65 a través de un catéter urinario, se siguió el protocolo propuesto por Sabbuba, *et al* (2002) (83). En una placa de Agar TSA se cortaron canales en el centro y uno adicional en ángulo recto. Después de esto, se inocularon 10 uL de cultivo de 4 horas de la cepa en estudio, en el borde del canal central de la placa y se dejó secar. Luego de que el inóculo se secó en el agar, se colocaron secciones de aproximadamente 1 cm de largo de catéter urinario N°16 de silicona, como puente adyacente a los canales centrales. Finalmente, la placa fue incubada a 37°C durante 24 horas. Una vez transcurrido este periodo, se examinó la placa en busca de crecimiento en el lado opuesto del agar adyacente a una sección del catéter. Como control negativo se inoculó caldo LB estéril y como control positivo se utilizó la cepa ATCC® 12453™ de *P. mirabilis*.

### 3.7 Detección de biopelícula de UPEC ST12 OD65.

Para verificar la capacidad de la cepa UPEC ST12 OD65 de formar biopelícula se realizaron 3 ensayos independientes con Cristal Violeta (CV) (84) en placa de 96 pocillos, según el esquema representado en la Figura 3.

A partir de un cultivo de 24 horas realizado en placa con Agar Tripticasa Soya (TSA), se tomó una colonia aislada y fue resuspendida en un tubo cónico de Polipropileno de 15 mL, con 10 mL de caldo LB e incubada a 37°C por 24 horas. Luego, en una placa de 96 pocillos, se realizó una dilución 1/10 del inóculo bacteriano previamente incubado con caldo LB, llevando a un volumen total de 200 µl por pocillo. La placa fue cultivada a 37°C durante 48 horas en una estufa de cultivo, sin agitación.

Transcurridas las 48 horas, se retiró la placa de la estufa y con la ayuda de una micropipeta multicanal se eliminó cuidadosamente el sobrenadante de los pocillos. Luego, se realizaron tres lavados con solución de fosfato salino (PBS) 1X, y posteriormente, se adicionaron 200 µl de tinción de Cristal Violeta al 0,1% (m/v) a cada pocillo y la placa se incubó a temperatura ambiente (RT) durante 15 minutos. A continuación, con la micropipeta se retiró el CV de los pocillos y se realizaron 3 lavados con PBS 1X. Por último, el CV adherido a la superficie de los pocillos fue eluido con etanol al 95% durante 20 minutos. Finalmente, se determinó la densidad óptica de cada pocillo, en un espectrofotómetro a una longitud de onda de 590 nm.

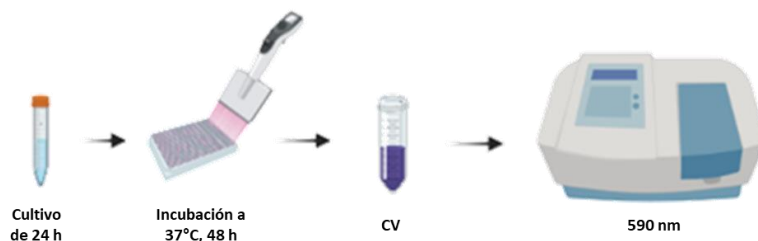


Figura 3. Esquema representativo del ensayo de Cristal Violeta.

Para el análisis de los resultados, se utilizaron los criterios establecidos para la evaluación de formación de biopelículas en ensayo de cristal violeta propuestos por Villegas, *et al.* 2013 (Tabla 1).

<b>No formador</b>	$DO \leq DOc$
<b>Débil</b>	$DOc < OD \leq (2 \times DOc)$
<b>Moderado</b>	$(2 \times DOc) < DO \leq (4 \times DOc)$
<b>Fuerte</b>	$(4 \times DOc) < DO$

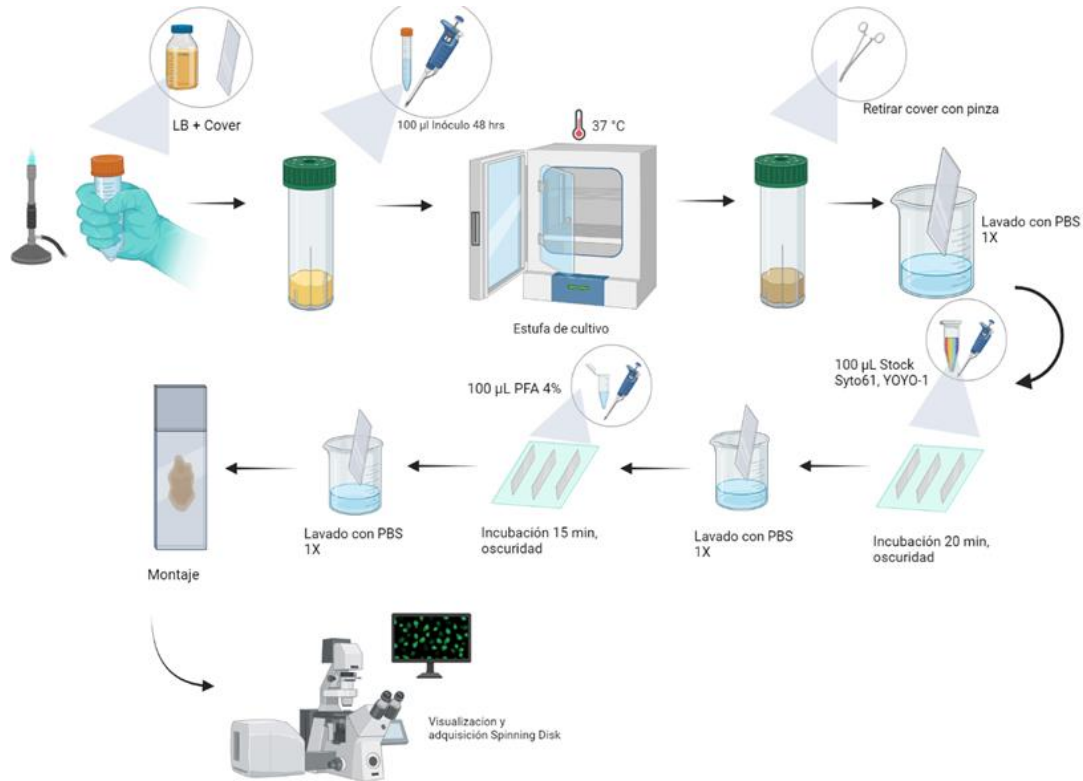
*Tabla 1- Criterios de clasificación para la evaluación de la formación de biopelículas en ensayo CV. DO:*

*Densidad Óptica, DOc: Densidad Óptica blanco. Villegas, et al (2013).*

### **3.8 Detección, cinética de formación y caracterización morfológica de biopelículas en cultivo estático de la cepa UPEC ST12 OD65 y la cepa control UPEC CFT073, en caldo LB.**

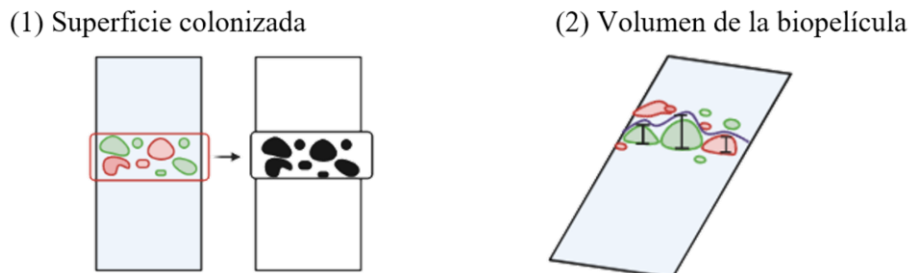
La capacidad de formación, la cinética y la morfología de biopelículas de la cepa UPEC ST12 OD65, se investigó mediante cultivo estático, utilizando el protocolo descrito por Schlapp, G *et al.* 2011. A partir de un cultivo en placa de 24 horas, se inoculó la cepa UPEC ST12 OD65 en un tubo cónico de Polipropileno con 30 mL de caldo Luria Bertani (LB), que se incubó a 37°C por 48 horas. Posteriormente, se preparó una serie de 81 tubos cónicos de Polipropileno de 50 mL, a los cuales se adicionó un cubreobjetos de vidrio (24x50 mm) previamente lavado y esterilizado, y luego 30 mL de caldo LB. Por último, cada tubo fue inoculado con 300 µl del cultivo realizado previamente (Fig. 4) (18). Los tubos se mantuvieron a 37°C durante 3 días en una estufa de cultivo. Para realizar una caracterización morfológica de la cinética de formación de las biopelículas y, según los antecedentes, se retiró el cubreobjetos de cada tubo (con la ayuda de una pinza) cada 1 hora hasta las 24 horas y, posteriormente los cubreobjetos restantes fueron retirados a las 48, 72 y 96 horas. Una vez retirados, los cubreobjetos fueron lavados con PBS 1X. Con la ayuda de un algodón embebido con etanol al 70% (v/v), se limpió una de las caras del vidrio para remover la biopelícula formada. A continuación, se realizó una tinción fluorescente, utilizando una combinación de Syto 61 (Ex.628/Em.645, bacterias vivas) y YOYO-1 (Ex.491/Em.509, bacterias muertas), durante 20 min en cámara oscura. Después, se realizó un segundo lavado con PBS 1X para quitar el exceso de tinción. Finalmente, se fijaron los cubreobjetos con Paraformaldehído (PFA) al 4% durante 20 minutos en cámara oscura y luego, se repitió el paso de lavado para quitar el exceso de PFA. Una vez procesados, los cubreobjetos fueron montados en un portaobjetos con una gota de FluorSave®, medio de montaje que ayuda a preservar la fluorescencia. Cada ensayo se realizó por triplicado. Como control positivo, se utilizó la cepa UPEC CFT073 y como control negativo, caldo LB. Para

la visualización de las biopelículas, se usó un sistema de disco giratorio motorizado mediante software *Volocity ViewVox* (Perkin Elmer®), acoplado a un microscopio confocal Zeiss Axiovert-200, con un objetivo 100X, de inmersión en aceite y apertura numérica (AN) 1,3. Las imágenes fueron capturadas con un “Z spacing” de 0,05  $\mu\text{m}$  y el campo observado corresponde a un segmento representativo de la interfaz aire-líquido del cubreobjetos de vidrio.



**Figura 4. Esquema representativo del desarrollo experimental del estudio de biopelículas de UPEC mediante cultivo estático.**

Para evaluar las etapas de formación y realizar la caracterización de las biopelículas obtenidas, se determinaron 2 parámetros morfológicos: (1) Superficie colonizada y (2) Volumen de la biopelícula formada (Fig. 5).





*Figura 5. Parámetros morfológicos definidos para la caracterización de biopelículas de UPEC formadas en cultivo estático.*

A partir del análisis cualitativo y cuantitativo de las imágenes, y según la literatura (18), definimos las siguientes características para cada etapa de formación de biopelículas de UPEC: **(I)** adherencia bacteriana reversible: número reducido de bacterias adheridas, morfología celular alargada, **(II)** adherencia irreversible: presencia de microcolonias (4 a 8 bacterias agrupadas), **(III)** maduración I: aumento en la tasa de crecimiento y división bacterianas, disminución en su elongación y cambio conformacional de 2D a 3D, **(IV)** maduración II: volumen y densidad bacteriana máxima, mayor compactación y **(V)** dispersión: reducción de la biomasa bacteriana.

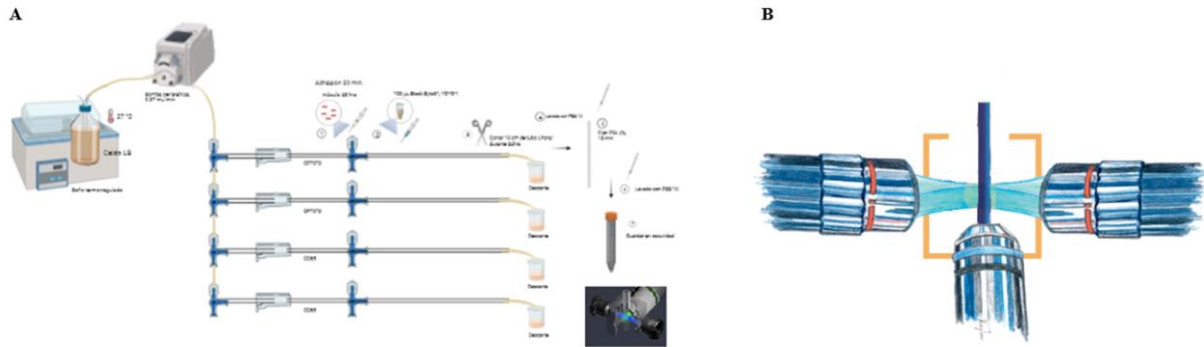
Para la obtención de los parámetros de superficie colonizada y volumen de las biopelículas formadas, las imágenes fueron deconvolucionadas con el Software de deconvolución, visualización y análisis Huygens Professional 21.10 (<https://svi.nl/HomePage>). Posteriormente, la segmentación de las imágenes fue ejecutada mediante el software de clasificación y segmentación Ilastik (<https://www.ilastik.org/>). Una vez obtenidas las máscaras binarias, se aplicó el *plug-in* de Fiji-ImageJ 3D Manager, que permite seleccionar y realizar mediciones individuales de RDIs en 3D.

### **3.9 Determinación de la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa UPEC**

#### **ST12 y la cepa control UPEC CFT073 en cultivo dinámico, con caldo LB.**

Para simular las condiciones de crecimiento de la biopelícula en un catéter urinario, se realizó un cultivo dinámico de la cepa UPEC ST12 OD65 en un tubo FEP (Etileno Propileno Fluorado) de 0,8 mm de diámetro interno. Para este montaje se utilizaron 4 tubos FEP, conectados en paralelo a través de bajadas de suero y llaves de 3 pasos, cuyas conexiones fueron fijadas utilizando Parafilm®. Este montaje fue conectado a un sistema de perfusión cerrado estéril acoplado a una bomba peristáltica, con una velocidad de perfusión de 0,5 mL/minuto de caldo LB durante 24 horas. Con la ayuda de un baño termostático, el caldo se mantuvo a 37°C durante la totalidad del experimento. El flujo de caldo de cultivo fue detenido cada 55 minutos para ejecutar la tinción de la biopelícula en formación. Para esto se utilizó una jeringa de 1 mL, en donde se preparó una dilución 1:10 del stock de fluoróforos (Syto 61 y YOYO-1) en caldo LB. Un extremo del tubo fue cortado cada 1 hora (10 cm), lavado con PBS 1X y luego fijado con PFA 4%, siguiendo los pasos y tiempos descritos, anteriormente, en el procesamiento de los cubreobjetos del cultivo estático.

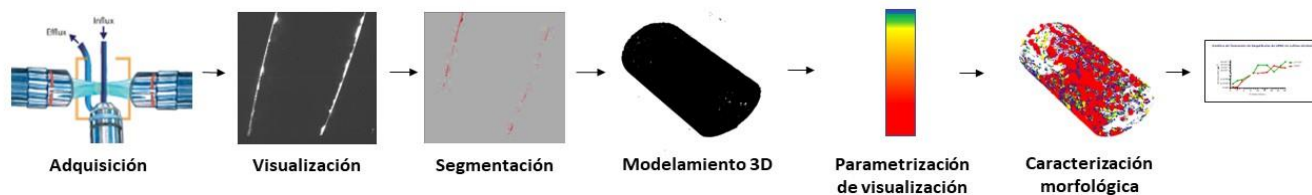
Cada trozo de tubo FEP procesado, fue almacenado y posteriormente visualizado en el microscopio LSM, montado en un holder de visualización, a través de un objetivo 10X de inmersión en agua y con una AN de 0,3 (Fig. 6). Los parámetros de captura son los siguientes: Láser 488: 18 mw, Láser 594: 18mw, um/pix: 0.65, um/slice: 2.25, Filtro: GFP/mcherry, Slices: 500.



**Figura 6. Esquema representativo del desarrollo experimental del estudio de biopelículas de UPEC mediante cultivo dinámico. A. Montaje cultivo dinámico B. Sistema de visualización de tubo FEP en LSM.**

Es importante mencionar que se usó este tubo FEP, pues su índice de refracción de la luz es similar al del agua, lo que disminuye las distorsiones en la imagen capturada.

La caracterización y comparación de las biopelículas formadas en el tubo FEP se realizó bajo el parámetro de volumen total. Las imágenes adquiridas fueron visualizadas en Fiji-ImageJ y posteriormente se aplicó un Filtro Laplaciano (Radio del Kernel:1,5), con el objetivo de resaltar regiones con diferencias de intensidad y detectar mejor los bordes del tubo. Posteriormente, se determinaron los umbrales de segmentación para los distintos tiempos y se obtuvo la máscara binaria. Esta fue exportada al Software IDL 7.1 (Interactive Data Language, ITT, CO, USA) y se realizaron reconstrucciones 3D de la biopelícula completa, formada al interior del tubo FEP. A partir de estas reconstrucciones, se obtuvieron los datos para el análisis del parámetro morfológico ya mencionado y, finalmente, se establecieron los valores límite para ejecutar una segmentación en 3D de la biopelícula generada, según el volumen total de los objetos detectados (Fig. 7).



**Figura 7. Procesamiento de imágenes obtenidas en LSFM de biopelículas de UPEC en modelo dinámico.**

De igual manera que en el objetivo anterior, se utilizó la combinación de fluoróforos Syto 61/YOYO-1 para obtener información sobre el estado fisiológico bacteriano y estructural de la biopelícula.

### **3.10 Comparación de la formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cuanto a su cinética y características morfológicas, en condiciones de cultivo estático vs dinámico.**

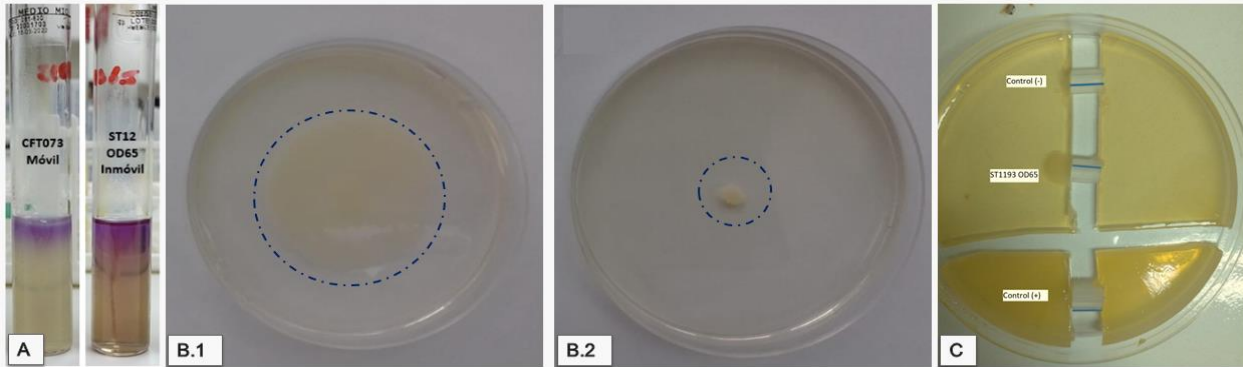
Para la ejecución de este objetivo se analizaron y compararon los resultados de las biopelículas formadas por la cepa UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en el sistema de cultivo estático y dinámico, en caldo LB. El análisis se centró en la cinética de formación y las características morfológicas de estas biopelículas, según los parámetros definidos anteriormente.

## **4. Resultados**

### **4.1 Caracterización fenotípica de la cepa de *E. coli* UPEC ST12 OD65 y detección de la formación de biopelículas**

El cultivo de la cepa de UPEC ST12 OD65 en Agar MacConkey evidenció una colonia característica de *E. coli* en cuanto a su morfología, pero lactosa negativa. Respecto de su caracterización fenotípica, se destaca su motilidad negativa en el agar MIO (Fig. 8). El resto de las pruebas de la batería bioquímica dieron resultados esperados, salvo la lactosa negativa. La cepa control UPEC CFT073 mostró el desarrollo de colonias lactosa positivo en Agar MacConkey y pruebas bioquímicas de *E. coli* según lo esperado.

El estudio de motilidad de UPEC ST12 OD65 en agar blando fue negativo para la cepa de UPEC ST12 OD65 y también la prueba de movilidad a través de catéter en agar TSA, como se puede apreciar en la Figura 8.



**Figura 8. Caracterización fenotípica de UPEC ST12 OD65.** A. Cultivo de cepas de *E. coli* en agar en medio movilidad - indol- ornitina (MIO), B. Cultivo de cepas de *E. coli* en agar blando, B.1 UPEC CFT073, B.2 UPEC ST12 OD65 C. Prueba de movilidad a través de catéter en agar TSA. Sabbuba, et al (2002).

En cuanto a la evaluación de la formación de biopelículas de la cepa de UPEC ST12 OD65 a través de ensayo de Cristal Violeta, podemos ver en la siguiente tabla (Tabla 2) el resultado de las determinaciones de absorbancia a 590 nm.

	Exp-1	Exp-2	Exp-3	Promedio
Blanco	0,07033333	0,04677778	0,048	0,055037
Promedio Cepa (ST12 OD65)	0,94666667	0,55722222	1,053	<b>0,8522962</b>

**Tabla 2- Media de las Densidades Ópticas (DO) obtenidas en el ensayo de Cristal Violeta.**

Según los criterios propuestos por Villegas, *et al.* 2013 (Tabla 1), la cepa de UPEC ST12 OD65 es una cepa formadora de biopelículas fuerte.

#### **4.2 Detección, cinética de formación y caracterización morfológica de biopelículas en cultivo estático de la cepa UPEC ST 12 OD65 y la cepa control UPEC CFT073**

#### **4.2.1 Detección, cinética de formación y caracterización morfológica de biopelículas en cultivo estático de la cepa control UPEC CFT073**

El análisis de las imágenes obtenidas en el microscopio confocal Zeiss Axiovert-200, evidenció que la fase de adherencia bacteriana reversible al cubreobjetos, que marca el inicio del desarrollo y cinética de formación de la biopelícula en la cepa de *E. coli* CFT073, se establece entre 1-2 horas de iniciado el cultivo, caracterizada por un número reducido de bacterias adheridas al sustrato (Fig. 9, 10). Además del aumento de la superficie colonizada, a las 3 horas observamos las primeras microcolonias bacterianas, signo que indica el comienzo de la adherencia irreversible. Esta etapa también considera el inicio de la síntesis de matriz de EPS, lo que se condice con el aumento del volumen total. Transcurridas 5 horas de iniciado el cultivo, podemos visualizar agrupaciones con mayor densidad celular y junto a esto, el primer cambio conformacional de 2D a 3D, característico de la fase de maduración I. En el periodo comprendido entre las 6 y 10 horas, tanto la superficie colonizada como el volumen de la biopelícula formada, tienden a aumentar. Sin embargo, presentan algunas fluctuaciones que se relacionarían con una reorganización a nivel celular. Posteriormente, se visibilizó un aumento de la densidad y de cohesión celular en el tiempo, alcanzando la cobertura total del campo observado (2370,26  $\mu\text{m}^2$ ) a las 11 horas. Este comportamiento se mantiene durante las 12 y 24 horas siguientes, alcanzando una mayor densidad celular y compactación entre las 16 y 23 horas, característicos de una biopelícula en fase de maduración II. A partir de las 24 horas, es posible observar sectores con bacterias en reordenamiento o dispersión, siendo más evidente a las 48 y 72 horas, acompañado de una disminución en la superficie colonizada y también del volumen total, dando paso a la fase de dispersión. En general y en base al análisis cualitativo de las imágenes, la arquitectura de la biopelícula formada por UPEC CFT073 en cultivo estático se caracteriza por ser aplanada, estable y compacta.

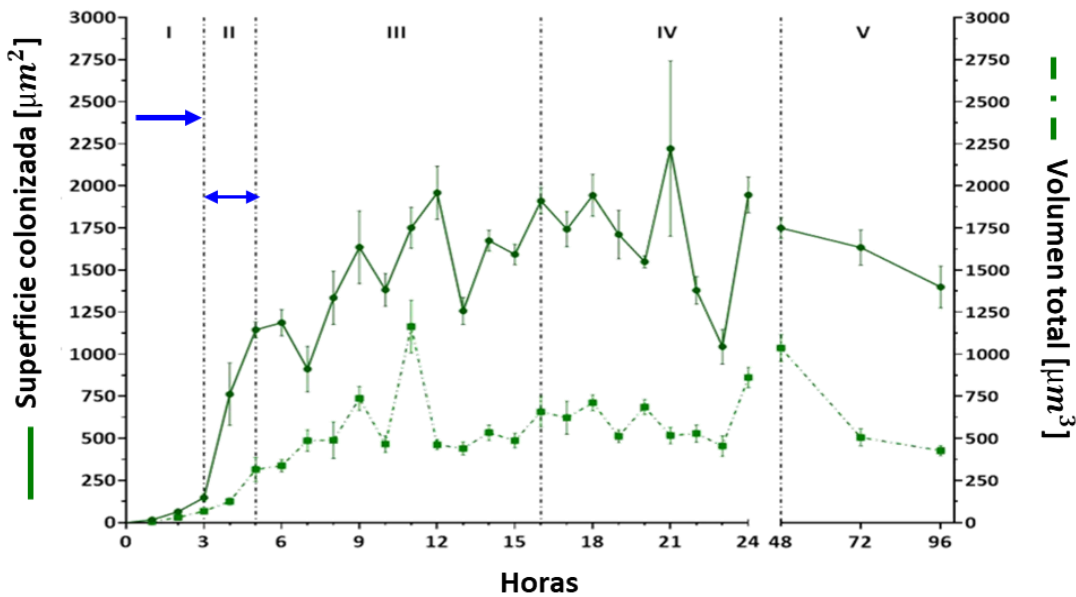
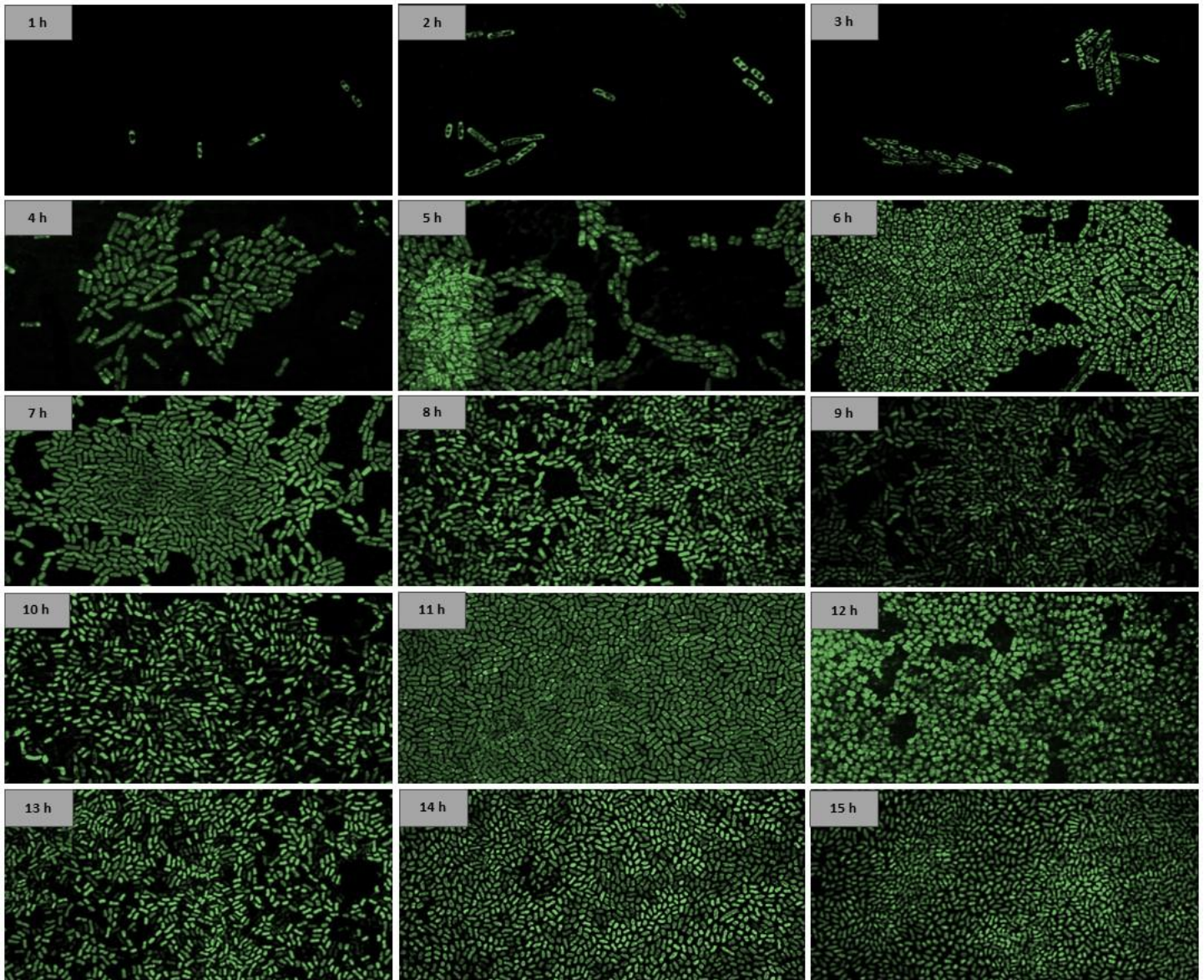
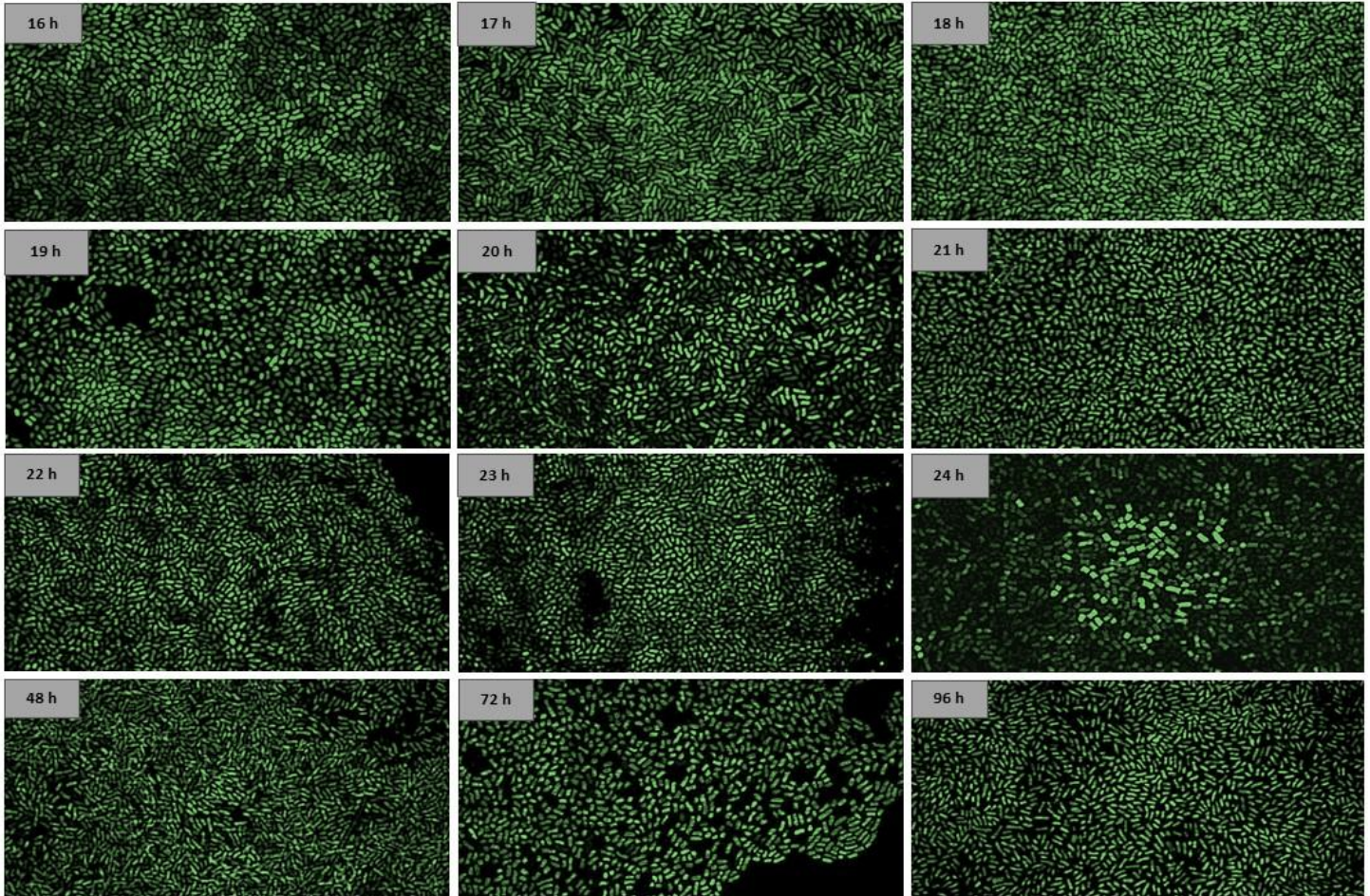


Figura 9. Gráfico de valores promedio y error estándar para Superficie colonizada ( $\mu\text{m}^2$ ) y Volumen de la biopelícula ( $\mu\text{m}^3$ ) de UPEC CFT073, en cultivo estático. Etapas de formación de biopelículas: **I.** Adherencia reversible, **II.** Adherencia irreversible, **III.** Maduración I, **IV.** Maduración II, **V.** Dispersión. Los valores se calculan con relación a un campo de visualización de  $2370,26 \mu\text{m}^2$ .

La cinética de formación de biopelículas de UPEC CFT073 en cultivo estático, se resume en la figura 10. Las imágenes corresponden a fotografías representativas del desarrollo para cada hora. La totalidad de imágenes adquiridas para cada hora de cultivo, se pueden observar en el Anexo I.





*Figura 10. Panel representativo de la cinética de formación de biopelículas de UPEC CFT073, en cultivo estático.*

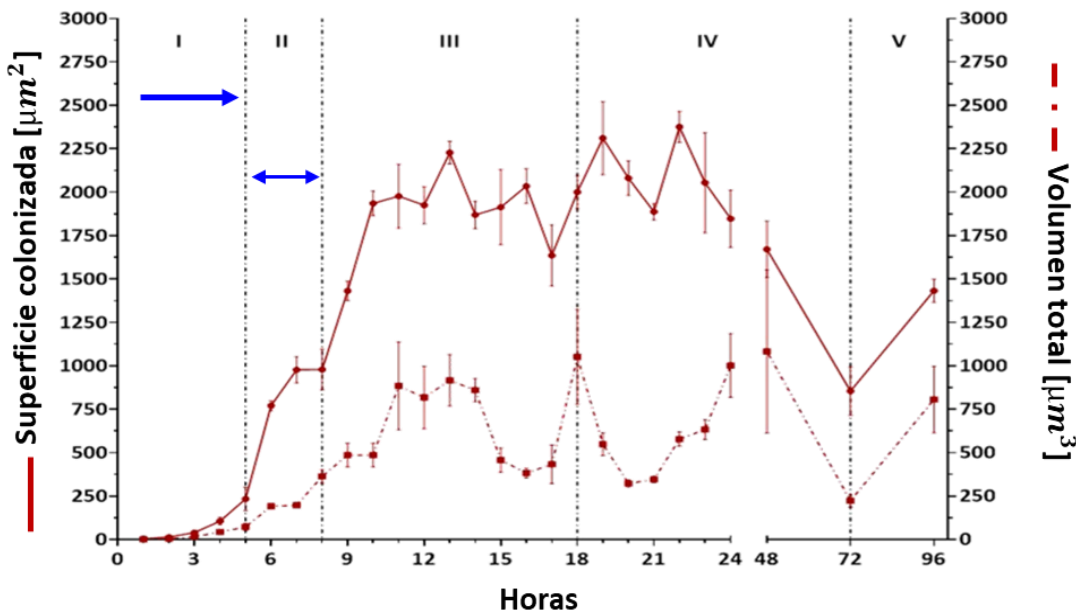
Vista de Proyección de Máxima intensidad (MIP) de las biopelículas cultivadas entre las 1-24, 45, 72 y 96 h.

#### **4.2.2 Detección, cinética de formación y caracterización morfológica de biopelículas en cultivo estático de la cepa UPEC ST 12 OD65 en caldo LB.**

En cuanto a la cepa de *E. coli* ST12 OD65, esta cursa con una fase de adherencia reversible más extensa, comprendida entre la 1- 4 horas de iniciado el cultivo (Fig. 11, 12), periodo en que también vemos un aumento de la superficie colonizada y el volumen total. A las 5 horas de cultivo podemos observar la formación de microcolonias, junto a un aumento de la superficie colonizada y el volumen total, iniciando la fase de adherencia irreversible. Una vez superada esta etapa, entre las 8 y 11 horas, tanto el volumen como la superficie colonizada aumentan de forma constante,

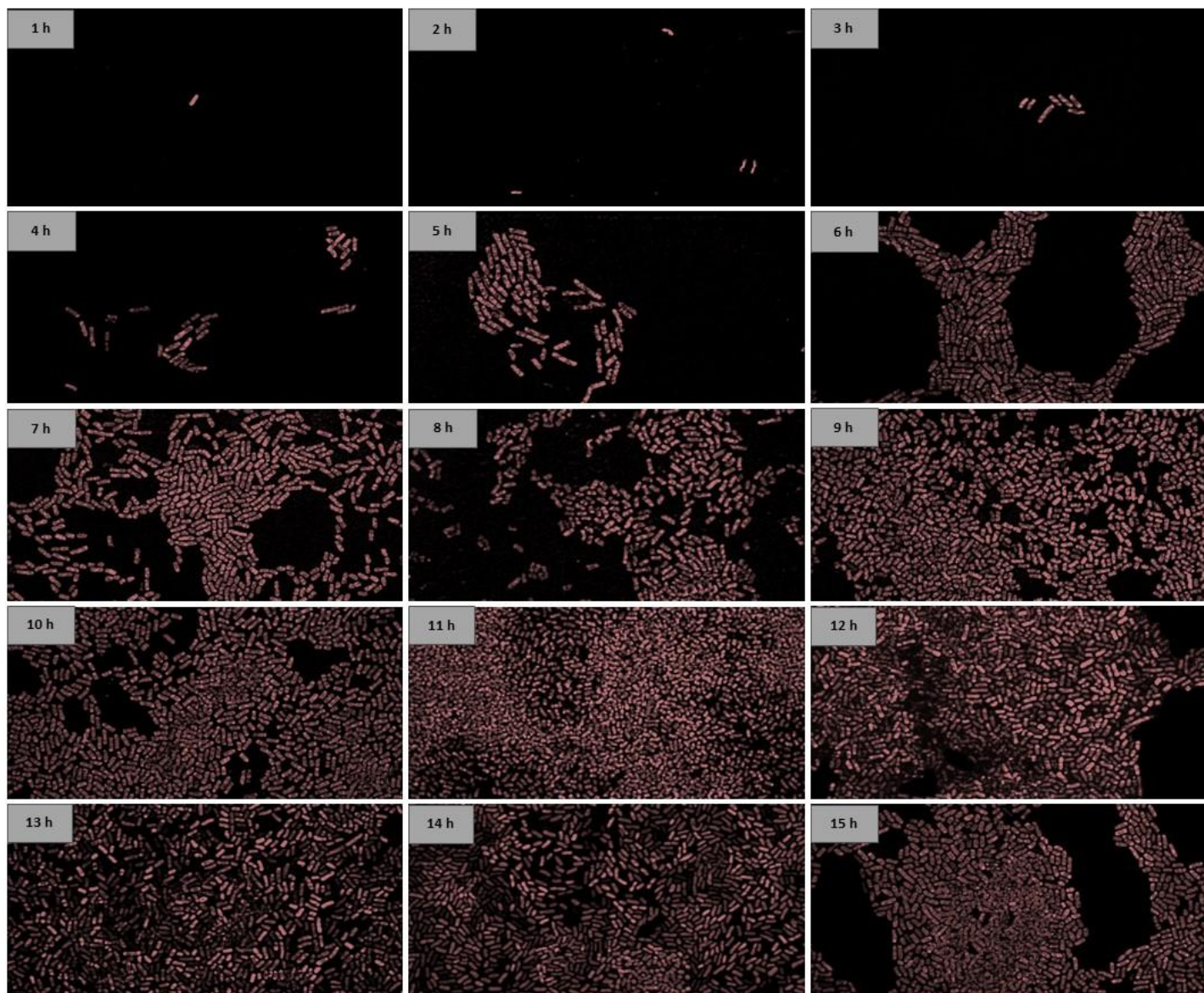


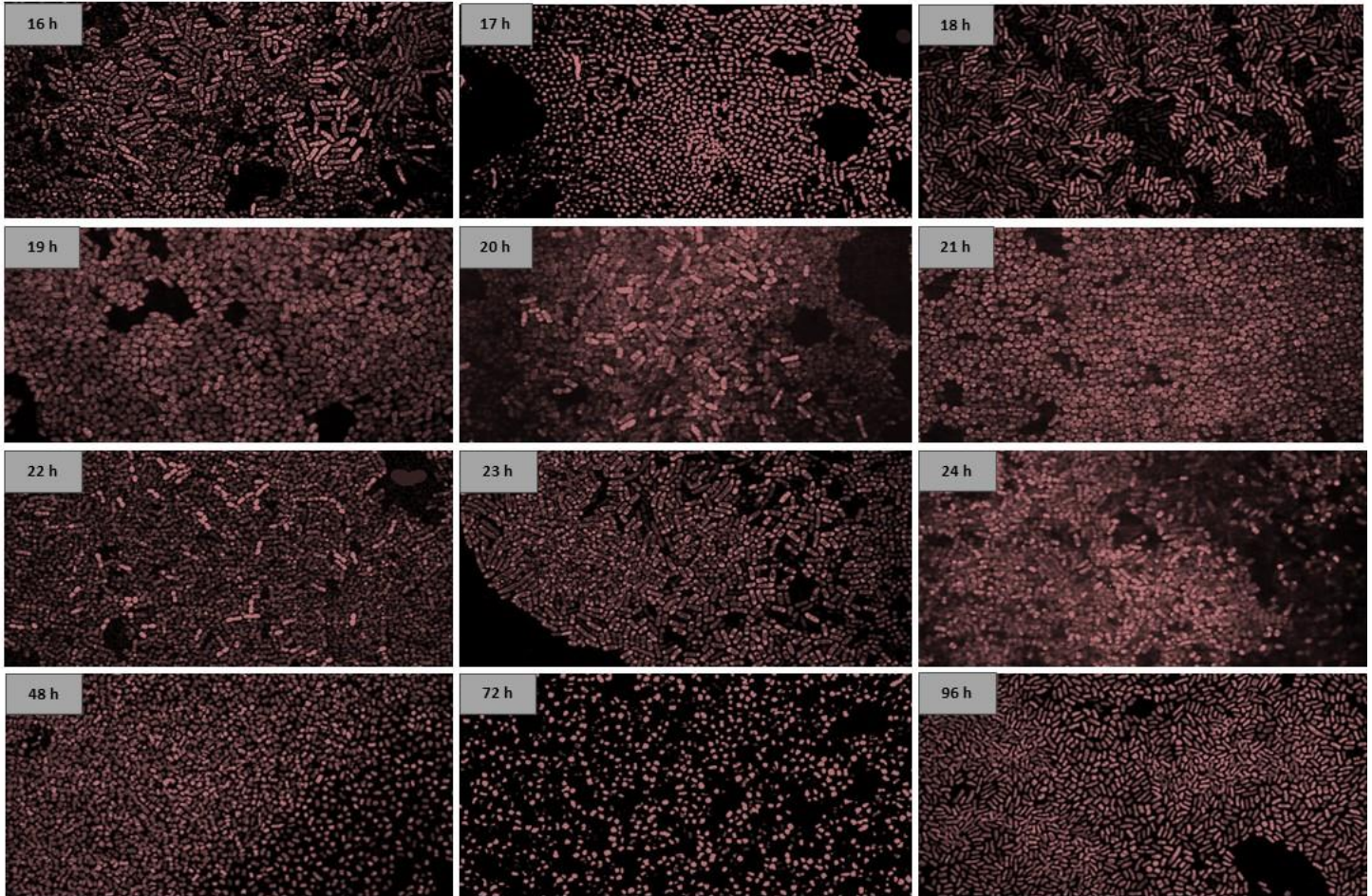
visualizándose agrupaciones con mayor densidad celular. Específicamente, a las 11 horas se observa la transición entre biopelícula 2D a 3D, marcando el inicio de la etapa de maduración I. Entre las 12 y 19 horas, el análisis de los parámetros morfológicos evidenció fluctuaciones, tanto para la superficie colonizada, como para el volumen total. Las fotografías adquiridas en estos tiempos muestran cambios constantes en el ordenamiento bacteriano y también, a nivel morfológico (Fig.12). La fase de maduración II se desarrolla entre las 18 y 22 horas, registrándose una disminución de la superficie colonizada y un aumento del volumen total, además de observarse una mayor compactación de la biopelícula. Este fenómeno se mantendría constante hasta las 48 h. Por último, a las 72 horas comienza la etapa de dispersión, observándose una reducción de la biomasa y del volumen total. Sin embargo, a las 96 h ocurre una reorganización celular/estructural, aumentando nuevamente la superficie colonizada y el volumen, originando una organización 3D. Los resultados del análisis cualitativo de las imágenes evidencian que la biopelícula formada por la cepa de UPEC ST12 OD65 es más gruesa, densa, irregular e inestable que la formada por la cepa control.



**Figura 11.** Gráfico de valores promedio y error estándar para Superficie colonizada ( $\mu\text{m}^2$ ) y Volumen de la biopelícula ( $\mu\text{m}^3$ ) de UPEC ST12 OD65, en cultivo estático. Etapas de formación de biopelículas: **I.** Adherencia reversible, **II.** Adherencia irreversible, **III.** Maduración I, **IV.** Maduración II, **V.** Dispersión. Los valores se calculan con relación a un campo de visualización de  $2370,26 \mu\text{m}^2$ .

La cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 en cultivo estático, se resume en la figura 12. Las imágenes corresponden a fotografías representativas del desarrollo para cada hora.





**Figura 12.** Panel representativo de la cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65, en cultivo *estático*. Vista de Proyección de Máxima intensidad (MIP) de las biopelículas cultivadas entre las 1-24, 45, 72 y 96 h.

Si bien, *E. coli* ST12 OD65 exhibe este comportamiento inmóvil, el cual retrasaría las fases iniciales de adhesión, el análisis de los parámetros morfológicos evidencia que, una vez establecida la adherencia irreversible, el desarrollo de las siguientes fases de formación de la biopelícula es equivalente a la cepa control móvil.

#### **4.3 Determinación de la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa UPEC ST12 OD65 y la cepa control UPEC CFT073 en cultivo dinámico**

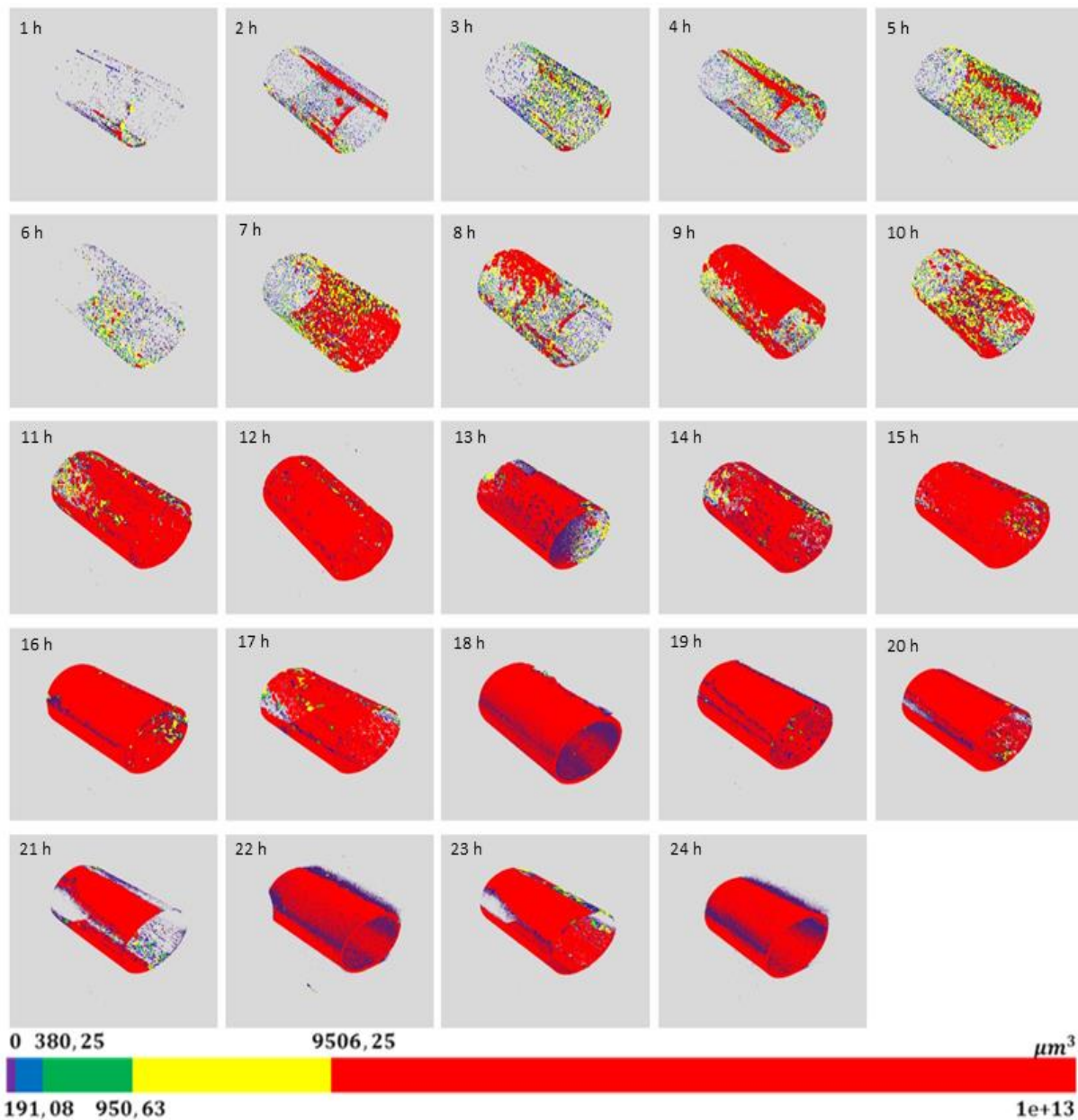
#### 4.3.1 Determinación de la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa control UPEC CFT073 en cultivo dinámico

A partir del análisis cualitativo de la reconstrucción en 3D de las imágenes adquiridas en LSM de los tubos FEP colectados cada una hora, los resultados obtenidos son los siguientes:

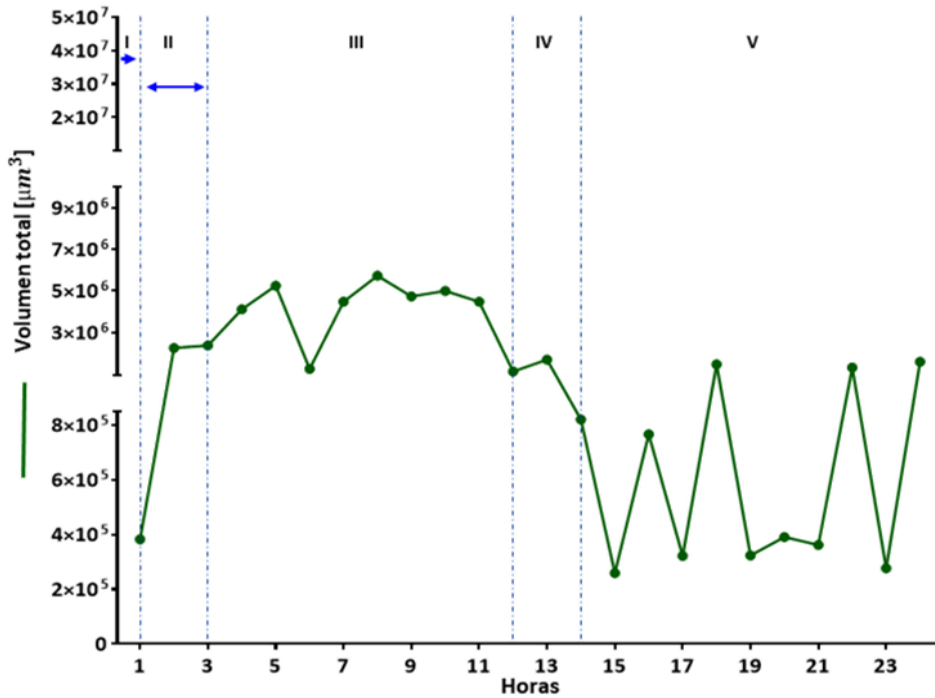
Transcurrida 1 hora del experimento en condiciones dinámicas de la cepa UPEC CFT073 (Fig.13 y 14), podemos visualizar un número reducido de estructuras bacterianas, cuyo volumen fluctúa entre 0 y  $380,25 \mu\text{m}^3$ , correspondientes con las características de la fase de adherencia reversible. A las 2 horas ya es posible visualizar un mayor número de estructuras con un volumen superior a  $950,63 \mu\text{m}^3$ , distribuidas heterogéneamente por el sustrato, por lo que se estableció en este punto el inicio de la fase de adherencia irreversible. Entre las 3-5 horas posteriores, se desarrolla la fase de maduración I, caracterizada por un aumento de las estructuras adheridas distribuidas homogéneamente a través del tubo, cuyo volumen es muy heterogéneo varía mayoritariamente entre  $191,08 - \sim 9000,00 \mu\text{m}^3$ . Específicamente, a las 5 horas podemos visualizar un aumento en la cantidad de estructuras que superan los  $1 \times 10^{13} \mu\text{m}^3$  de magnitud. Sin embargo, a las 6 horas se observa un notorio descenso en el volumen y también, de las estructuras adheridas al tubo, seguido de un aumento de las estructuras de mayor volumen que cubren homogéneamente la superficie, a las 7 horas. Si bien el *peak* del volumen total se da a las 8 horas, en las imágenes se observa una reducción del número de estructuras adheridas y también de su volumen. Entre las 9 y 11 horas siguientes, se cuantificó una reducción del volumen total de la biopelícula, pero un aumento progresivo de las estructuras adheridas al tubo FEP, cubriéndolo en gran parte. La fase de maduración II comenzaría a las 12 horas, marcada por la cobertura total del sustrato y una disminución importante del volumen total, por lo que habría una mayor compactación de la biopelícula al interior del tubo, dando origen a lo que pareciera ser una gran estructura tipo alfombra. A las 13 horas es posible visualizar un aumento de estructuras de menor volumen situadas en el lumen del tubo, junto a la cobertura de gran parte de este. Sin embargo, el primer evento dispersivo se da a las 14 horas, en donde se cuantificó una disminución del volumen total, junto a la aparición de sectores del tubo sin cubrir, dando paso a la última etapa de formación de biopelículas. A partir de las 15 horas y hasta finalizar el experimento, los sectores libres son recolonizados por estructuras de menor volumen, originándose ciclos de dispersión y recolonización del sustrato, consolidándose nuevamente la cobertura total del tubo FEP a las 19, 22 y 24 horas. En

general y en base al análisis cualitativo y cuantitativo de los modelos en 3D obtenidos del procesamiento de las imágenes adquiridas en LSM, la biopelícula formada por UPEC CFT073 en cultivo dinámico exhibe una arquitectura plana y compacta.

La cinética de formación de biopelículas de UPEC CFT073 en cultivo dinámico, se resume en la figura 13. El siguiente panel corresponde a los modelos 3D de las imágenes del tubo FEP adquiridas en LSM, representativas del desarrollo para cada hora. La totalidad de los modelos obtenidos del procesamiento de imágenes para cada hora de cultivo, se pueden observar en el Anexo II.



**Figura 13. Cinética de formación de biopelículas de UPEC CFT073 en cultivo dinámico.** Panel representativo de las reconstrucciones en 3D obtenidas del procesamiento de imágenes adquiridas en LSM, correspondientes a la formación de biopelículas durante 24 horas.



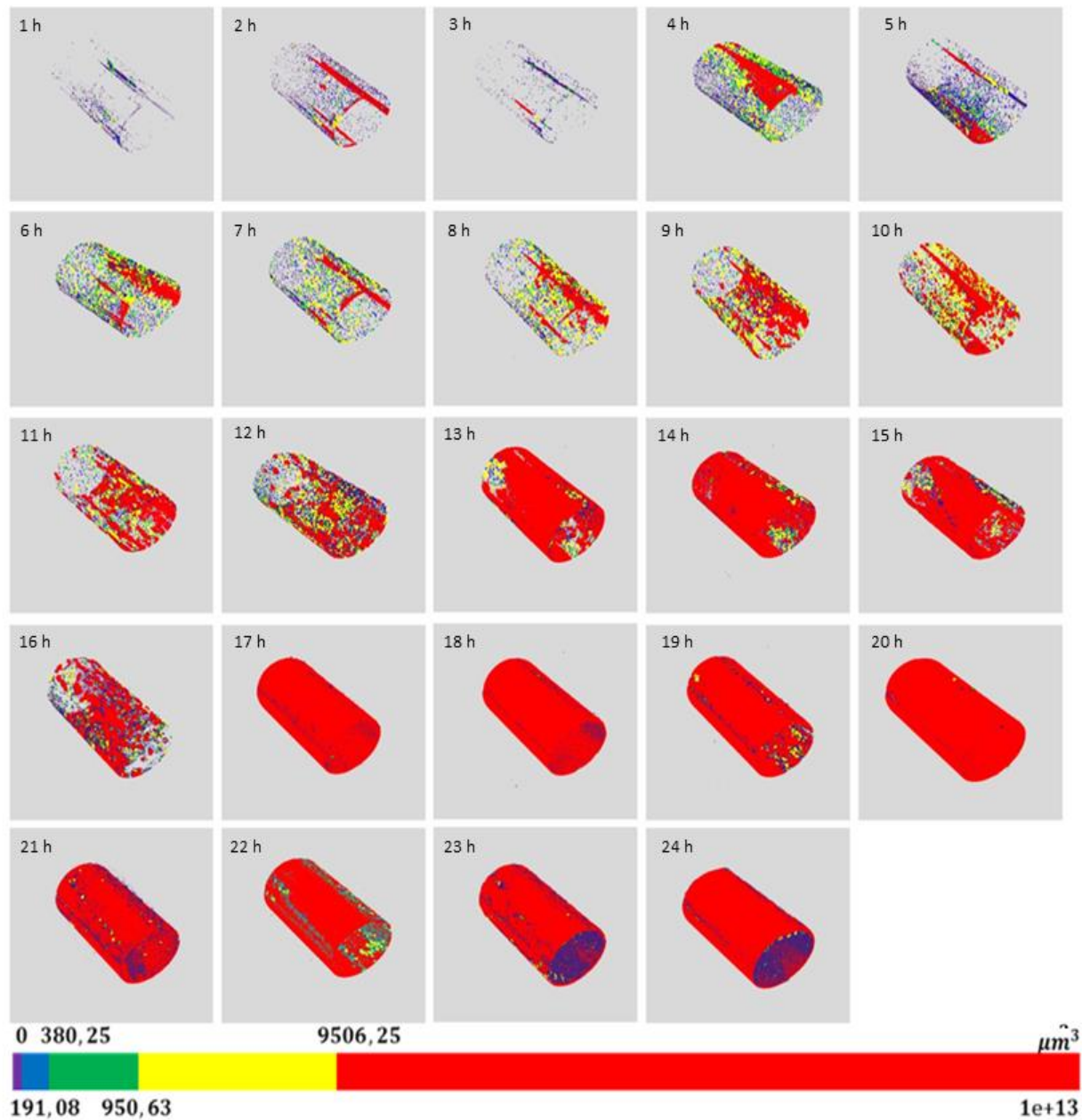
**Figura 14. Gráfico de Volumen total (µm³) de la biopelícula formada por UPEC CFT073 en el tubo FEP, en cultivo dinámico.** Etapas de formación de biopelículas: **I.** Adherencia reversible, **II.** Adherencia irreversible, **III.** Maduración I, **IV.** Maduración II, **V.** Dispersión.

### 4.3.2 Determinación de la presencia, formación y morfología de biopelículas de la cepa UPEC ST12 OD65 en cultivo dinámico

La cepa de *E. coli* ST12 OD65, por otra parte, cuenta con una fase de adherencia reversible más extensa, desarrollándose durante las 3 primeras horas (Fig.16). En este periodo es posible observar una cantidad reducida de estructuras adheridas y distribuidas heterogéneamente al interior del tubo, con un volumen que fluctúa entre 191,08 - 380,00 µm³ (Fig.15). En particular, a las 3 horas ocurre una marcada reducción de las bacterias adheridas, disminuyendo también el volumen total cuantificado. No obstante, esta situación es revertida a las 4 horas, cuando la biopelícula consigue

iniciar la fase de adherencia irreversible. Tanto en el análisis cualitativo como cuantitativo, se evidencia un aumento en la cantidad de estructuras adheridas que cubren homogéneamente el sustrato, y junto con esto, un aumento considerable del volumen, tanto de las agrupaciones bacterianas como del total de la biopelícula en formación. A las 5 horas, nuevamente se da una reducción de las bacterias adheridas y del volumen total. A partir de las 6 y hasta las 12 horas, es posible visualizar estructuras de mayor volumen (superando los  $1 \times 10^{13} \mu\text{m}^3$  de magnitud), que comienzan a agruparse, evidenciando la transición entre estructuras 2D a 3D, que dejan espacios entre ellas. Estas características dan cuenta de que la biopelícula se encuentra en fase de maduración I. Desde las 13 horas en adelante, es posible observar estructuras de gran volumen que cubren gran parte de la superficie, junto a una disminución sustantiva del volumen total. La etapa de maduración II comienza a las 14 horas, con un aumento del volumen y la cobertura totales del tubo FEP. A partir de las 15-16 horas en adelante, ocurrirían ciclos de dispersión y recolonización de la superficie, que conllevan una disminución del volumen total y un aumento de la cobertura del sustrato y viceversa. Este comportamiento cíclico se repite aproximadamente cada 2-3 horas, hasta las 23 horas. Finalmente, a las 24 horas se cuantificó un aumento considerable del volumen total, acompañado de la cobertura total del lumen del tubo, junto al desarrollo simultáneo de estructuras de menor volumen.

En general y con base en el análisis cualitativo y cuantitativo de los modelos en 3D obtenidos del procesamiento de las imágenes de la biopelícula formada por UPEC ST12 OD65 en cultivo dinámico, su arquitectura se caracteriza por la formación de agrupaciones bacterianas densas e irregulares, distribuidas de manera heterogénea por el sustrato.



**Figura 15. Cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 en cultivo dinámico.** Panel representativo de las reconstrucciones en 3D obtenidas del procesamiento de imágenes adquiridas en LSM, correspondientes a la formación de biopelículas durante 24 horas.



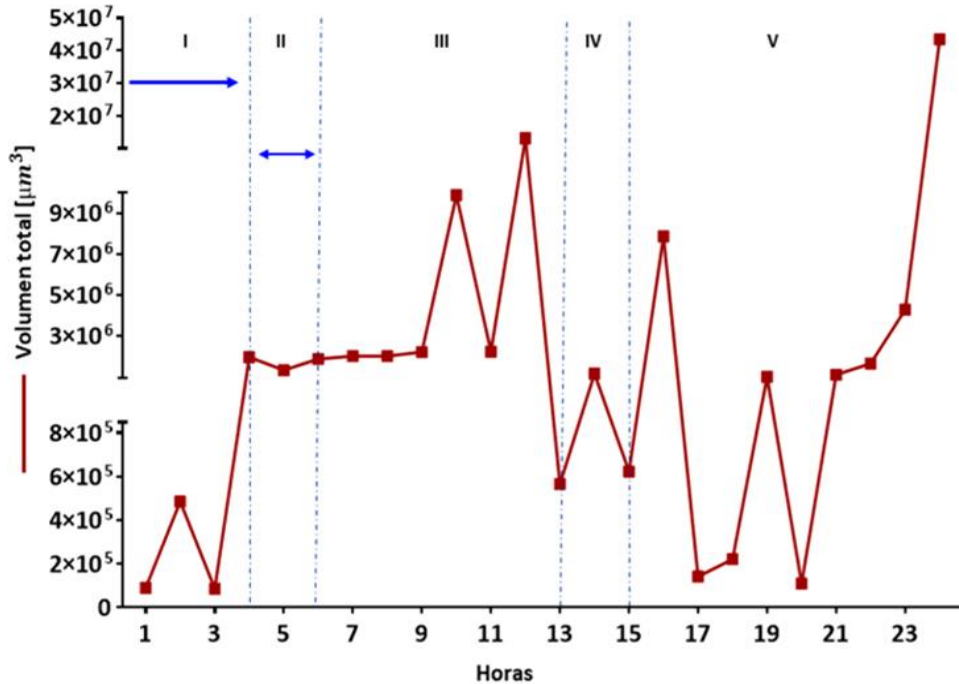


Figura 16. Gráfico de Volumen total ( $\mu\text{m}^3$ ) de la biopelícula formada por UPEC ST12 OD65 en el tubo FEP, en cultivo dinámico. Etapas de formación de biopelículas: I. Adherencia reversible, II. Adherencia irreversible, III. Maduración I., IV. Maduración II, V. Dispersión.

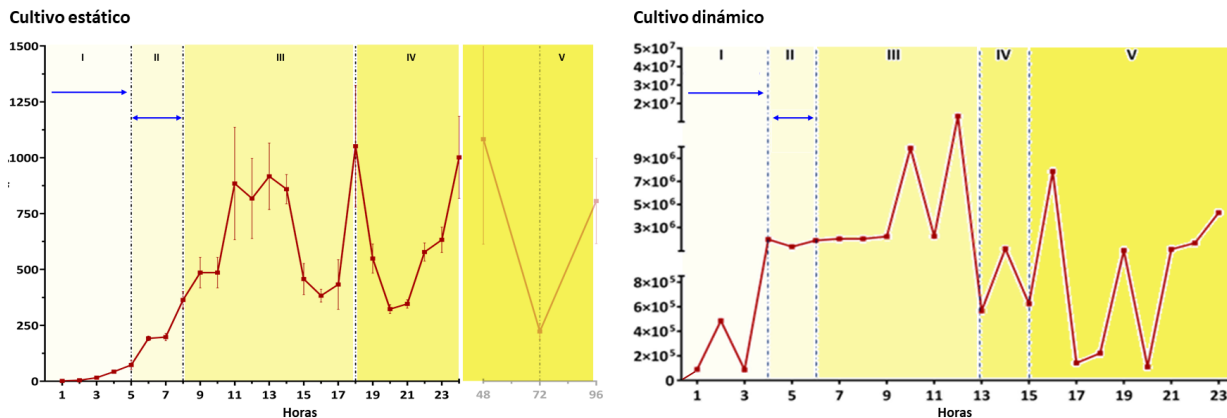
#### 4.4 Comparación de la formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cuanto a su cinética y características morfológicas, en condiciones de cultivo estático vs dinámico.

Este objetivo planteó hacer una comparación en cuanto a la cinética de formación de la biopelícula de *E. coli* ST12 OD65 y su morfología, según el modelo de cultivo realizado.

El análisis cualitativo de las imágenes obtenidas tras el cultivo estático y dinámico, junto al análisis cuantitativo del volumen total de la biopelícula de UPEC ST12 OD65, también en ambos métodos, muestran una correlación entre la cinética del crecimiento y desarrollo de la biopelícula en el tiempo (Fig.17). En ambos métodos de cultivo, se observa un retraso en la adherencia inicial de la cepa de UPEC ST12 OD65 al sustrato correspondiente. Sin embargo, en el cultivo dinámico esta etapa es 1 hora menos extensa que en el cultivo estático. También, la fase de adherencia irreversible es más corta en el sistema de cultivo dinámico (entre las 4-5 horas) que en estático (5-7 horas). Si

bien se conserva la ventaja temporal del cultivo dinámico, la fase de maduración I es 8 horas más extensa en este tipo de cultivo que en el método estático. Sin embargo, durante la fase de maduración II podemos ver que la biopelícula desarrollada en el cultivo estático sería más estable, extendiéndose entre las 18 a 22 horas, que el cultivo dinámico, en donde se evidencia solo 1 hora de duración. Seguido de esto, la fase de dispersión comienza a las 15 horas en el cultivo dinámico, evidenciándose dispersiones y reorganizaciones bacterianas sucesivas hasta completar las 24 horas de ensayo. En cambio, en condiciones de cultivo estático, los signos de dispersión son más claros recién a las 72 horas de cultivo.

En cuanto a la comparación morfológica, es importante mencionar que no fue posible llevar a cabo una comparación equivalente, debido a que la magnificación con la que fueron adquiridas las imágenes en el microscopio confocal Zeiss Axiovert-200 (100X) no es equivalente a la utilizada para la captura en el Microscopio de Fluorescencia Light Sheet (10X). Sin embargo, al observar las imágenes adquiridas sobre la formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 para ambos métodos de cultivo, es posible identificar similitudes en la arquitectura de la biopelícula generada, caracterizada por la formación de estas agrupaciones tridimensionales densas, irregulares e inestables.



**Figura 17. Cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cultivo estático vs dinámico.** Etapas de formación de biopelículas: **I.** Adherencia reversible, **II.** Adherencia irreversible, **III.** Maduración I, **IV.** Maduración II, **V.** Dispersión.

## 5. Discusión

Las biopelículas son comunidades organizadas capaces de adherirse a diferentes superficies y sintetizar una matriz extracelular que les permite protegerse de numerosos factores externos, como la acción de los antimicrobianos entre otros. La ITU asociada a CUP es una de las patologías intrahospitalarias más frecuentes. La gran mayoría de estas infecciones son causadas por agentes bacterianos, entre los cuales se destaca a UPEC, responsable de hasta el 60% de los casos. Generalmente *E. coli* exhibe un comportamiento móvil, ya que posee flagelos peritricos y asciende por la uretra tras la inserción de la sonda, adhiriéndose a esta superficie y formando biopelículas.

En este estudio se evaluó la capacidad de la cepa UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, para formar biopelículas en dos sistemas de cultivo, estático y dinámico, cuyas condiciones influyen en su desarrollo. Considerando que cada biopelícula microbiana es única (3,4), caracterizamos cinética y morfológicamente la formación de estas comunidades bacterianas en la cepa de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, la cual fue comparada con la biopelícula formada por una cepa control, UPEC CFT073 móvil, en ambos métodos de cultivo.

### **Cinética de formación de biopelículas de UPEC en cultivo estático**

En términos generales, el crecimiento y desarrollo de las biopelículas de UPEC CFT073 móvil y UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cultivo estático, es consistente con lo descrito por Schlapp, G. *et al*, en 2011, observándose el desarrollo de las cinco fases principales: **(I)** adherencia bacteriana reversible, caracterizada por contar con un número reducido de bacterias adheridas, morfología celular alargada y ausencia de matriz de EPS, **(II)** adherencia irreversible, representada por la conformación de microcolonias y el inicio de la síntesis de matriz, **(III)** maduración I, en donde se evidencia un aumento en la tasa de crecimiento y división bacterianos, disminución en la elongación bacteriana y, cambio conformacional de 2D a 3D, **(IV)** maduración II, alcanzando el volumen y densidad bacteriana máxima, una mayor compactación y producción de EPS y, por último **(V)** reducción de la biomasa bacteriana y de la matriz, por efecto del desprendimiento y dispersión (18). Sin embargo, las principales diferencias de la cepa UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil respecto a la cepa UPEC CFT073 móvil, están dadas en los tiempos

comprendidos en el desarrollo de cada etapa y en las características morfológicas de las biopelículas generadas.

Nuestros resultados evidencian que la formación de biopelículas por parte de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cultivo estático, comienza con una fase de adherencia reversible más extensa que la cepa control. Las diferencias en el tiempo en que tardan las bacterias en consolidar la adherencia dependen tanto de su cercanía al sustrato, como de las interacciones entre sus estructuras de superficie (apéndices bacterianos) y las moléculas de superficie del sustrato (19). Estas interacciones pueden ser favorecidas por ciertas características celulares que aumentan la probabilidad de consolidar una adherencia estable y productiva al alcanzar el sustrato. En el caso de *E. coli*, la adherencia inicial a las superficies se ve acelerada cuando poseen flagelos funcionales, los cuales le permiten a la bacteria superar ciertas fuerzas de repulsión provenientes de la superficie (26). En nuestro caso, la cepa en estudio UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, exhibe un retraso en la adherencia reversible, lo cual concuerda con lo descrito por Kim, T. *et al*, 2008 quienes demostraron que cepas inmóviles de *Y. enterocolitica*, que carecen de flagelos, exhiben un retraso en la fase de adherencia reversible, consolidando la adherencia irreversible a las 6 horas (49). En la misma línea, nuestros resultados son similares a los descritos por Wang, F *et al*, en 2020, quienes compararon la formación de biopelículas de mutantes isogénicos flagelares de *Salmonella* entérica Serovar Typhimurium, respecto de una cepa WT, durante 20 horas. En este estudio, observaron que a las 6 horas post inoculación, los bacilos WT se agrupaban en pequeños racimos, transformándose en microcolonias constituidas por múltiples capas a las 20 horas de incubación. No obstante, a las 6 horas de incubación, los mutantes isogénicos flagelares registraron una pequeña cantidad de agrupaciones conformadas por células dispersas, que a las 20 horas presentaba un menor número de colonias y una menor cobertura del área total que la cepa WT, confirmando que la motilidad mediada por flagelo desempeña un rol importante en las etapas iniciales de formación de biopelículas (85), lo cual podría explicar la situación de retraso de la adherencia reversible observada en nuestra cepa de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil.

Independientemente del retraso en las etapas iniciales de formación de biopelículas, la cepa de UPEC ST12 OD65 forma biopelículas maduras en cultivo estático, alcanzando un volumen similar al de la biopelícula formada por la cepa control. Nuestro resultado contrasta con lo mencionado por Pratt & Kolter en 1998, quienes demostraron que las cepas de *E. coli* que carecen de flagelos

o que poseen flagelos paralizados, presentaron defectos graves en la formación de biopelículas en cultivo estático, especialmente en sus etapas iniciales (49). Además, estas cepas mostraron problemas de adherencia al PVC, formando pequeños y densos grupos celulares, similares a los observados en la biopelícula formada por la cepa de UPEC inmóvil, por lo que la motilidad también puede estar implicada en la expansión lateral de biomasa adherida y su posterior acumulación (49). Sin embargo, no se conoce el comportamiento cinético ni el desarrollo morfológico de la biopelícula en el periodo intermedio comprendido entre las 24 - 48 - 72 y 96 horas, porque para la ejecución de esta tesis, priorizamos dilucidar cómo es la cinética de formación de estas comunidades bacterianas en las horas que, según la bibliografía, la motilidad sería determinante para la adherencia a las superficies.

### **Morfología de las biopelículas de UPEC en cultivo estático**

La formación de agrupaciones y sus patrones espaciales involucran una serie de interacciones entre la motilidad asociada a la superficie, la proliferación celular y la producción de EPS. Mabrouk, N *et al*, en 2010 describieron la relación entre la motilidad y la morfología de las biopelículas formadas por *P. aeruginosa*. Observaron que, durante la adherencia reversible, las bacterias móviles pueden desprenderse y dispersarse para muestrear la superficie, originando biopelículas homogéneas y planas. Por el contrario, las cepas inmóviles, pasan directamente a la adherencia irreversible, ya que no pueden desprenderse activamente, por lo que su colonización se basa en las interacciones cercanas al origen, formando microcolonias aisladas, redondas y por crecimiento clonal (48,86). Esta información coincide con la caracterización morfológica de las biopelículas de UPEC, realizada a partir del análisis de las imágenes adquiridas en el microscopio confocal Zeiss Axiovert-200, que mostró diferencias en la distribución de la biopelícula sobre el cubreobjetos de vidrio y en la morfología de las estructuras generadas. La cepa de UPEC móvil originó una biopelícula que se distribuye de forma homogénea por el sustrato, de aspecto regular, plano y estable. En cambio, la biopelícula formada por la cepa de UPEC inmóvil exhibe estructuras de mayor volumen, distribuidas heterogéneamente a través del sustrato, caracterizada por la formación de agrupaciones más bien irregulares, densas e inestables, resultado que difiere de lo mencionado por Wood, T *et al*, 2006, quien indica que una baja motilidad en *E. coli* conduce a la formación de biopelículas planas, en comparación a las estructuras verticales formadas por *E. coli* móviles (87).

Sin embargo, sí se relacionan con las características morfológicas observadas por Wang, F *et al*, en 2020, quien describe la formación de estructuras internas más densas, en mutantes flagelares de *S. entérica* Serovar Typhimurium. Finalmente, estas variaciones morfológicas concuerdan con análisis microscópicos realizados en biopelículas de *E. coli*, que muestran una gran diversidad en la distribución de la población bacteriana y en su morfología (50).

### **Cinética de formación de biopelículas de UPEC en cultivo dinámico**

Con respecto a la cinética de formación y desarrollo de las biopelículas de las cepas de UPEC CFT073 y UPEC ST12 OD65 en cultivo dinámico, observamos un comportamiento similar al registrado en el cultivo estático. En esta ocasión, el estudio de las reconstrucciones 3D y también, el análisis cuantitativo del volumen total de la biopelícula formada para cada hora reveló que ambas cepas desarrollaron las 5 etapas de formación de biopelículas definidas anteriormente, en el transcurso de las 24 horas de experimento. Si bien, observamos nuevamente un retraso en la etapa de adherencia reversible e irreversible de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, respecto de su contraparte UPEC CFT073 móvil, este comportamiento no impide el establecimiento de la comunidad bajo condiciones de flujo.

Lecuyer, S *et al*, 2011 describieron que en las etapas iniciales de la formación de biopelículas de *P. aeruginosa* en microcanales de PDMS, el flujo aumenta el tiempo de permanencia de las bacterias en la interfaz del sustrato, favoreciendo tanto su adherencia como su dispersión (17,87). Por otro lado, Korber *et al*, 1989 realizaron experimentos con cepas móviles y no móviles de *P. fluorescens* y demostraron que, a contracorriente, las bacterias móviles se adhieren más rápidamente que las inmóviles (88). Esto podría explicar la heterogeneidad volumétrica que observamos en la biopelícula de UPEC ST12 OD65 en el transcurso del tiempo, en donde de forma simultánea a la adherencia de nuevas bacterias al sustrato, las agrupaciones conformadas previamente se desarrollan, dividen y transicionan entre una estructura 2D a 3D, facilitando la extensión de la biopelícula sobre la superficie. Esta heterogeneidad en la colonización deriva en una ralentización de la maduración de la biopelícula (4,26), explicando el lento progreso hacia la fase de maduración I observado en la cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65. Estos resultados, además coinciden con los experimentos realizados por Koseoglu, H. *et al*, 2006, los cuales revelaron que *E. coli* comienza a adherirse a la superficie del catéter urinario entre las 4-

12 horas, alcanzando la maduración de la biopelícula entre las 12 y 24 horas, periodo en que se visualiza canales de agua y un aumento de grosor (3). Sin embargo, no solo el crecimiento es favorecido por la presencia del flujo, ya que también influye en el desprendimiento de la biopelícula a altas velocidades y tensiones mecánicas (26). Fink, R *et al.* 2015 mencionan que este aumento puede dar lugar a una mayor fuerza de cizallamiento, aumentando la dispersión e incluso, evitando la formación de biopelículas (89,90).

### **Morfología de las biopelículas de UPEC en cultivo dinámico**

A partir del análisis cualitativo de la morfología de las biopelículas formadas en cultivo dinámico, podemos mencionar que la biopelícula generada por UPEC CFT073 exhibe una arquitectura plana, compacta y distribuida homogéneamente a través del tubo FEP, mientras que, la arquitectura de la biopelícula originada por UPEC ST12 OD65 se caracterizó por el desarrollo de agrupaciones bacterianas densas e irregulares, distribuidas heterogéneamente por el sustrato. Estas observaciones coinciden con lo reportado por O'Toole, G *et al.*, 2000, quienes indicaron, que si bien, los mutantes flagelares de *E. coli* logran hacer contacto con las superficies, estas no logran extenderse para cubrirla (13), por lo que presentan microcolonias clonales densas, de aspecto irregular o “punteado” (48) como lo observado en nuestro estudio.

Además, el análisis cuantitativo del volumen proveniente de las reconstrucciones 3D de los diferentes tubos, la cepa UPEC ST12 OD65 exhibió el crecimiento simultáneo de estructuras con diferente volumen a través del tiempo. Este fenómeno podría explicarse según el movimiento de un fluido, el cual solo puede darse en paralelo a una superficie plana, por lo que cerca de esta se crea un campo de cizalladura, en donde la velocidad del flujo volumétrico aumenta linealmente a medida que se aleja de la superficie. Esto tiene como consecuencia que las bacterias se mueven siguiendo líneas de corrientes cercanas a la superficie, por lo que el tiempo en que están en contacto con puntos del material es limitado, resultando en una distribución de bacterias capturadas con diferentes tiempos de residencia, lo que permite que algunas se dividan en este durante varias generaciones, mientras otras se agrupan o co-adhieren (19,38).

Se ha observado también, que los mutantes flagelares de *E. coli* forman biopelículas que se desprenden con mayor facilidad que las cepas silvestres móviles (21), afectando directamente la morfología de la estructura formada. Sin embargo, esto no solo supone una desventaja en el desarrollo y formación de biopelículas, sino que también puede ser una ventaja evolutiva dentro de la misma comunidad, ya que las bacterias con menos capacidad adhesiva logran desprenderse y dispersarse a través de la superficie con más facilidad que las fuertemente adhesivas, obteniendo acceso preferencial a los nutrientes que difunden por el medio (91). Este aumento en la concentración o disponibilidad de nutrientes se correlaciona con un aumento del número de células bacterianas adheridas (26).

### **Cinética de formación de biopelículas de UPEC: cultivo estático vs cultivo dinámico**

En cuanto a la comparación sobre la cinética de formación de biopelículas de UPEC ST12 OD65 en cultivo estático y dinámico, podemos mencionar que existe una correlación en el transcurso del tiempo. Si bien observamos un retraso en la adherencia inicial en ambos métodos, la fase de adherencia reversible e irreversible es menos extensa en el cultivo dinámico. Este comportamiento podría explicarse por diversas razones: características iónicas del sustrato, formación de una película acondicionadora, la velocidad del flujo y también, la concentración de nutrientes disponibles (26).

El tubo de etileno propileno fluorado o FEP, sustrato elegido para nuestro modelo de cultivo dinámico, generalmente es utilizado como revestimiento de tuberías y válvulas, debido a su alta resistencia química y propiedades dieléctricas, antiadherentes y deslizantes. Sin embargo, este polímero posee propiedades similares al teflón, descrita como una de las superficies hidrofóbicas no polares, en que la adherencia se da más rápido y más fuerte, a diferencia de los sustratos hidrofílicos, como el vidrio y los metales (26). Por otra parte, la formación de una película acondicionadora puede favorecer la velocidad y el alcance de la adherencia bacteriana. Esta película, compuesta de polímeros y moléculas adsorbidas, se forma en los dispositivos médicos debido a la exposición y posterior adsorción de componentes macromoleculares presentes en fluidos corporales como la sangre, orina, saliva, etc (26,37,38). En nuestros modelos, la película acondicionadora, formada probablemente por las sales y péptidos disueltos en el caldo LB, puede



ocultar las características electrostáticas e hidrofóbicas de la superficie, favoreciendo la adherencia microbiana (30). Con relación al flujo, uno de los factores que determina la formación de biopelículas en estas condiciones, es la cinética de transporte. Esta corresponde a la velocidad a la que las células llegan a una superficie desde un punto lejano y determina la rapidez con la que las bacterias comienzan a agruparse en el sustrato (19). Esto explicaría por qué observamos una mayor cantidad de estructuras adheridas al tubo FEP, entre las 3 y 4 horas en el cultivo dinámico, a pesar del comportamiento inmóvil de UPEC ST12 OD65. Por otro lado, Tsai, Y *et al* en 2005, evaluaron el papel del flujo en la formación de biopelículas de bacterias heterótrofas en un sistema de reactor anular, que emula las condiciones de un sistema de distribución de agua potable y, observaron cambios en el grosor, superficie y viabilidad de la comunidad, lo que concuerda con las características morfológicas de la biopelícula de UPEC ST12 OD65 en condiciones dinámicas (93). Por último, Zhang, Y *et al*, 2022 demostraron que el suministro continuo de nutrientes presentes en el flujo de un sistema dinámico acelera la proliferación de la biopelícula de *P. aeruginosa*, generando estructuras de mayor volumen, a diferencia de las formadas en condiciones estáticas, con limitación de nutrientes y acumulación de productos metabólicos de desecho (39).

Adicionalmente, la interacción entre la tensión de cizallamiento y el crecimiento derivado del consumo de nutrientes en el tiempo influye directamente en la morfología de la biopelícula (1). Por ejemplo, las biopelículas cultivadas en una interfaz líquido- líquido en donde hay un cambio constante en torno al flujo, originan estructuras más heterogéneas con una menor densidad bacteriana que las cultivadas en una interfaz aire- líquido, caracterizadas por ser más planas y homogéneas. Asimismo, el estrés causado por el cizallamiento mecánico tendría un efecto significativo en el grosor y densidad de la biopelícula, generando biopelículas con estructuras heterogéneas, delgadas y de gran fuerza adhesiva (20). Estos antecedentes podrían explicar por qué a partir de las 15-16 horas en adelante, ocurrirían ciclos de dispersión y recolonización de la superficie, en el cultivo dinámico, que conlleva una disminución del volumen total y un aumento de la cobertura del sustrato y viceversa. Esto se puede relacionar también con la compactación de la biopelícula que es distinta en medio estático y dinámico, debido a la superficie disponible. En nuestro modelo estático tenemos un vidrio plano como superficie y en modelo dinámico, un cilindro con un lumen de 0,8 mm de diámetro interno, cuya luz disminuye a medida que se

desarrolla y crece la biopelícula en su interior, aumentando la fuerza de cizallamiento proveniente del flujo.

En resumen, la velocidad y el alcance de la adherencia bacteriana para la formación de biopelículas dependen tanto de la detección de superficies a través de interacciones fisicoquímicas e hidrofobicidad, como de la presencia o ausencia de apéndices bacterianos como flagelos y fimbrias y, por último, de la producción de EPS (19, 26). Sin embargo, la forma y tamaño de la biopelícula puede verse afectada mayormente por la disponibilidad de nutrientes, de oxígeno y la fuerza de cizallamiento (17,26,38).

Nuestros resultados evidencian la importancia de la motilidad flagelar de UPEC durante las etapas iniciales de formación de biopelículas. Si bien, no hemos determinado el origen de este comportamiento inmóvil, a partir de la caracterización de las biopelículas formadas por UPEC ST12 OD65 y, según lo descrito en la literatura para la formación de biopelículas en bacterias que carecen de flagelo, es que hipotetizamos que UPEC ST12 OD65 no contaría con este apéndice o en caso de tener flagelos, estos podrían ser afuncionales. Sin embargo, considerando nuestros resultados, el flagelo no sería imprescindible para la formación de una biopelícula madura, pues una vez establecida la adherencia irreversible el desarrollo de las siguientes etapas de formación de la biopelícula de la cepa fenotípicamente inmóvil, es equivalente a la cepa control móvil. Esto podría deberse a la participación de otros apéndices bacterianos, como las fimbrias u otras adhesinas, que se encargarían de mejorar la adherencia de UPEC a la superficie y también, entre bacteria-bacteria, consolidando finalmente su formación.

Adicionalmente, para desplazarse, las bacterias emplean diferentes mecanismos dependientes y no dependientes de apéndices bacterianos. Entre estos encontramos: *swarming*, *twitching* y *gliding*. Durante el *swarming* o movilidad tipo enjambre, las bacterias son impulsadas por la rotación flagelar, a través de superficies húmedas y blandas (93). Por otra parte, el movimiento de *twitching* o contracción, es facilitado por la extensión de los Pili tipo IV, cuya retracción es la que “tira” o atrae la bacteria hacia delante, por medio de sacudidas cortas e intermitentes (93,94). Por último, el *gliding* o deslizamiento corresponde a una translocación suave de las bacterias sobre superficies

sólidas, a través de un proceso activo con gasto energético, que no requiere de apéndices externos (93), pues estaría mediado por interacciones elásticas, viscosas y capilares (95).

### **Quorum sensing y formación de biopelículas en cultivo estático y dinámico**

Aparte de los factores ambientales que podrían estar influyendo sobre la cinética de formación y la morfología de las biopelículas formadas por las cepas de UPEC en el cultivo estático y dinámico, el Quorum sensing (QS) también participa en la organización y diferenciación de la biopelícula.

El papel del QS en la formación de estas comunidades se ha confirmado en algunas especies, demostrando que regula la síntesis y actividad flagelar, influyendo en la adherencia bacteriana a las superficies, junto a la acumulación de biomasa, regulación de la estructura y dispersión de la biopelícula (96,97). Silagyi, K *et al*, 2009 confirmaron que en *E. coli*, la regulación de genes de motilidad, síntesis flagelar y quimiotaxis, están mediados por el AI-2 (98). Por otro lado, una mutación en la proteína transportadora de AI-2, YdgG, produce un aumento de la concentración intracelular de esta molécula de señalización y también, aumenta la producción de fimbrias curli, involucradas en la adherencia y maduración de la biopelícula (99).

En entornos naturales las bacterias se adhieren a superficies en las que, tanto su distribución espacial y las condiciones ambientales, como las fuentes de carbono disponibles, el pH y las tasas de flujo, pueden afectar la concentración local de AI (100-102). Esta relación fue investigada por Meyer, A *et al*, 2012 quien demostró que la regulación de los AI no depende solo de la densidad celular (102). Estudios realizados han evidenciado que, dentro de los sistemas cerrados, la concentración de AI se acumula continuamente, por lo que se desencadena tempranamente la expresión de genes dependientes de quórum (100). Dicha acumulación podría explicar porque en nuestro modelo de cultivo estático, la biopelícula de UPEC ST12 OD65 una vez consolidada la adherencia, alcanzaría las etapas de maduración I y II en tiempos similares a UPEC CFT073, y también, porque consigue desarrollar estructuras de volúmenes similares, a pesar de sus diferencias morfológicas.

Por el contrario, en sistemas abiertos y con flujo, la concentración local de AI debe superar el lavado o dilución de las moléculas de señalización, por lo que se requiere de una mayor tasa de

producción de señales, una mayor biomasa bacteriana, o, un umbral de detección de quórum más bajo, siempre y cuando este no sea lo suficientemente fuerte para suprimir por completo la detección (96,103,104).

Cuando las biopelículas se desarrollan en presencia de flujo, por ejemplo, en una tubería industrial, la longitud del espacio confinado determina la activación precisa de la detección de quórum (101). Uecker, H *et al*, 2014 describe dos efectos contrapuestos del flujo laminar en un tubo, el lavado y el efecto descendente, que influyen la comunicación a través de variaciones en la concentración de AI (105). En primer lugar, las moléculas de señalización son arrastradas por el flujo, interrumpiendo la comunicación, sin embargo, las bacterias localizadas aguas abajo reciben una mayor cantidad de estas. Esto concuerda con lo reportado por Kim, M *et al*, 2016, quienes realizaron experimentos en canales de microfluidos de ~0,3 m, evidenciando que la detección de quórum estaba detenida en la entrada del canal, a causa de la advección de estas moléculas de señalización, mediada por el flujo, por lo que se requiere una mayor biomasa bacteriana para alcanzar la detección (101,106). A partir del análisis de las reconstrucciones en 3D de las biopelículas formadas en cultivo dinámico, al interior del tubo FEP, pudimos evidenciar una adherencia bacteriana al sustrato más temprana que en cultivo estático, en ambas cepas de UPEC.

El flujo en este caso estaría favoreciendo el transporte bacteriano a través del tubo, facilitando la interacción bacteriana con el sustrato y posteriormente, induciendo un aumento de la biomasa. Junto con este, aumentaría también la síntesis de moléculas de señalización, las cuales serían transportadas por advección a través del tubo. Probablemente, durante el transcurso de nuestro experimento, muchas de estas fueron eluidas por el flujo de caldo, pero también muchas de estas fueron trasladadas hacia distintos sectores del tubo en donde habrían sido captadas activamente, por micro o macrocolonias que se comportan como compartimentos, según lo descrito por Meyer, A *et al*, 2012 (102). Esto sería factible si consideramos la longitud total del tubo, que alcanzaba los 170 cm y el tiempo total transcurrido en nuestro experimento.

Durante nuestro experimento, el flujo era detenido en dos ocasiones, por cada hora. La primera detección era para incorporar la tinción fluorescente al medio, la cual era constantemente lavada por el caldo, por lo que una vez inyectada a través de la llave de 3 pasos se dejaba 'incubar' durante

2 minutos antes de restablecer el flujo, para asegurarnos de que las estructuras bacterianas quedaran marcadas fluorescentemente. Y la segunda detención ocurría al momento de cortar el extremo inferior del tubo y que luego, era restablecido. Si bien la presencia de flujo es común en los sistemas vivos, este suele ser intermitente, oscilando entre su aumento y su reducción o ausencia. Se ha descrito que, por ejemplo, durante la digestión o la micción, las bacterias formadoras de biopelículas pueden transicionar entre la activación de la detección de quórum cuando el flujo está detenido o desactivando dicha detección cuando es restablecido (106), por lo que existe la posibilidad de que bajo estas 'ventanas' libres de flujo, ambas cepas lograrán alcanzar la detección de quórum, activando la expresión de genes dependientes de esta e induciendo cambios en el comportamiento de esta comunidad.

### **Adherencia a la superficie: el papel de otras adhesinas bacterianas**

Si bien hemos recalcado la importancia del flagelo en la adherencia bacteriana inicial a los sustratos, esta no es la única que participa o facilita este proceso.

Se ha descrito que la motilidad de contracción mediada por las fimbrias tipo IV en *E. coli*, permite anclar el Pili al sustrato para luego retraerse y permitir el acercamiento bacteriano a la superficie. Además, se ha reportado que las cepas no móviles de *E. coli* se vuelven más "pegajosas" cuando se produce un exceso en la síntesis de curli. De esta forma, UPEC lograría interacciones más fuertes y estables, entre bacteria- bacteria y también, con la superficie, permitiendo la formación de biopelículas en condiciones de cultivo estático (26,49), a pesar de exhibir un comportamiento inmóvil.

La interacción bacteriana con una superficie implica normalmente una adherencia temporal o reversible y posteriormente, una adherencia permanente o irreversible. Durante la adherencia temporal, la bacteria muestrea el entorno, en un periodo que va desde segundos hasta pocos minutos, para luego fijarse de forma permanente en la superficie. Esta adherencia bacteriana irreversible ocurre en los 10 minutos posteriores y proporciona la base para el desarrollo de las siguientes etapas de formación de biopelículas (107,108). Si bien el mecanismo molecular que estaría involucrado en estas interacciones temporales o permanentes no está bien definido, se ha identificado en *E. coli* un polisacárido, denominado poli-b-1,6-GlcNAc o PGA, que favorece la adherencia de este microorganismo a las superficies abióticas, marcando el paso entre adherencia

reversible e irreversible, además de estabilizar la interacción bacteria- bacteria y también, la estructura de la biopelícula formada (107,109).

Por lo tanto, la participación del flagelo en las etapas iniciales de la formación de biopelículas estaría más bien dirigida al desplazamiento bacteriano a través del sustrato y a su detección, mientras que la consolidación de la adherencia bacteriana a la superficie involucraría a estas fimbrias y adhesinas bacterianas, explicando por qué a pesar del comportamiento fenotípicamente inmóvil de nuestra cepa de UPEC, si bien hay un retraso en las etapas iniciales, se consolida la formación de biopelículas en cultivo estático y dinámico. Por último, sería interesante establecer si existe participación de estas fimbrias y/o adhesinas bacterianas en el proceso de adherencia de UPEC ST12 OD65.

### **El papel estructural de la Matriz extrapolimérica de UPEC**

La morfología tridimensional de las biopelículas formadas por UPEC, específicamente de sus macrocolonias, está determinada por las diferentes proporciones y disposiciones locales de celulosa y curli (110,111). La fosfoetanolamina o pEtN-celulosa, es un exopolisacárido que proporciona el andamiaje elástico de la estructura, con alta resistencia mecánica y flexibilidad, mientras que la fibra amiloide, denominada curli, funciona como “mortero”, incrustando e inmovilizando las células bacterianas, de modo que las células basales no solo se agrupan verticalmente, sino que se extiendan lateralmente (111-113).

Serra, D *et al*, 2013 describieron conceptualmente la morfología de la arquitectura tridimensional de la matriz de la biopelícula de *E. coli*. Ellos describen su aspecto como “arrugada” o “rugosa”, además de su tamaño, la planitud de la macrocolonia, así como también la presencia de “crestas”, “arrugas” y “anillos”, que se presentan de forma radial, concéntrica y/o irregulares (111). La cohesión, estabilidad y elasticidad de la macrocolonia, otorgada por la combinación de fibras de celulosa y curli, genera biopelículas “extremadamente planas” (60-70  $\mu\text{m}$  de altura) en *E. coli*, que se expanden horizontalmente, tolerando la tensión mecánica inducida por la proliferación bacteriana (111). Estas observaciones, concuerdan con las características morfológicas de la biopelícula de UPEC CFT073 móvil, en cultivo estático y dinámico. Empero, las macrocolonias

constituidas solo por curli o pEnT- celulosa, se caracterizan por una pronunciada diferencia en el grosor vertical (200-300  $\mu\text{m}$ ), además de exhibir consecuencias fisiológicas y estructurales (111,113), por lo que sería importante dilucidar si la morfología de la biopelícula de UPEC ST12 OD65, caracterizada por la formación de agrupaciones densas e irregulares, se debe a la ausencia de alguno de estos componentes, o sólo se debe a su comportamiento inmóvil.

Estudiar los componentes de la matriz de UPEC ST12 OD65 era uno de los objetivos planteados inicialmente para esta investigación. Sin embargo, debido a la contingencia sanitaria y a la gran cantidad de datos por adquirir, procesar y analizar, se decidió priorizar los objetivos relacionados con caracterizar morfológicamente la biopelícula formada por las cepas de UPEC.

### **Microscopía en el estudio de biopelículas**

En los últimos años, los avances tecnológicos a nivel de imagen, mediante el uso de microscopía, han revolucionado las diferentes áreas de investigación microbiológica, aumentando especialmente el conocimiento sobre el desarrollo de las biopelículas. Además, el desarrollo de dispositivos y sistemas de microfluidos, han permitido simular y controlar las condiciones físicas y químicas naturales de los hábitats microbianos (101).

En esta investigación utilizamos dos poderosas herramientas microscópicas de alta resolución, que facilitaron la identificación y caracterización de los procesos cinéticos y dinámicos involucrados en el desarrollo de las biopelículas. En primer lugar, la adquisición de imágenes de las biopelículas cultivadas en método estático se realizó en un microscopio confocal Zeiss Axiovert 200, que cuenta con un Sistema de disco giratorio Volocity ViewVox (Perkin Elmer) acoplado. La microscopía confocal de escaneo láser o CLSM, se fundamenta en la excitación de un láser a determinada longitud de onda, que realiza un barrido de la muestra en los ejes x e y. Además, permite el seccionamiento óptico en el eje z, a partir del cual se adquiere una serie de imágenes longitudinales de la muestra, que durante el procesamiento pueden reconstruirse y utilizarse para el análisis cuantitativo de descriptores morfo-topológicos de los objetos observados. En particular, el acoplamiento de un Sistema de disco giratorio antes del sistema de detección propicia la eliminación de la mayor parte de la fluorescencia inespecífica proveniente de otros planos focales

(114), además de mejorar la relación señal/ruido y también, disminuir la tasa de fotoblanqueo que ocurre durante la adquisición de imágenes y que es una de las principales limitantes de este tipo de microscopía (115,116). En esta oportunidad, la resolución óptica de la microscopía confocal, facilitó la caracterización morfológica de las biopelículas formadas, permitiendo la identificación de los hitos definidos en la literatura para cada etapa de su desarrollo.

Por otro lado, para la adquisición de las imágenes de las biopelículas de UPEC formadas bajo condiciones dinámicas, utilizamos la microscopía de fluorescencia Light Sheet (LSFM). Esta técnica se destaca por realizar el seccionamiento óptico de la muestra de tejidos u organismos completos a gran velocidad, a través de una fina lámina o haz de luz, orientada ortogonalmente al eje de detección, que ilumina solo un plano. En este microscopio, la iluminación y la detección de fluorescencia están desacoplados, por lo que se utiliza un objetivo para iluminar la muestra y un segundo objetivo, perpendicular al eje de iluminación, para capturar la fluorescencia emitida dentro del plano. De esta manera, el espécimen observado se mueve a través de la lámina de luz, se adquieren rápidamente las imágenes plano a plano y luego, son procesadas para la reconstrucción del espécimen en 3D, a partir del cual se realiza el análisis cuantitativo (115,117). A diferencia de la microscopía confocal, LSFM es capaz de adquirir imágenes de objetos más gruesos (>1 cm), generando secciones ópticas adecuadas para una reconstrucción tridimensional de las imágenes, con una menor fototoxicidad y fotoblanqueo (118), además de no presentar el efecto de dispersión de la luz, mejorando la relación señal/ruido (117). Adicionalmente LSFM posee una mayor resolución espacial, permitiendo observar y capturar campos de 1.33 mm x 1.33 mm, en XY y Z de una vez. En nuestro caso, a pesar de no poder distinguir bacterias individuales o microcolonias, debido al aumento del objetivo utilizado, nos entregó información importante sobre la distribución de las colonias adheridas al sustrato y también, nos otorgó información cuantificable sobre el tamaño y/o volumen de las estructuras formadas. Por lo tanto, la caracterización de las estructuras identificadas a partir de la reconstrucción 3D de las imágenes adquiridas en LSFM, proporciona información sobre las etapas de formación de las biopelículas en entornos dinámicos.

Finalmente, es importante destacar el aporte que se logró mediante el uso de estos equipos de microscopía avanzados, capaces de resolver la arquitectura y dinámica de formación de biopelículas de manera poco invasiva, que nos permitieron observar el comportamiento de una



cepa de UPEC fenotípicamente inmóvil, respecto de la formación de biopelículas, y compararlo con el de una cepa UPEC móvil, en un modelo que emula a los dispositivos médicos como catéteres urinarios, los cuales son colonizados frecuentemente por cepas de UPEC y que son responsables de la mayoría de las ITU nosocomiales, que en el contexto clínico constituyen un grave problema de salud pública.

En cuanto a la capacidad de formación de biopelículas de la cepa de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, sería interesante profundizar en 3 aspectos principales. Primero, investigar las bases genéticas y la expresión de sus flagelos, para conocer la base de su comportamiento inmóvil. En segundo lugar, dilucidar si esta cepa es capaz de sobreexpresar fimbrias curli, dado que se ha observado previamente que esta fibra amiloide facilita las interacciones iniciales entre las bacterias y las superficies. Estos apéndices filamentosos influyen en las propiedades de adherencia de *E. coli*, favoreciendo el establecimiento de las fases iniciales de la formación de biopelículas, por lo que los flagelos serían prescindibles para su desarrollo. Este hallazgo fue descrito por Prigent-Combaret, *et al.*, en el año 2000, quien documentó que la motilidad flagelar no es necesaria para la adhesión inicial y la formación de biopelículas, si la cepa en estudio sobreexpresa adhesinas de superficie tipo curli (90). Esto fue confirmado posteriormente por Beloin, *et al*, en el 2008, quien indica que las bacterias no móviles pueden adherirse a las superficies (49). Además, dado las características morfológicas de las macrocolonias desarrolladas por la cepa inmóvil de UPEC, sería interesante estudiar la composición de la matriz extrapolimérica de la biopelícula, ya que, según lo descrito por Serra, D *et al* 2021(113), la ausencia de curli o pEtN- celulosa daría origen a macrocolonias de mayor grosor.

Por último, y siguiendo con el componente microscópico de esta tesis, sería un buen complemento observar la cepa de UPEC ST12 OD65 a través de microscopía electrónica, en busca de los apéndices bacterianos descritos.

## 6. Conclusiones

- La cepa de UPEC ST 12 OD65, fenotípicamente inmóvil es capaz de formar biopelículas.
- La formación de biopelículas de la cepa de UPEC ST 12 OD65, tanto en cultivo estático, como dinámico evidencia un retraso en la fase de adherencia reversible, lo que coincide con lo reportado en la literatura.
- Los resultados del análisis cualitativo de las imágenes evidencian que la arquitectura de la biopelícula formada por la cepa de UPEC CFT073 en cultivo estático se caracteriza por ser aplanada, estable y compacta, mientras que la arquitectura de la biopelícula de UPEC ST12 OD65 es más gruesa, densa, irregular e inestable.
- La biopelícula de UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cultivo estático y dinámico, se caracteriza por la formación de agrupaciones tridimensionales densas, irregulares e inestables.
- Se logró caracterizar, por primera vez, la formación de biopelículas en modelo estático y dinámico, en una cepa UPEC que exhibe un comportamiento fenotípicamente inmóvil.
- Los resultados de nuestra investigación aportan conocimiento que podría ayudar a modelar la formación de estas biopelículas en contextos nosocomiales.

## 7. Bibliografia

- (1) O'Toole, G. A. Microtiter dish biofilm formation assay. *Journal of visualized experiments, JoVE*: (2011); (47).
- (2) Costerton, J. W. Introduction to biofilm. *International journal of antimicrobial agents*: (1999); 11(3-4), 217-221.
- (3) Koseoglu, H., Aslan, G., Esen, N., Sen, B. H., & Coban, H. Ultrastructural stages of biofilm development of *Escherichia coli* on urethral catheters and effects of antibiotics on biofilm formation. *Urology*: (2006); 68(5): 942-946.
- (4) Donlan, R. M. Biofilms: microbial life on surfaces. *Emerging infectious diseases*: (2002); 8(9), 881.
- (5) Sarowska, J., Futoma-Koloch, B., Jama-Kmiecik, A., Frej-Madrzak, M., Ksiazczyk, M., Bugla-Ploskonska, G., & Choroszy-Krol, I. Virulence factors, prevalence and potential transmission of extraintestinal pathogenic *Escherichia coli* isolated from different sources: recent reports. *Gut pathogens*: (2019); 11(1), 1-16.
- (6) Jiang, Z., Nero, T., Mukherjee, S., Olson, R., & Yan, J. Searching for the secret of stickiness: how biofilms adhere to surfaces. *Frontiers in microbiology*: (2021); 12, 686-793.
- (7) Tallawi, M., Opitz, M., & Lieleg, O. Modulation of the mechanical properties of bacterial biofilms in response to environmental challenges. *Biomaterials science*: (2017); 5(5), 887-900.
- (8) Van Houdt, R., & Michiels, C. W. Role of bacterial cell surface structures in *Escherichia coli* biofilm formation. *Research in microbiology*:(2005); 156 (5-6), 626-633.
- (9) Flemming, H. C., & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*: (2010); 8(9): 623-633.
- (10) Toyofuku, M., Inaba, T., Kiyokawa, T., Obana, N., Yawata, Y., & Nomura, N. Environmental factors that shape biofilm formation. *Bioscience, biotechnology, and biochemistry*:(2016); 80(1), 7-12.
- (11) Qvortrup, K., Hultqvist, L. D., Nilsson, M., Jakobsen, T. H., Jansen, C. U., Uhd, J., ... & Tolker-Nielsen, T. Small molecule anti-biofilm agents developed on the basis of mechanistic understanding of biofilm formation. *Frontiers in chemistry*: (2019); 7, 742.

- (12) Schulze, A., Mitterer, F., Pombo, J. P., & Schild, S. Biofilms by bacterial human pathogens: Clinical relevance-development, composition and regulation-therapeutical strategies. *Microbial Cell*: (2021); 8(2), 28.
- (13) O'Toole, G., Kaplan, H. B., & Kolter, R. Biofilm formation as microbial development. *Annual review of microbiology*: (2000); 54, 49.
- (14) Trautner, B. W., & Darouiche, R. O. Catheter-associated infections: pathogenesis affects prevention. *Archives of internal medicine*: (2004); 164(8), 842-850.
- (15) Kumar, A., Alam, A., Rani, M., Ehtesham, N. Z., & Hasnain, S. E. Biofilms: Survival and defense strategy for pathogens. *International Journal of Medical Microbiology*: (2017); 307(8): 481-489.
- (16) Treter, J., & Macedo, A. J. Catheters: a suitable surface for biofilm formation. *Science against microbial pathogens: communicating current research and technological advances*: (2011); 2(3): 835-842.
- (17) Kim, J., Park, H. D., & Chung, S. Microfluidic approaches to bacterial biofilm formation. *Molecules*: (2012); 17(8), 9818-9834.
- (18) Schlapp, G., Scavone, P., Zunino, P., & Härtel, S. Development of 3D architecture of uropathogenic *Proteus mirabilis* batch culture biofilms-A quantitative confocal microscopy approach. *Journal of microbiological methods*: (2011); 87(2), 234–240.
- (19) Santore, M. M. Interplay of physico-chemical and mechanical bacteria-surface interactions with transport processes control early biofilm growth: A review. *Advances in Colloid and Interface Science*: (2022); 102, 665.
- (20) Monds RD, Newell PD, Gross RH, O'Toole GA. Phosphatedependent modulation of c-di-GMP levels regulates *Pseudomonas fluorescens* Pf0-1 biofilm formation by controlling secretion of the adhesin LapA. *Mol Microbiol*: (2007); (63) :656–679.
- (21) Kimkes, T. E., & Heinemann, M. How bacteria recognise and respond to surface contact. *FEMS microbiology reviews*: (2020); 44(1), 106-122.
- (22) Monds RD, O'Toole GA. The developmental model of microbial biofilms: ten years of a paradigm up for review. *Trends in microbiology*: (2009); (17) :73–87.
- (23) Berne, C., Ducret, A., Hardy, G. G., & Brun, Y. V. Adhesins involved in attachment to abiotic surfaces by Gram-negative bacteria. *Microbial Biofilms*: (2015); 163-199.

- (24) Verderosa, A. D., Totsika, M., & Fairfull-Smith, K. E. Bacterial biofilm eradication agents: a current review. *Frontiers in chemistry*: (2019); (7), 824.
- (25) Liedl B. Catheter-associated urinary tract infections. *Current opinion in urology*: (2001); 11(1), 75–79.
- (26) Jain, A., Gupta, Y., Agrawal, R., Jain, S. K., & Khare, P. Biofilms- a microbial life perspective: a critical review. *Critical Reviews in Therapeutic Drug Carrier Systems*: (2007); 24(5).
- (27) Martínez-García, R., Nadell, C. D., Hartmann, R., Drescher, K., & Bonachela, J. A. Cell adhesion and fluid flow jointly initiate genotype spatial distribution in biofilms. *PLoS computational biology*: (2018); 14(4), e1006094.
- (28) Flemming, H. C., & Wingender, J. The biofilm matrix. *Nature reviews microbiology*: (2010); 8(9), 623-633.
- (29) Zhang W and Li C Exploiting Quorum Sensing Interfering Strategies in Gram-Negative Bacteria for the Enhancement of Environmental Applications. *Front. Microbiol*: (2016); (6) :1535.
- (30) Atkinson S and Williams P. Quorum sensing and social networking in the microbial world. *JR Soc. Interface*: (2009); (6): 959–978.
- (31) Solano, C., Echeverz, M., & Lasa, I. Biofilm dispersion and quorum sensing. *Current opinion in microbiology*: (2014); (18) : 96-104.
- (32) Pena RT, Blasco L, Ambroa A, González-Pedrajo B, Fernández-García L, López M, Bleriot I, y cols. Relationship Between Quorum Sensing and Secretion Systems. *Front. Microbiol*: (2019); (10) :1100.
- (33) Escobar-Muciño, E., Arenas-Hernández, M. M. P., & Luna-Guevara, M. L. Mechanisms of Inhibition of Quorum Sensing as an Alternative for the Control of *E. coli* and *Salmonella*. *Microorganisms*: (2022); 10(5), 884.
- (34) Zohar, B.A.; Kolodkin-Gal, I. Quorum sensing in *Escherichia coli*: Interkingdom, inter-and intraspecies dialogues, and a suicideinducing peptide. In *Quorum Sensing vs. Quorum Quenching: A Battle with No End in Sight*; Springer: New Delhi, India, (2015); 85–99
- (35) Kierek-Pearson, K., & Karatan, E. Biofilm development in bacteria. *Advances in applied microbiology*: (2005); 57, 79–111.
- (36) Witsø, I.L.; Rukke, H.V.; Benneche, T.; Scheie, A.A. Thiophenone attenuates enteropathogenic *Escherichia coli* O103:H2 virulence by interfering with AI-2 signaling. *PLoS ONE*:(2016); 11, e0157334.

- (37) Krsmanovic, M., Biswas, D., Ali, H., Kumar, A., Ghosh, R., & Dickerson, A. K. Hydrodynamics and surface properties influence biofilm proliferation. *Advances in Colloid and Interface Science*: (2021); 288, 102336.
- (38) Allen, A., Habimana, O., & Casey, E. The effects of extrinsic factors on the structural and mechanical properties of *Pseudomonas fluorescens* biofilms: A combined study of nutrient concentrations and shear conditions. *Colloids and surfaces. B, Biointerfaces*: (2018); 165, 127–134.
- (39) Zhang, Y., Silva, D. M., Young, P., Traini, D., Li, M., Ong, H. X., & Cheng, S. Understanding the effects of aerodynamic and hydrodynamic shear forces on *Pseudomonas aeruginosa* biofilm growth. *Biotechnology and Bioengineering*: (2022); 119(6), 1483–1497.
- (40) Duan, Q., Zhou, M., Zhu, L., & Zhu, G. Flagella and bacterial pathogenicity. *Journal of basic microbiology*: (2013); 53(1), 1-8.
- (41) Chaban, B., Hughes, H. V., & Beeby, M. The flagellum in bacterial pathogens: for motility and a whole lot more. In *Seminars in cell & developmental biology*: (2015); 46, 91-103.
- (42) Zhou, M., Yang, Y., Chen, P., Hu, H., Hardwidge, P. R., & Zhu, G. More than a locomotive organelle: flagella in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*: (2015); 99(21), 8883-8890.
- (43) Nguyen, H., Ybarra, A., Başığaoğlu, H., & Shindell, O. Biofilm viscoelasticity and nutrient source location control biofilm growth rate, migration rate, and morphology in shear flow. *Scientific reports*: (2021); 11(1), 16118.
- (44) P. Klemm, K.A. Krogfelt, in: P. Klemm (Ed.), *Fimbriae, Adhesion, Genetics, Biogenesis and Vaccines*: (1994); 9–26.
- (45) Hou, J., Veeregowda, D. H., van de Belt-Gritter, B., Busscher, H. J., & van der Mei, H. C. Extracellular polymeric matrix production and relaxation under fluid shear and mechanical pressure in *Staphylococcus aureus* biofilms. *Applied and environmental microbiology*: (2018); 84(1), e01516-17.
- (46) Stewart, P. S. Mini-review: convection around biofilms. *Biofouling*: (2012); 28(2), 187-198.
- (47) Shave, M. K., Xu, Z., Raman, V., Kalasin, S., Tuominen, M. T., Forbes, N. S., & Santore, M. M. *Escherichia coli* Swimming back Toward Stiffer Polyethylene Glycol Coatings, Increasing Contact in Flow. *ACS applied materials & interfaces*: (2021); 13(15), 17196-17206.

- (48) Merritt, P. M., Danhorn, T., & Fuqua, C. Motility and chemotaxis in *Agrobacterium tumefaciens* surface attachment and biofilm formation. *Journal of bacteriology*: (2007);189(22), 8005–8014.
- (49) Pratt, L. A., & Kolter, R. Genetic analysis of *Escherichia coli* biofilm formation: roles of flagella, motility, chemotaxis and type I pili. *Molecular microbiology*: (1998); 30(2): 285-293.
- (50) Hung, C., Zhou, Y., Pinkner, J. S., Dodson, K. W., Crowley, J. R., Heuser, J., ... & Hultgren, S. J. *Escherichia coli* biofilms have an organized and complex extracellular matrix structure. *MBio*: (2013); 4(5), e00645-13.
- (51) Kim, T. J., Young, B. M., & Young, G. M. Effect of flagellar mutations on *Yersinia enterocolitica* biofilm formation. *Applied and Environmental Microbiology*: (2008); 74(17): 5466-5474.
- (52) Alonso, A. N., Perry, K. J., Regeimbal, J. M., Regan, P. M., & Higgins, D. E. Identification of *Listeria monocytogenes* determinants required for biofilm formation. *PloS one*: (2014); 9(12): e113696.
- (53) Weinstein, R. A., & Darouiche, R. O. Device-associated infections: a macroproblem that starts with microadherence. *Clinical infectious diseases*: (2001); 33(9): 1567-1572.
- (54) Donlan, R. M. Biofilm formation: a clinically relevant microbiological process. *Clinical Infectious Diseases*: (2001); 33(8) : 1387-1392.
- (55) Schultz, M., Sanchez, R. O., Hernandez, N. E., & Hernandez, J. M. Nosocomial infection among immunosuppressed patients in the intensive care unit. *Critical care nursing quarterly*: (2001); 24(2): 55-63.
- (56) MINSAL. 2018. Informe de vigilancia de infecciones asociadas a la atención en salud 2018. [En línea] <https://www.minsal.cl/wp-content/uploads/2020/08/INFORME-DE-VIGILANCIA-DE-IAAS-2018.pdf> [consulta : 03-03-2021].
- (57) Wilson ML, Gaido L. Laboratory diagnosis of urinary tract infections in adult patients. *Clin Infect Dis*: (2004); (38): 1150-8.
- (58) Hunstad, D. A., & Justice, S. S. Intracellular lifestyles and immune evasion strategies of uropathogenic *Escherichia coli*. *Annual review of microbiology*: (2010); 64, 203-221.
- (59) Flores-Mireles, A., Hreha, T. N., & Hunstad, D. A. Pathophysiology, treatment, and prevention of catheter-associated urinary tract infection. *Topics in spinal cord injury rehabilitation*: (2019); 25(3): 228-240.

- (60) Lichtenberger, P., & Hooton, T. M. Complicated urinary tract infections. *Current infectious disease reports*: (2008); 10(6): 499-504.
- (61) Saint, S., & Chenoweth, C. E. Biofilms and catheter-associated urinary tract infections. *Infectious Disease Clinics*: (2003); 17(2), 411-432.
- (62) Kass EH. Asymptomatic infections of the urinary tract. *Trans Assoc Am Physicians* (1956); 69:56-64.
- (63) Sharma, G., Sharma, S., Sharma, P., Chandola, D., Dang, S., Gupta, S., & Gabrani, R. Escherichia coli biofilm: development and therapeutic strategies. *Journal of applied microbiology*: (2016); 121(2): 309-319.
- (64) Povolotsky, T. L., & Hengge, R. 'Life-style' control networks in Escherichia coli: signaling by the second messenger c-di-GMP. *Journal of Biotechnology*: (2012); 160(1-2), 10-16.
- (65) Bien, J., Sokolova, O., & Bozko, P. Role of Uropathogenic Escherichia coli Virulence Factors in Development of Urinary Tract Infection and Kidney Damage. *International Journal of Nephrology*: (2012); 1–15.
- (66) Brill, F. H., Hambach, J., Utpatel, C., Mogrovejo, D., Gabriel, H., Klock, J. H., & Arndt, A. Biofilm prevention potential of 0.02% polyhexanide irrigation solution in urethral catheters under practice-like in vitro conditions. (2020).
- (67) Lo, A. W., Moriel, D. G., Phan, M. D., Schulz, B. L., Kidd, T. J., Beatson, S. A., & Schembri, M. A. 'Omic' approaches to study uropathogenic Escherichia coli virulence. *Trends in microbiology*: (2017); 25(9), 729-740.
- (68) Hufnagel, D. A., Depas, W. H., & Chapman, M. R. The biology of the Escherichia coli extracellular matrix. *Microbiology spectrum*: (2015); 3(3), 3-3.
- (69) Beloin, C., Roux, A., & Ghigo, J. M. Escherichia coli biofilms. *Current topics in microbiology and immunology*: (2008); (322): 249–289.
- (70) Chapman, M. R., Robinson, L. S., Pinkner, J. S., Roth, R., Heuser, J., Hammar, M., & Hultgren, S. J. Role of Escherichia coli curli operons in directing amyloid fiber formation. *Science*: (2002); 295(5556): 851-855.
- (71) Prüß, B. M. Involvement of two-component signaling on bacterial motility and biofilm development. *Journal of bacteriology*: (2017); 199(18).
- (72) Hufnagel, D. A., Depas, W. H., & Chapman, M. R. The biology of the Escherichia coli extracellular matrix. *Microbiology spectrum*: (2015); 3(3): 3-3.



- (73) Kai-Larsen, Y., Lüthje, P., Chromek, M., Peters, V., Wang, X., Holm, Å., ... & Brauner, A. Uropathogenic *Escherichia coli* modulates immune responses and its curli fimbriae interact with the antimicrobial peptide LL-37. *PLoS pathogens*: (2010); 6(7): e1001010.
- (74) Lane, M. C., Alteri, C. J., Smith, S. N., & Mobley, H. L. Expression of flagella is coincident with uropathogenic *Escherichia coli* ascension to the upper urinary tract. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: (2007); 104(42): 16669–16674.
- (75) Jacobsen, S. Á., Stickler, D. J., Mobley, H. L. T., & Shirtliff, M. E. Complicated catheter-associated urinary tract infections due to *Escherichia coli* and *Proteus mirabilis*. *Clinical microbiology reviews*: (2008); 21(1): 26-59.
- (76) Fahrner, K. A., & Berg, H. C. Mutations that stimulate *flhDC* expression in *Escherichia coli* K-12. *Journal of bacteriology*: (2015); 197(19): 3087-3096.
- (77) Hadjifrangiskou, M., Gu, A. P., Pinkner, J. S., Kostakioti, M., Zhang, E. W., Greene, S. E., & Hultgren, S. J. Transposon mutagenesis identifies uropathogenic *Escherichia coli* biofilm factors. *Journal of bacteriology*: (2012); 194(22): 6195-6205.
- (78) Prüß, B. M., Besemann, C., Denton, A., & Wolfe, A. J. A complex transcription network controls the early stages of biofilm development by *Escherichia coli*. *Journal of bacteriology*: (2006); 188(11): 3731-3739.
- (79) McClaine JW, Ford RM. Characterizing the adhesion of motile and nonmotile *Escherichia coli* to a glass surface using a parallel-plate flow chamber. *Biotechnol. Bioeng*: (2002); (78): 179–89
- (80) Wood, T. K., Barrios, A. F. G., Herzberg, M., & Lee, J. Motility influences biofilm architecture in *Escherichia coli*. *Applied microbiology and biotechnology*: (2006); 72(2): 361-367.
- (81) Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental microbiology*: (2000); 2(4): 450-464.
- (82) Cattò, C., & Cappitelli, F. Testing Anti-Biofilm Polymeric Surfaces: Where to Start? *International journal of molecular sciences*: (2019); 20(15): 3794.
- (83) Sabbuba, N., Hughes, G., & Stickler, D. J. The migration of *Proteus mirabilis* and other urinary tract pathogens over Foley catheters. *BJU international*: (2002); 89(1), 55–60.

- (84) Villegas, N. A., Baronetti, J., Albesa, I., Polifroni, R., Parma, A., Etcheverria, A., & Paraje, M. Relevance of biofilms in the pathogenesis of Shiga-toxin-producing *Escherichia coli* infection. *ScientificWorld Journal*: (2013); 607258.
- (85) Wang, F., Deng, L., Huang, F., Wang, Z., Lu, Q., & Xu, C. Flagellar Motility Is Critical for *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium Biofilm Development. *Frontiers in microbiology*: (2020); 11, 1695.
- (86) Mabrouk, N., Deffuant, G., Tolker-Nielsen, T., & Lobry, C. Bacteria can form interconnected microcolonies when a self-excreted product reduces their surface motility: evidence from individual-based model simulations. *Theory in biosciences = Theorie in den Biowissenschaften* (2010); 129(1), 1–13.
- (87) Lecuyer, S., Rusconi, R., Shen, Y., Forsyth, A., Vlamakis, H., Kolter, R., & Stone, H. A. Shear stress increases the residence time of adhesion of *Pseudomonas aeruginosa*. *Biophysical journal*: (2011); 100(2), 341–350.
- (88) Korber, D. R., Lawrence, J. R., Sutton, B., & Caldwell, D. E. Effect of laminar flow velocity on the kinetics of surface recolonization by Mot(+) and Mot (-) *Pseudomonas fluorescens*. *Microbial ecology*: (1989); 18(1), 1–19.
- (89) Dan Vo, G., Brindle, E., & Heys, J. An experimentally validated immersed boundary model of fluid–biofilm interaction. *Water Science and Technology*: (2010); 61(12), 3033-3040.
- (90) Oder, M., Arlič, M., Bohinc, K., & Fink, R. *Escherichia coli* biofilm formation and dispersion under hydrodynamic conditions on metal surfaces. *International journal of environmental health research*: (2018); 28(1): 55-63.
- (91) Schluter, J., Nadell, C. D., Bassler, B. L., & Foster, K. R. Adhesion as a weapon in microbial competition. *The ISME journal*:(2015); 9(1), 139-149.
- (92) Tsai, Y. Impact of flow velocity on the dynamic behaviour of biofilm bacteria. *Biofouling*: (2005); 21, 267 - 277
- (93) Nan, B., & Zusman, D. R. Novel mechanisms power bacterial gliding motility. *Molecular microbiology*: (2016); 101(2), 186–193.
- (94) McBride, M. J. Bacterial Gliding Motility: Multiple. *Annu. Rev. Microbiol*: (2001); 55, 49-75.

- (95) Tchoufag, J., Ghosh, P., Pogue, C. B., Nan, B., & Mandadapu, K. K. Mechanisms for bacterial gliding motility on soft substrates. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*: (2019); 116(50), 25087–25096.
- (96) Passos da Silva, D., Schofield, M. C., Parsek, M. R., & Tseng, B. S. An Update on the Sociomicrobiology of Quorum Sensing in Gram-Negative Biofilm Development. *Pathogens* (Basel, Switzerland): (2017); 6(4), 51.
- (97) Petrova, O. E., & Sauer, K. Sticky situations: key components that control bacterial surface attachment. *Journal of bacteriology*: (2012); 194(10), 2413–2425.
- (98) Silagyi, K., Kim, S. H., Lo, Y. M., & Wei, C. I. Production of biofilm and quorum sensing by *Escherichia coli* O157:H7 and its transfer from contact surfaces to meat, poultry, ready-to-eat deli, and produce products. *Food microbiology*: (2009); 26(5), 514–519.
- (99) Herzberg, M., Kaye, I. K., Peti, W., & Wood, T. K. YdgG (TqsA) controls biofilm formation in *Escherichia coli* K-12 through autoinducer 2 transport. *Journal of bacteriology*: (2006);, 188(2), 587–598.
- (100) Ribbe, J., & Maier, B. Density-Dependent Differentiation of Bacteria in Spatially Structured Open Systems. *Biophysical journal*: (2016); 110(7), 1648–1660.
- (101) Mukherjee, S., Bassler, B.L. Bacterial quorum sensing in complex and dynamically changing environments. *Nat Rev Microbiol*: (2019); 17, 371–382.
- (102) Meyer, A., Megerle, J. A., Kuttler, C., Müller, J., Aguilar, C., Eberl, L., Hense, B. A., & Rädler, J. O. Dynamics of AHL mediated quorum sensing under flow and non-flow conditions. *Physical biology*: (2012); 9(2), 026007.
- (103) Li, J., & Zhao, X. Effects of quorum sensing on the biofilm formation and viable but non-culturable state. *Food research international* (Ottawa, Ont.): (2020); 137, 109742.
- (104) Jung, H., & Meile, C. D. Numerical investigation of microbial quorum sensing under various flow conditions. *PeerJ*: (2020); 8, e9942.
- (105) Uecker, H., Müller, J., & Hense, B. A. Individual-based model for quorum sensing with background flow. *Bulletin of mathematical biology*: (2014); 76(7), 1727–1746.
- (106) Kim, M. K., Ingremeau, F., Zhao, A., Bassler, B. L. & Stone, H. A. Local and global consequences of flow on bacterial quorum sensing. *Nat. Microbiol*: (2016); 1, 15005.

- (107) Agladze, K., Wang, X., & Romeo, T. Spatial periodicity of *Escherichia coli* K-12 biofilm microstructure initiates during a reversible, polar attachment phase of development and requires the polysaccharide adhesin PGA. *Journal of bacteriology*: (2005); 187(24), 8237–8246.
- (108) Stoodley, P., K. Sauer, D. G. Davies, and J. W. Costerton. 2002. Biofilms as complex differentiated communities. *Annu. Rev. Microbiol.* 56:187-209.
- (109) Wang, X., Dubey, A. K., Suzuki, K., Baker, C. S., Babitzke, P., & Romeo, T. CsrA post-transcriptionally represses pgaABCD, responsible for synthesis of a biofilm polysaccharide adhesin of *Escherichia coli*. *Molecular microbiology*: (2005); 56(6), 1648–1663.
- (110) Zogaj X, Nimtz M, Rohde M, Bokranz W, Römling U. The multicellular morphotypes of *Salmonella typhimurium* and *Escherichia coli* produce cellulose as the second component of the extracellular matrix. *Mol. Microbiol*: (2001); 39:1452–1463
- (111) Serra, D. O., Richter, A. M., & Hengge, R. Cellulose as an architectural element in spatially structured *Escherichia coli* biofilms. *Journal of bacteriology*: (2013); 195(24), 5540–5554.
- (112) Serra, D. O., & Hengge, R. A c-di-GMP-Based Switch Controls Local Heterogeneity of Extracellular Matrix Synthesis which Is Crucial for Integrity and Morphogenesis of *Escherichia coli* Macrocolony Biofilms. *Journal of molecular biology*: (2019); 431(23), 4775–4793.
- (113) Serra, D. O., & Hengge, R. (2021). Bacterial Multicellularity: The biology of *Escherichia coli* building large-scale biofilm communities. *Annual review of microbiology*, 75, 269-290.
- (114) Canette, A., Deschamps, J., & Briandet, R. High Content Screening Confocal Laser Microscopy (HCS-CLM) to Characterize Biofilm 4D Structural Dynamic of Foodborne Pathogens. *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.): (2019); 1918, 171–182.
- (115) Wan, Y., McDole, K., & Keller, P. J. Light-Sheet Microscopy and Its Potential for Understanding Developmental Processes. *Annual review of cell and developmental biology*: (2019); 35, 655–681.
- (116) Yordanov, S., Neuhaus, K., Hartmann, R., Díaz-Pascual, F., Vidakovic, L., Singh, P. K., & Drescher, K. Single-objective high-resolution confocal light sheet fluorescence microscopy for standard biological sample geometries. *Biomedical optics express*: (2021); 12(6), 3372–3391.
- (117) Chatterjee, K., Pratiwi, F. W., Wu, F. C. M., Chen, P., & Chen, B. C. Recent Progress in Light Sheet Microscopy for Biological Applications. *Applied spectroscopy*: (2018); 72(8), 1137–1169.
- (118) Santi P. A. Light sheet fluorescence microscopy: a review. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*:(2011); 59(2), 129–138.

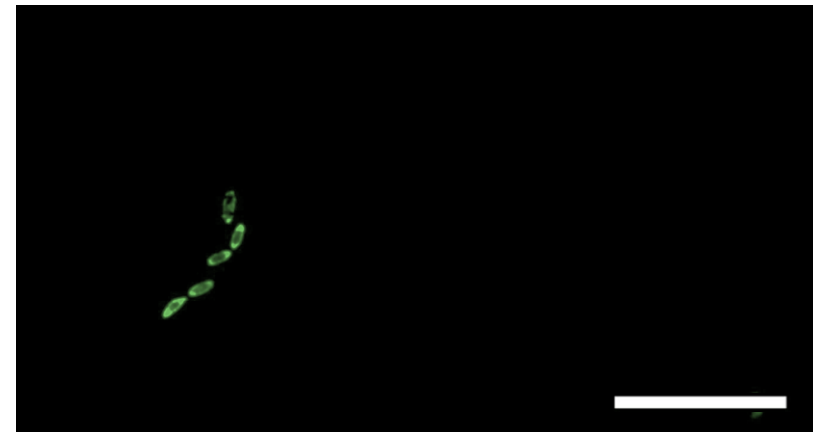
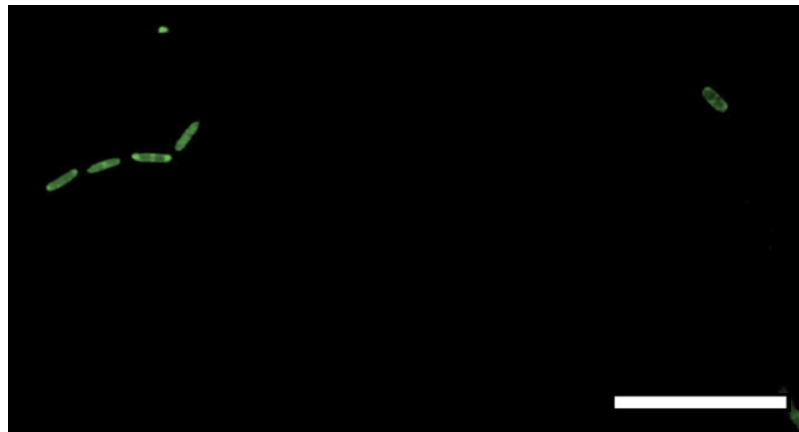
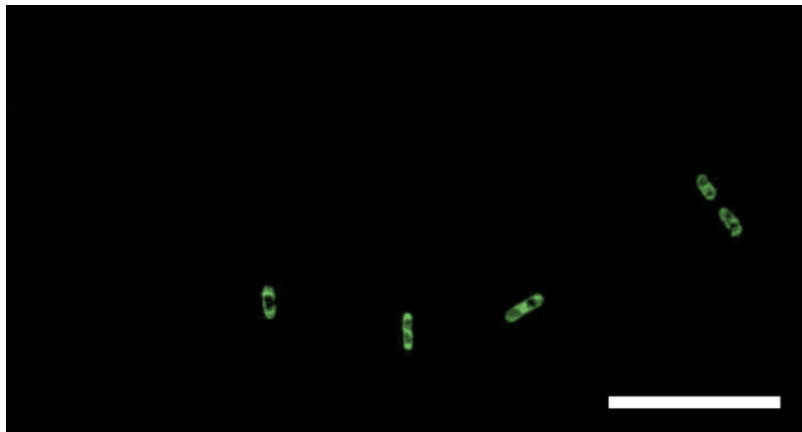
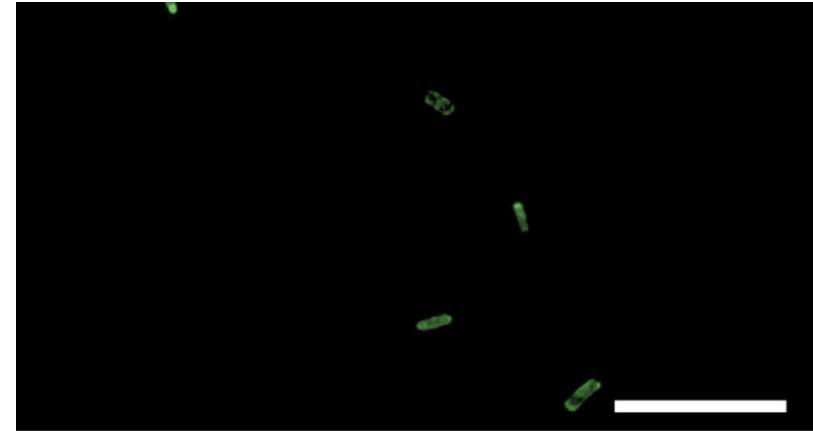
(119) Prigent-Combaret, C., Prensier, G., Le Thi, T. T., Vidal, O., Lejeune, P., & Dorel, C. Developmental pathway for biofilm formation in curli-producing *Escherichia coli* strains: role of flagella, curli and colanic acid. *Environmental microbiology*: (2000); 2(4): 450-464.

# Anexo I

Formación de biopelículas de UPEC CFT073 móvil y UPEC ST12 OD65 fenotípicamente inmóvil, en cultivo estático.

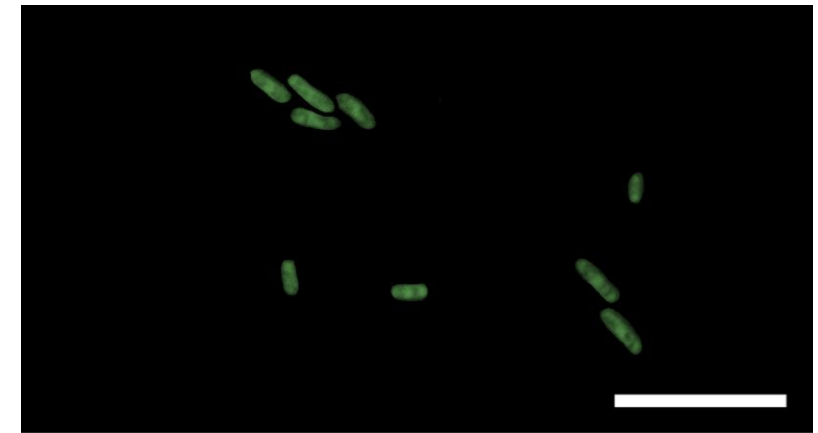
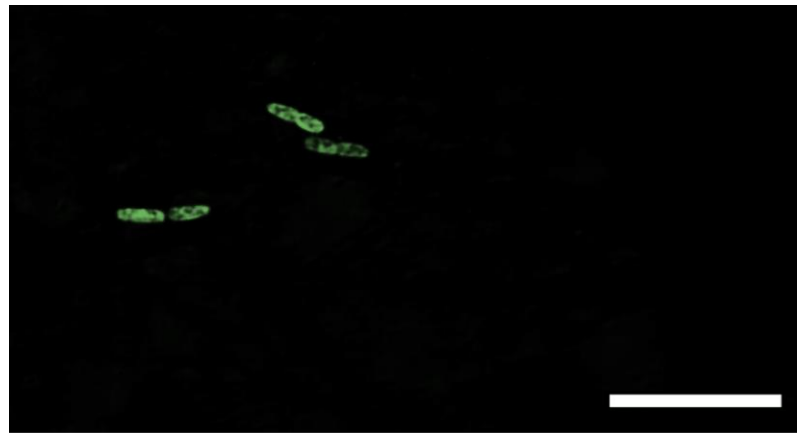
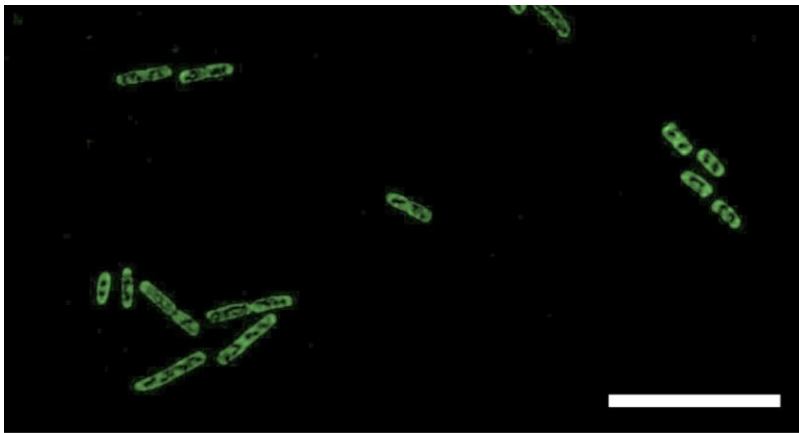
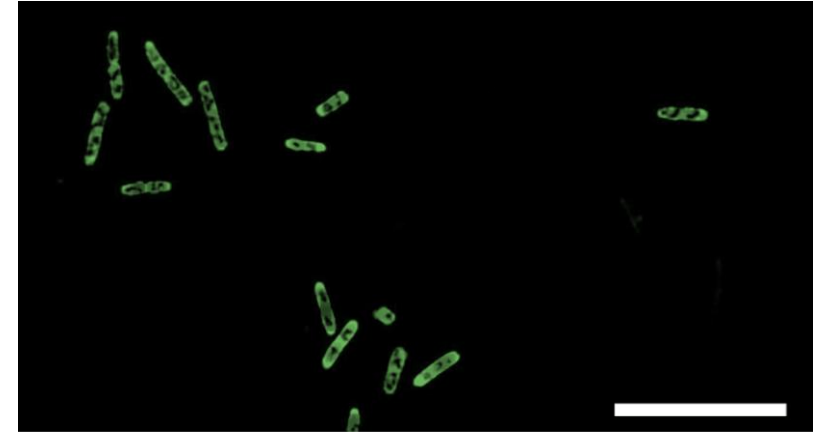
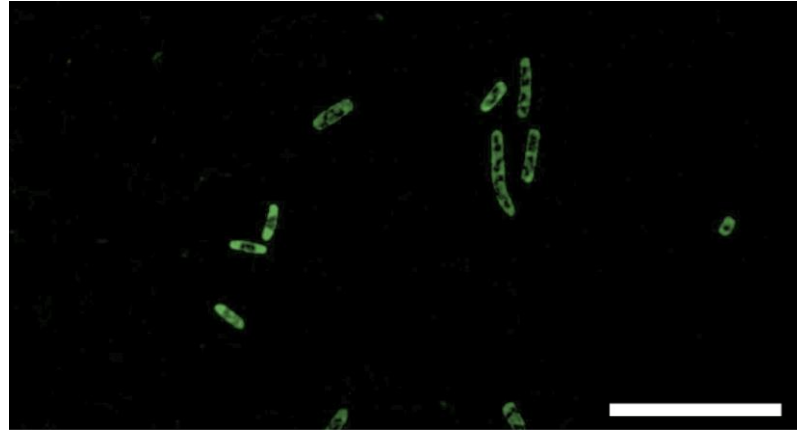
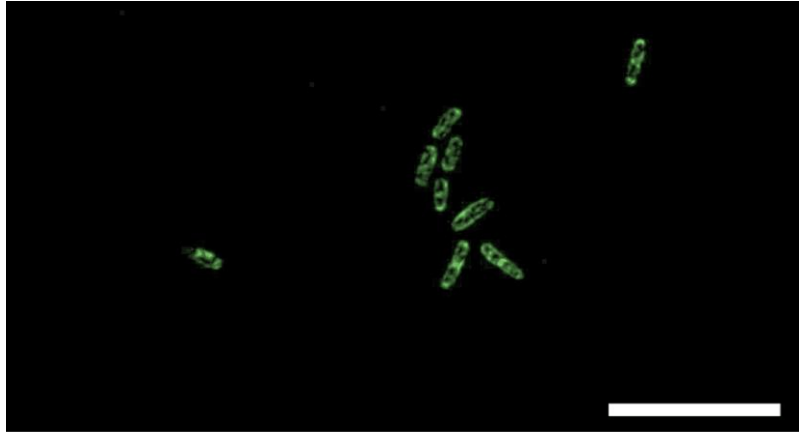
**UPEC CFT073**

CFT073- 1 h

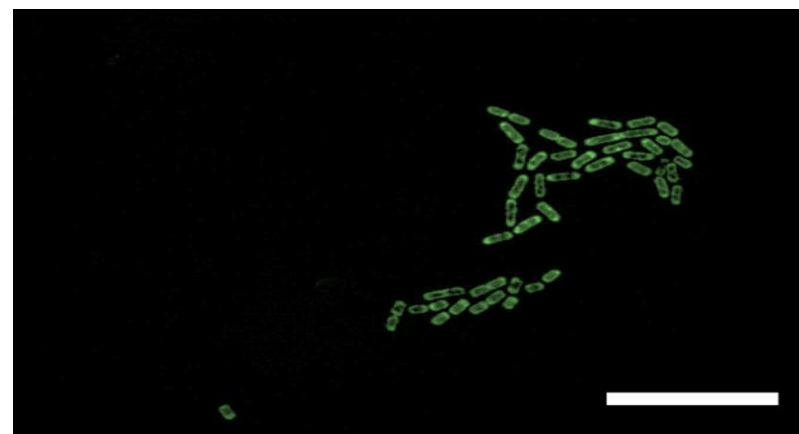
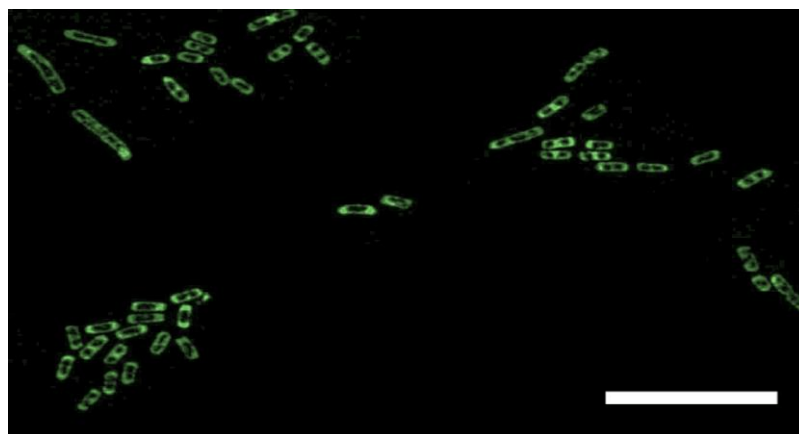
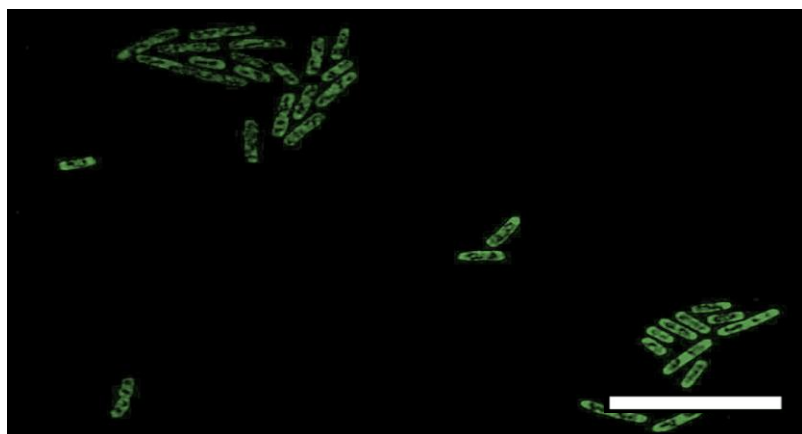
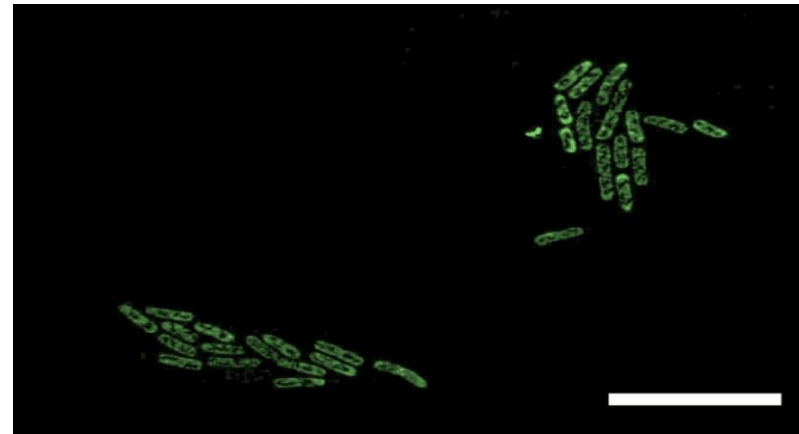
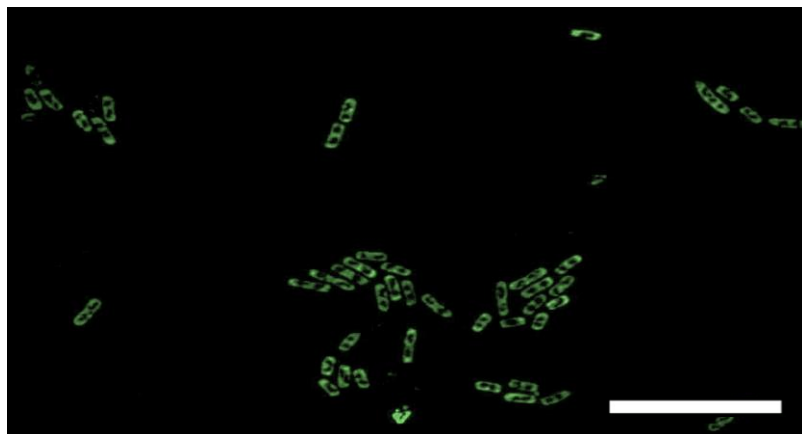




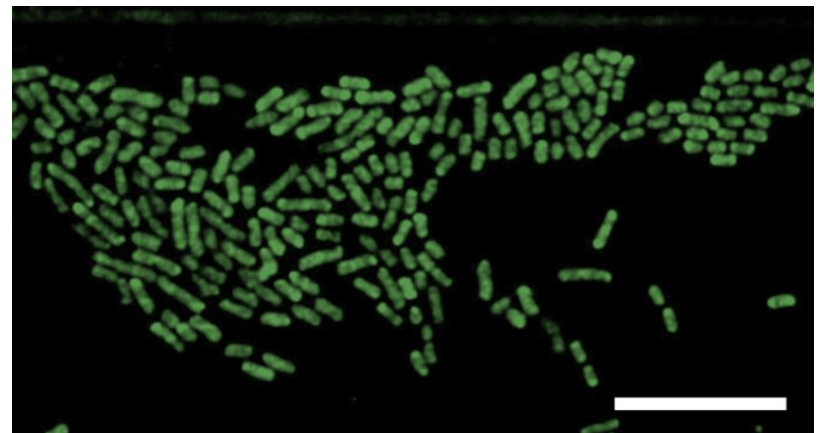
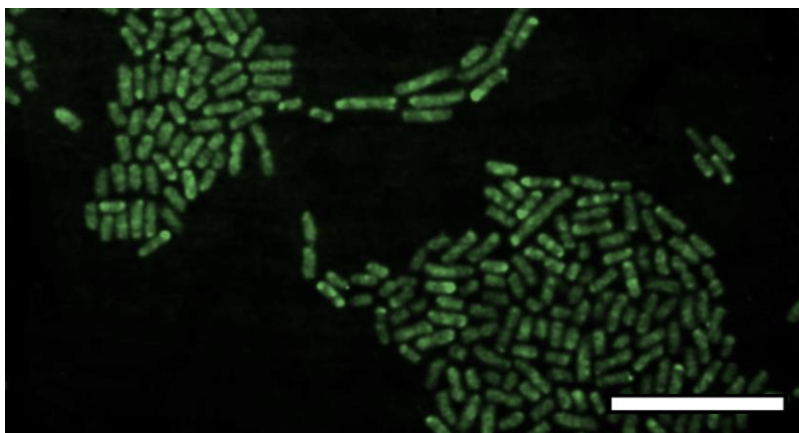
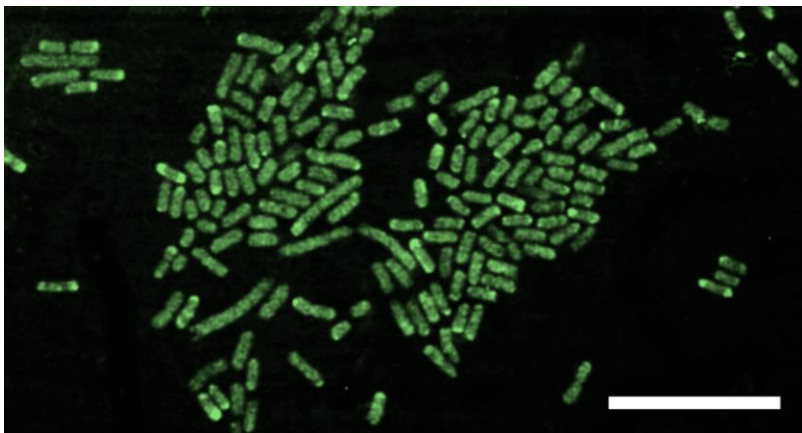
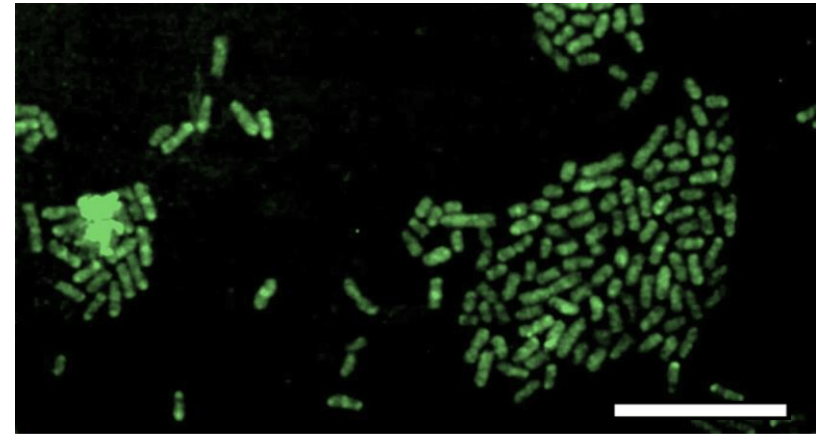
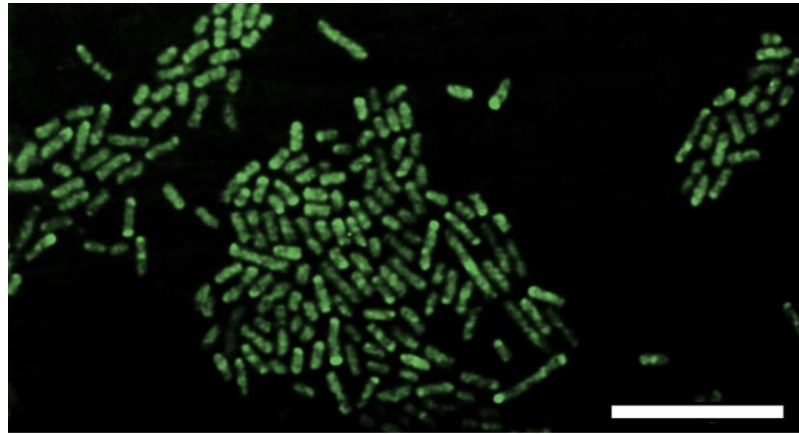
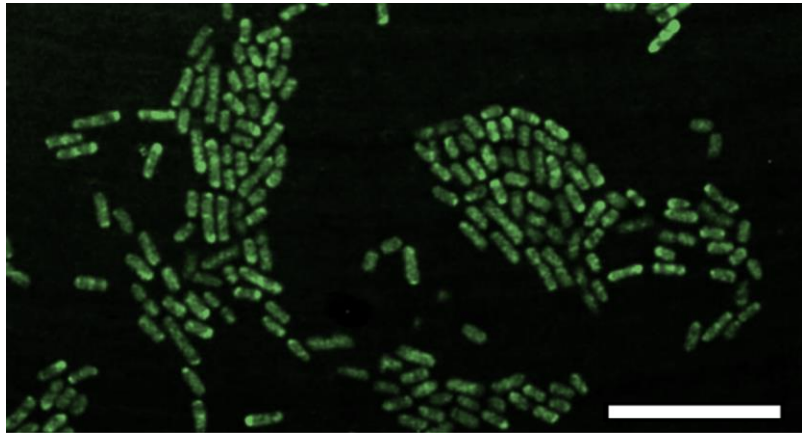
# CFT073- 2 h



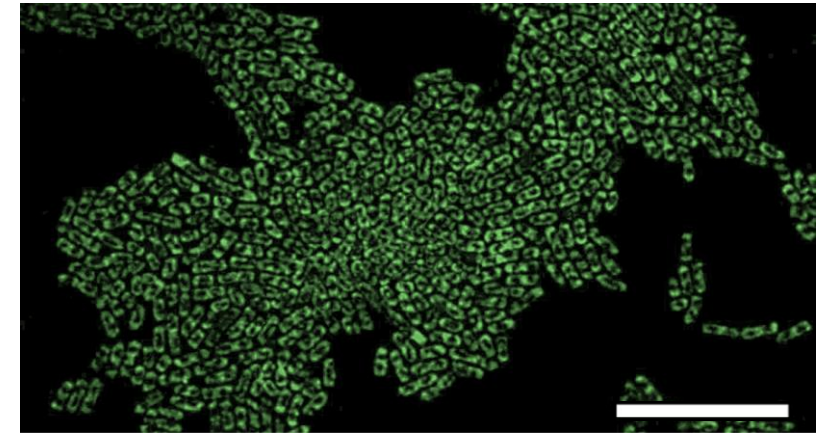
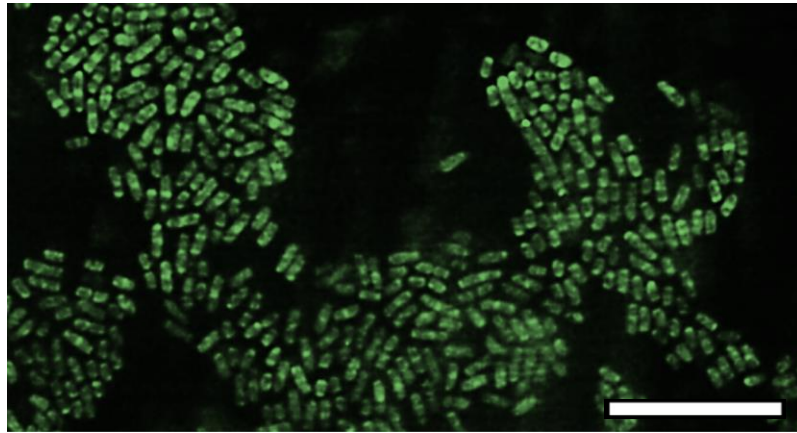
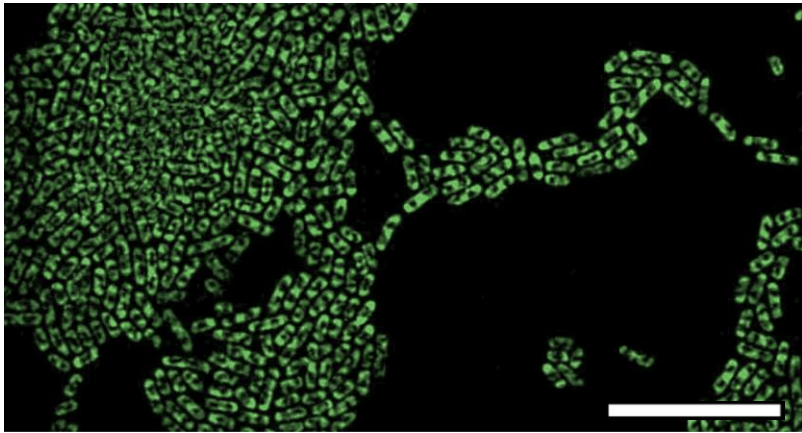
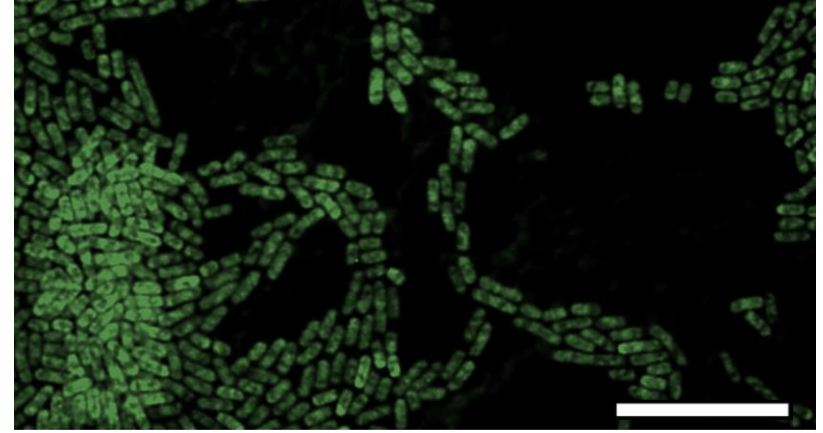
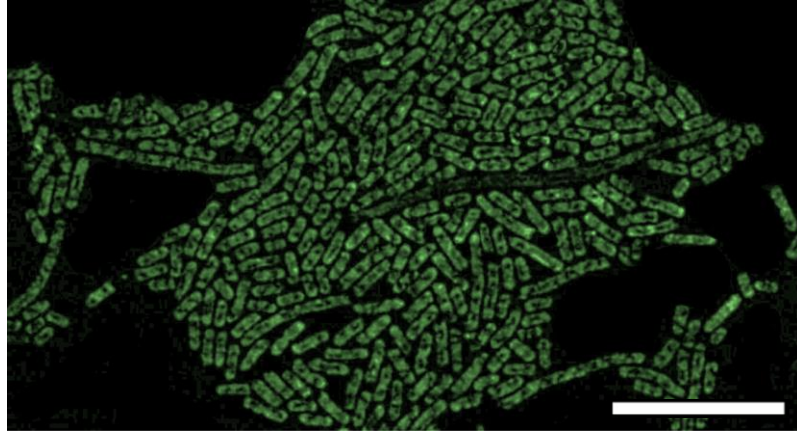
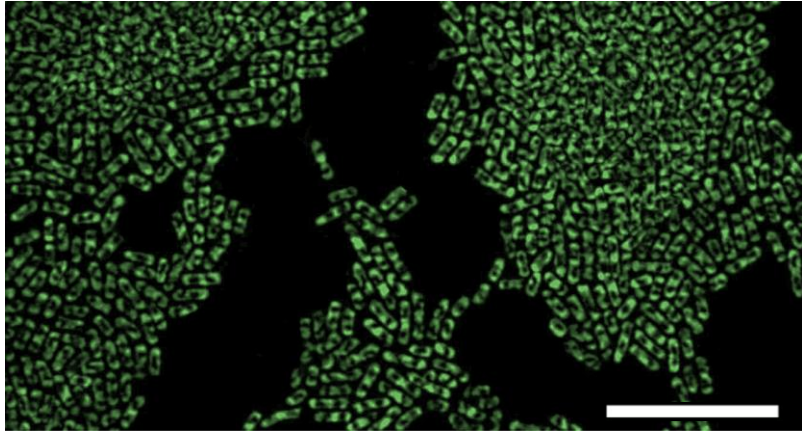
CFT073- 3 h



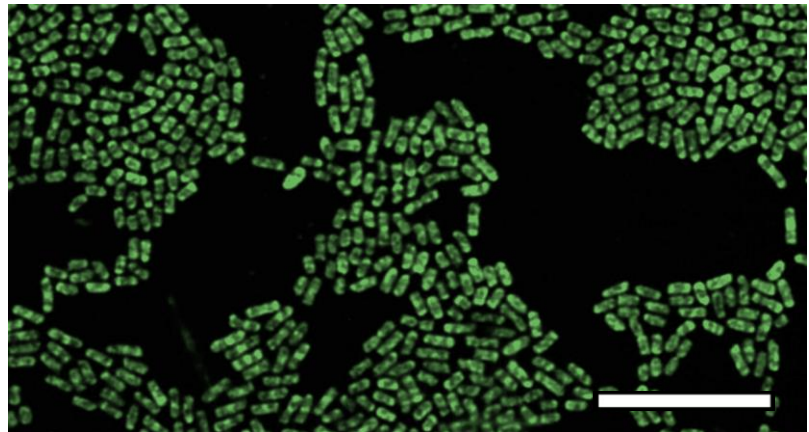
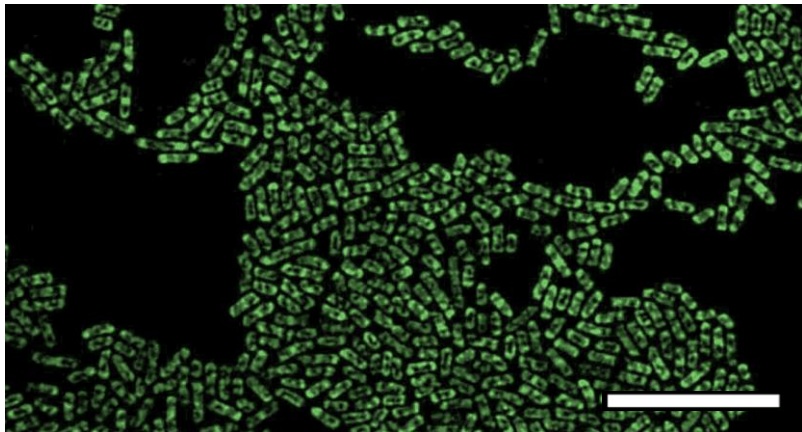
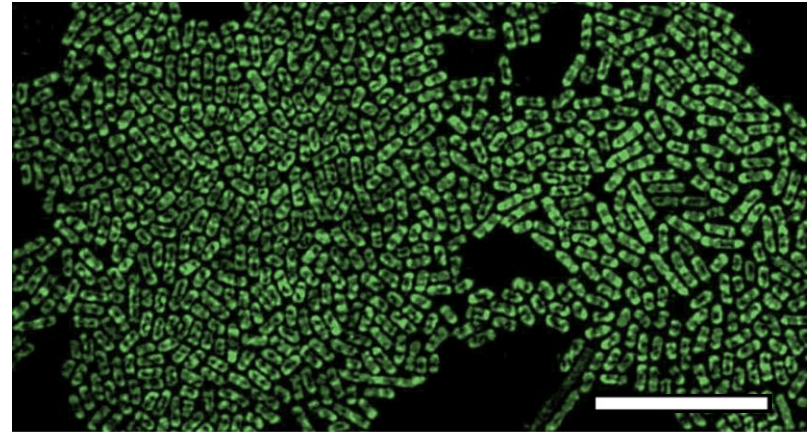
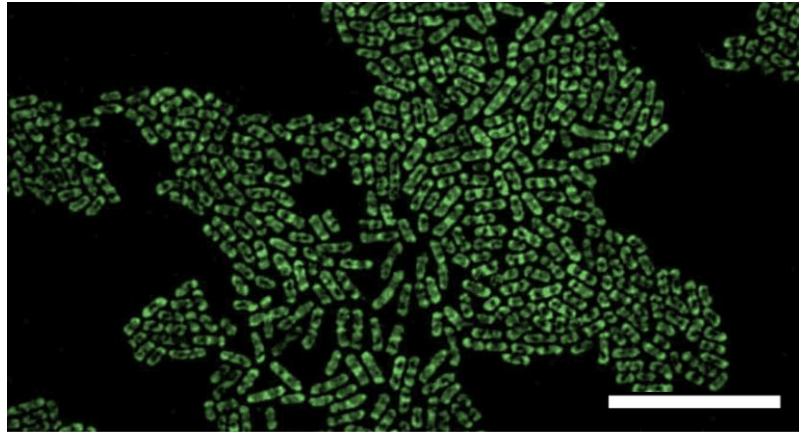
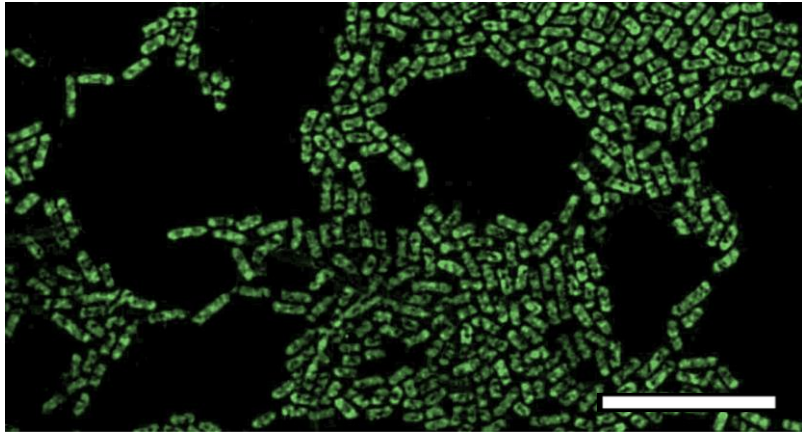
CFT073- 4 h



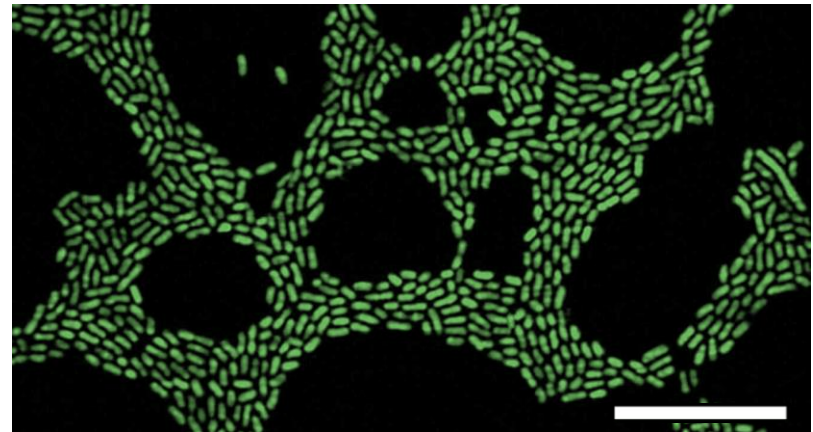
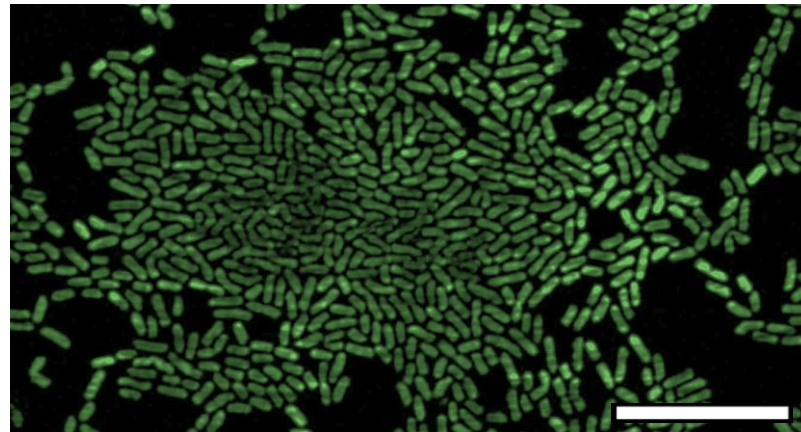
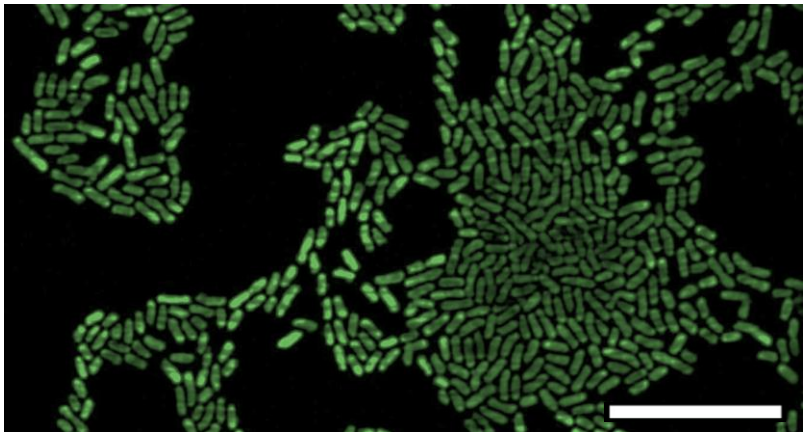
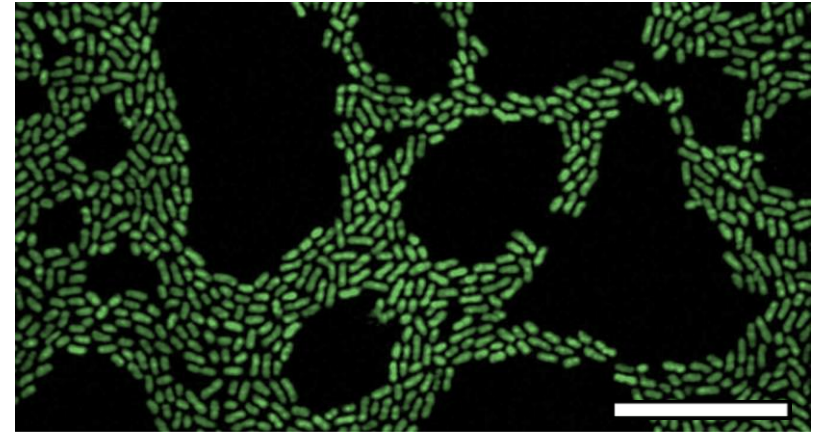
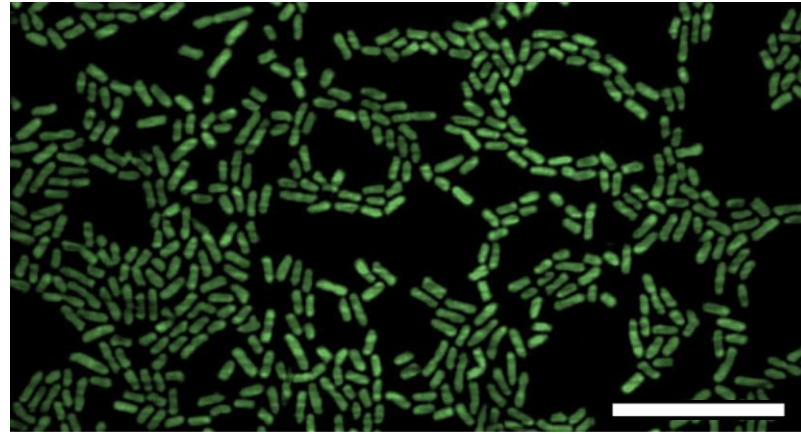
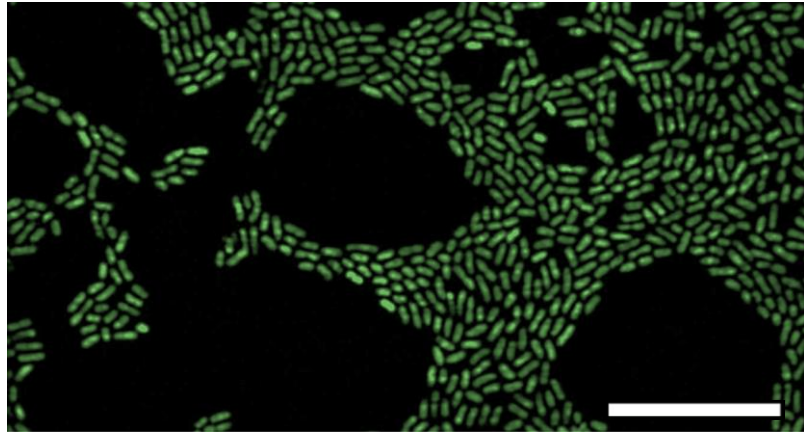
# CFT073- 5 h



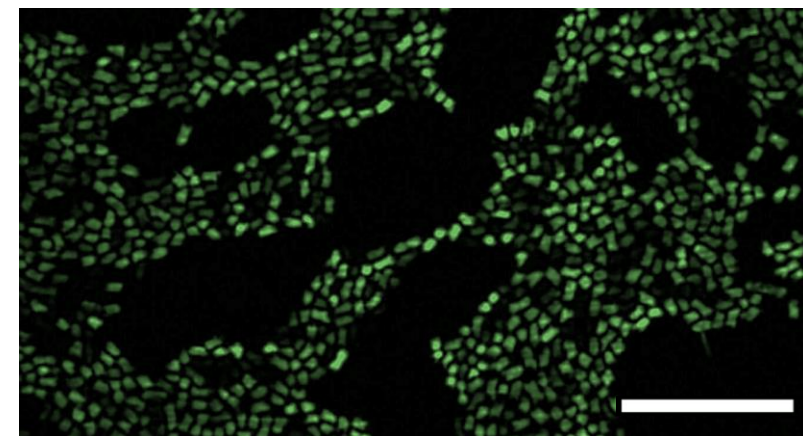
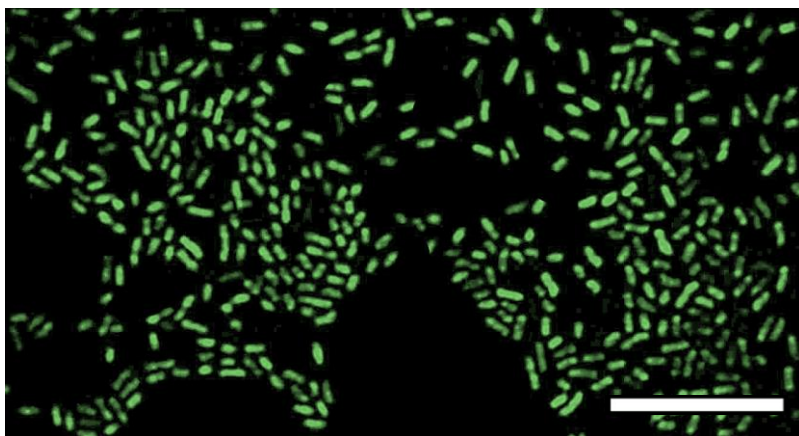
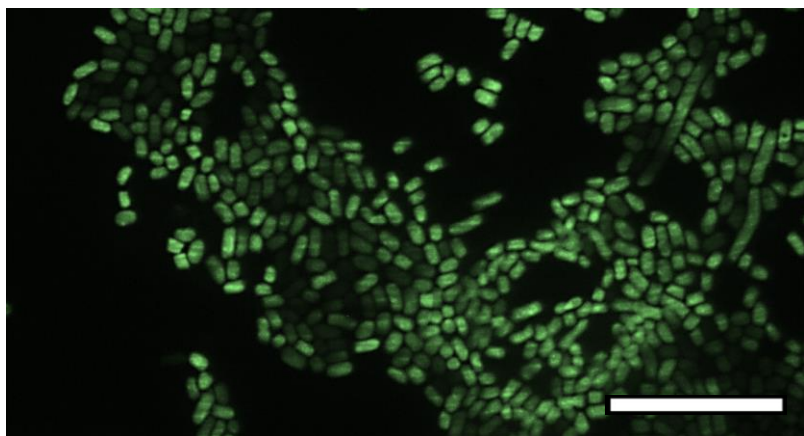
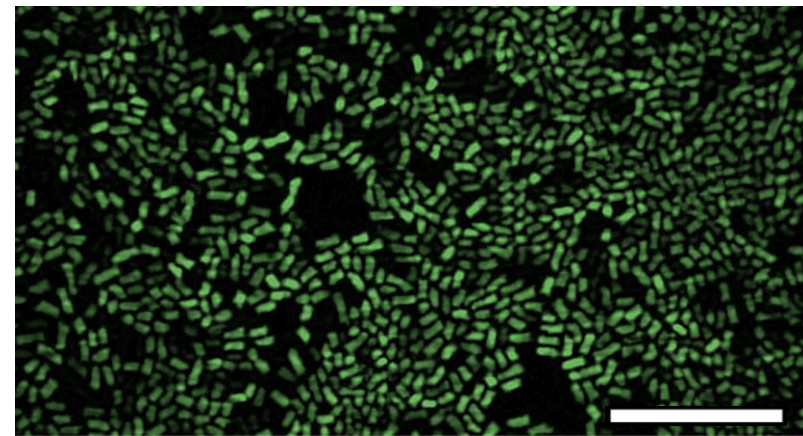
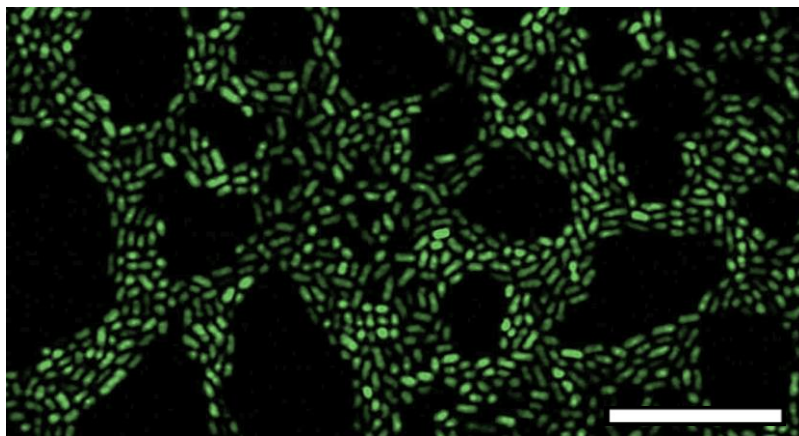
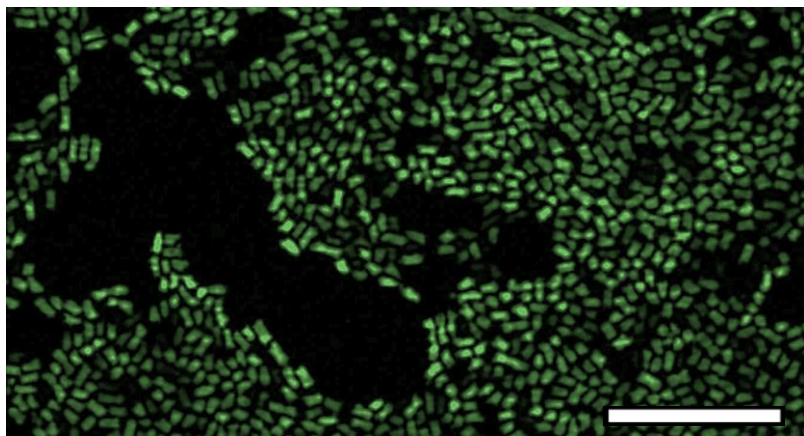
# CFT073- 6 h



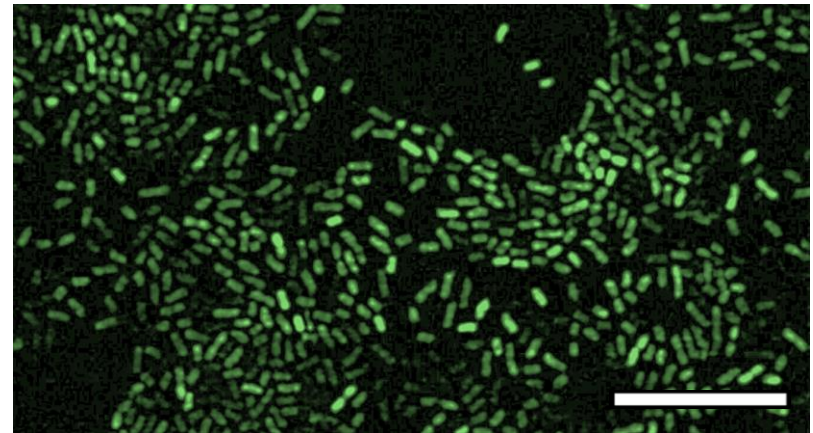
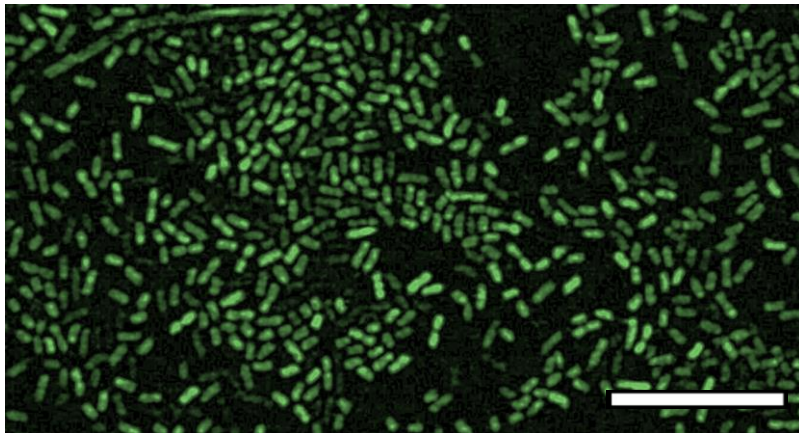
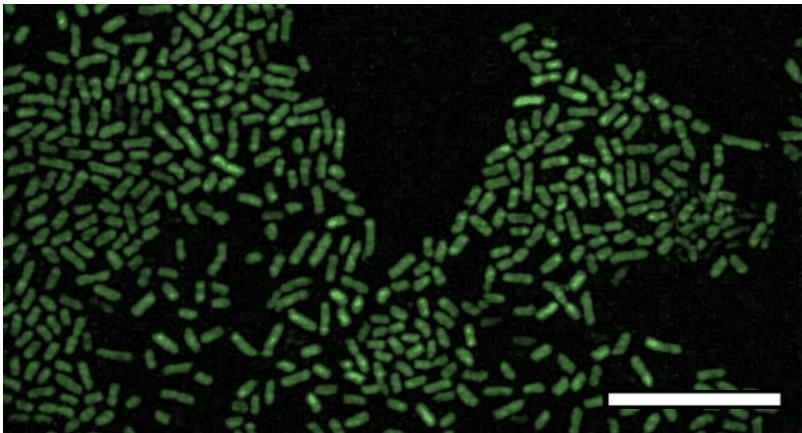
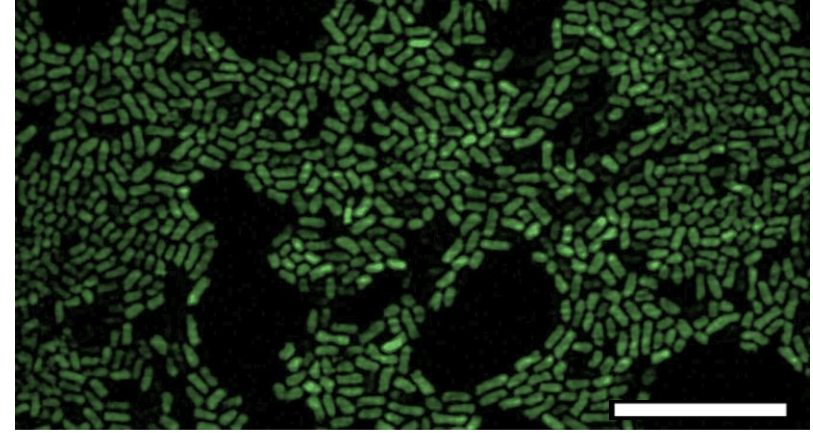
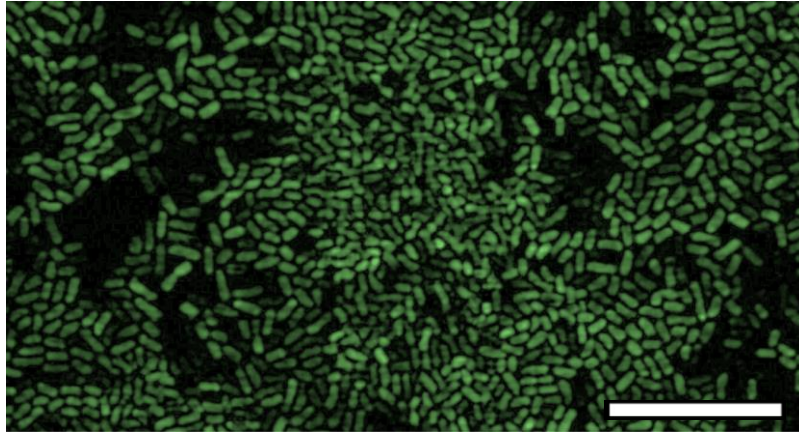
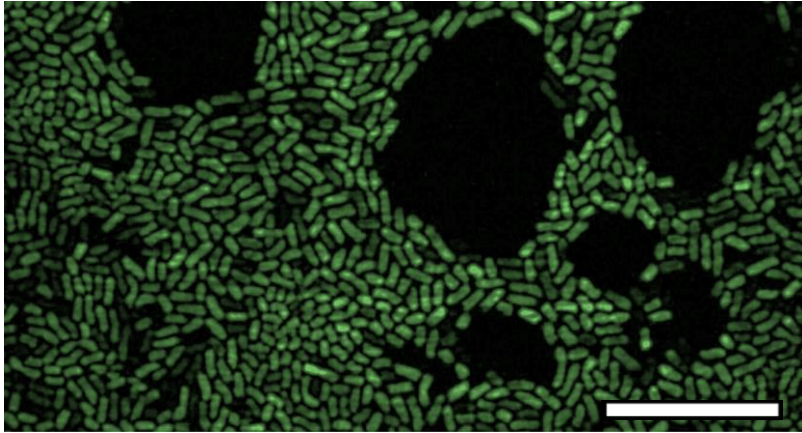
CFT073- 7 h



CFT073- 8 h

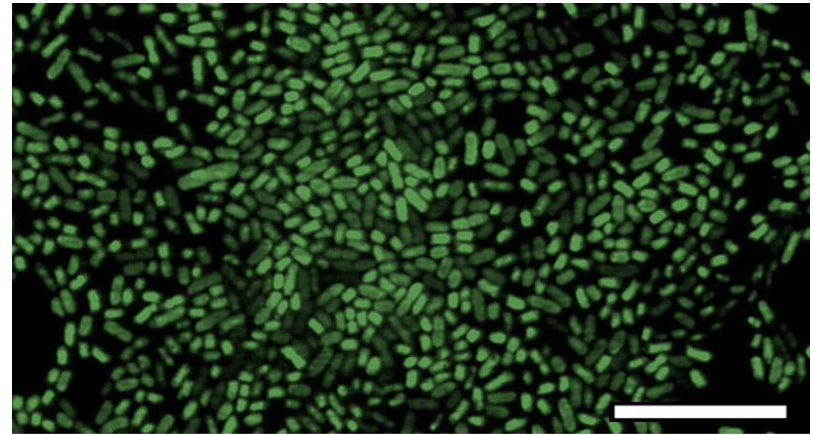
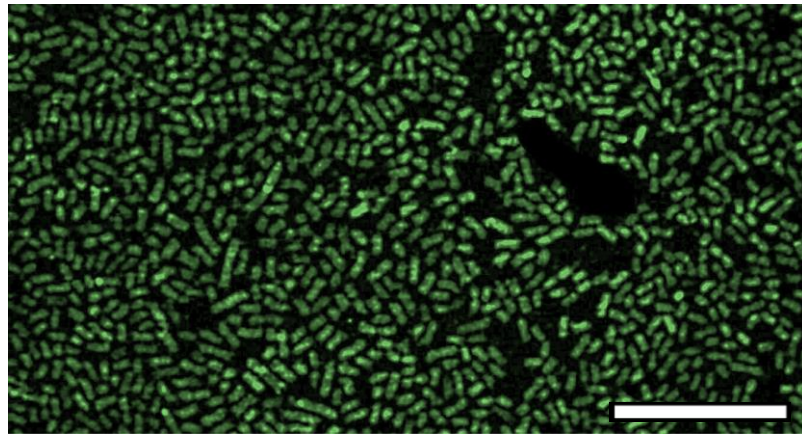
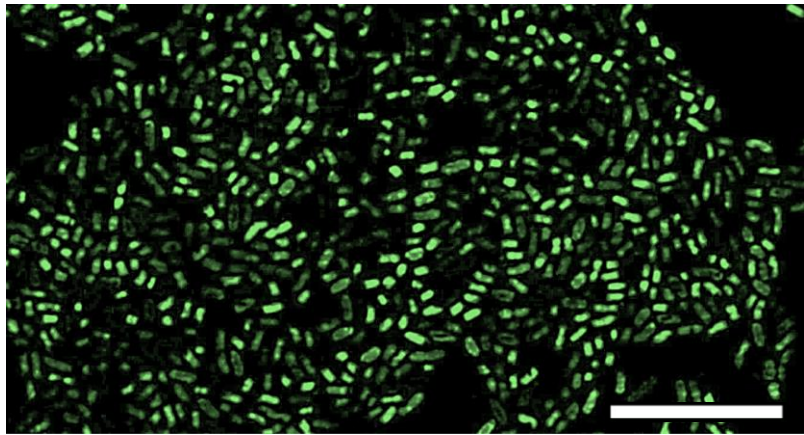
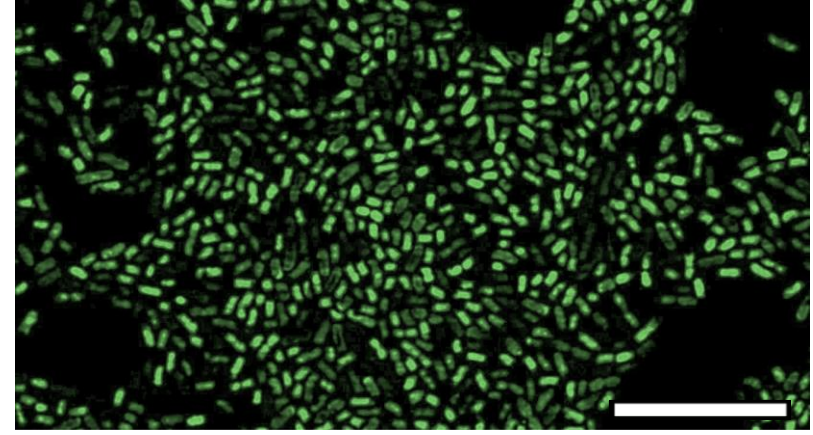
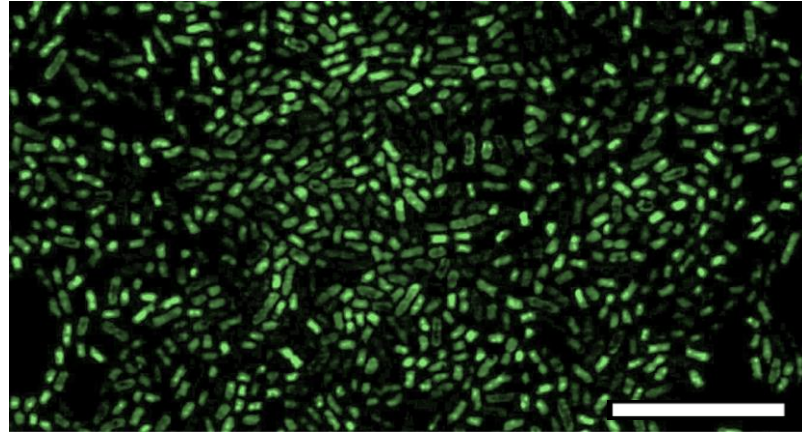
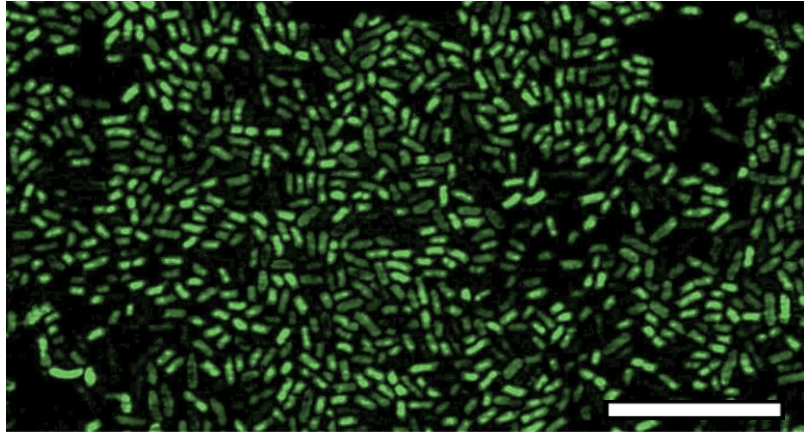


CFT073- 9 h

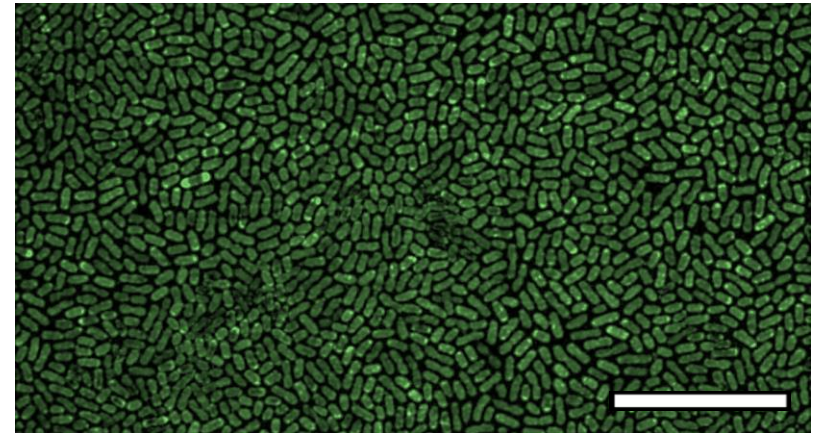
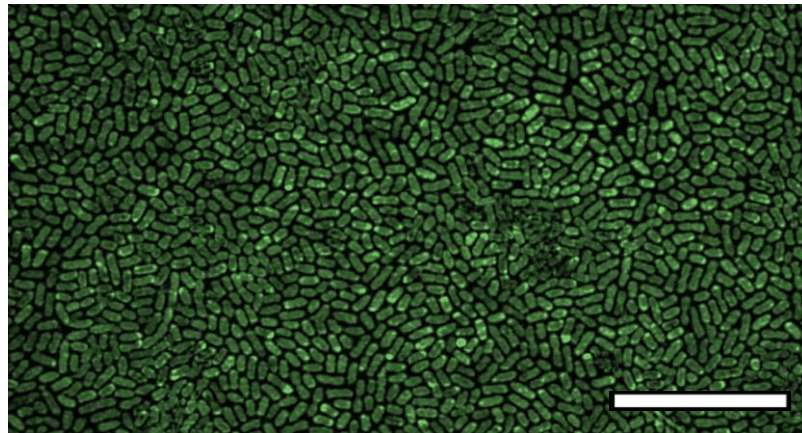
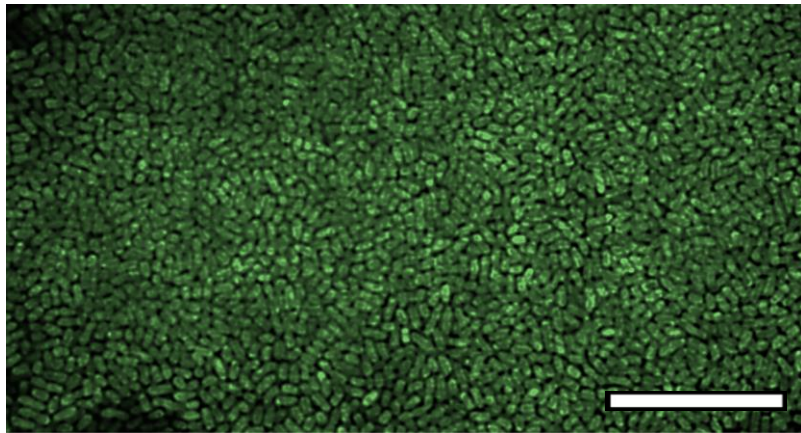
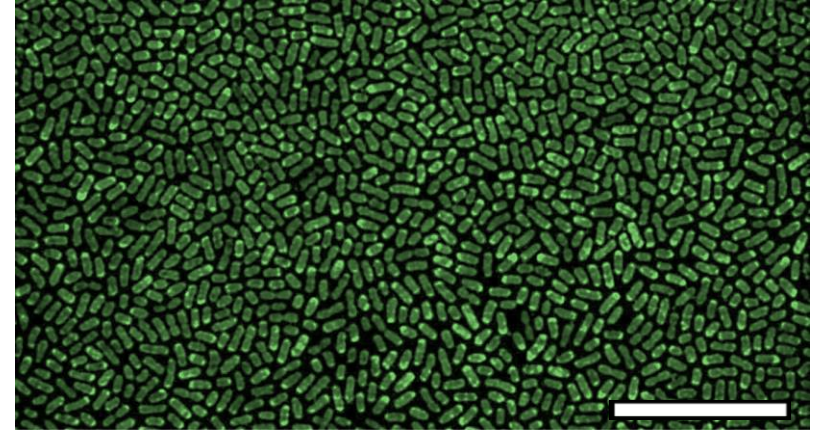
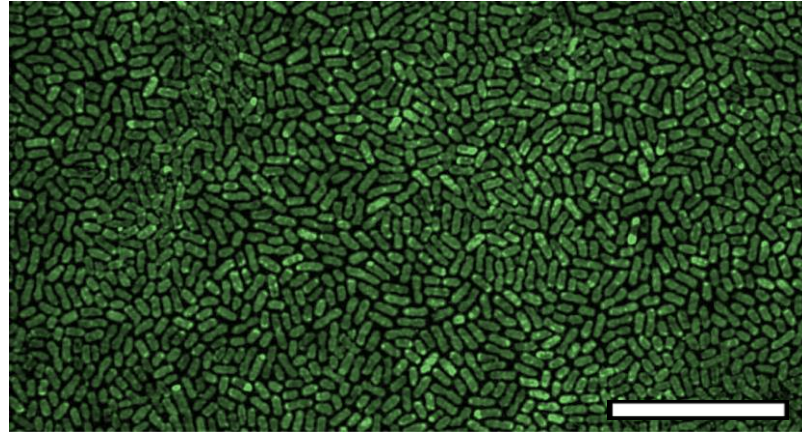
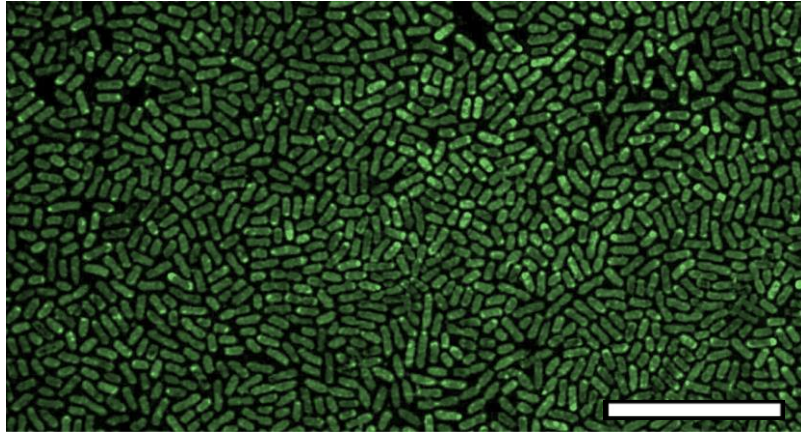




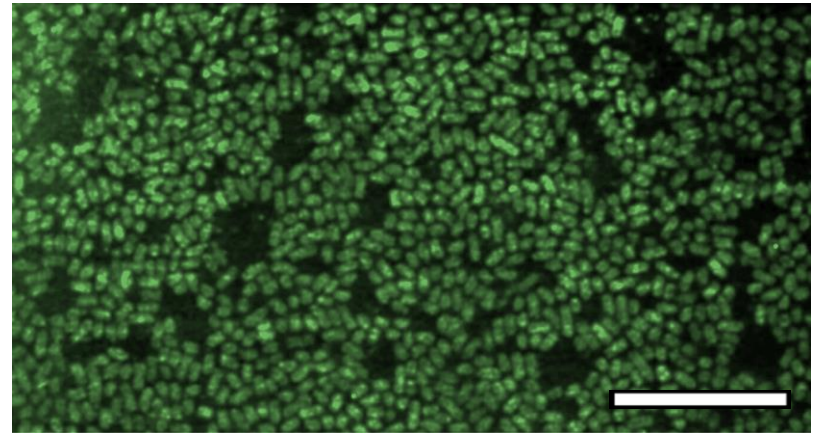
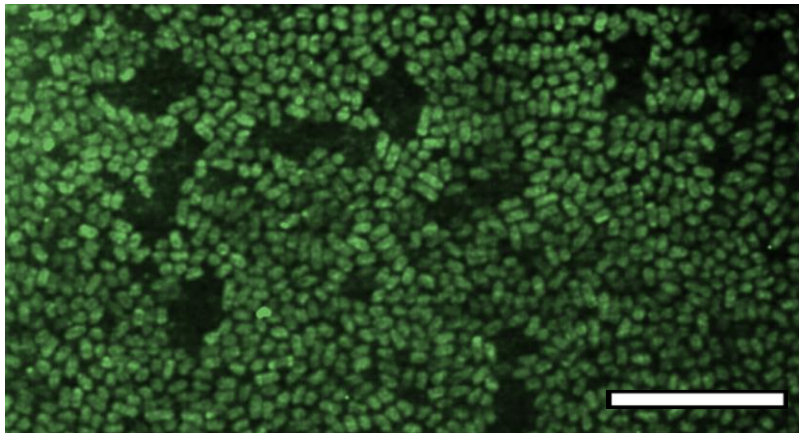
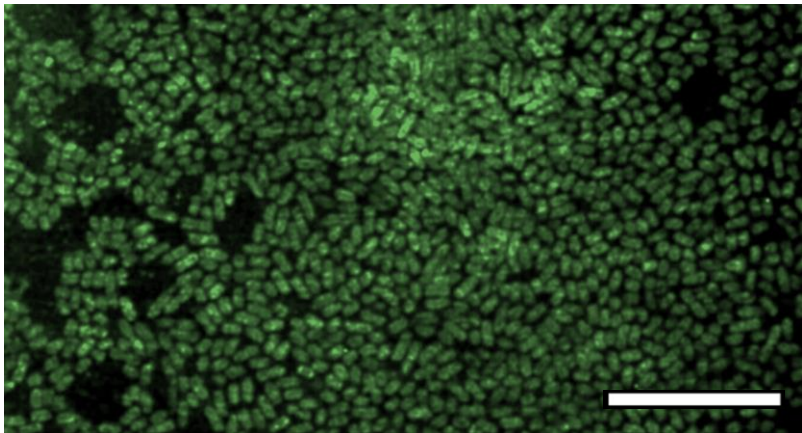
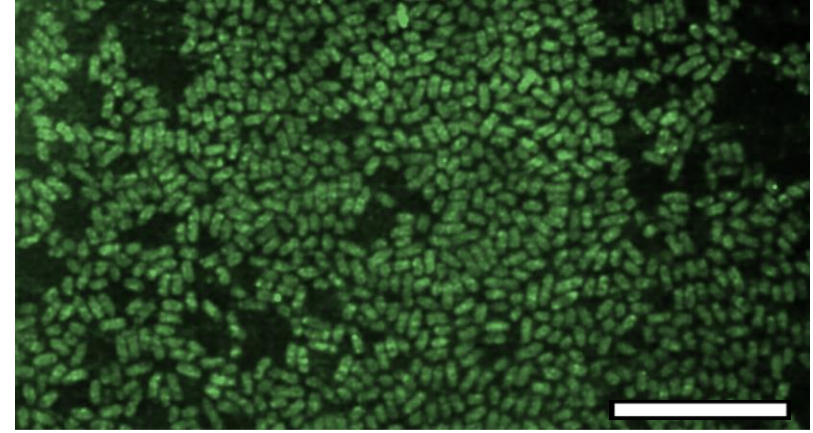
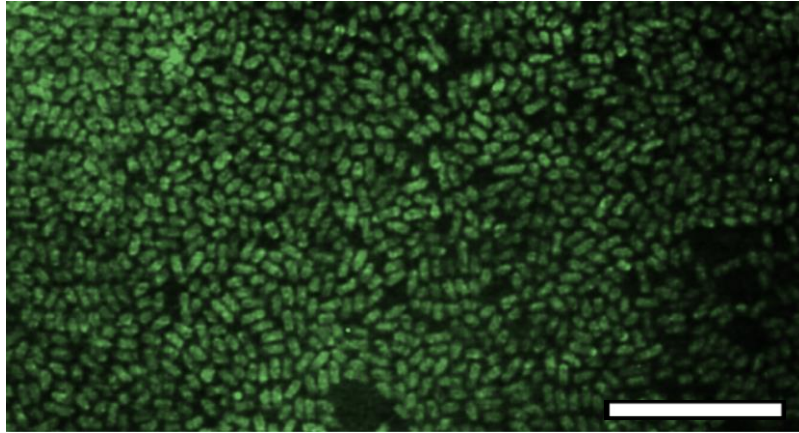
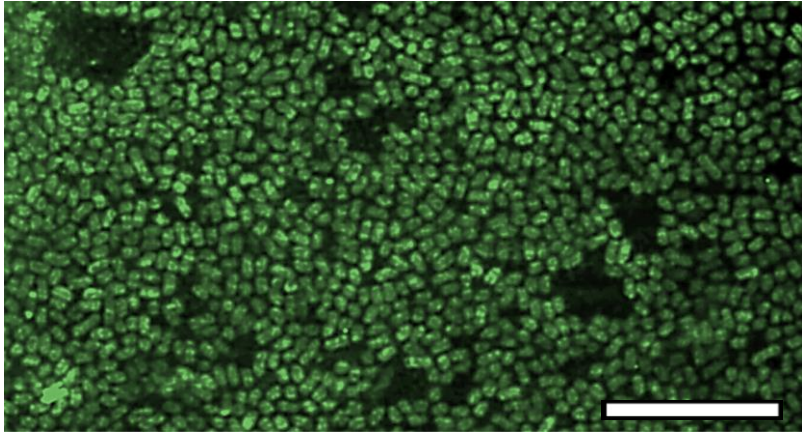
# CFT073- 10 h



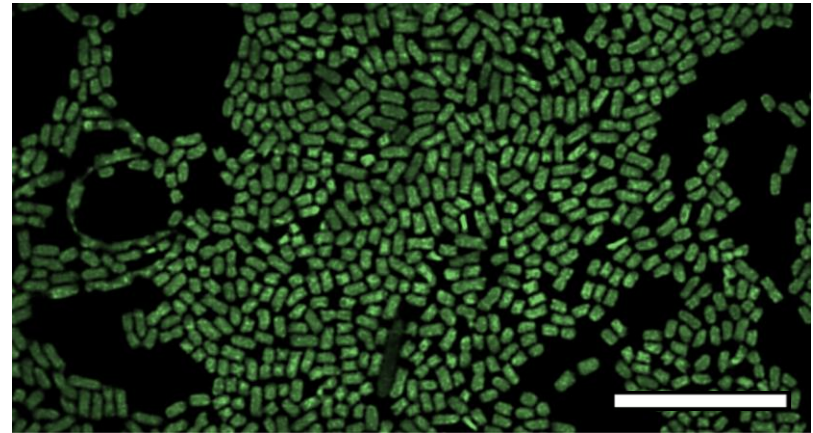
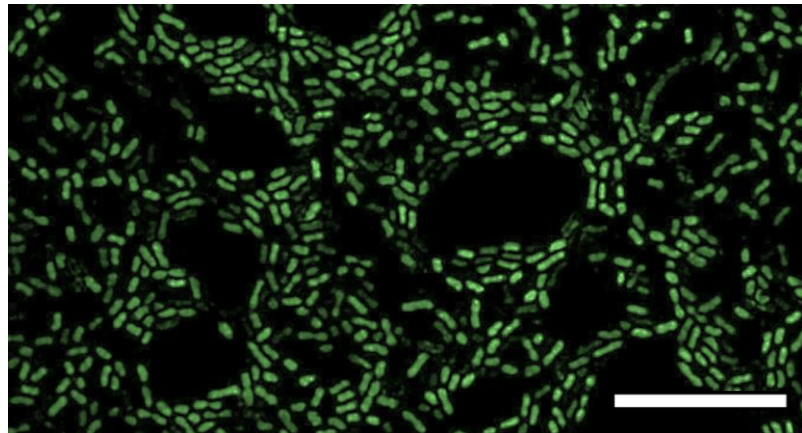
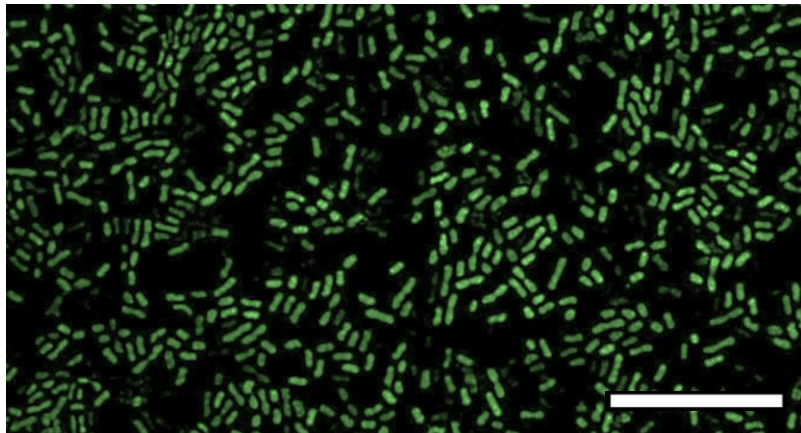
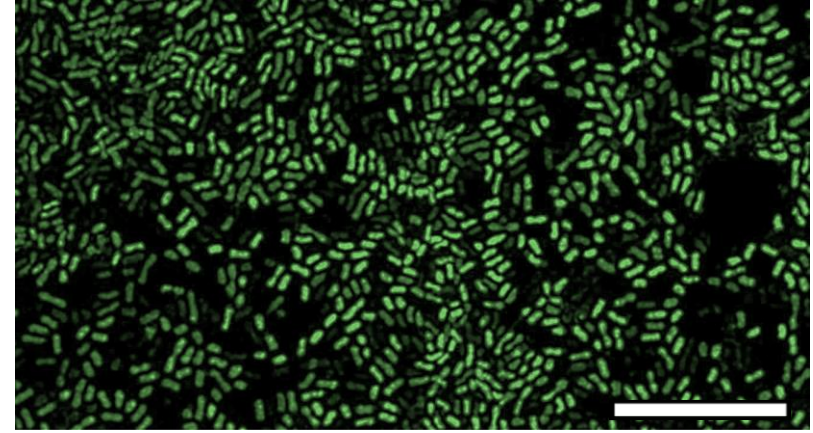
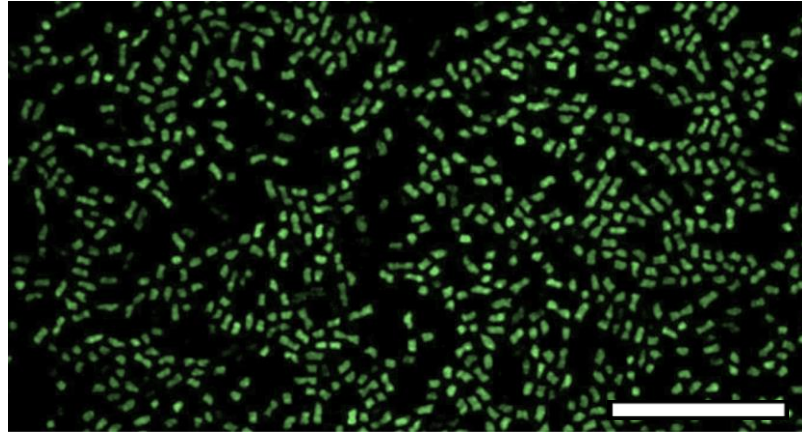
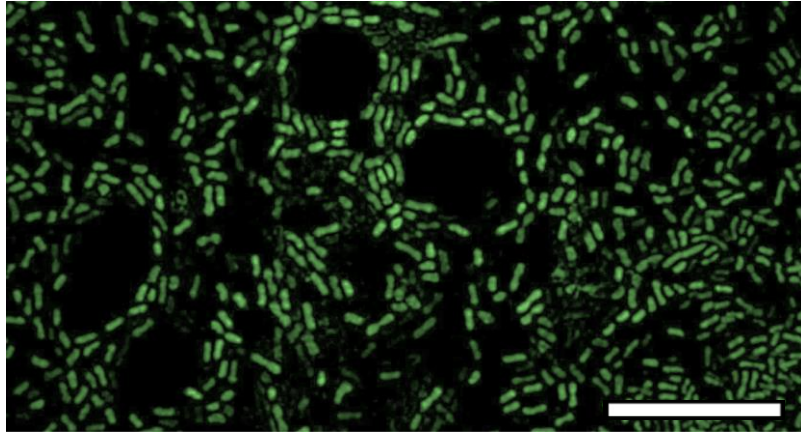
CFT073- 11 h



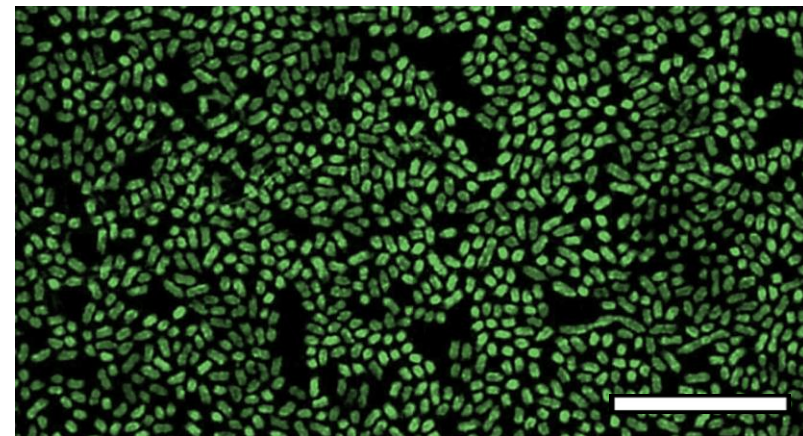
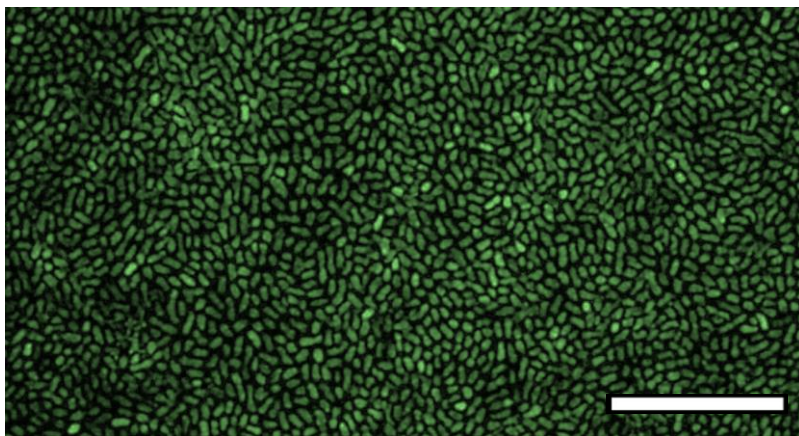
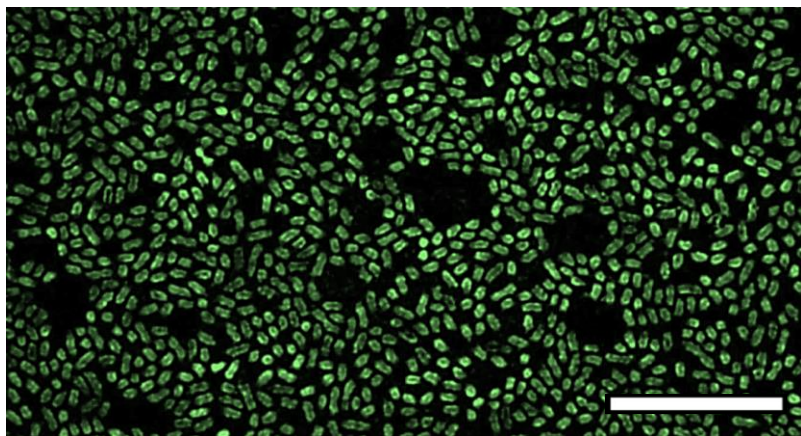
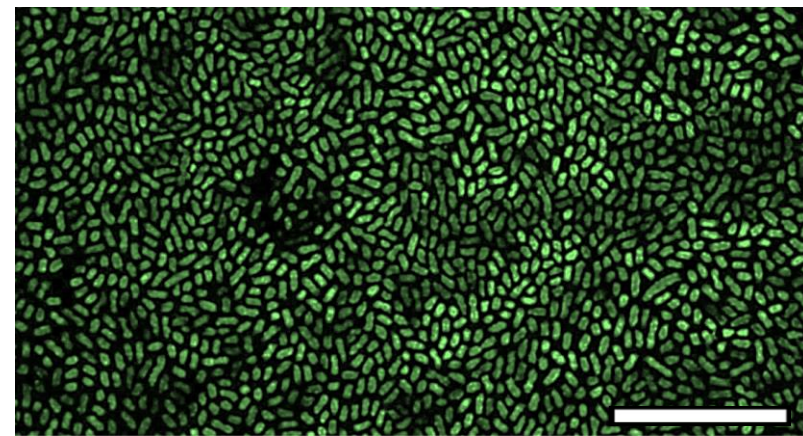
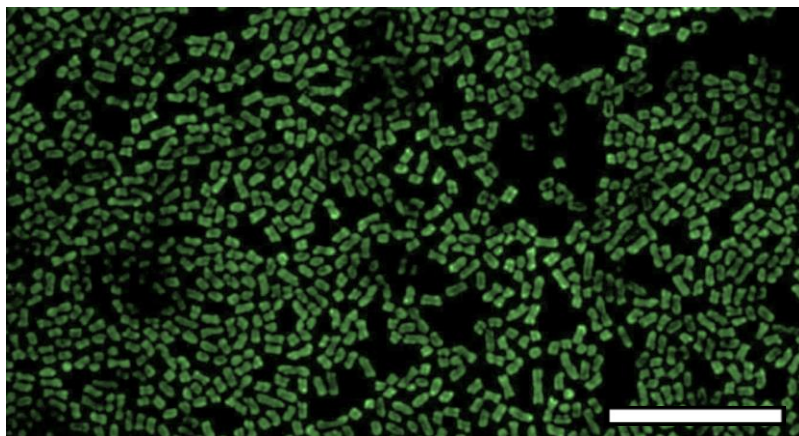
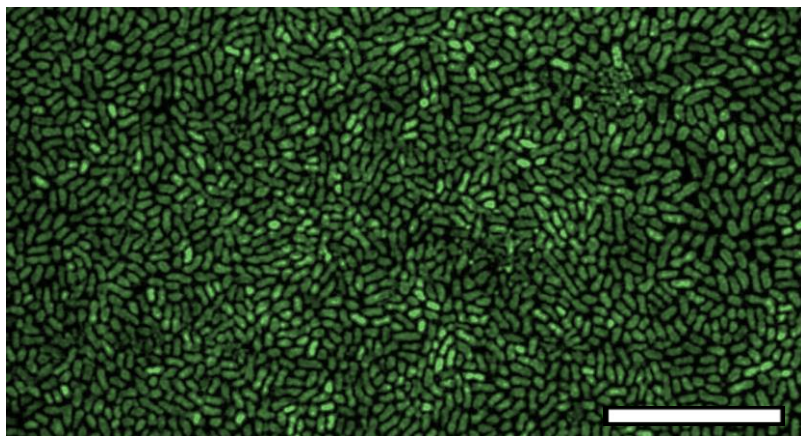
CFT073- 12 h



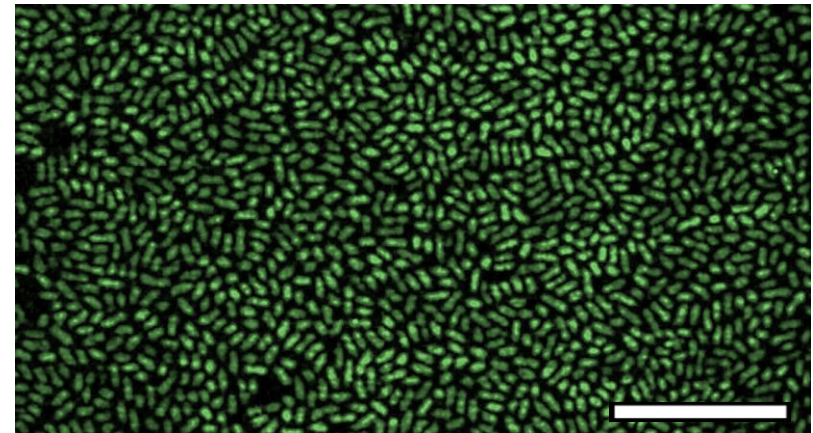
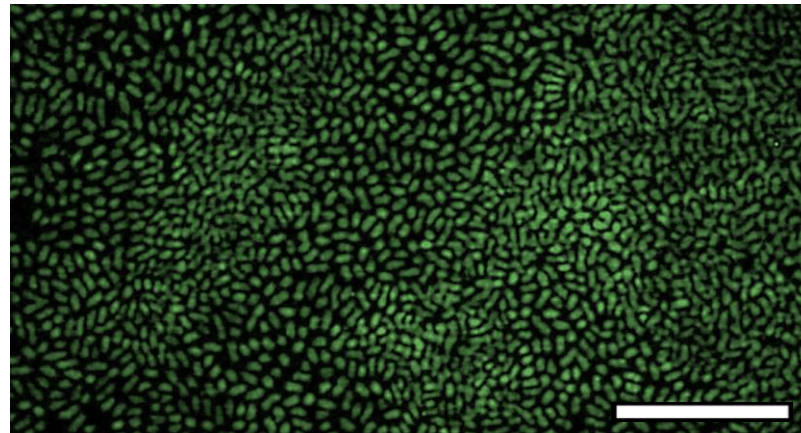
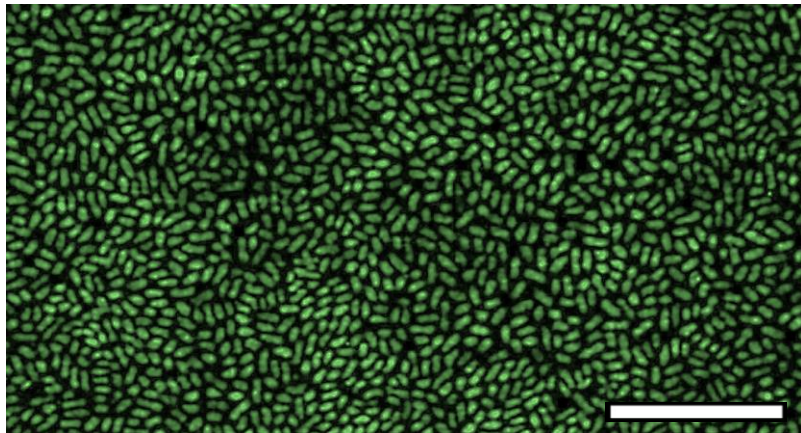
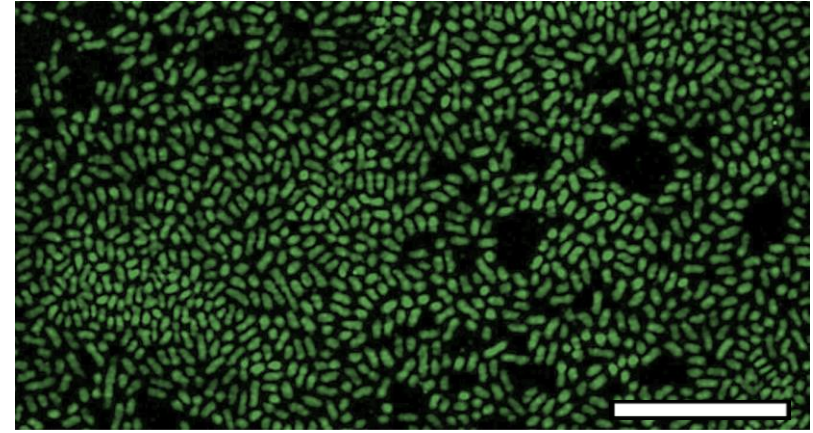
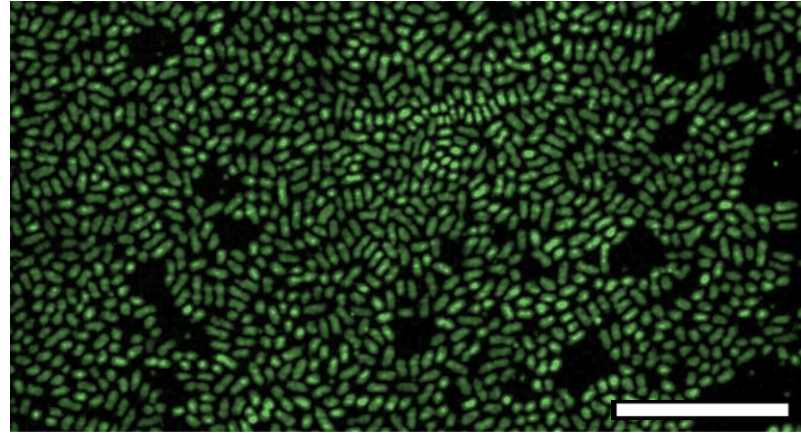
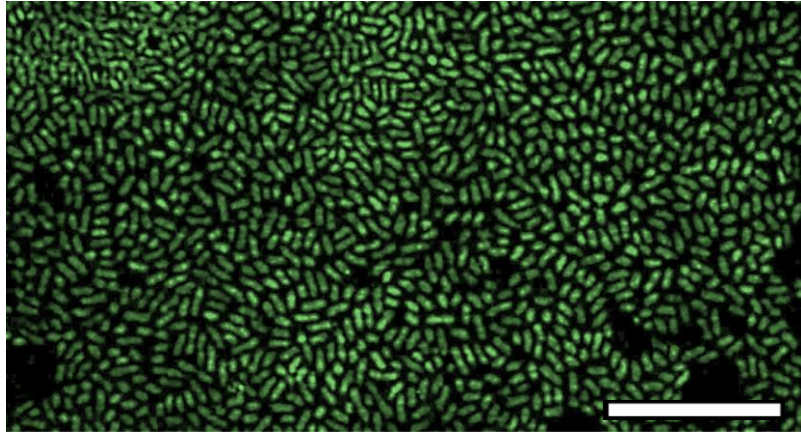
# CFT073- 13 h



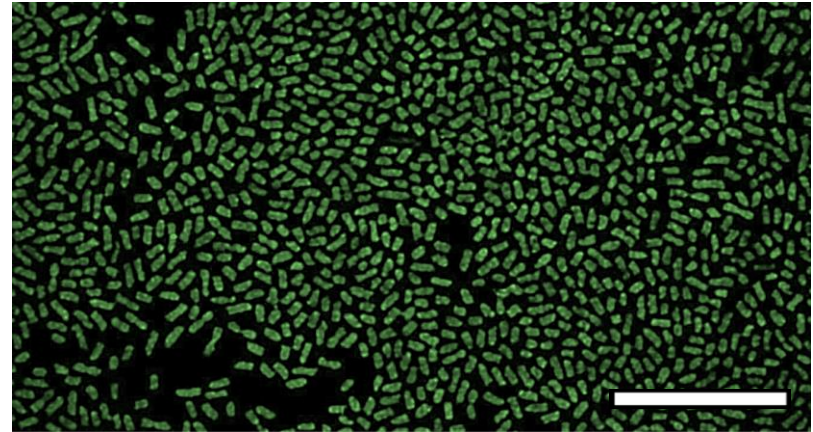
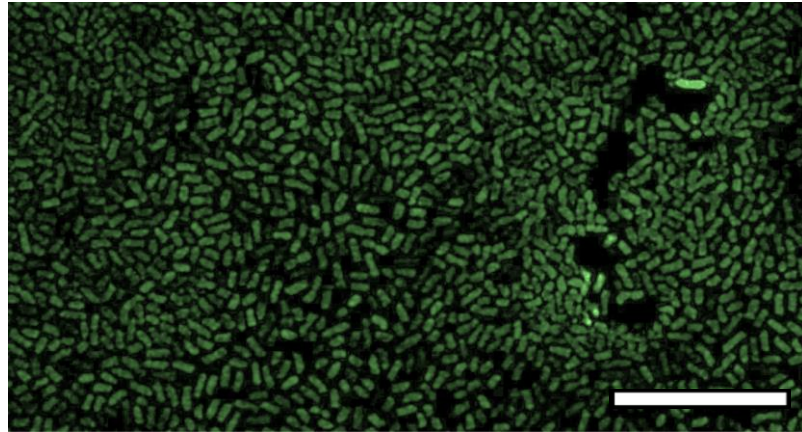
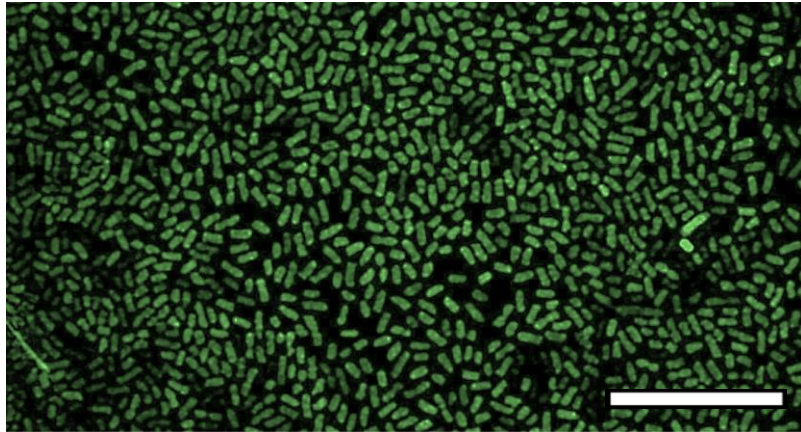
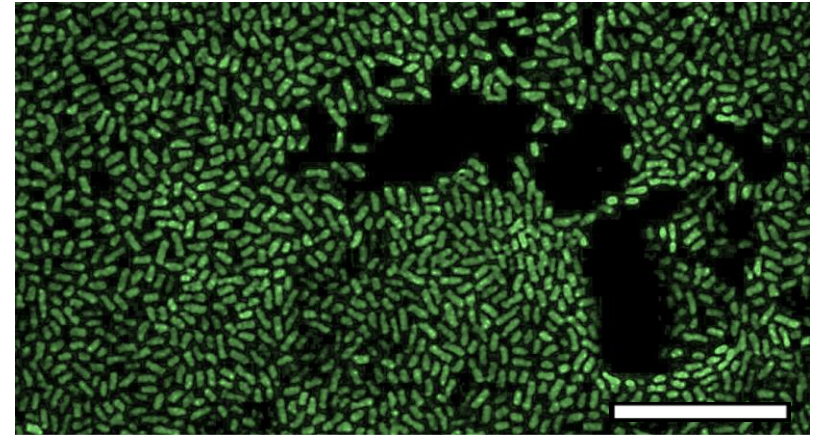
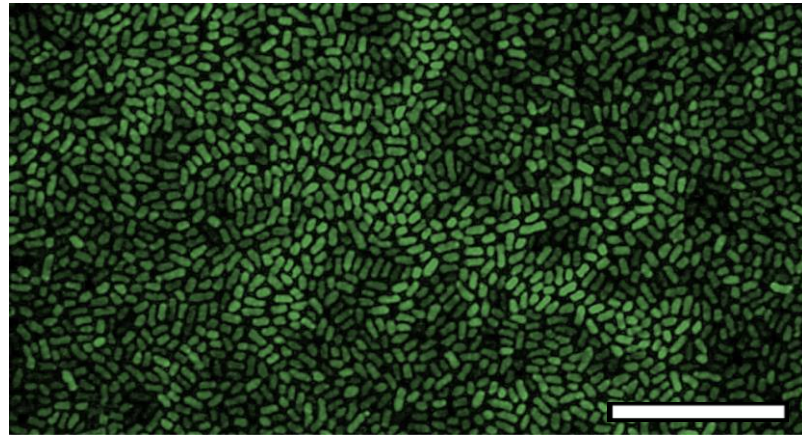
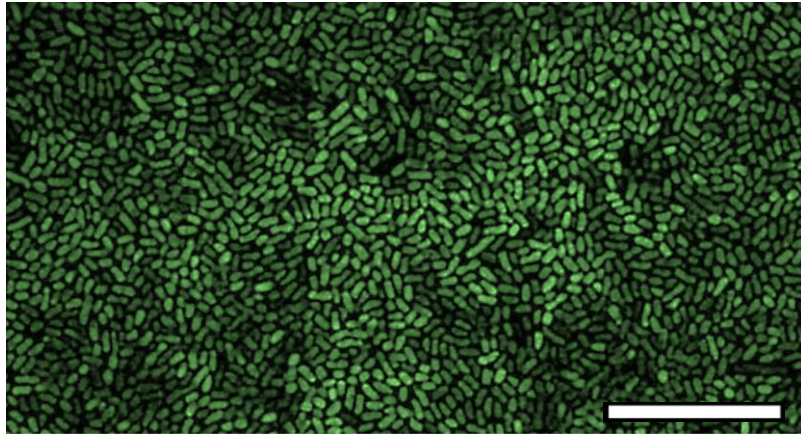
# CFT073- 14 h



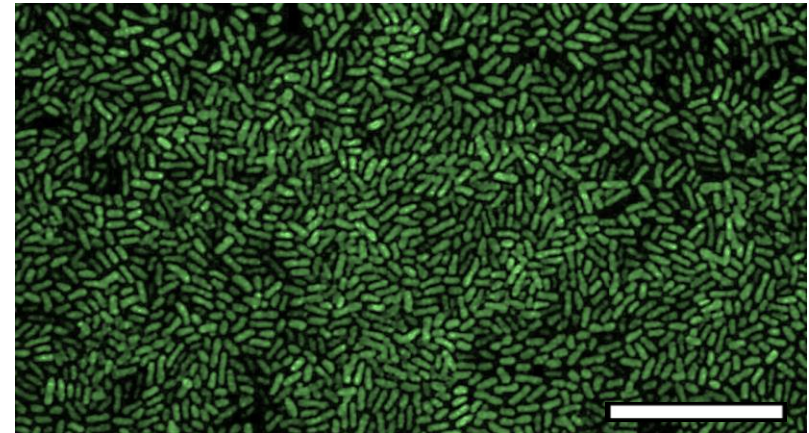
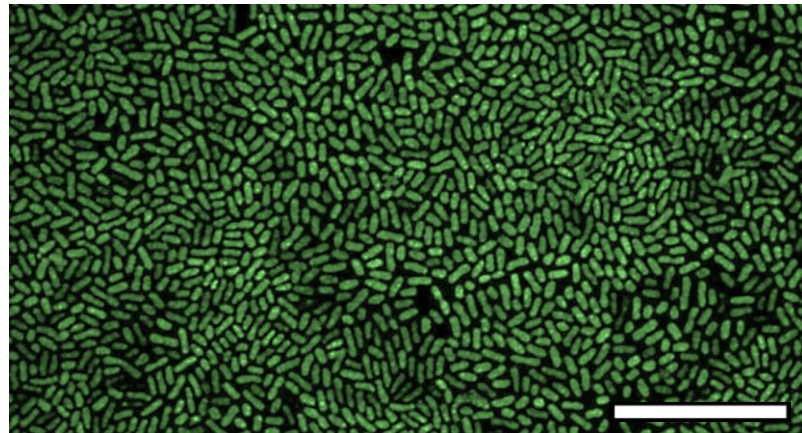
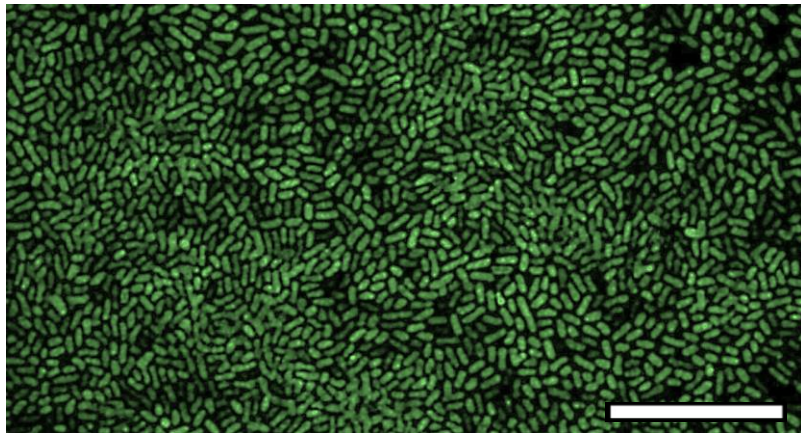
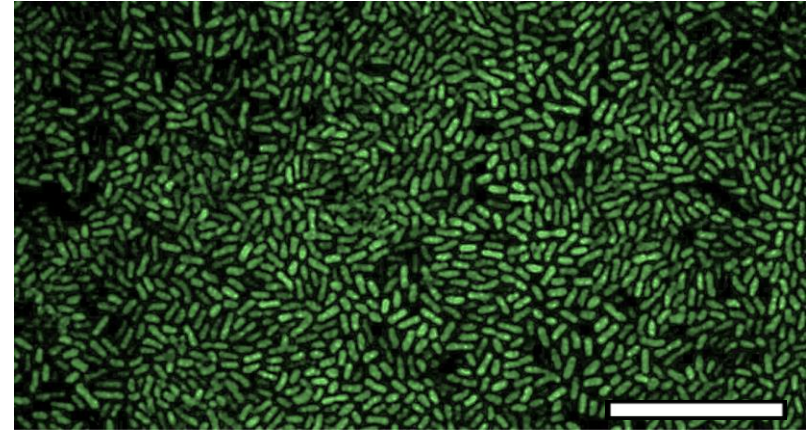
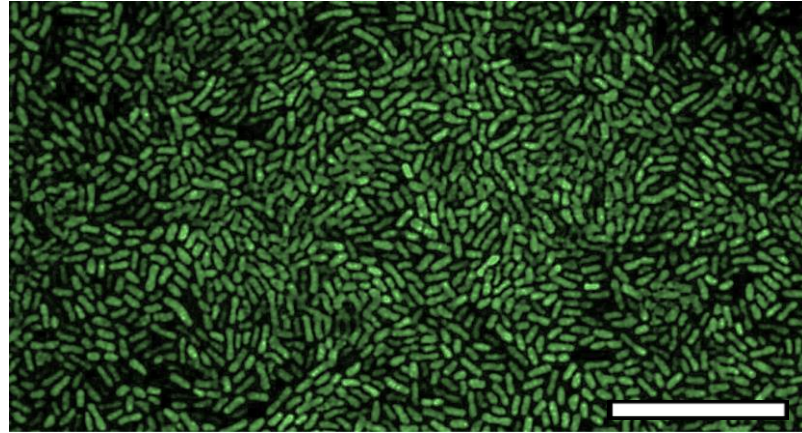
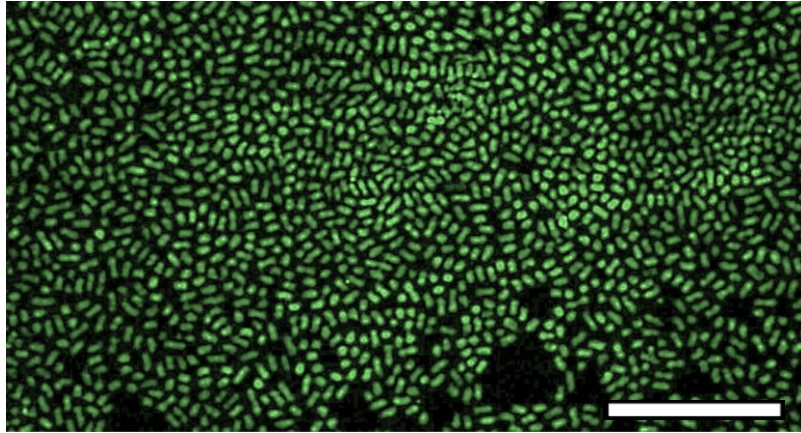
CFT073- 15 h



# CFT073- 16 h

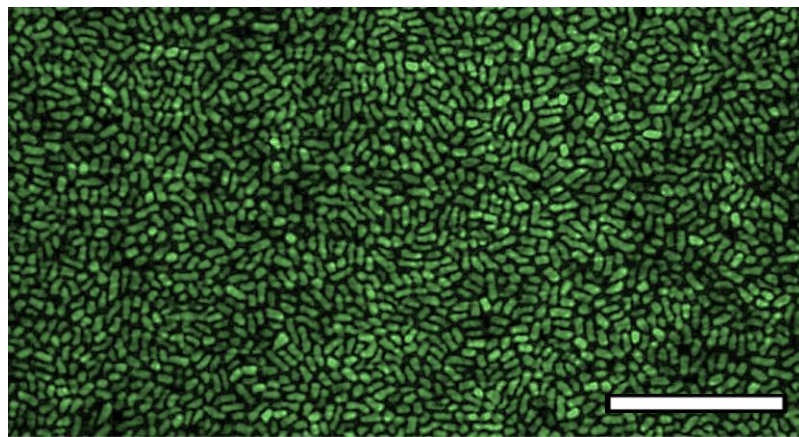
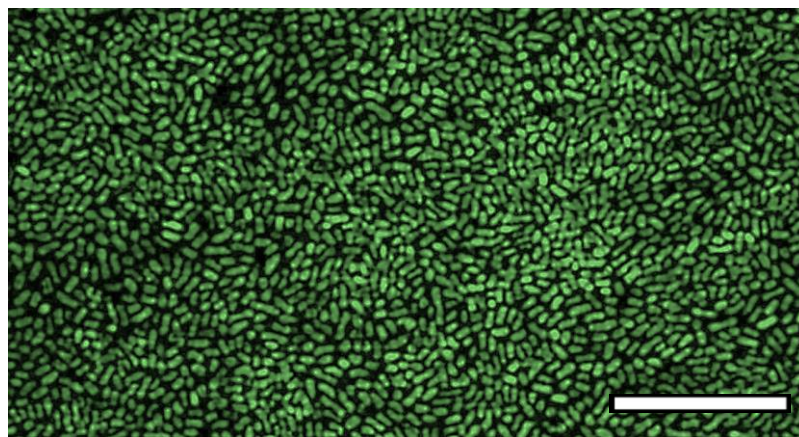
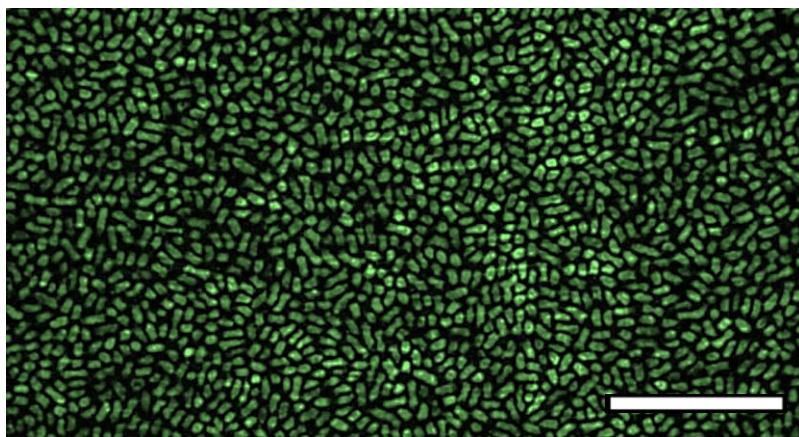
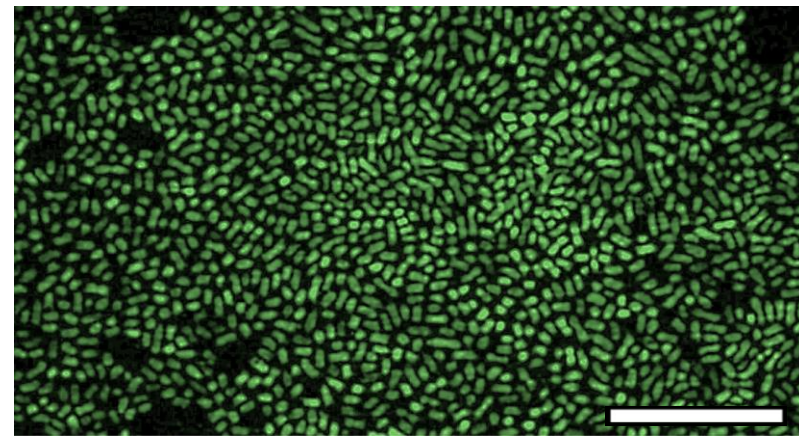
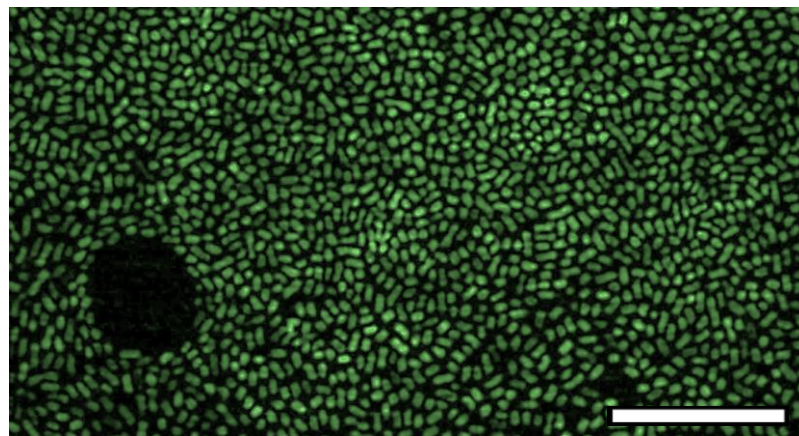
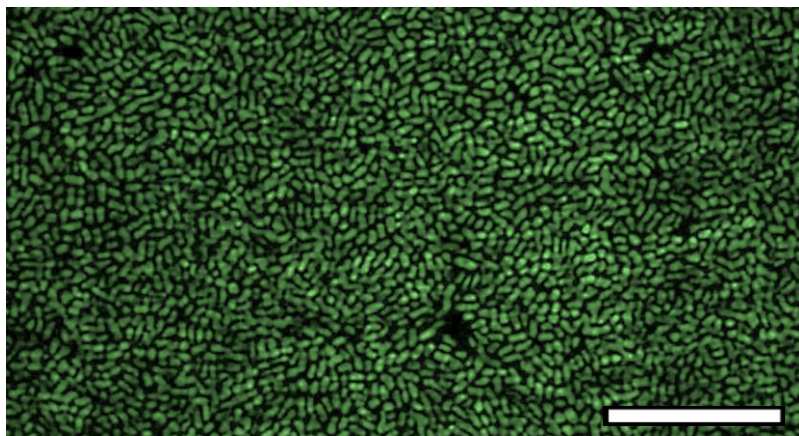


CFT073- 17 h

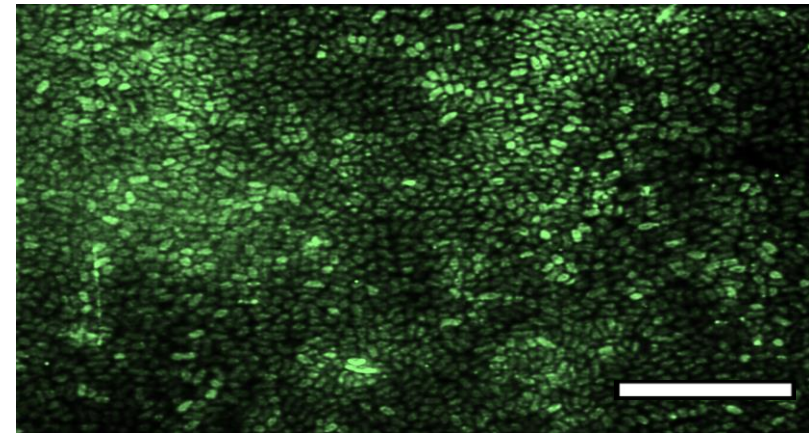
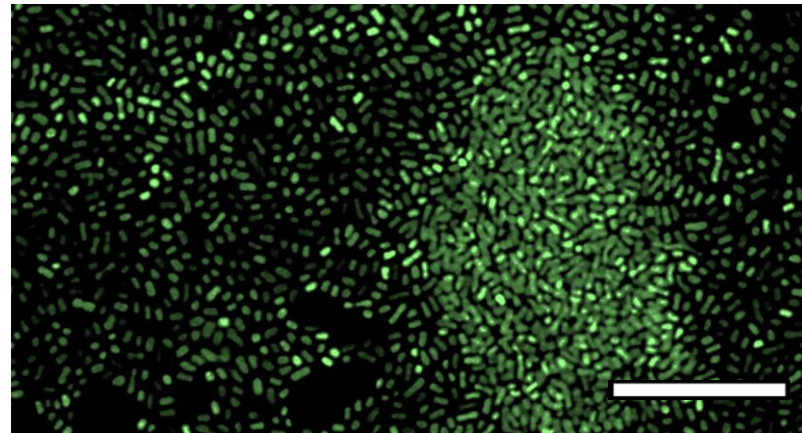
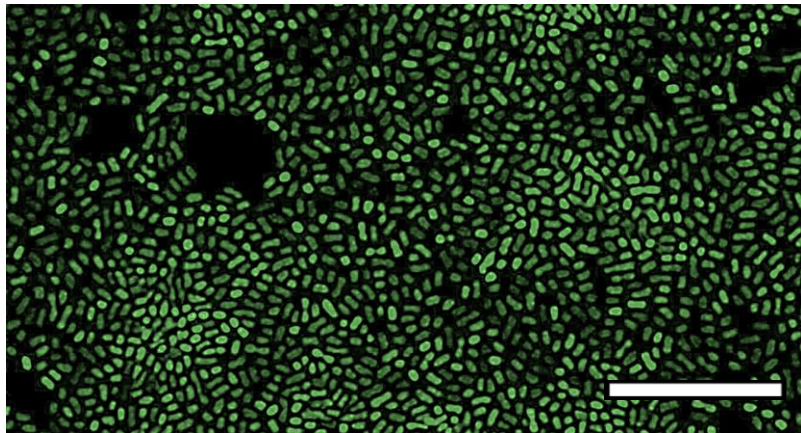
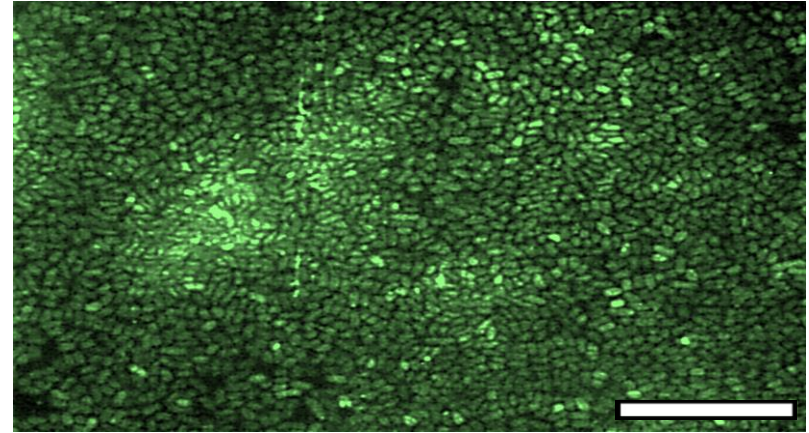
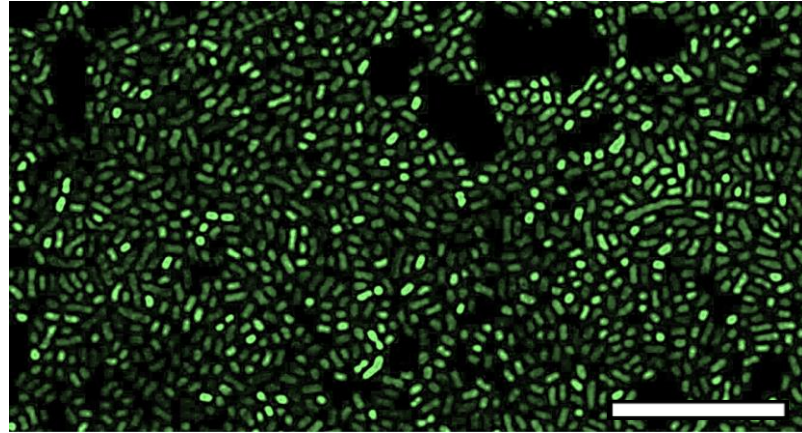
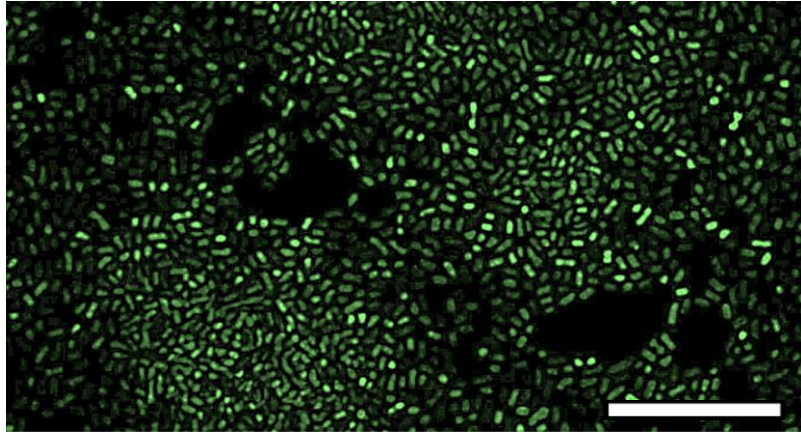




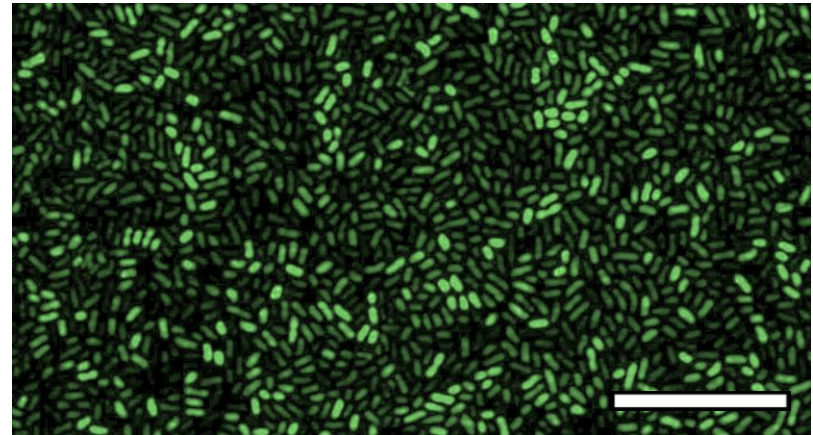
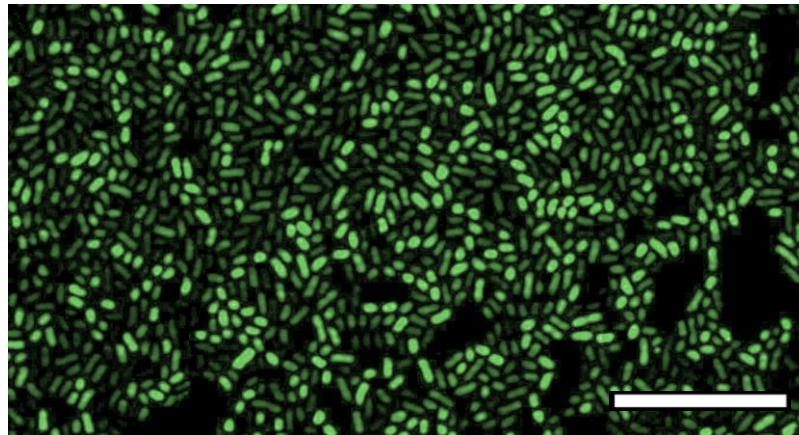
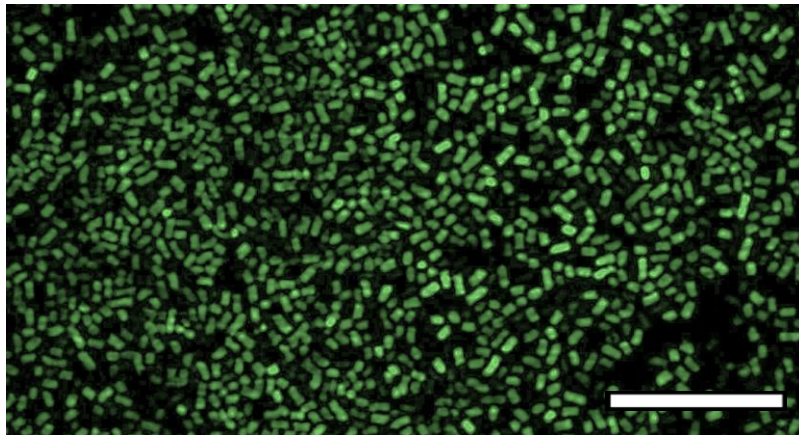
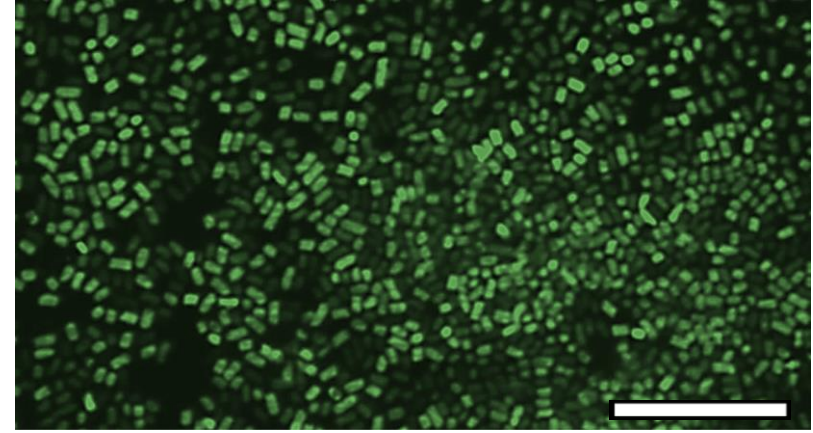
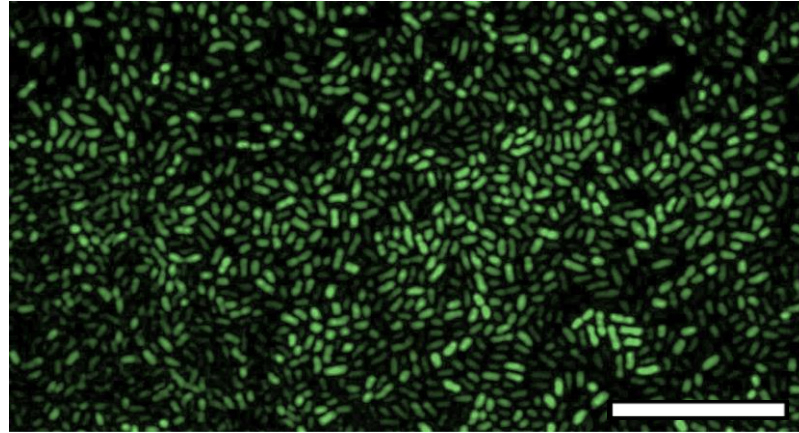
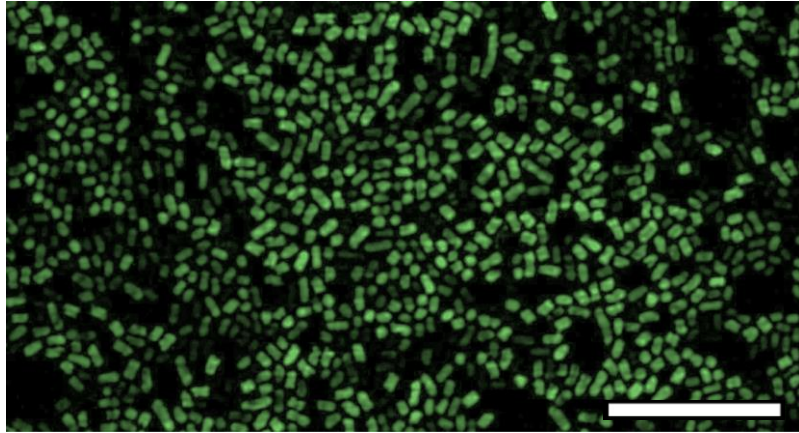
CFT073- 18 h



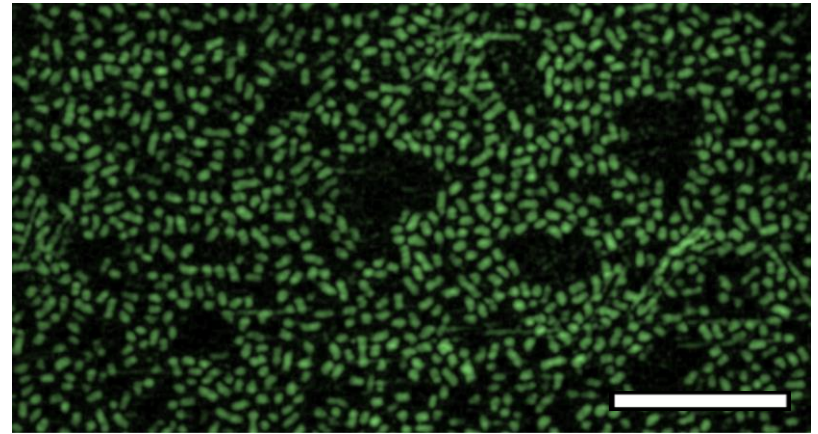
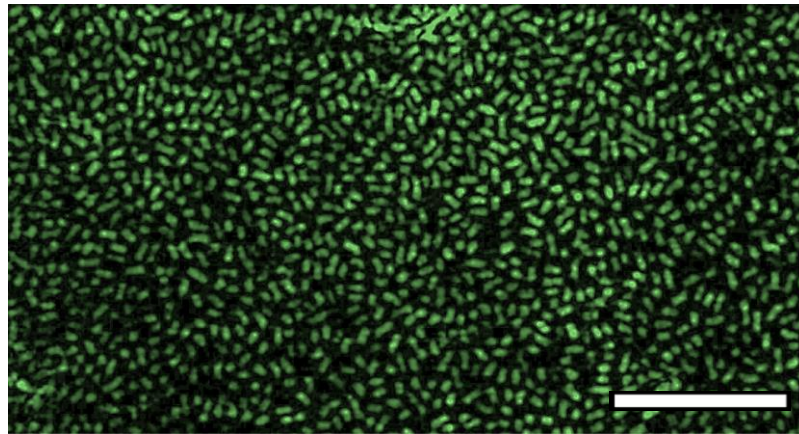
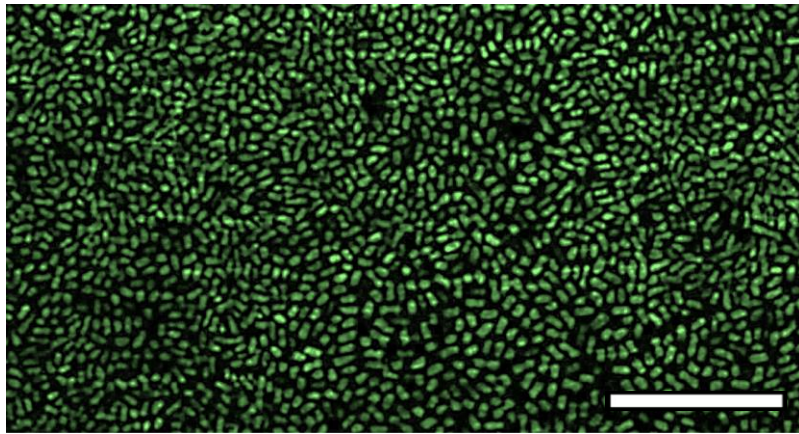
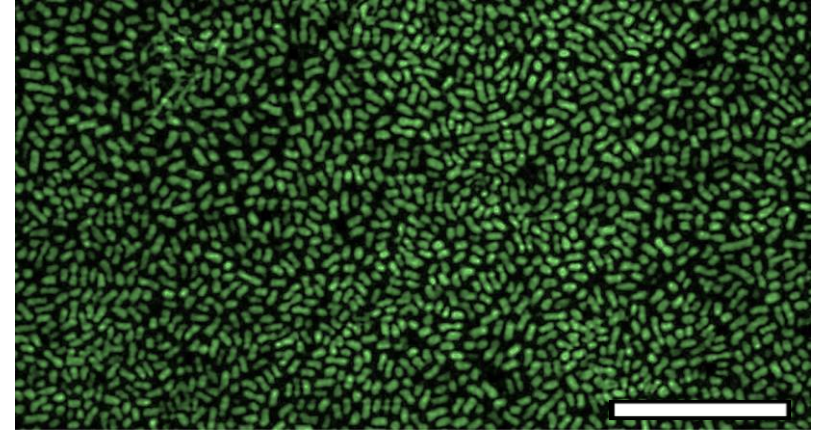
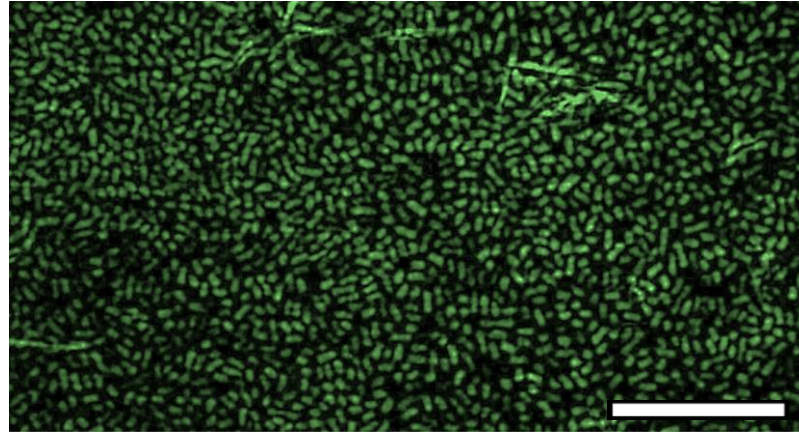
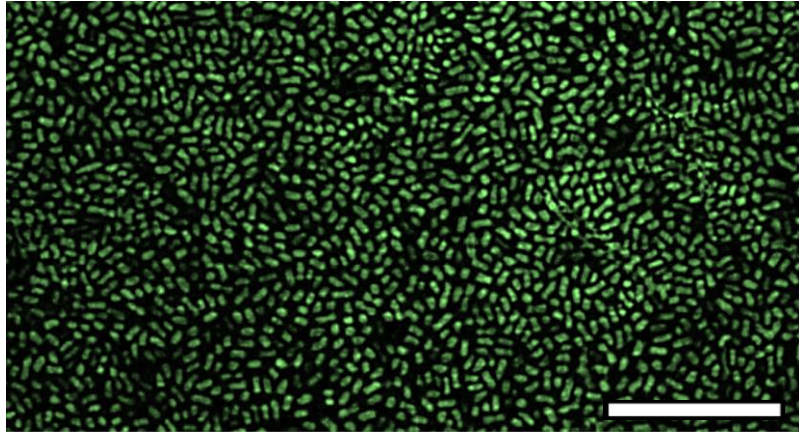
CFT073- 19 h



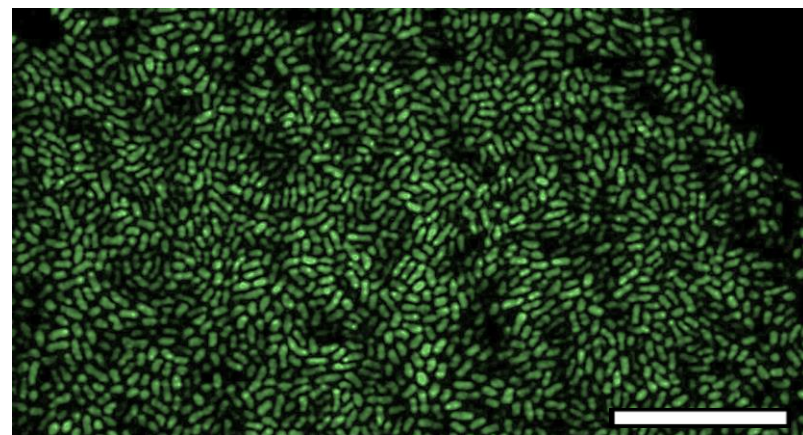
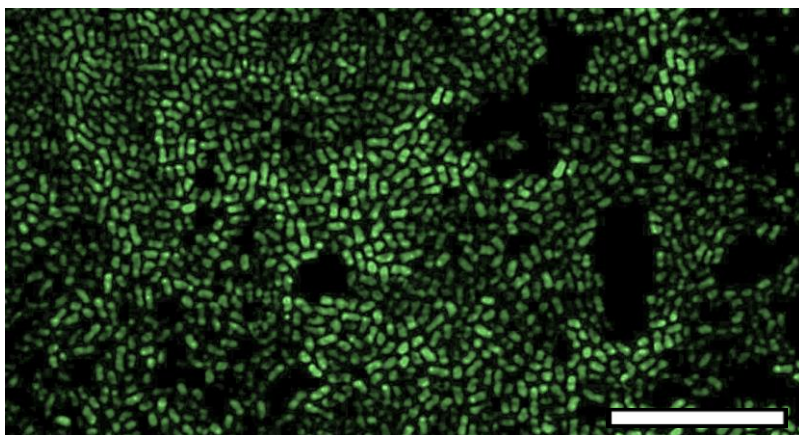
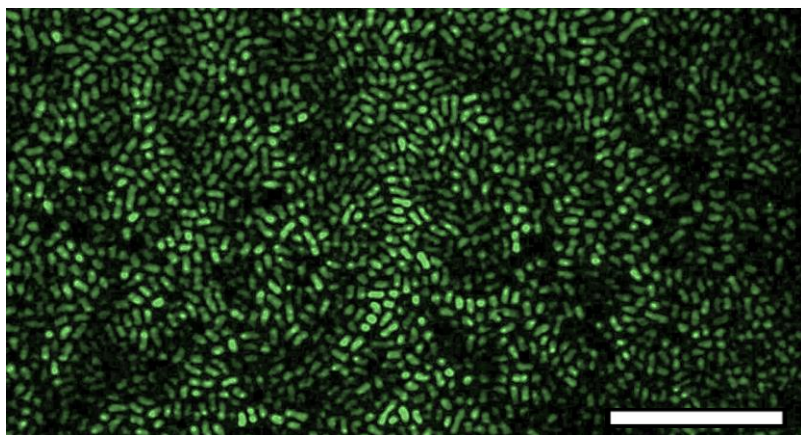
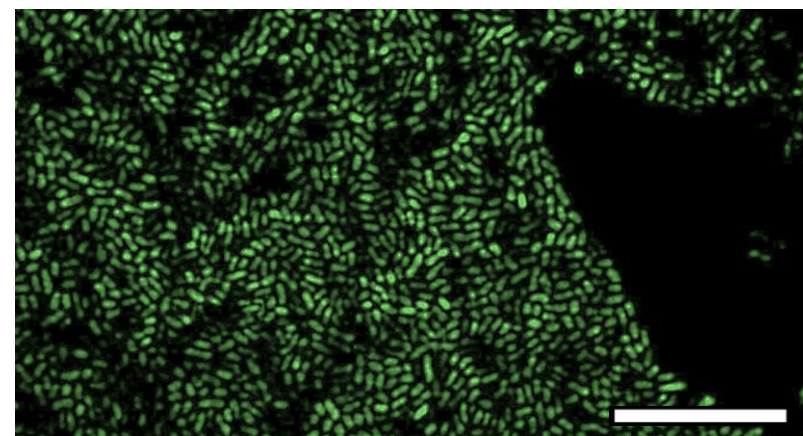
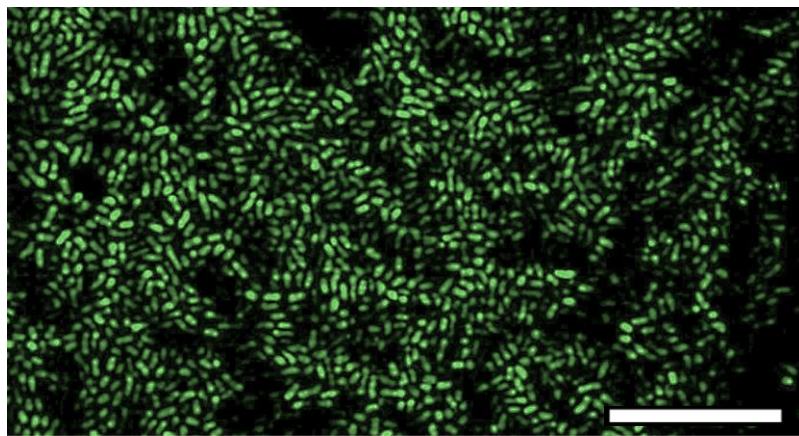
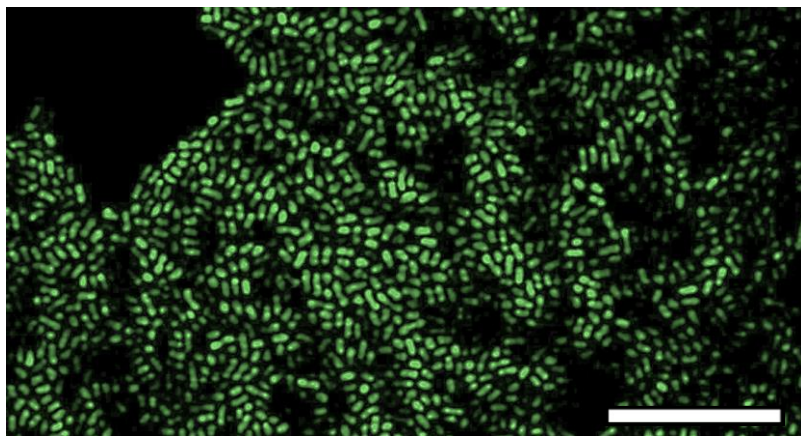
# CFT073- 20 h



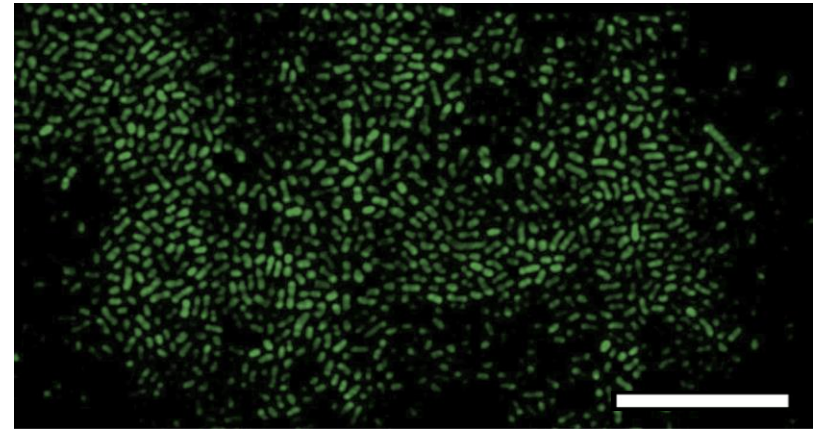
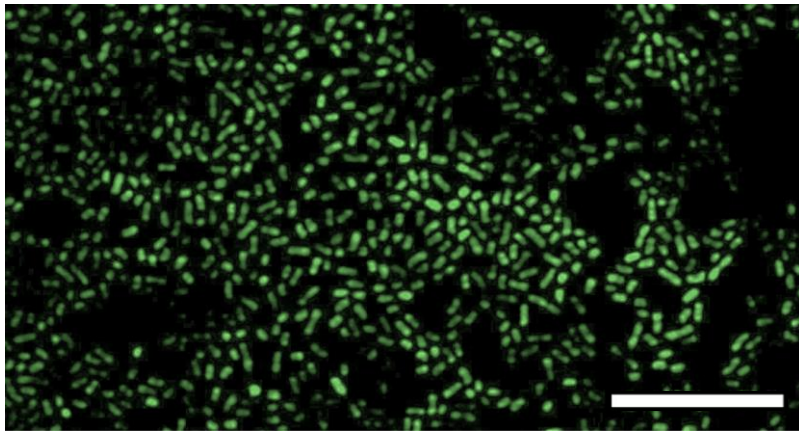
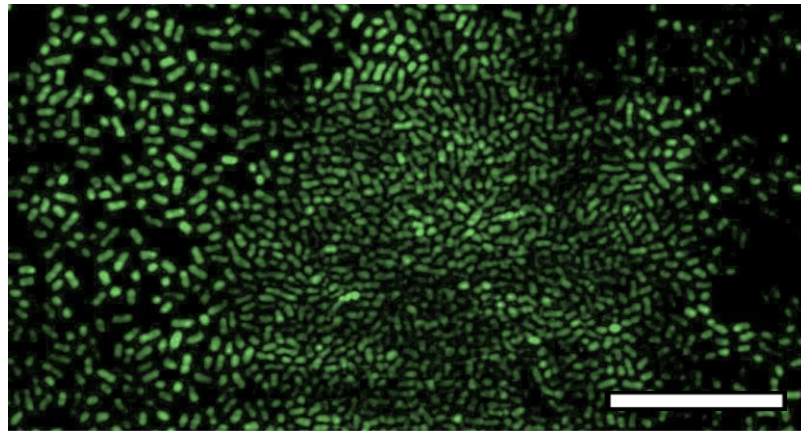
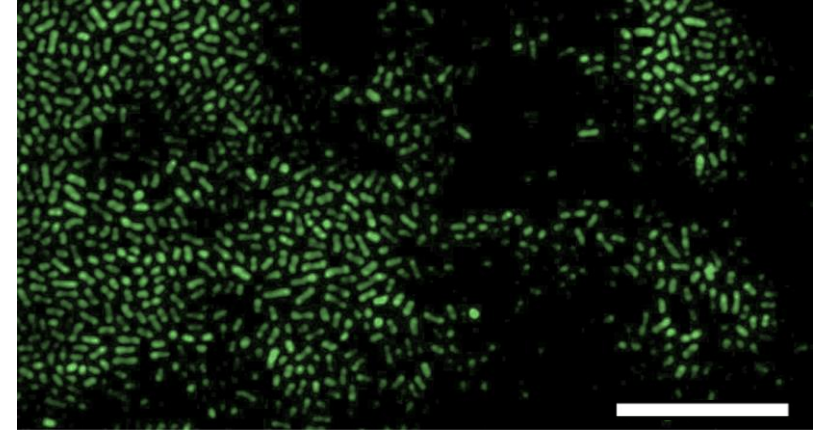
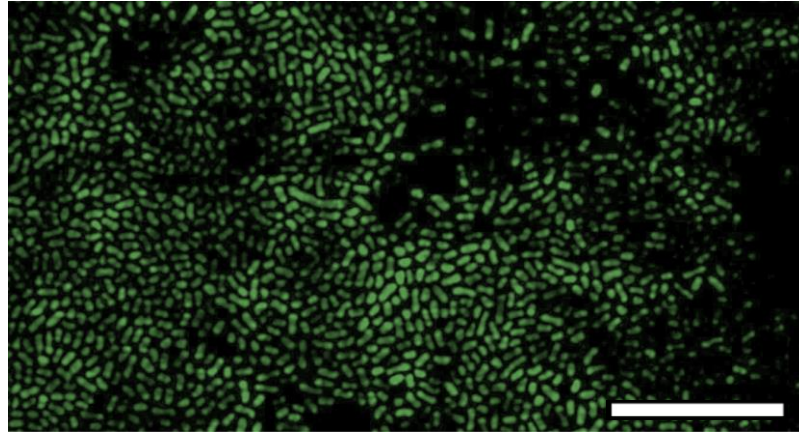
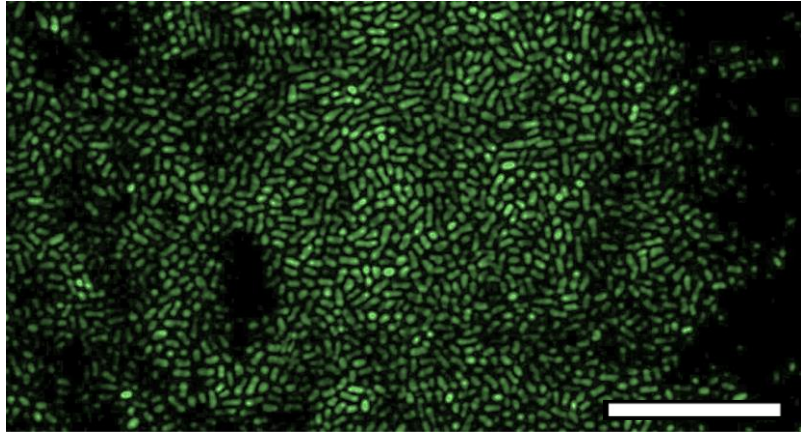
CFT073- 21 h



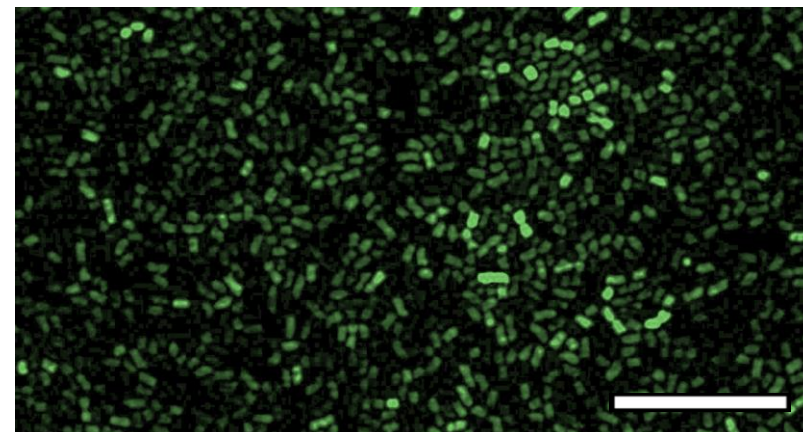
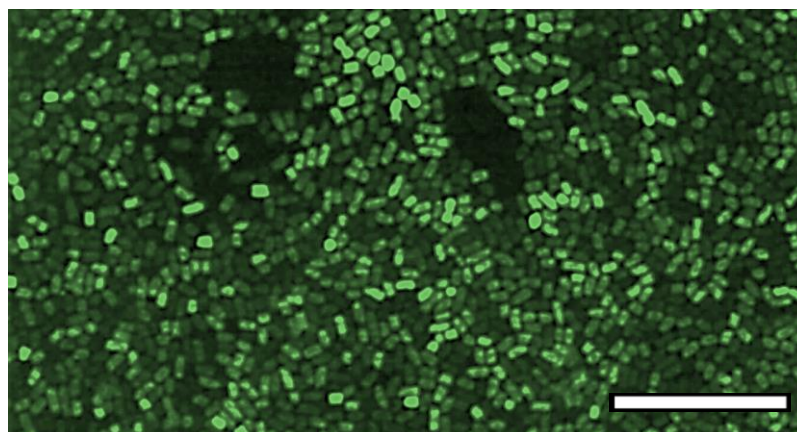
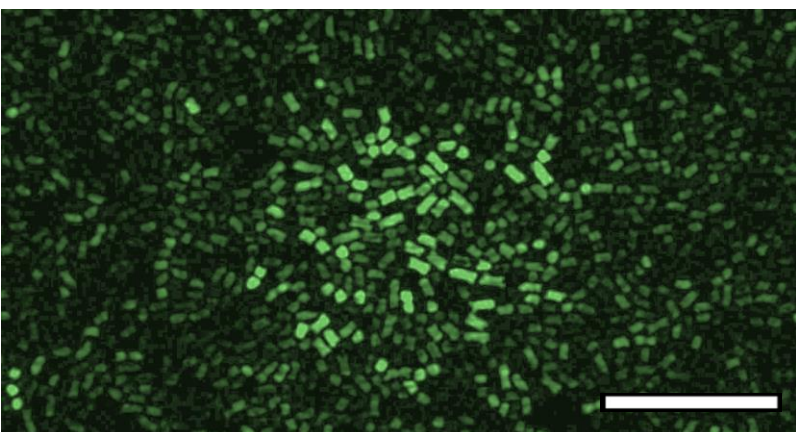
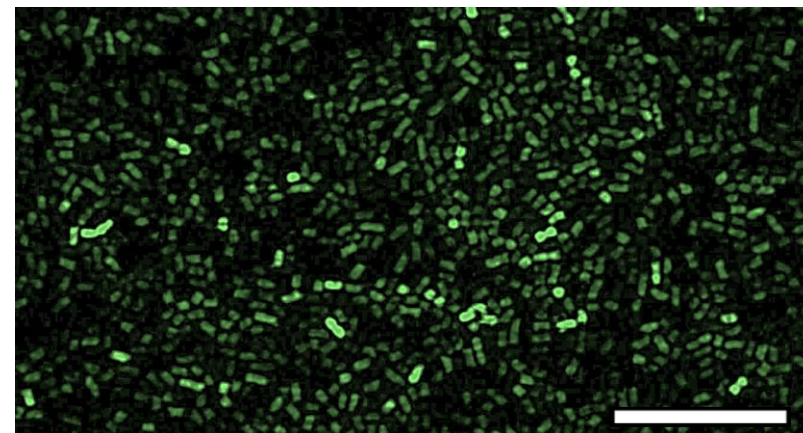
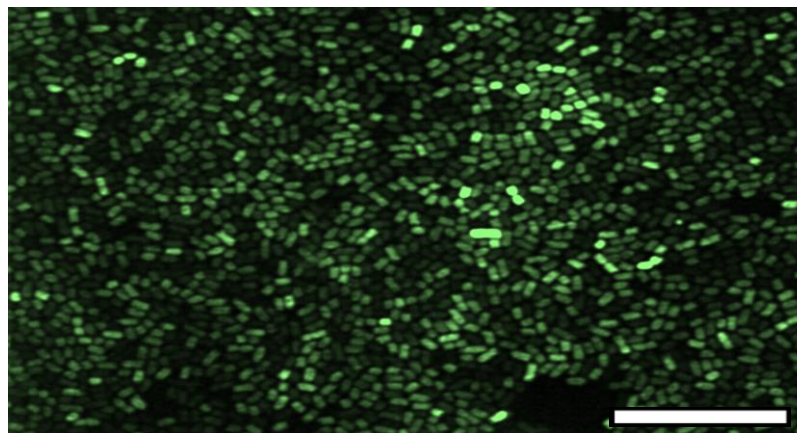
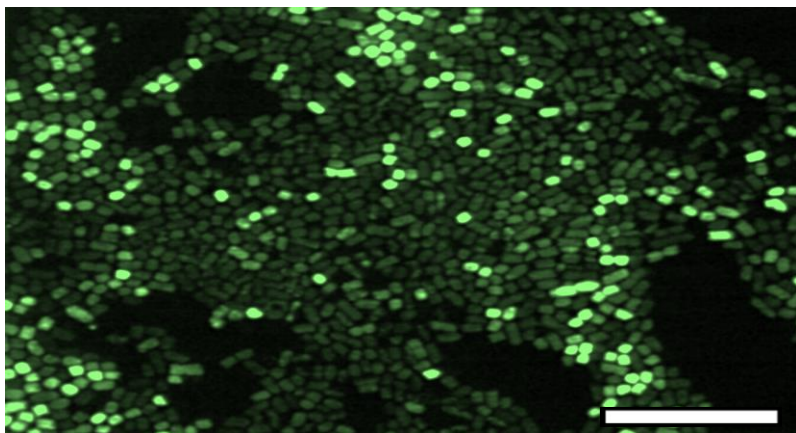
CFT073- 22 h



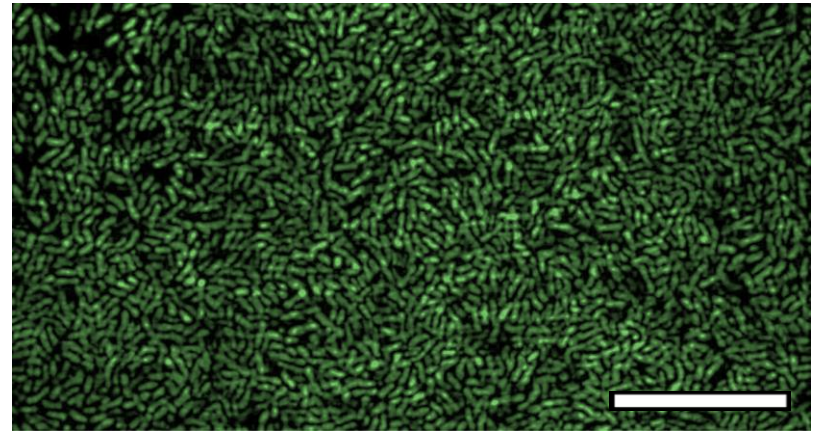
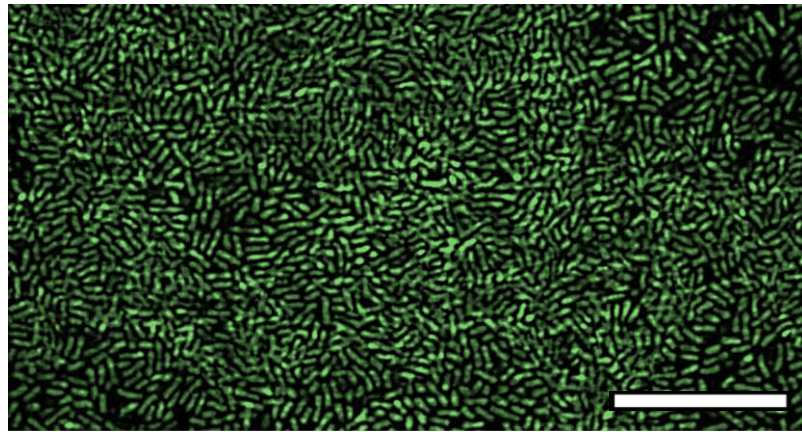
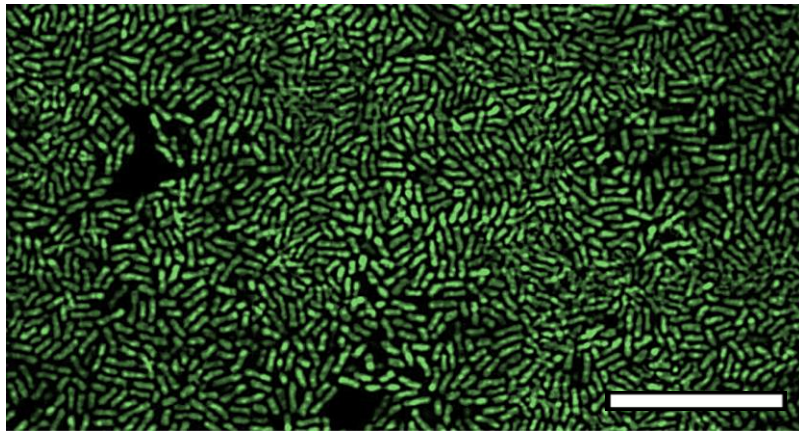
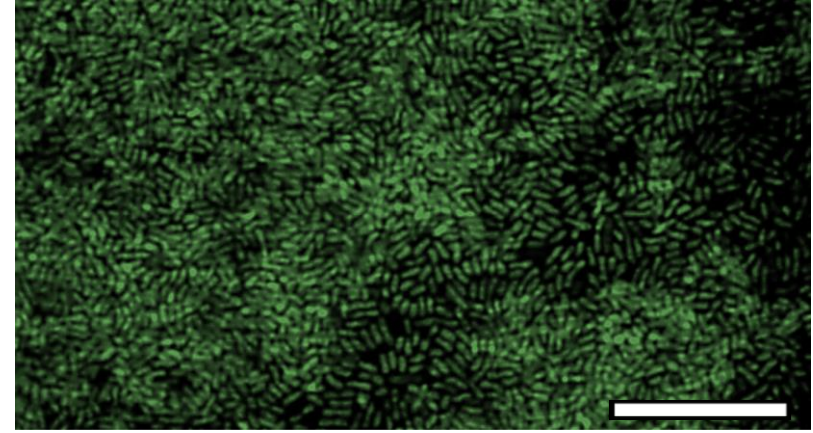
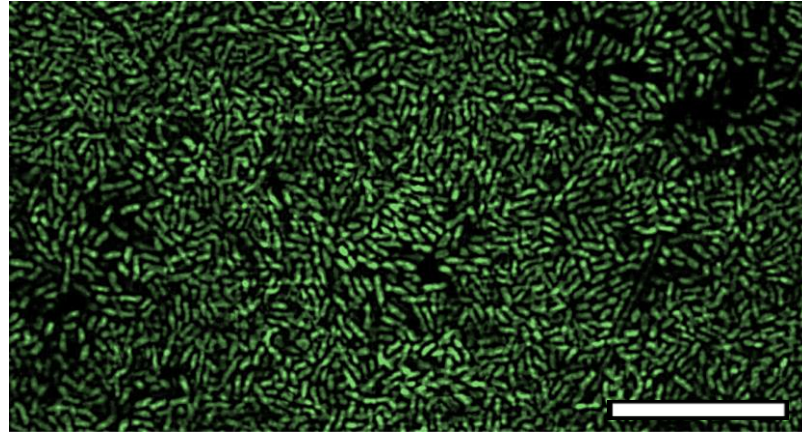
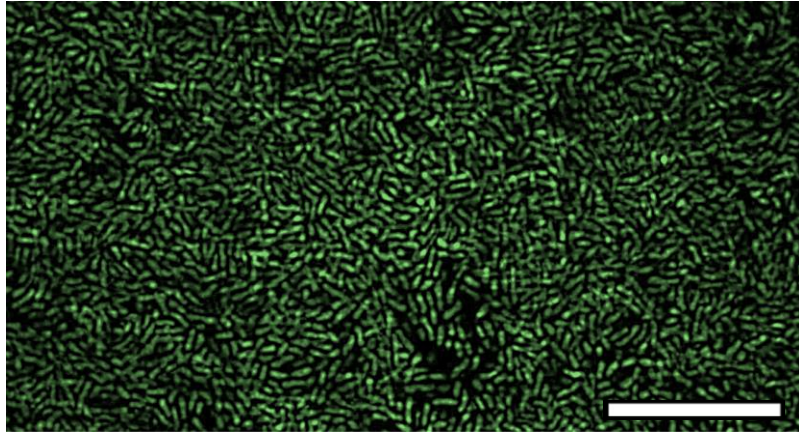
CFT073- 23 h



# CFT073- 24 h

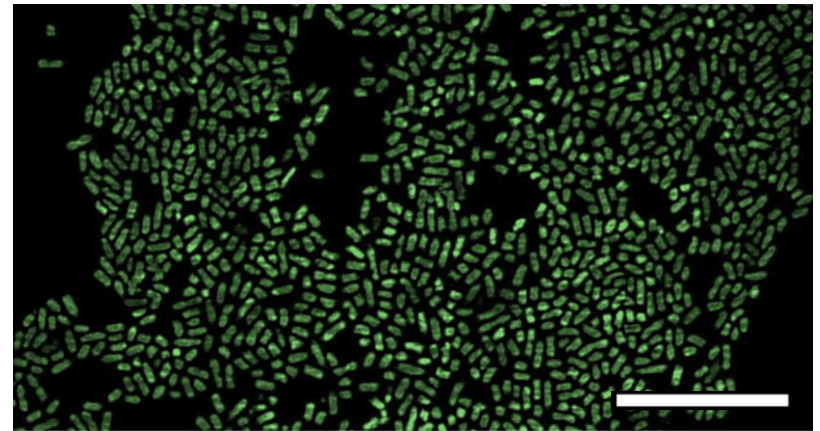
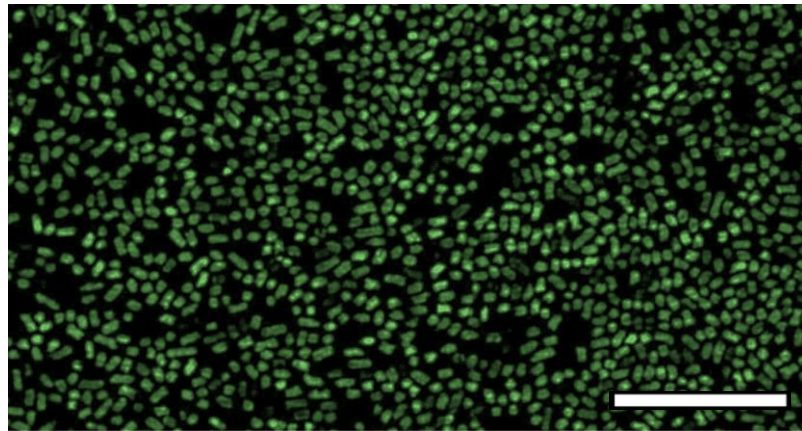
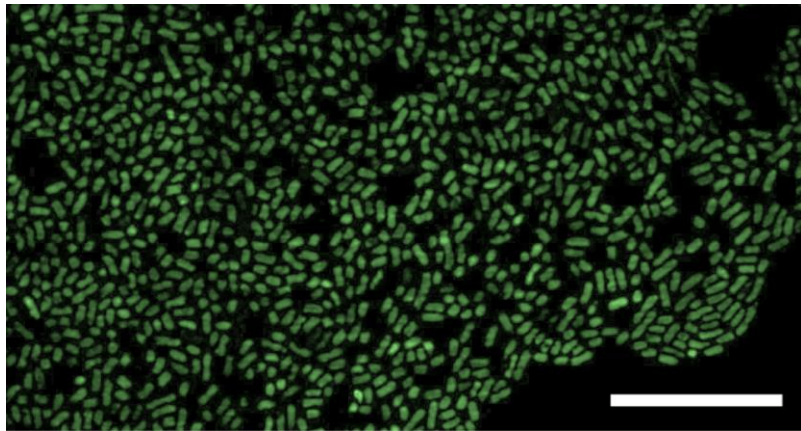
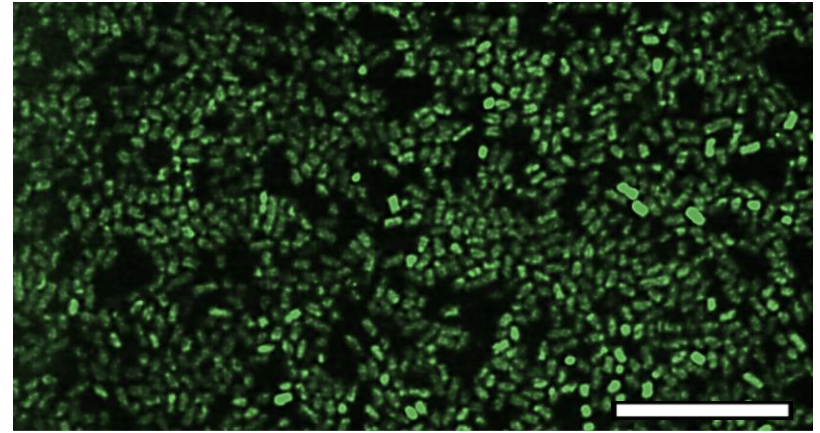
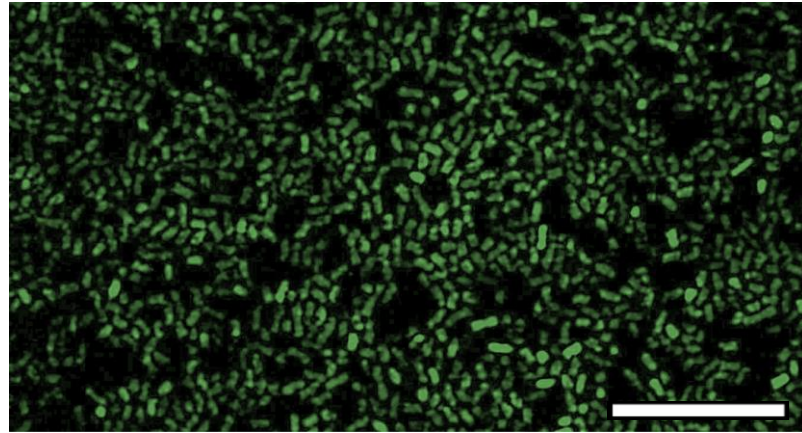
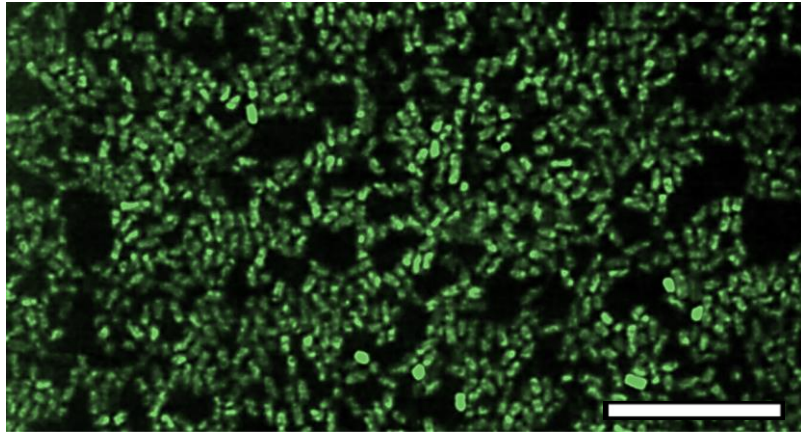


CFT073- 48 h

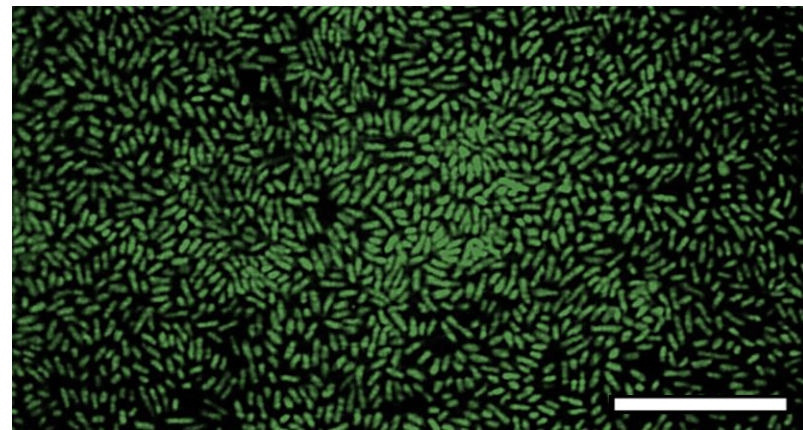
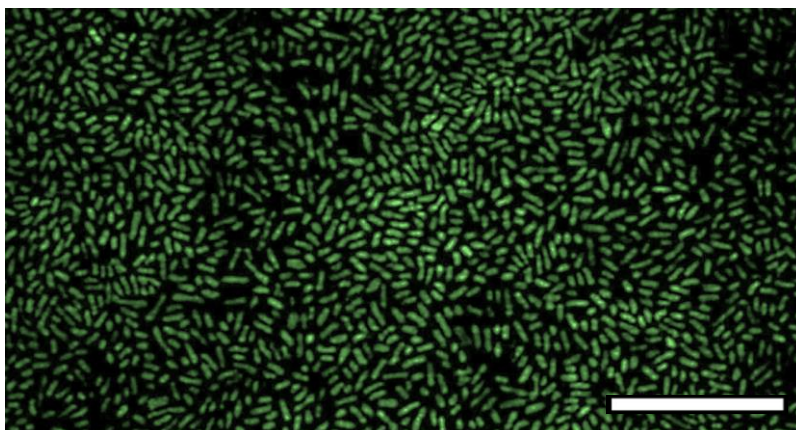
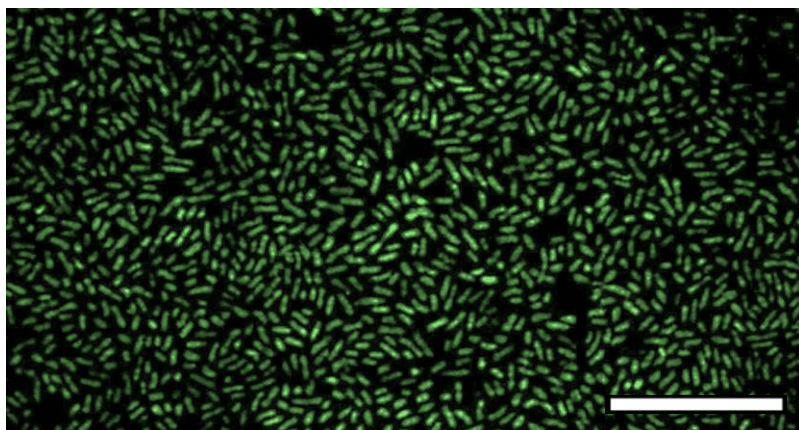
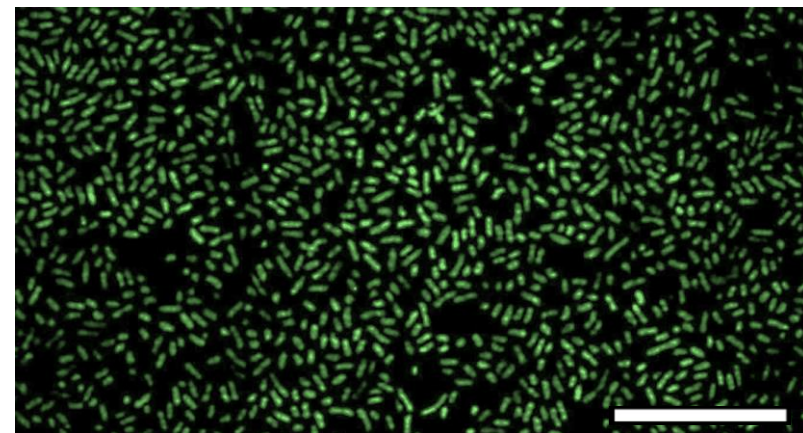
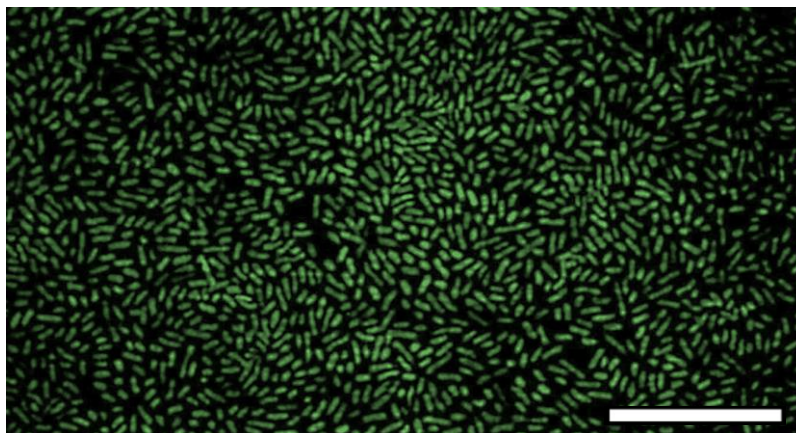
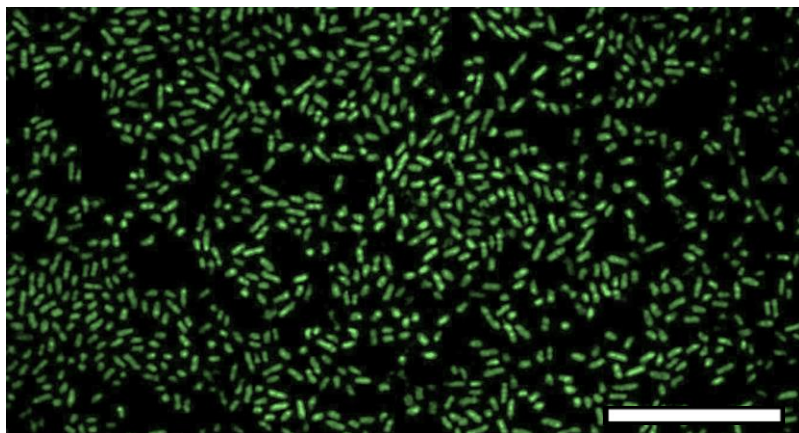




# CFT073- 72 h

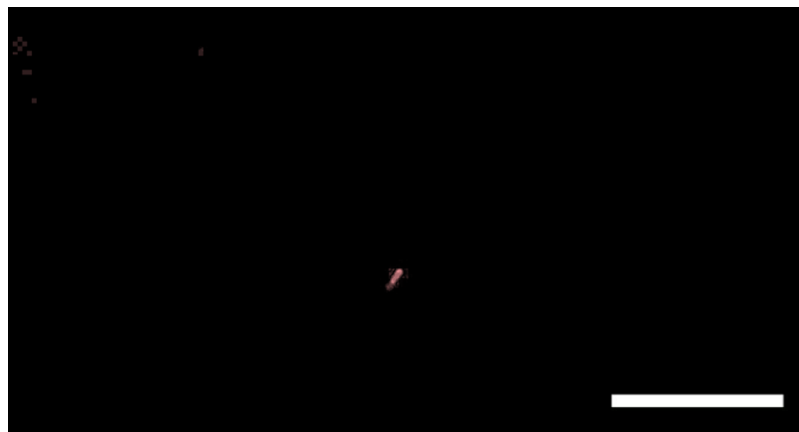
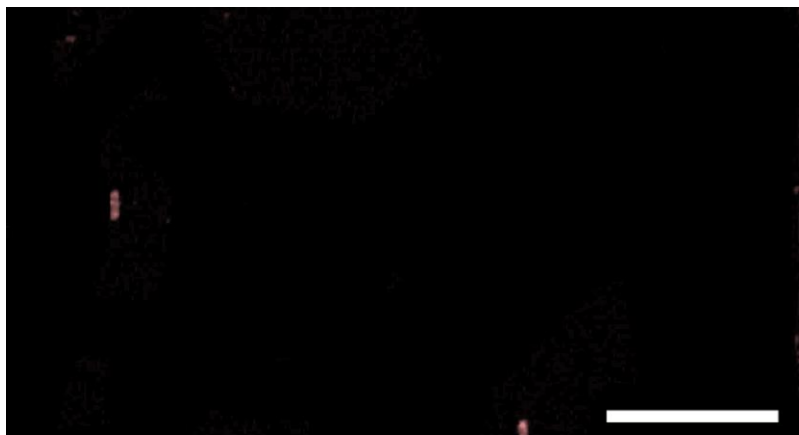


CFT073- 96 h

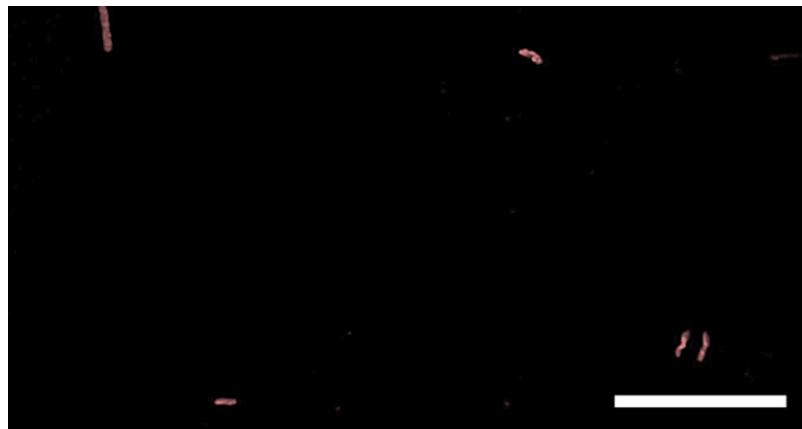
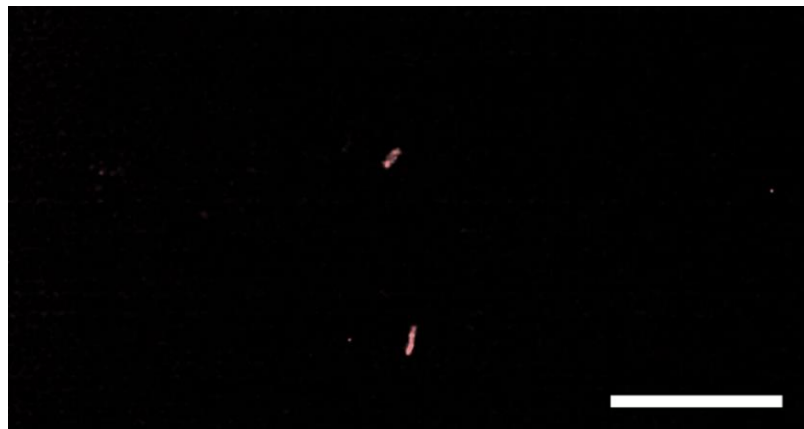
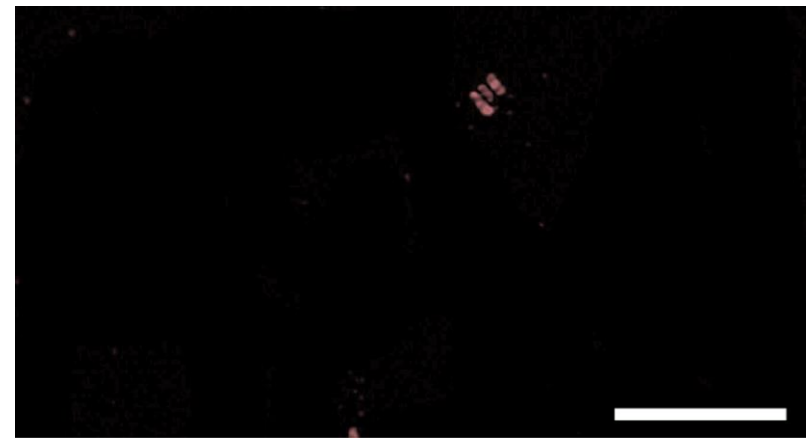
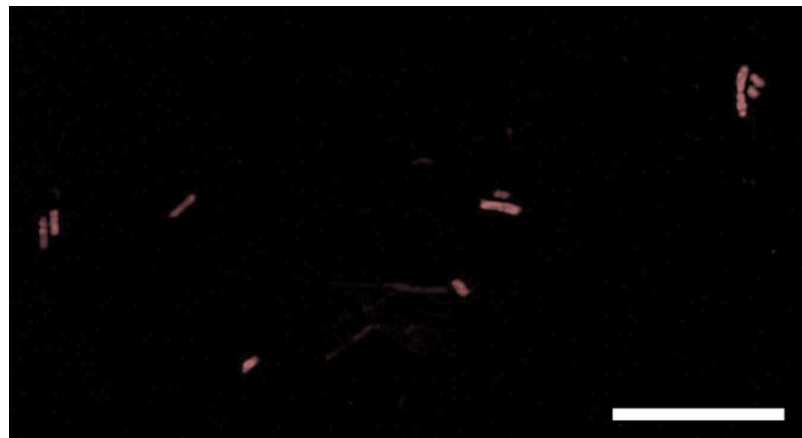
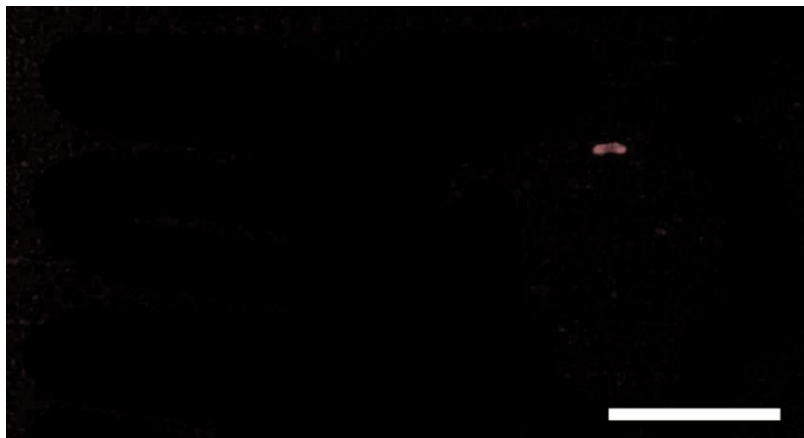


**UPEC ST12 OD65**

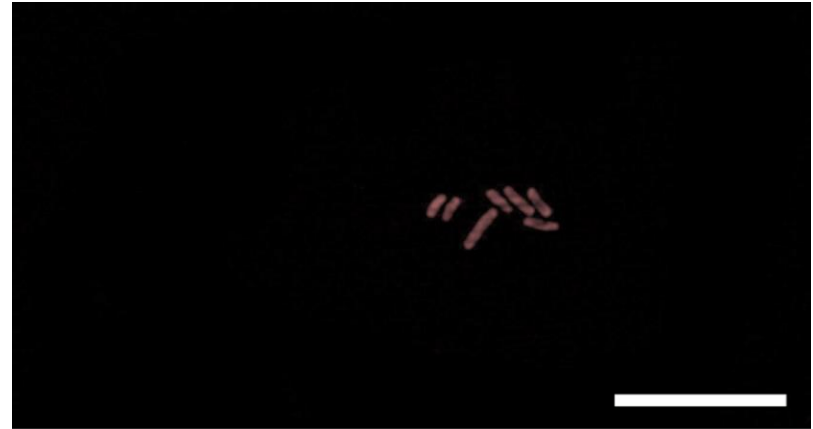
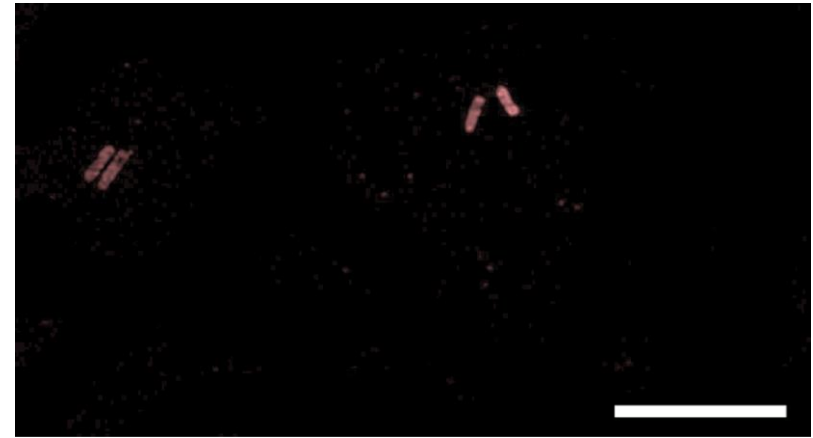
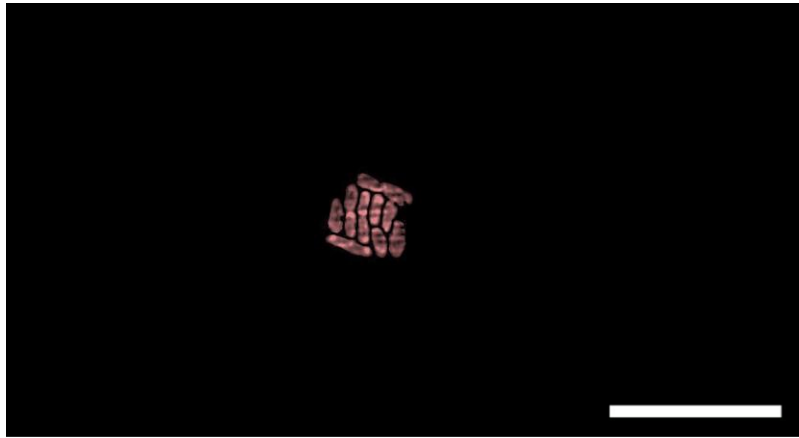
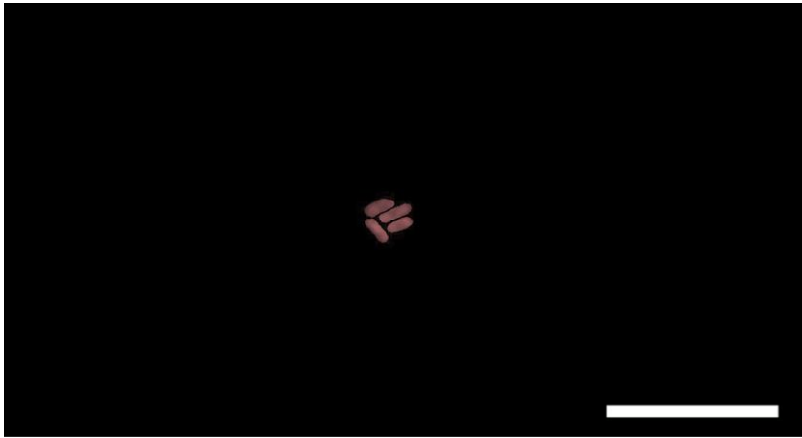
OD65- 1 h



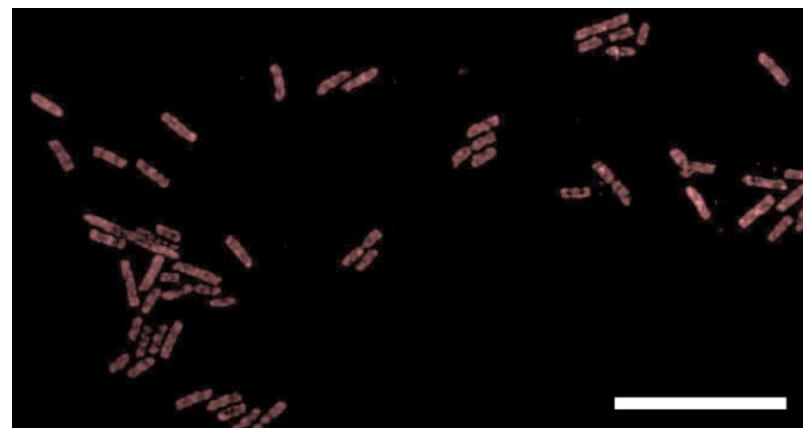
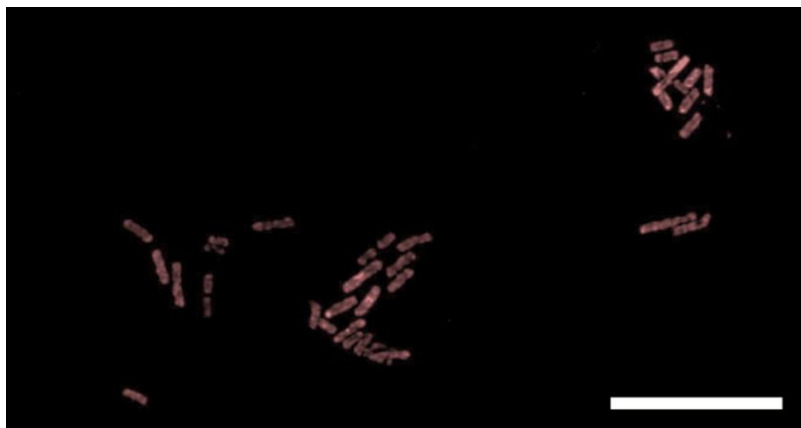
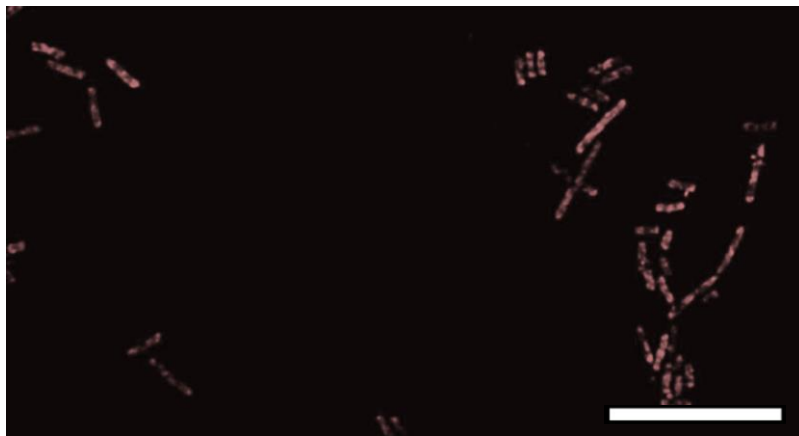
OD65- 2 h



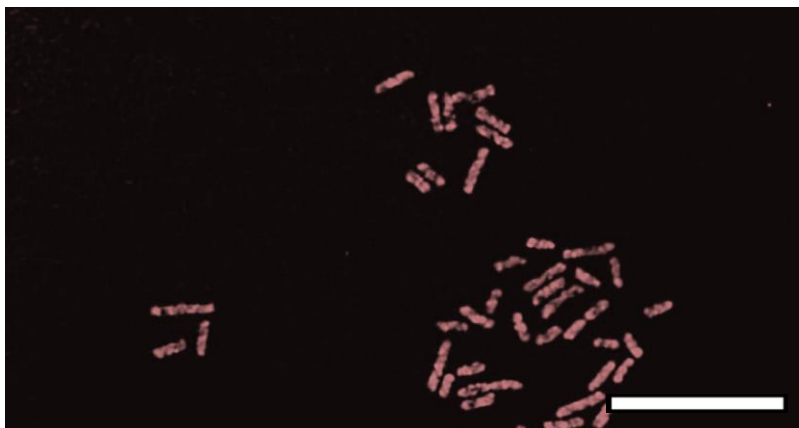
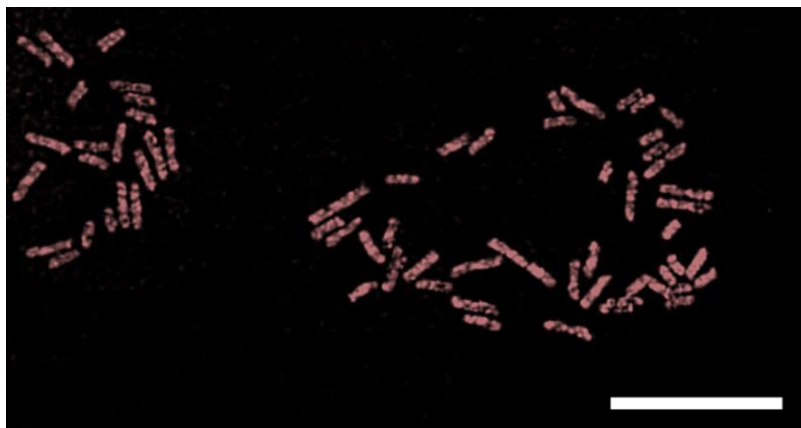
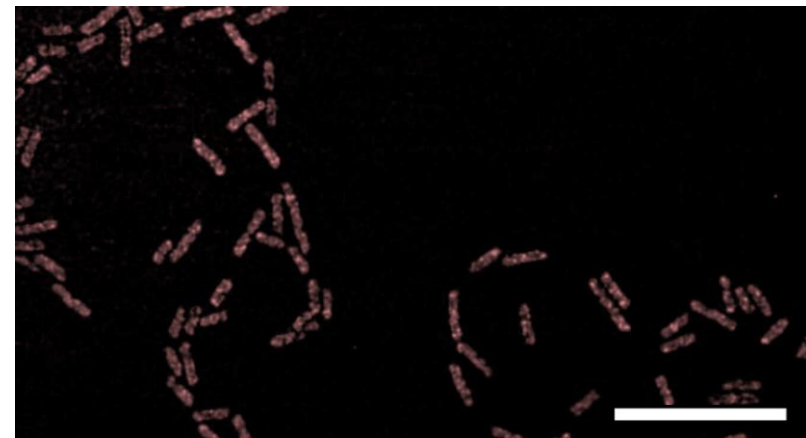
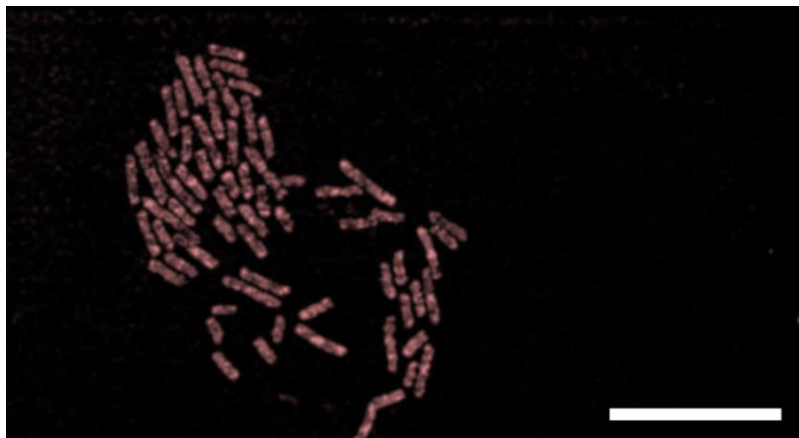
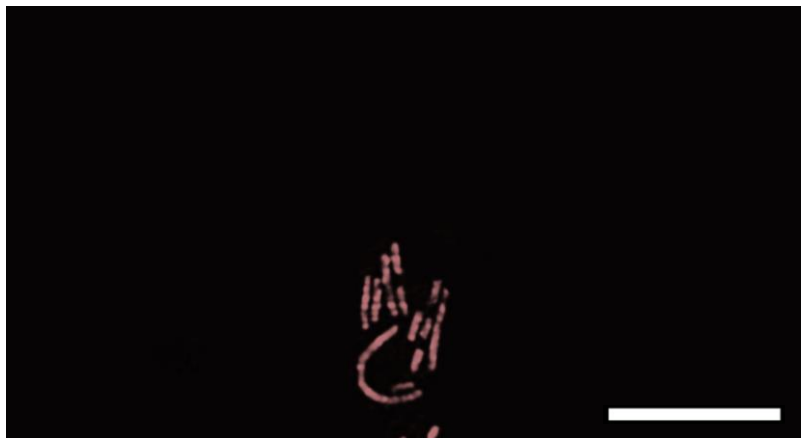
OD65- 3 h



OD65- 4 h

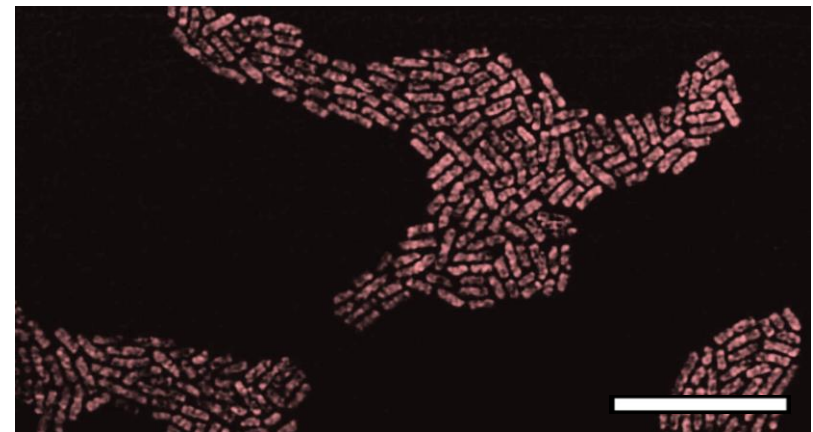
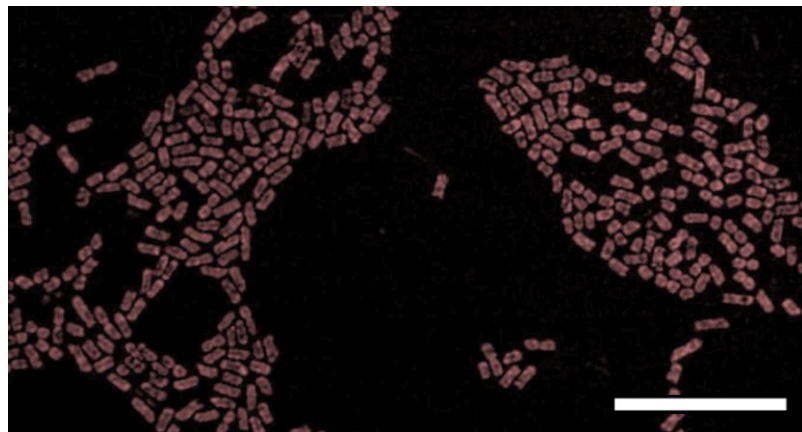
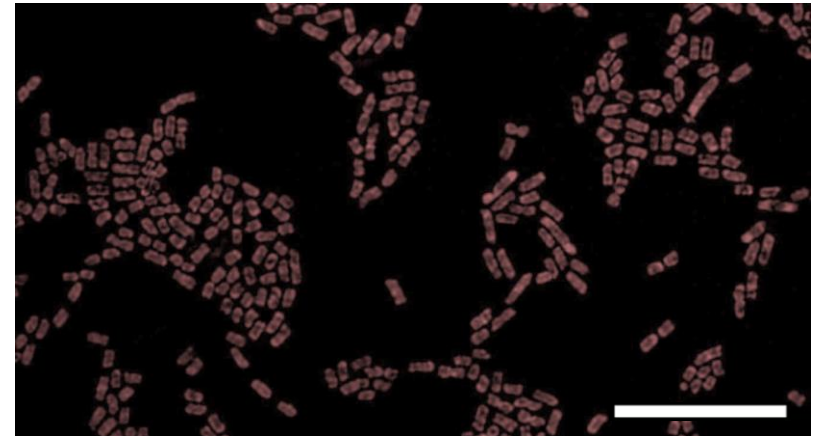
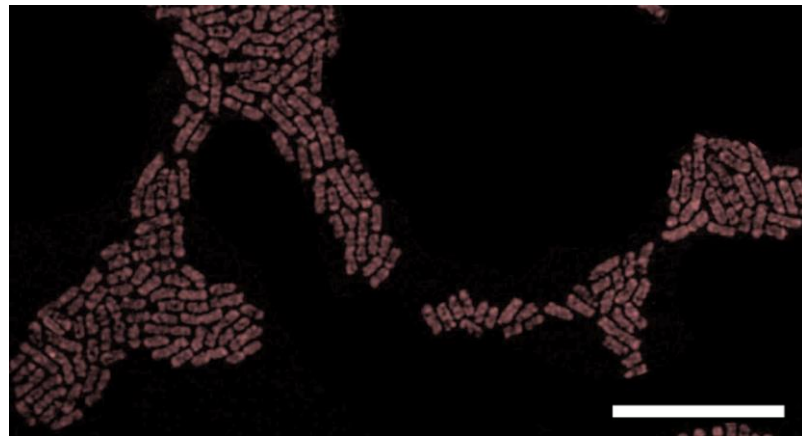
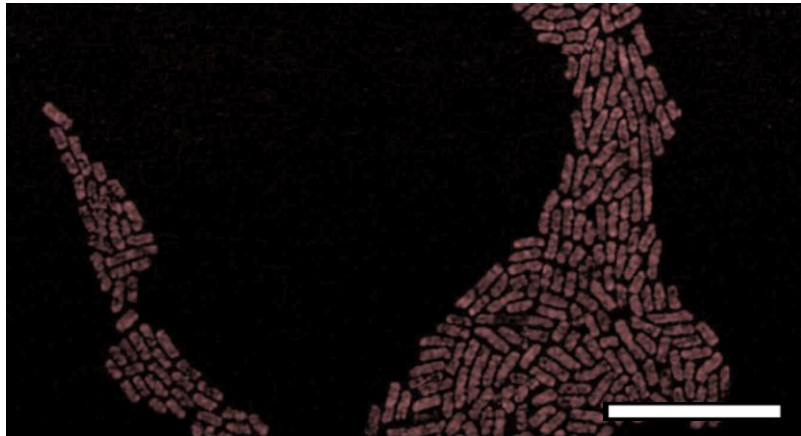


OD65- 5 h

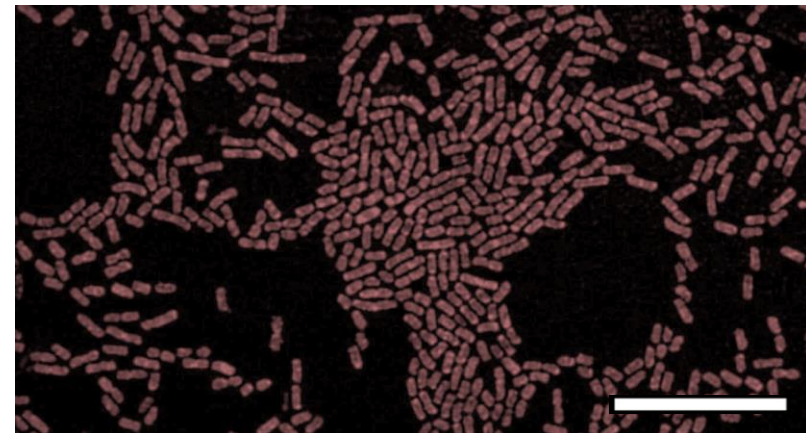
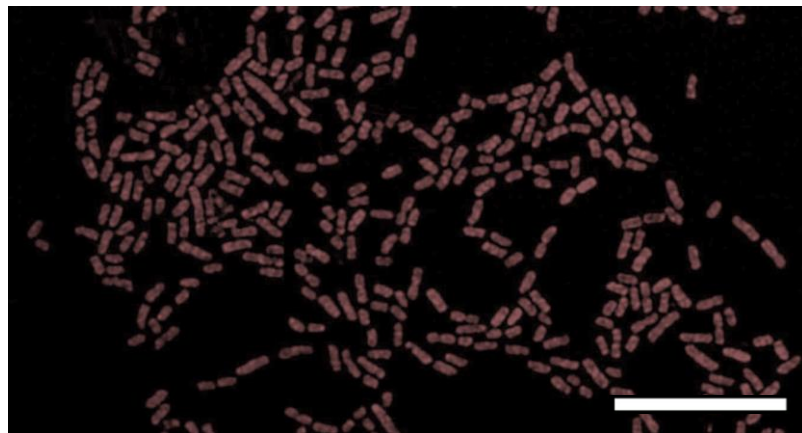
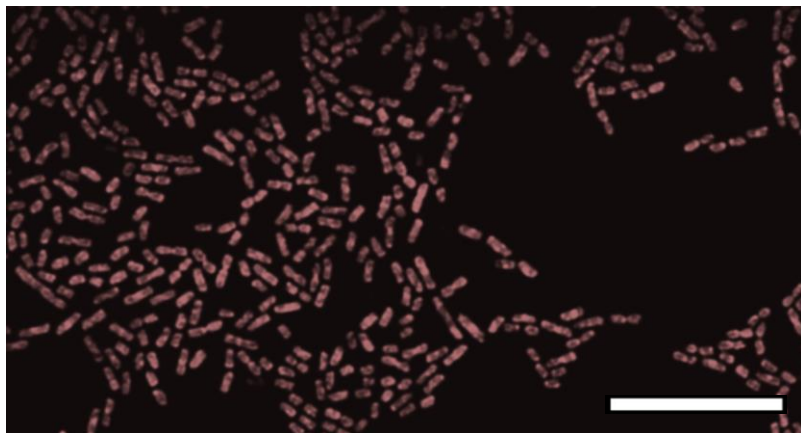
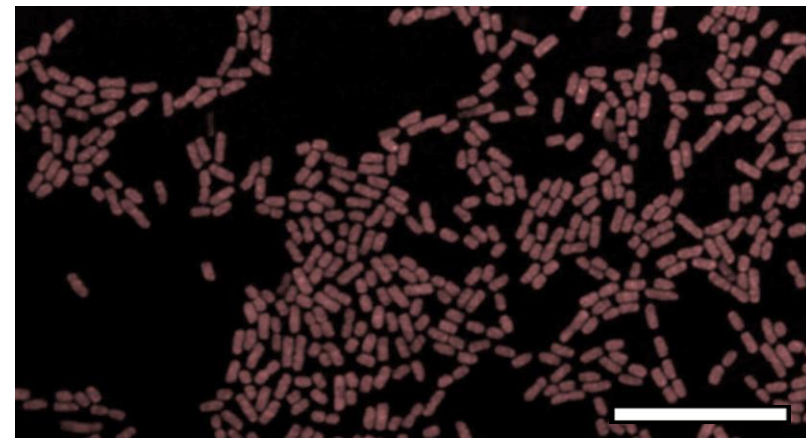
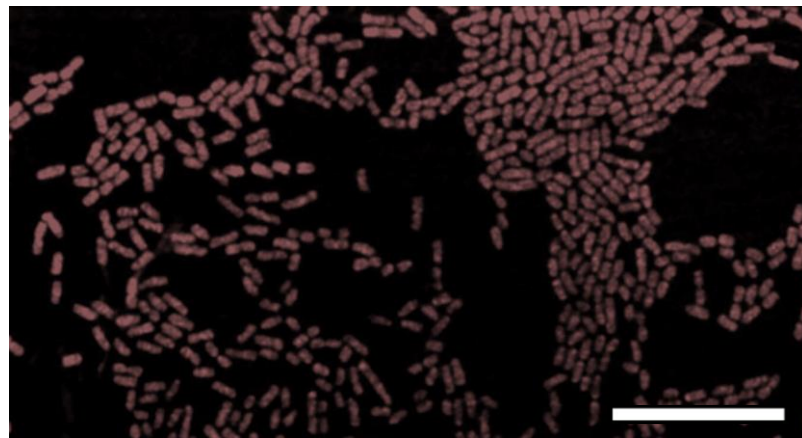
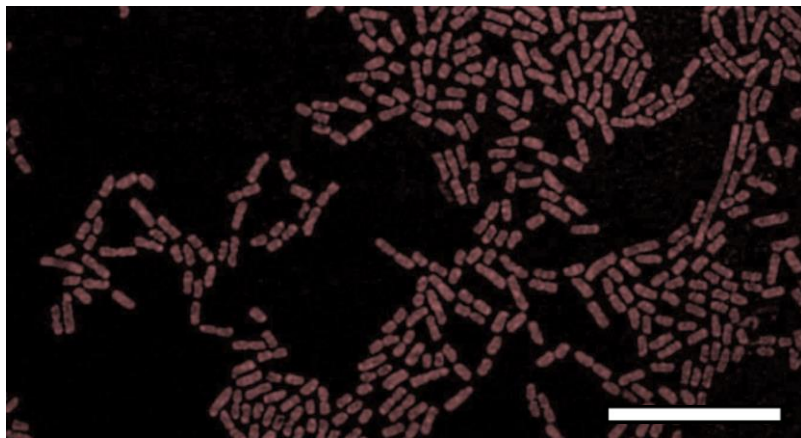




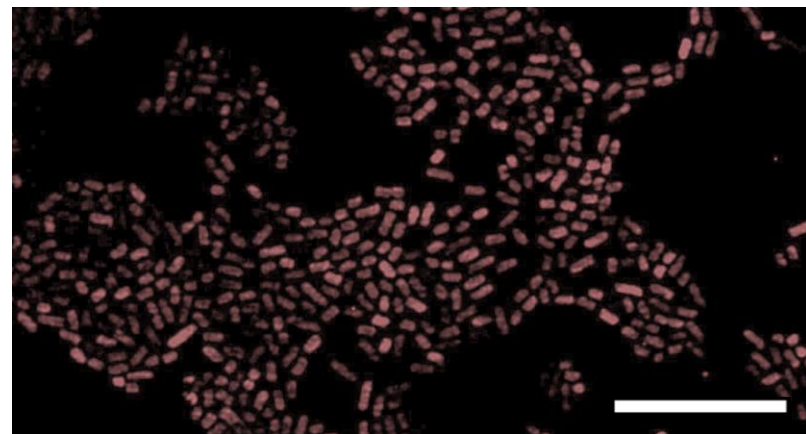
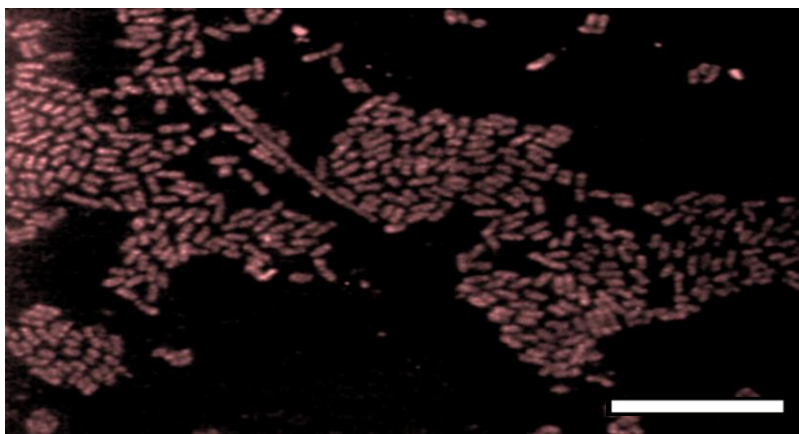
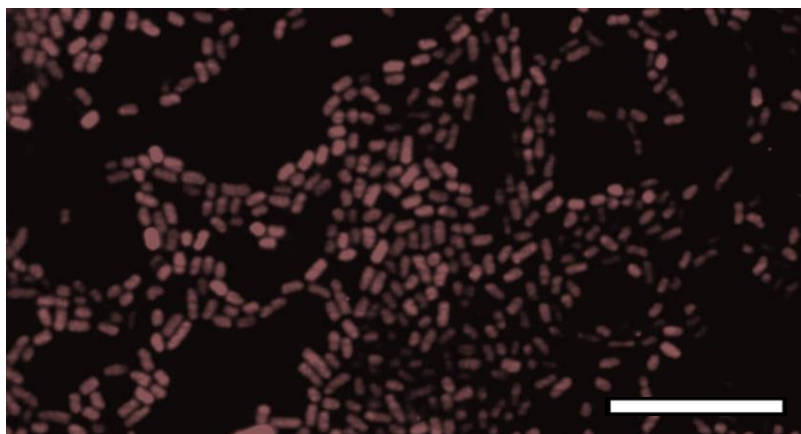
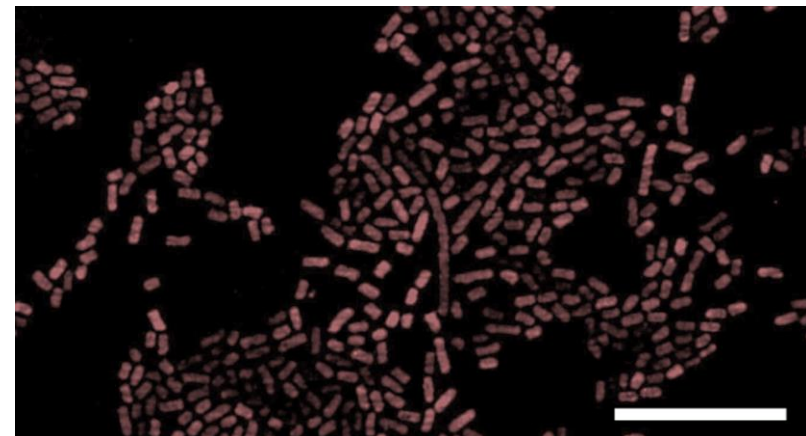
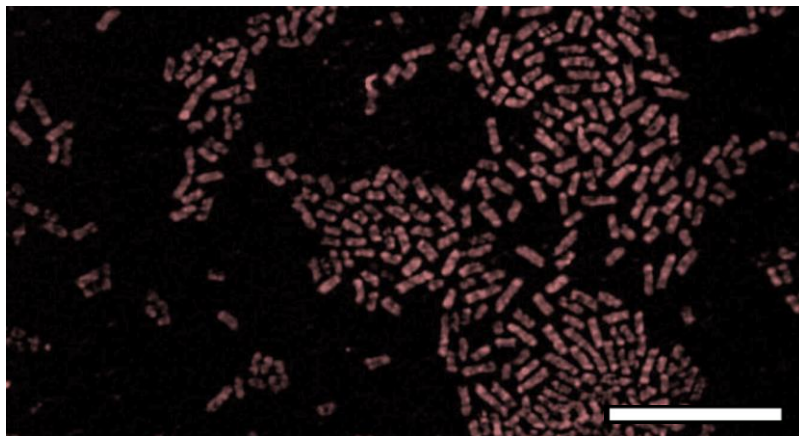
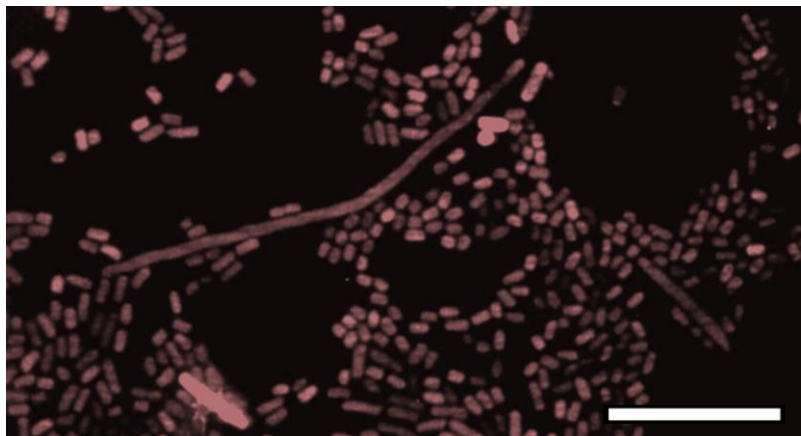
OD65- 6 h



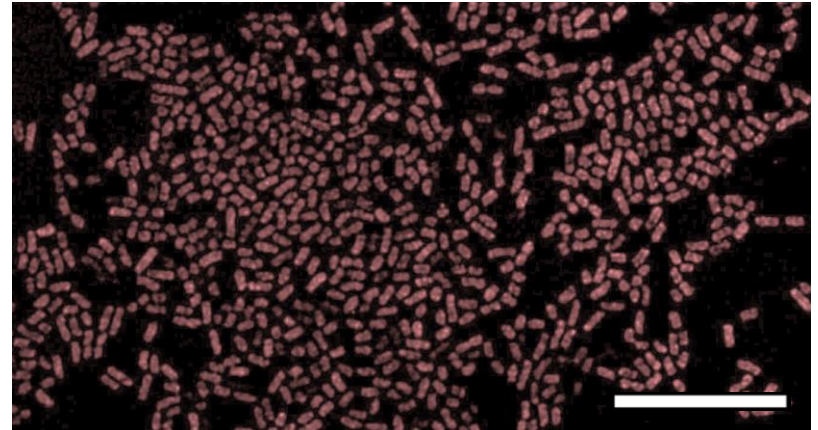
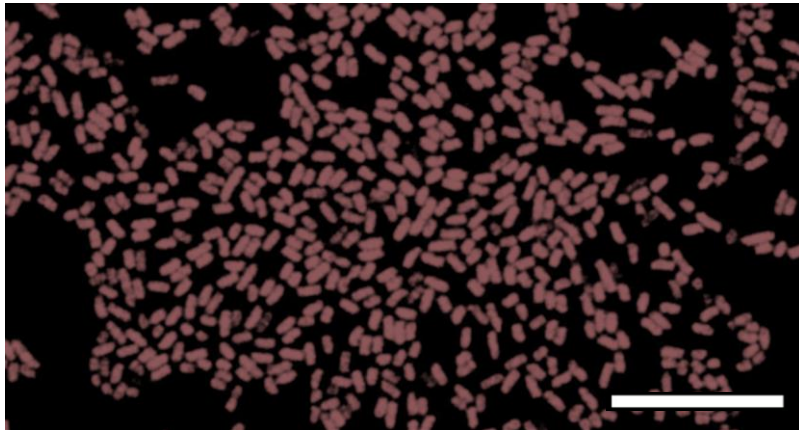
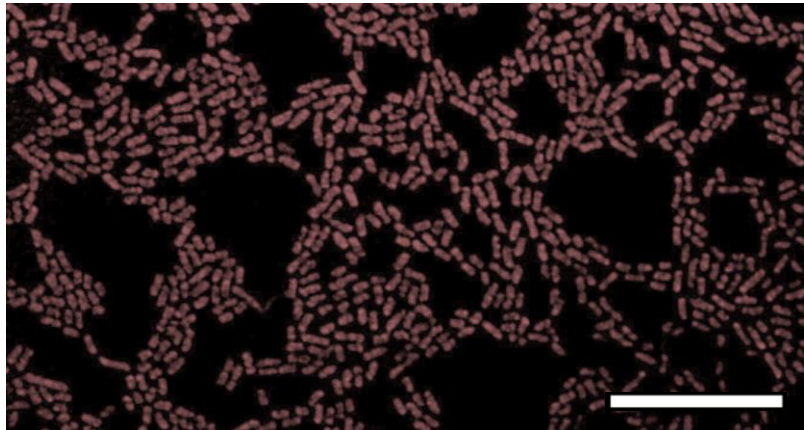
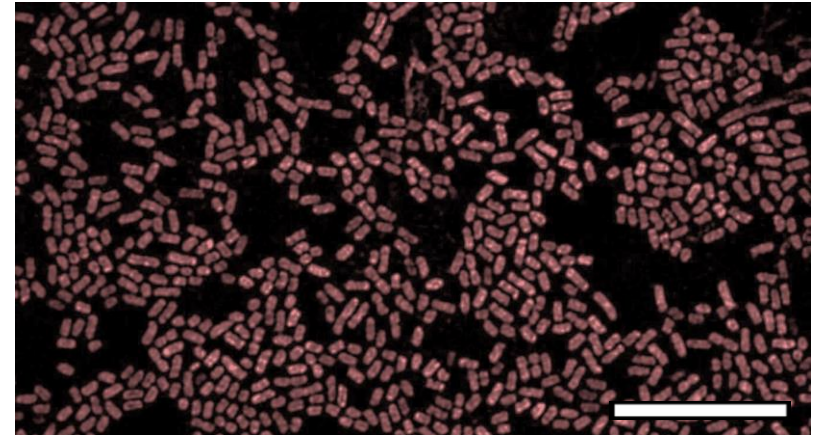
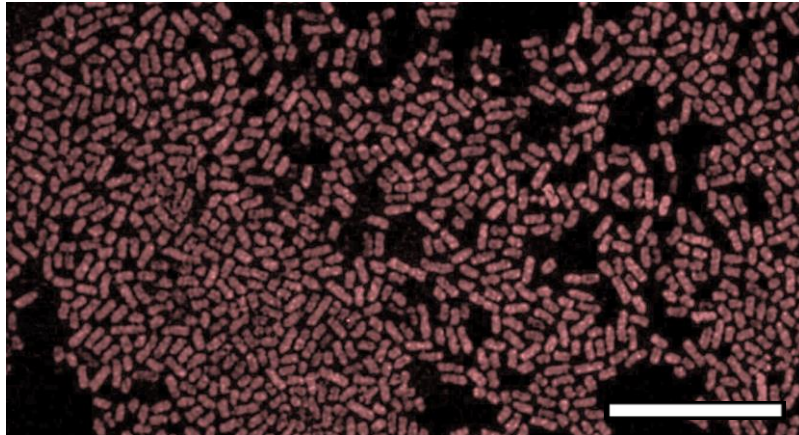
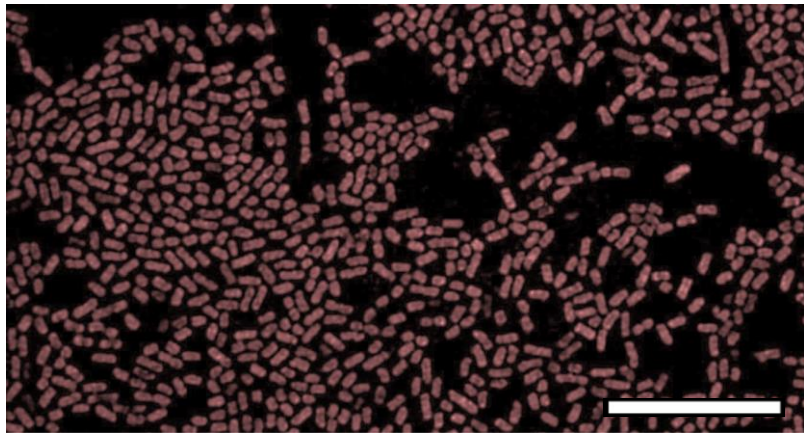
OD65- 7 h



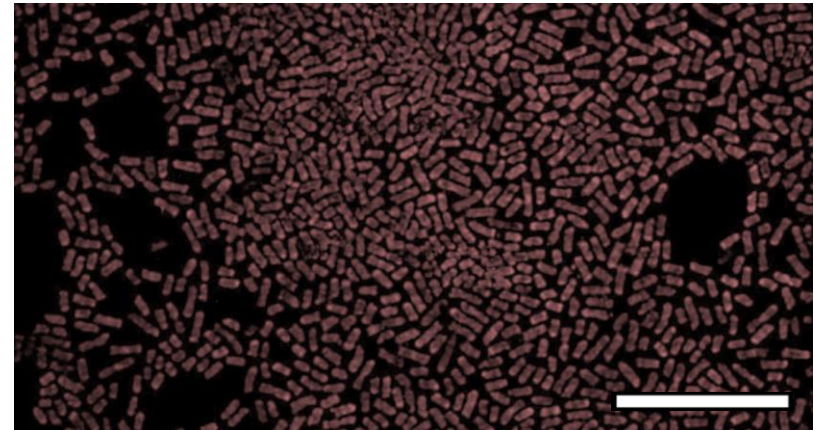
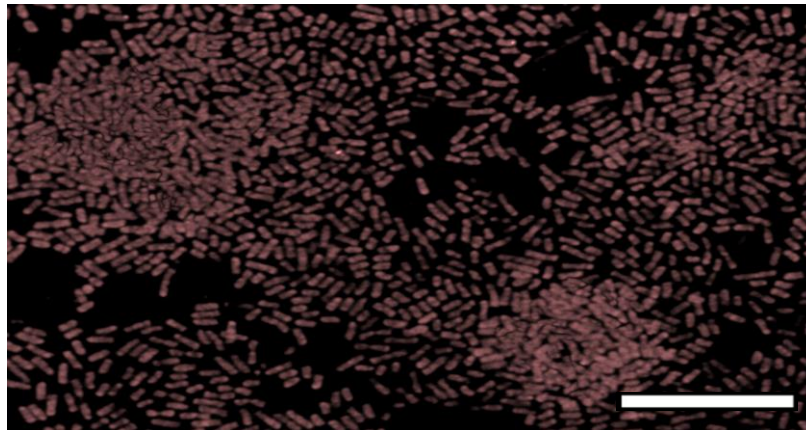
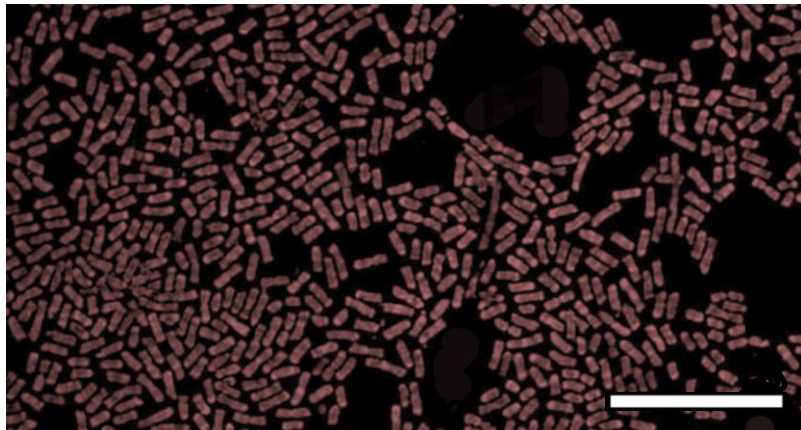
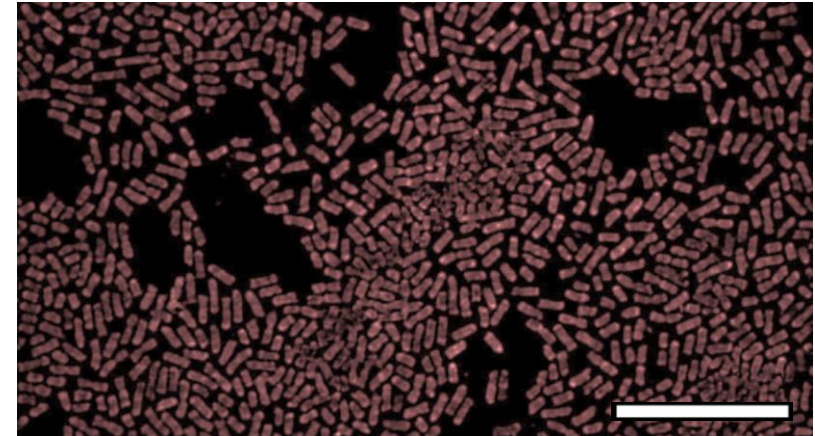
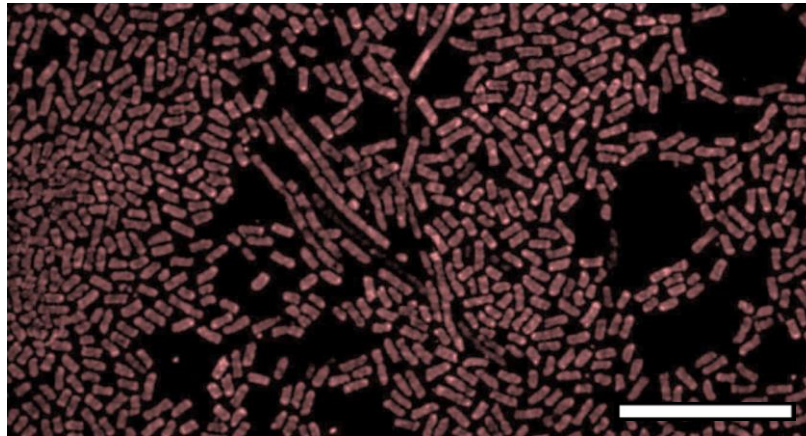
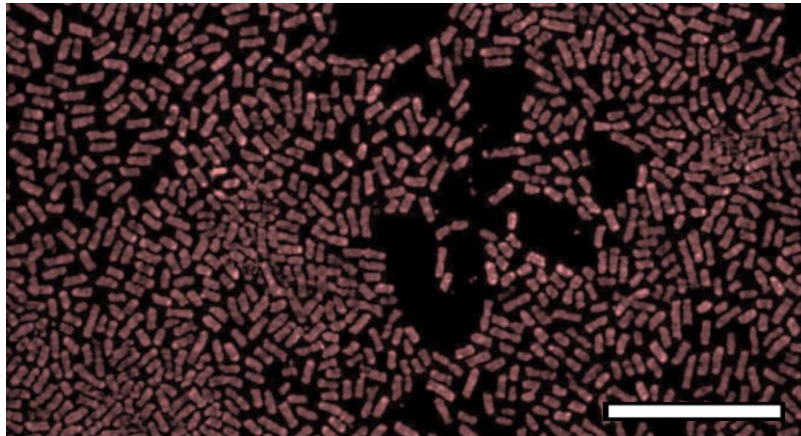
OD65- 8 h



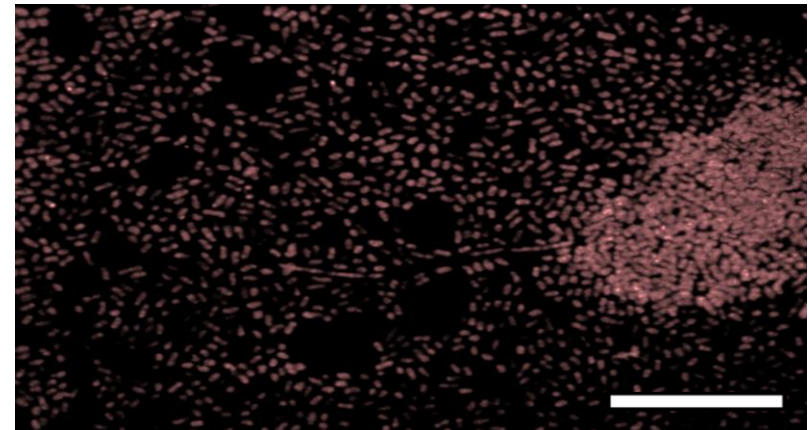
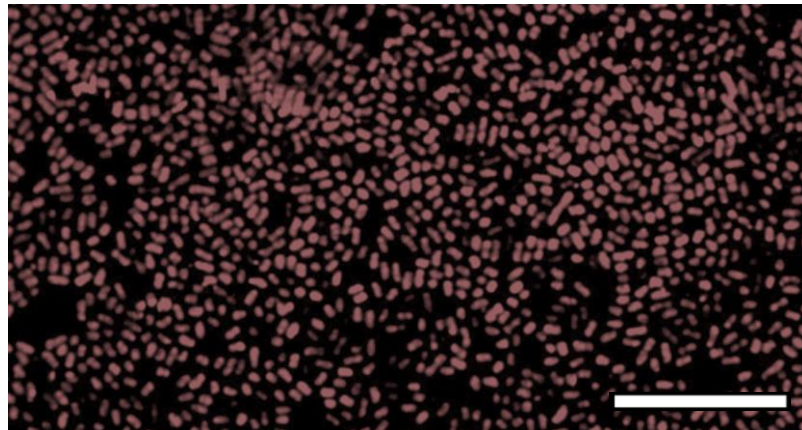
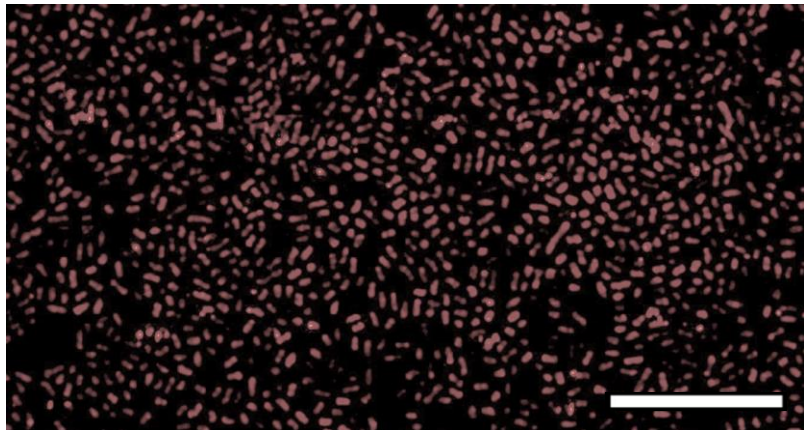
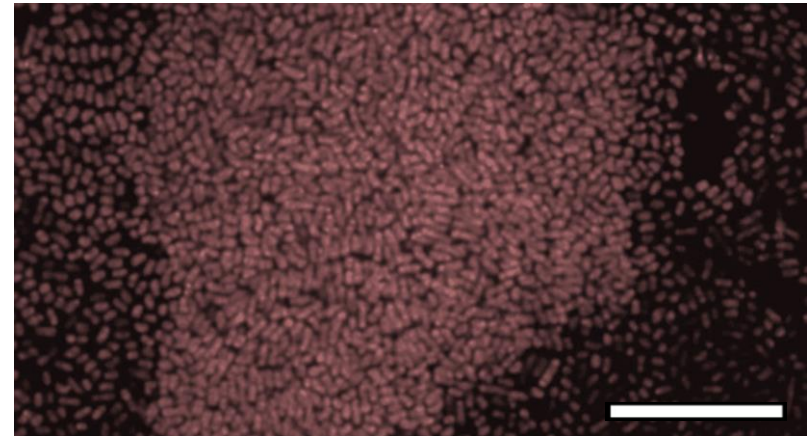
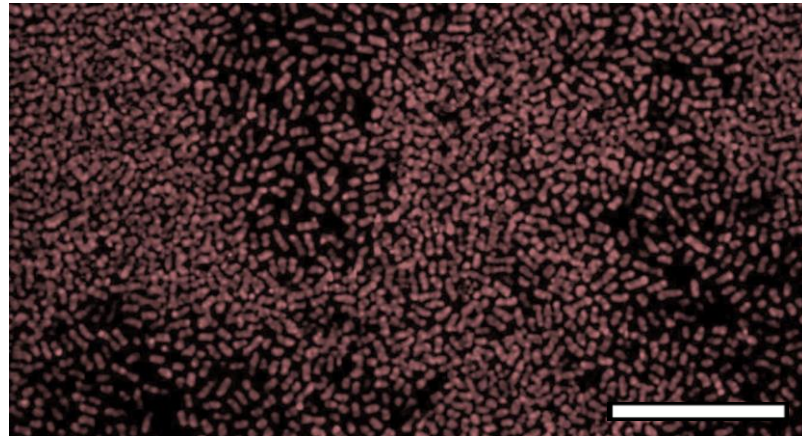
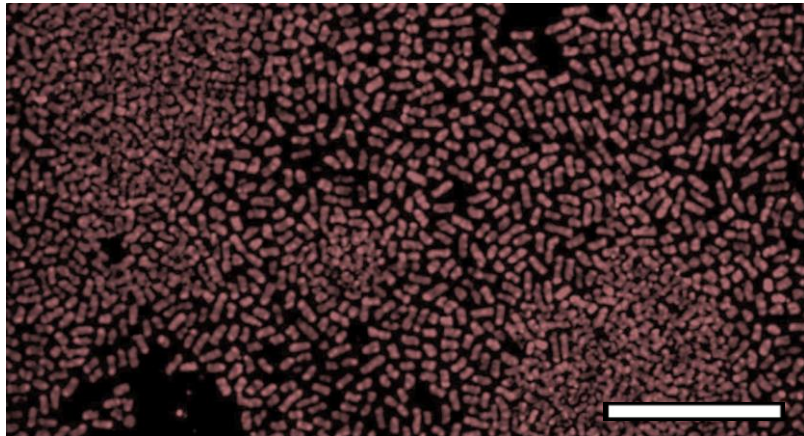
OD65- 9 h



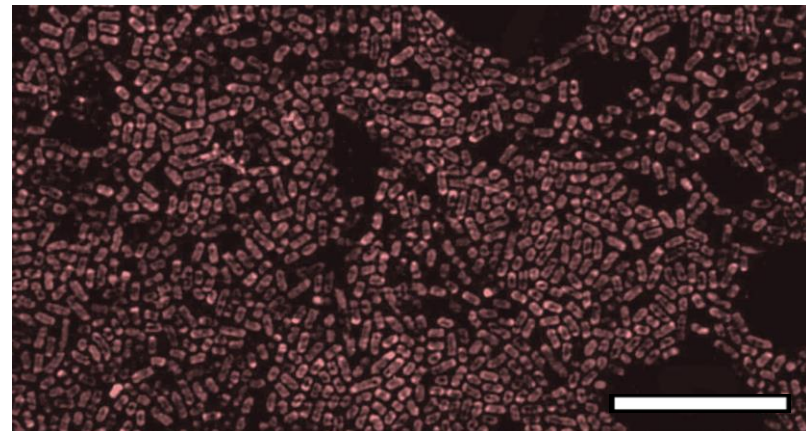
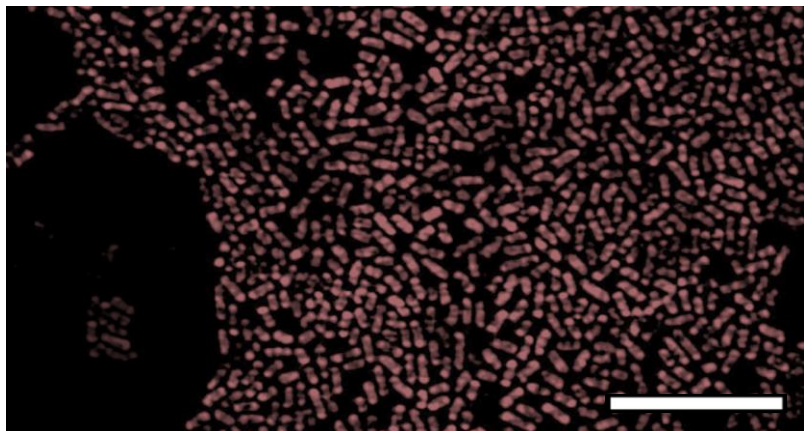
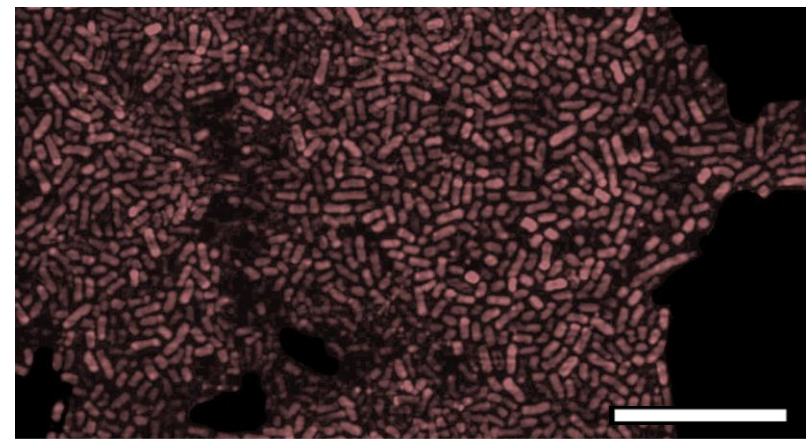
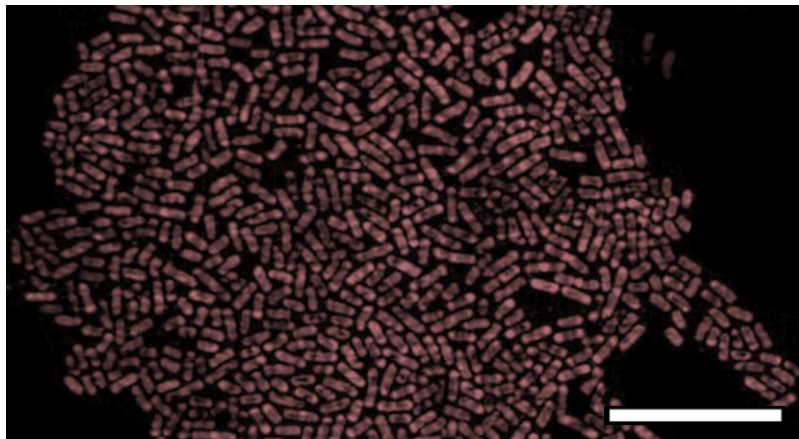
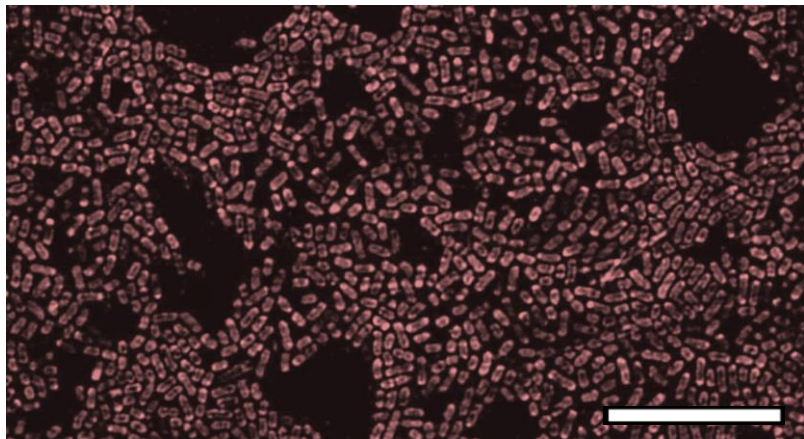
OD65- 10 h



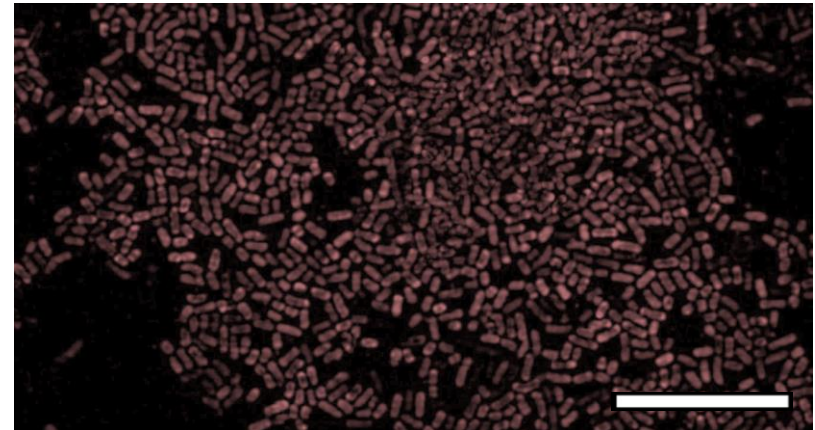
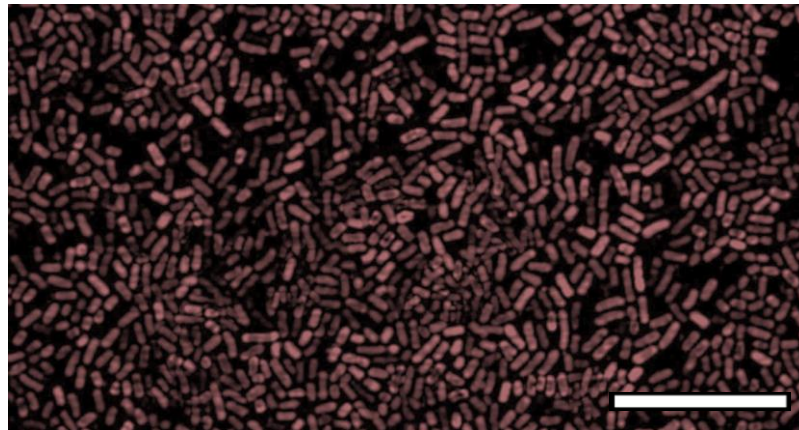
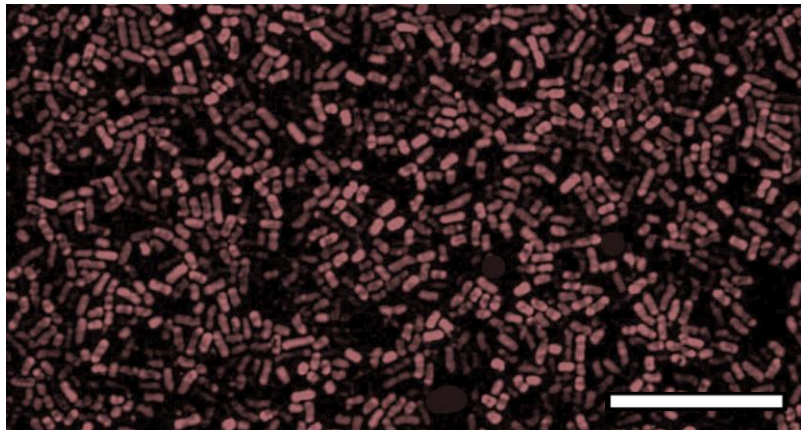
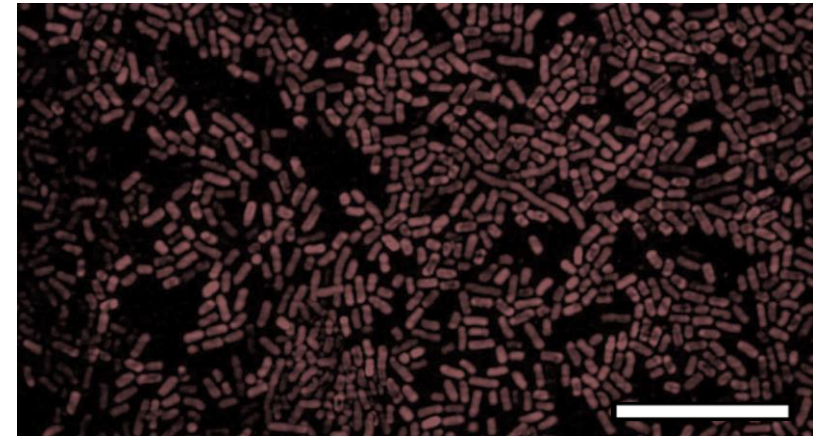
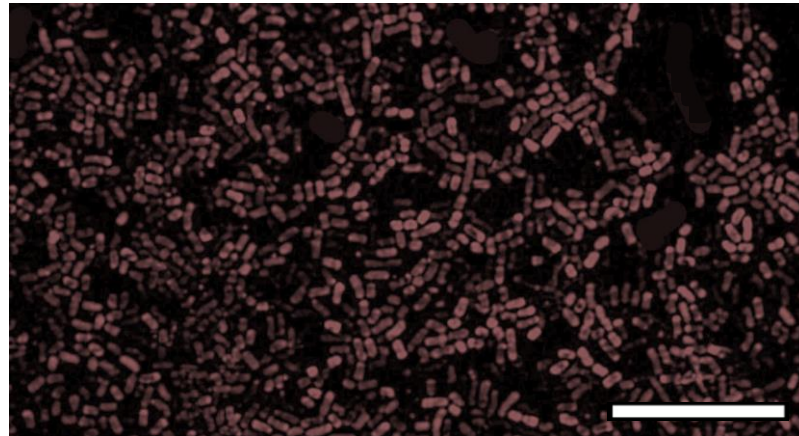
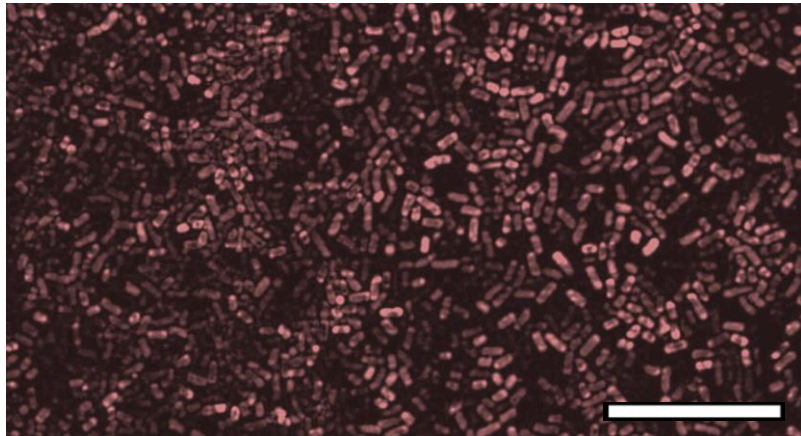
OD65- 11 h



OD65- 12 h

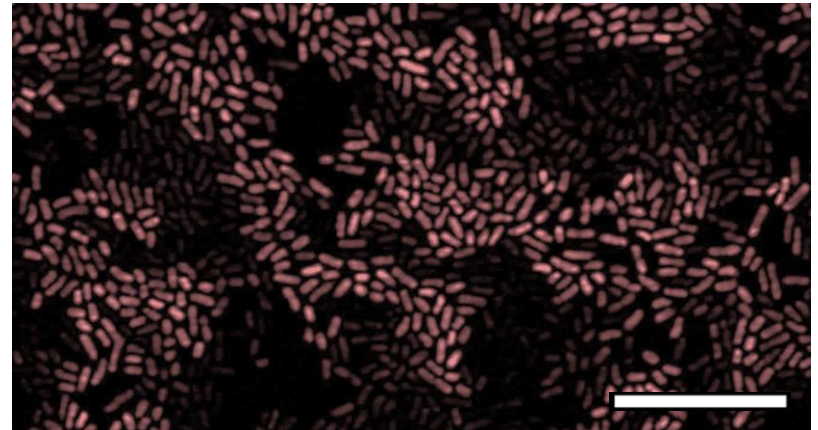
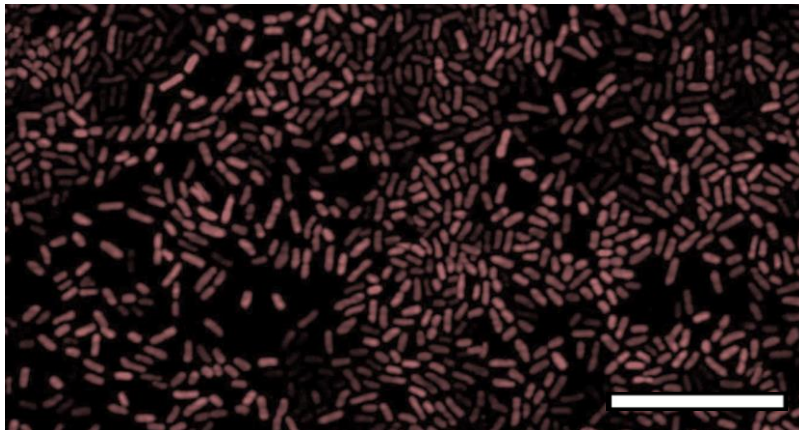
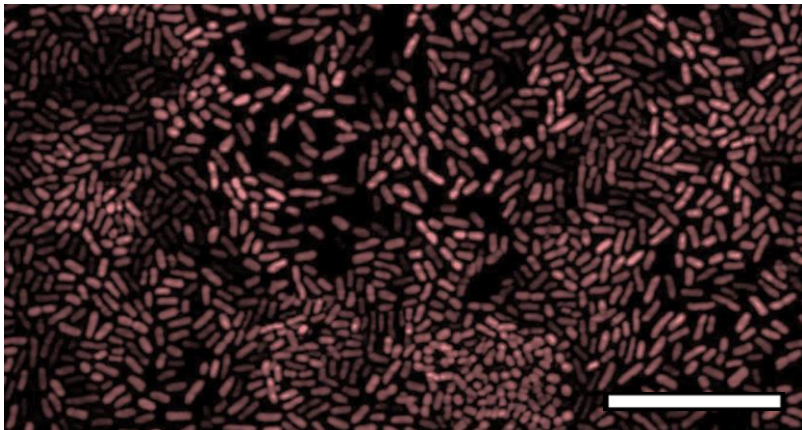
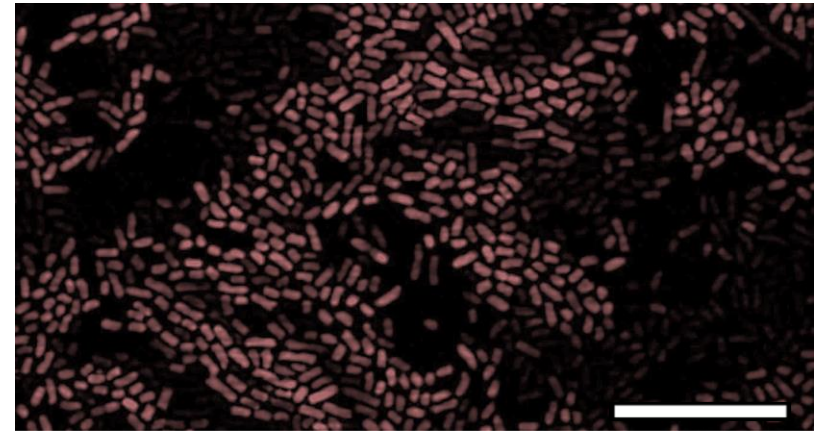
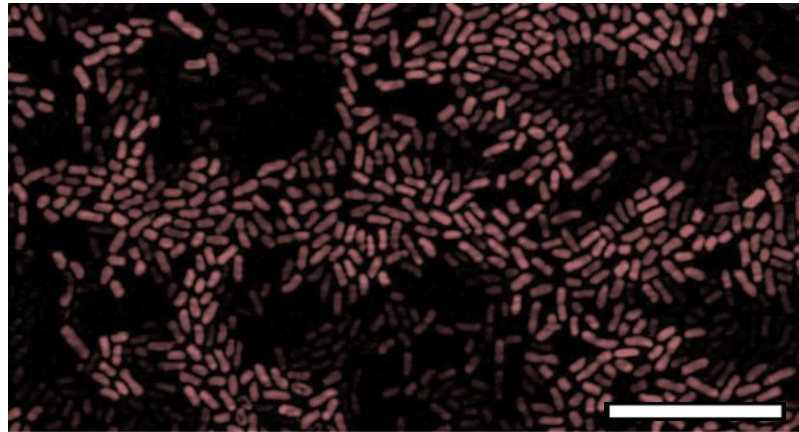
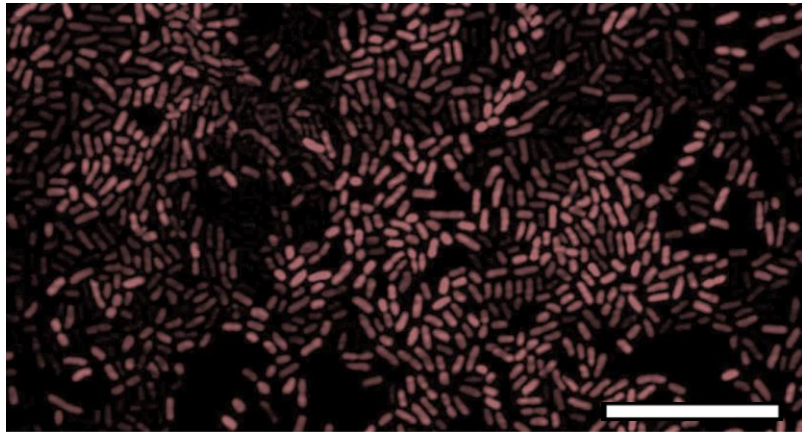


OD65- 13 h

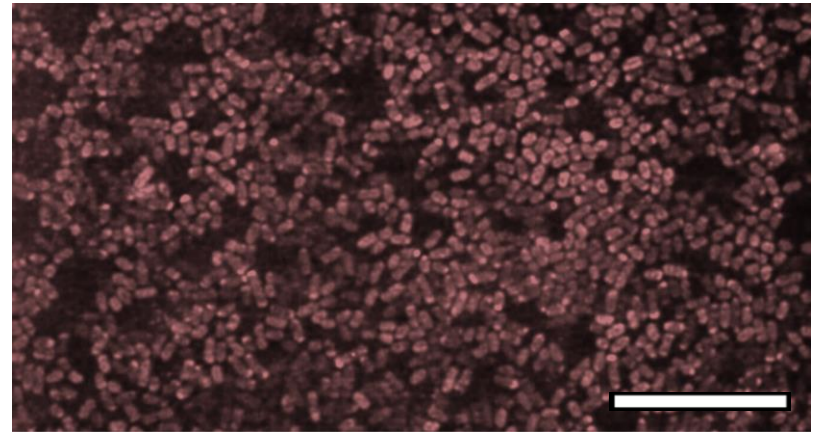
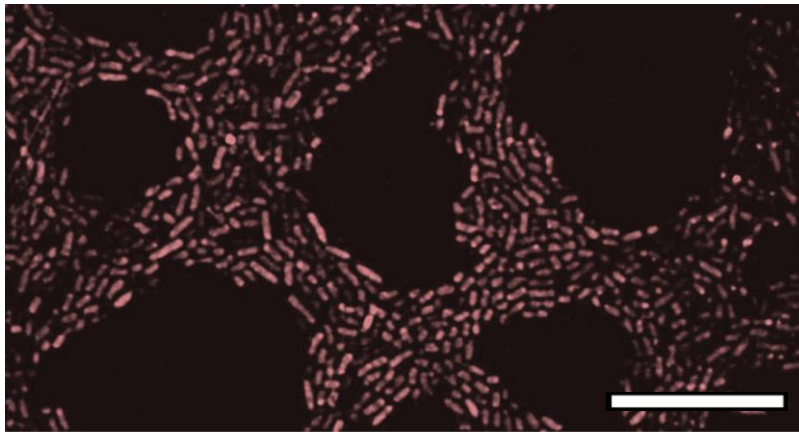
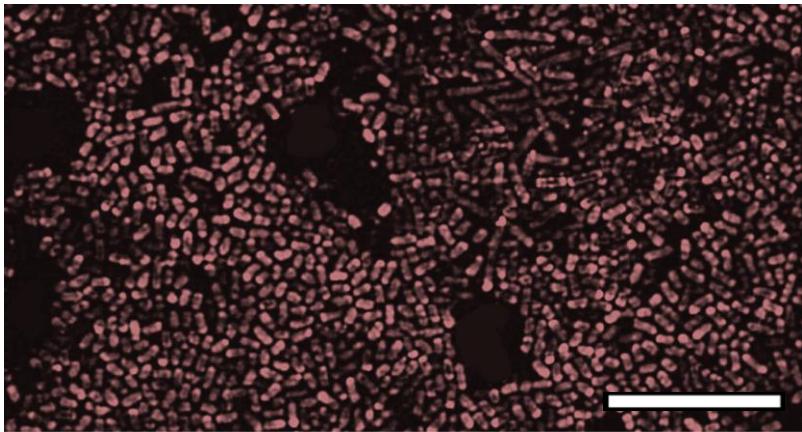
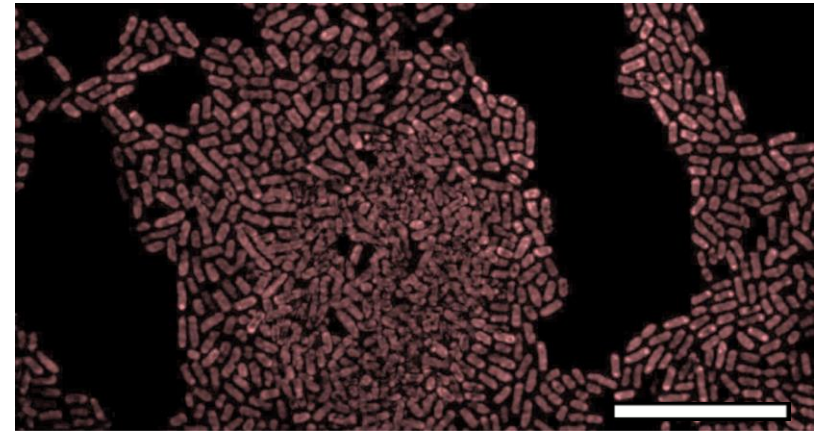
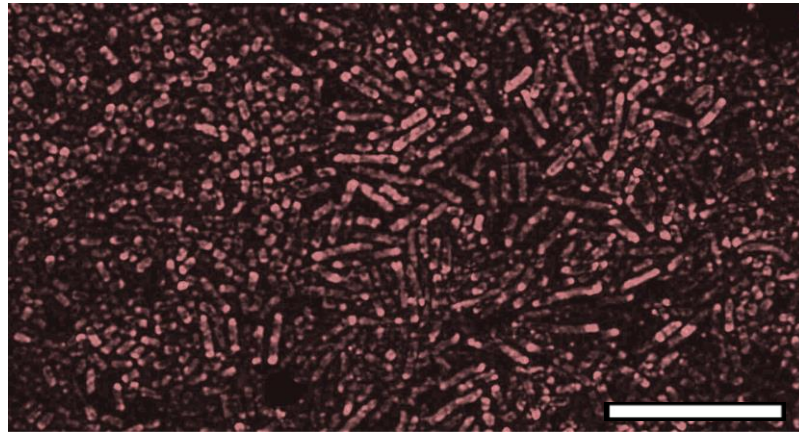
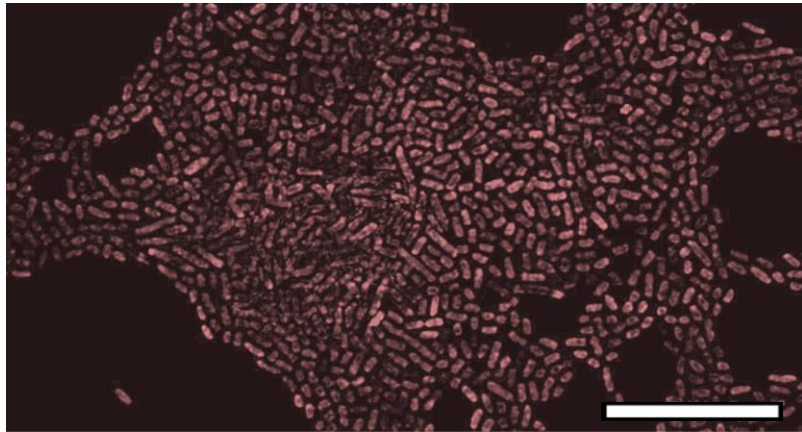




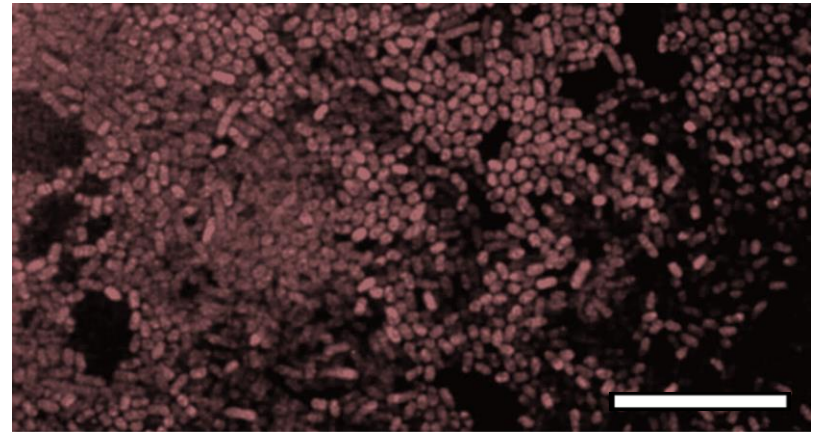
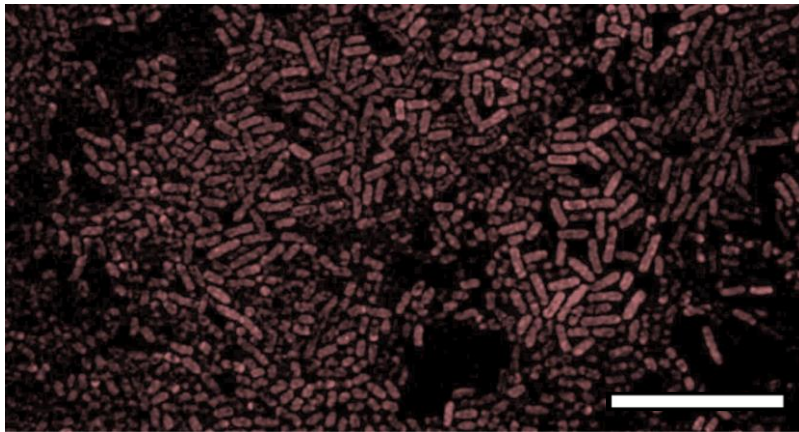
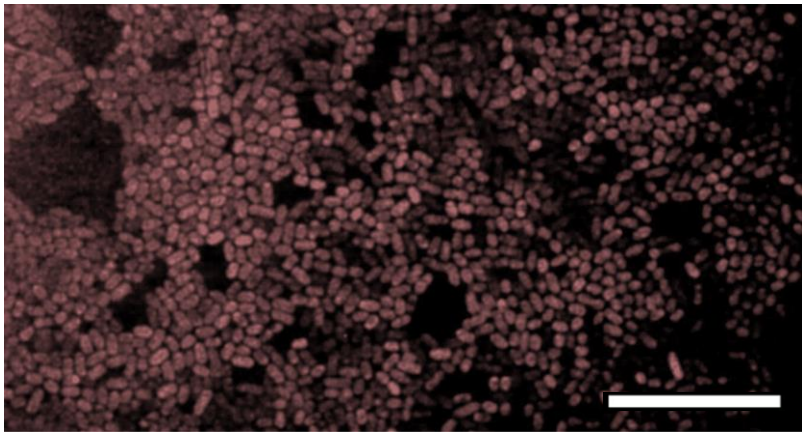
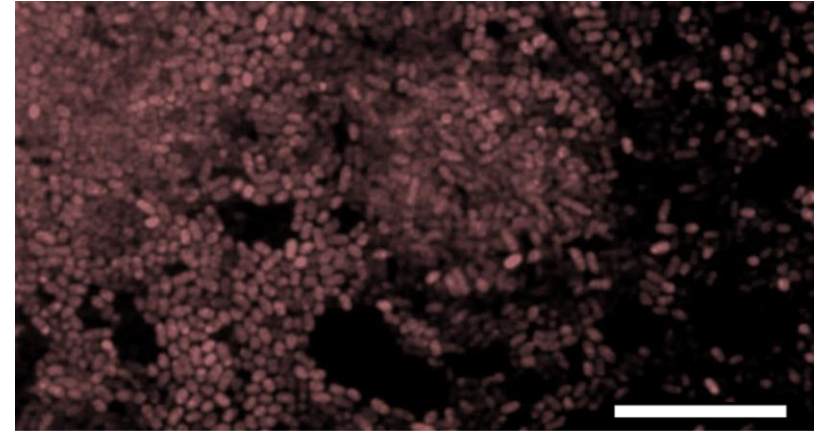
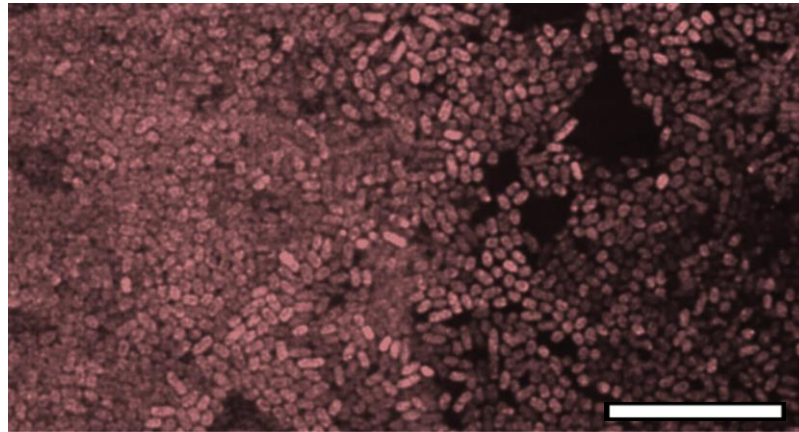
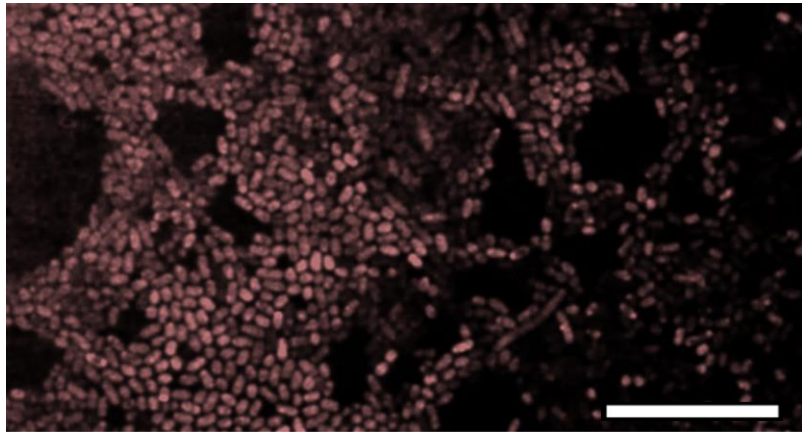
OD65- 14 h



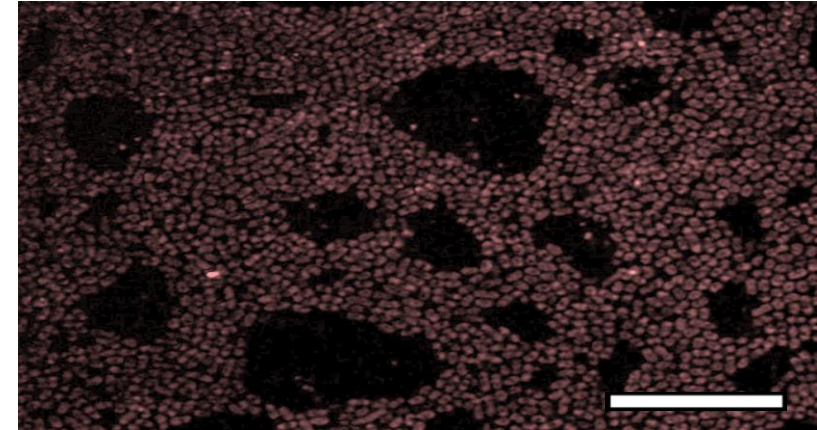
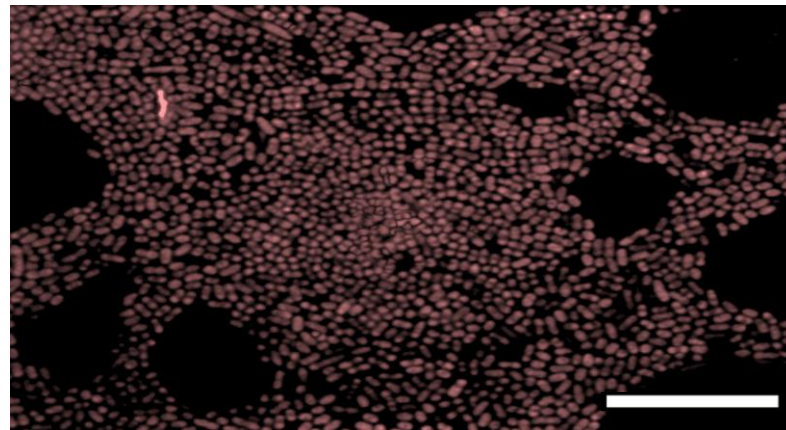
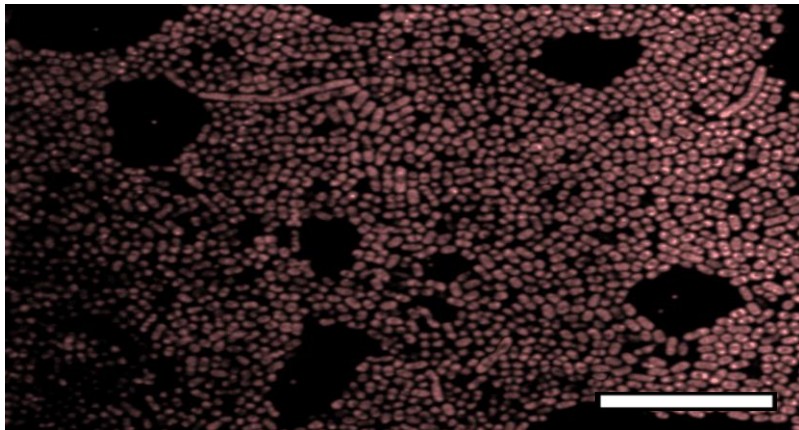
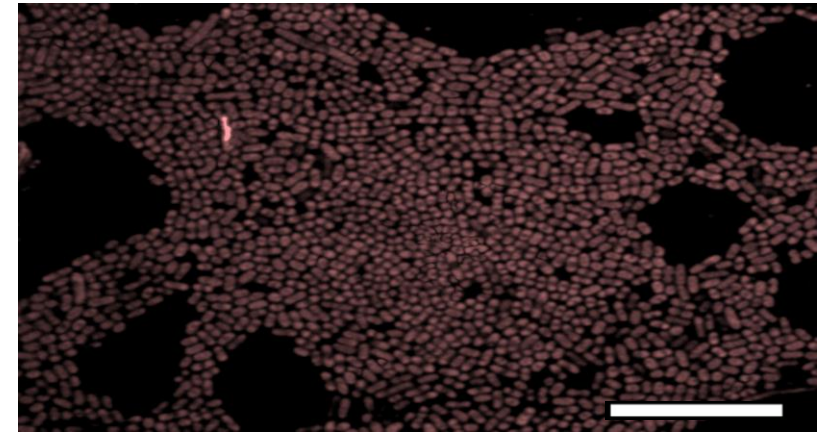
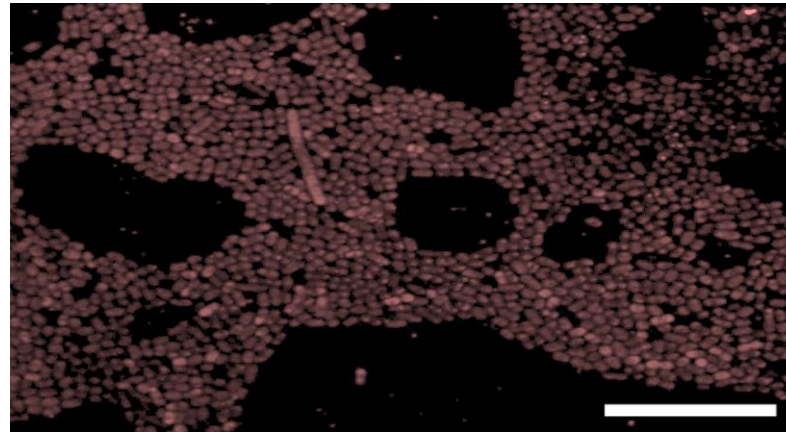
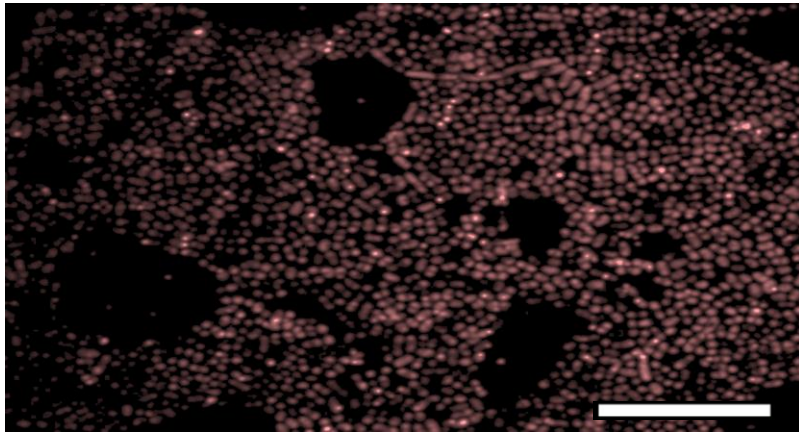
OD65- 15 h



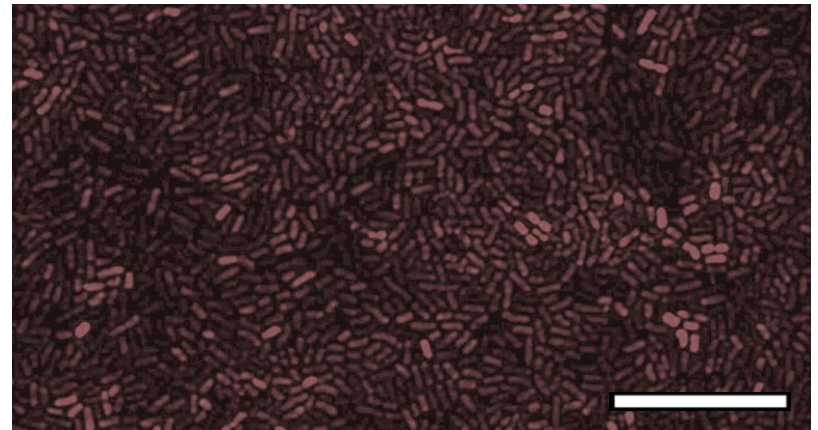
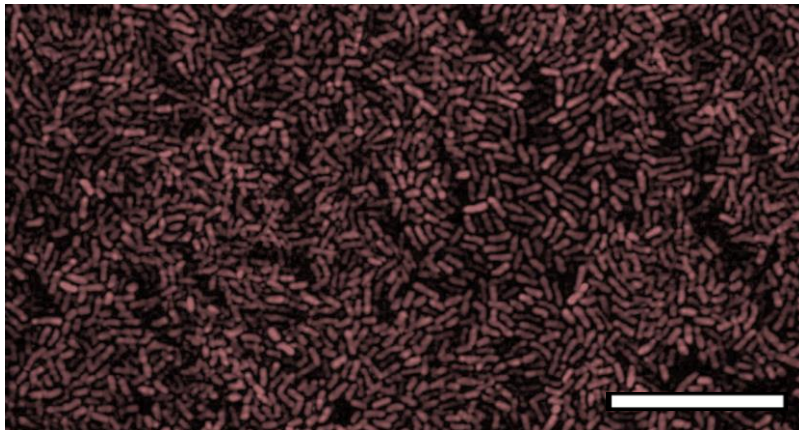
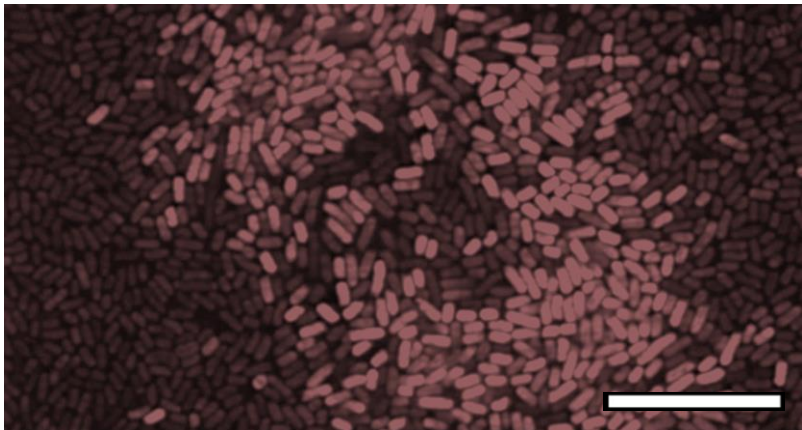
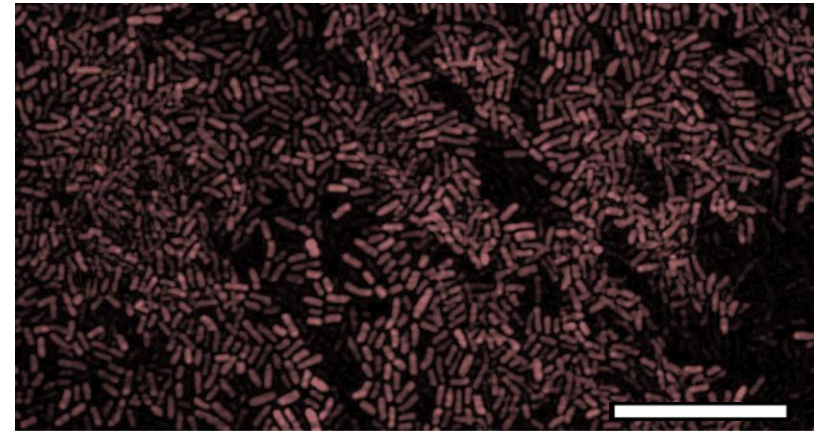
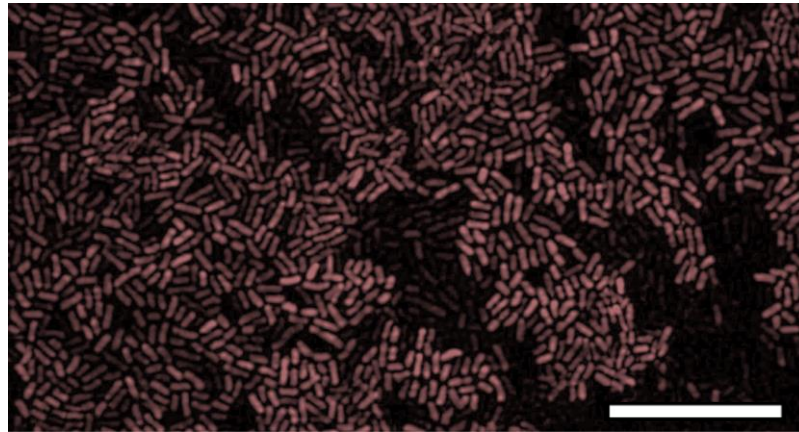
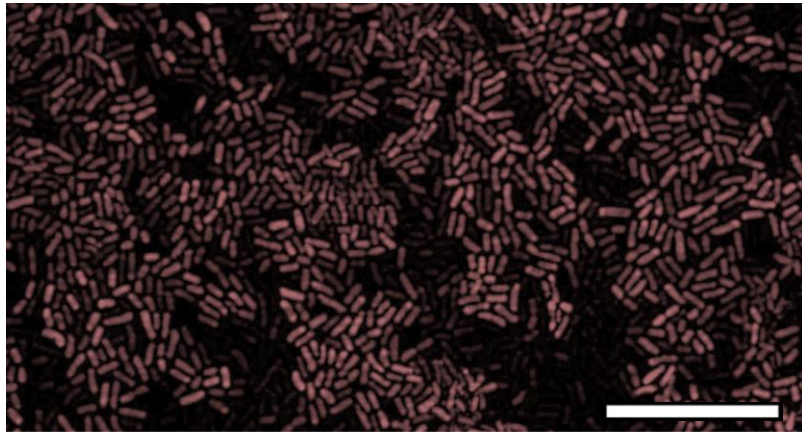
OD65- 16 h



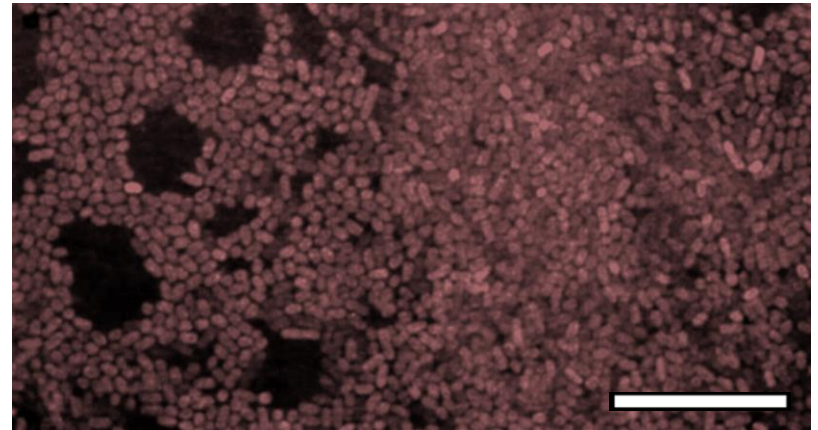
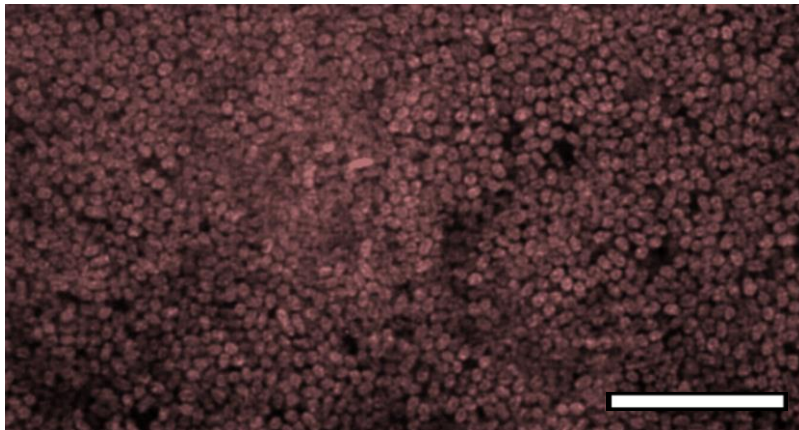
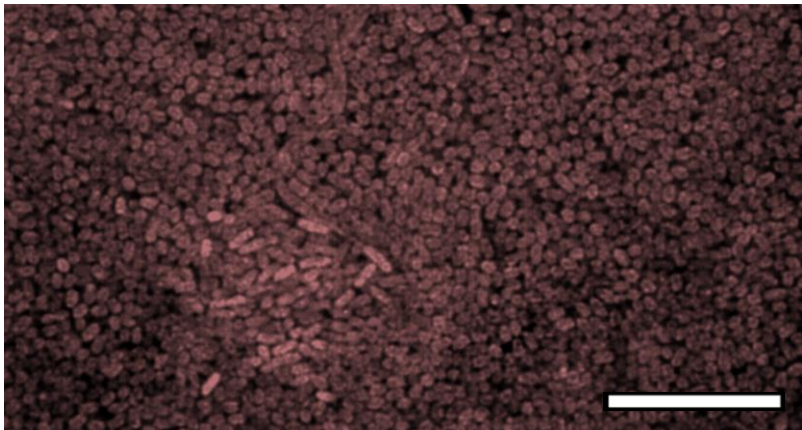
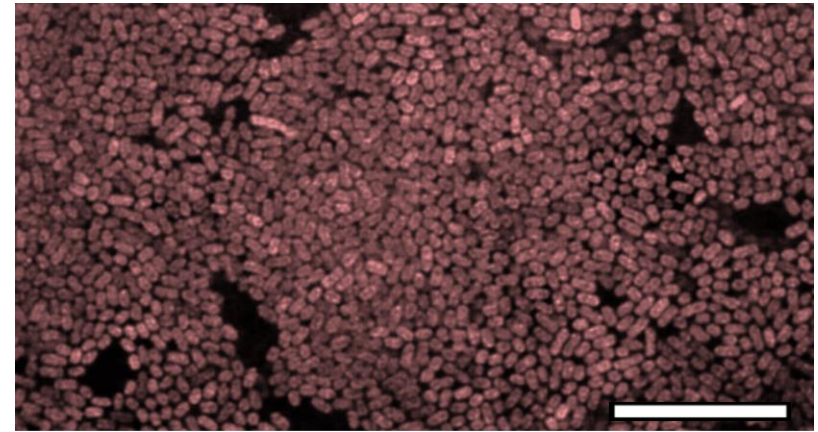
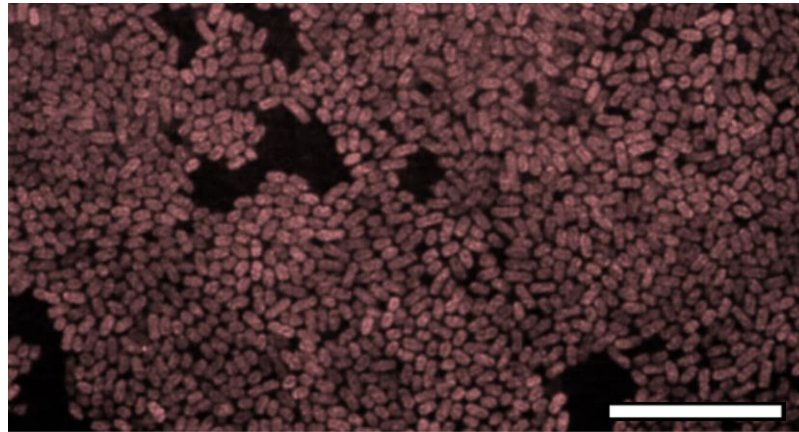
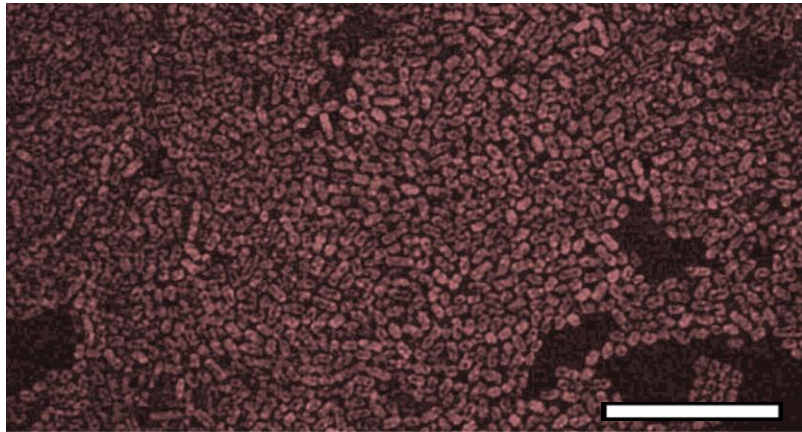
OD65- 17 h



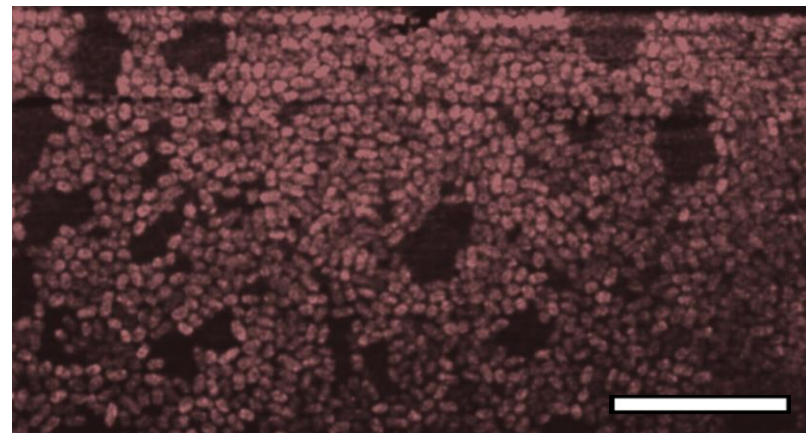
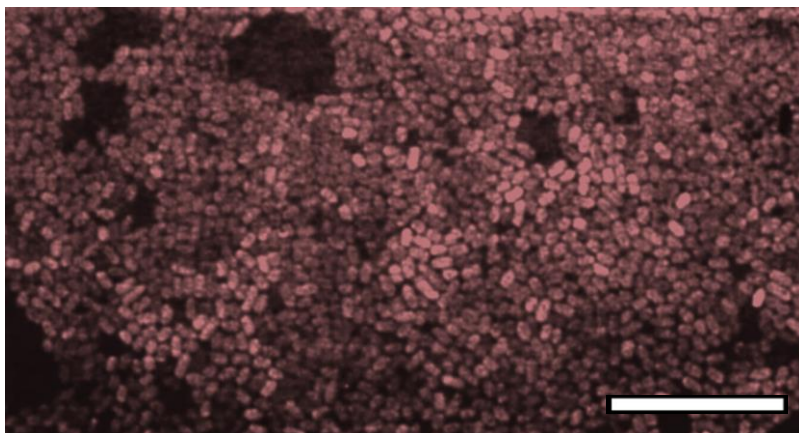
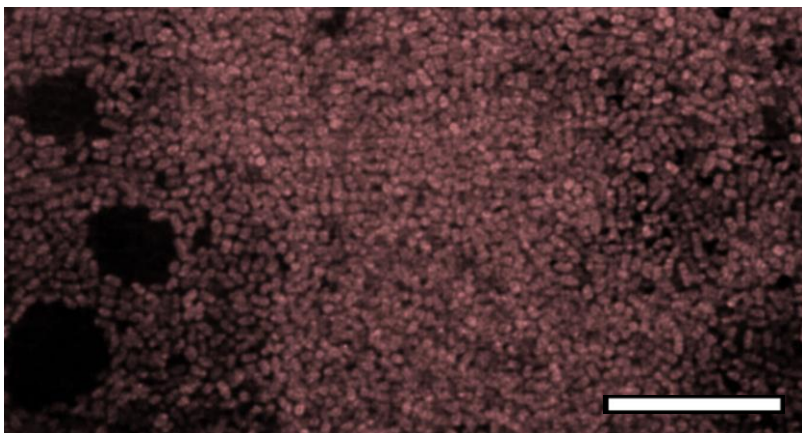
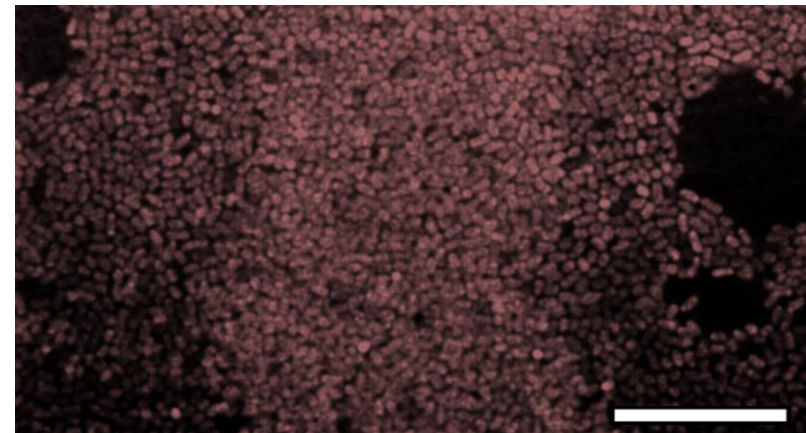
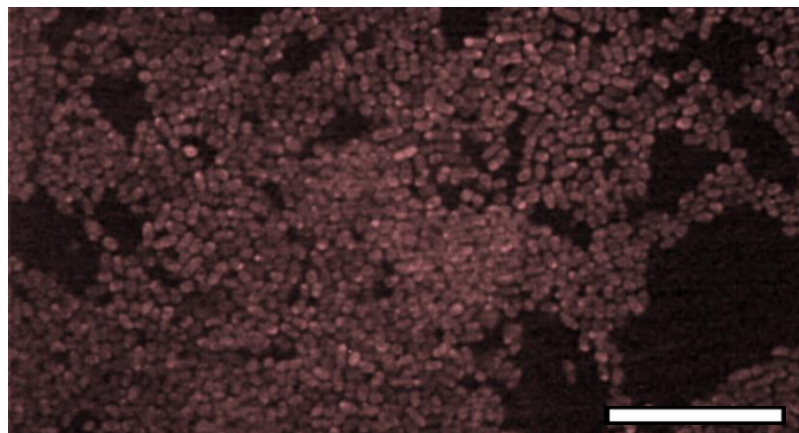
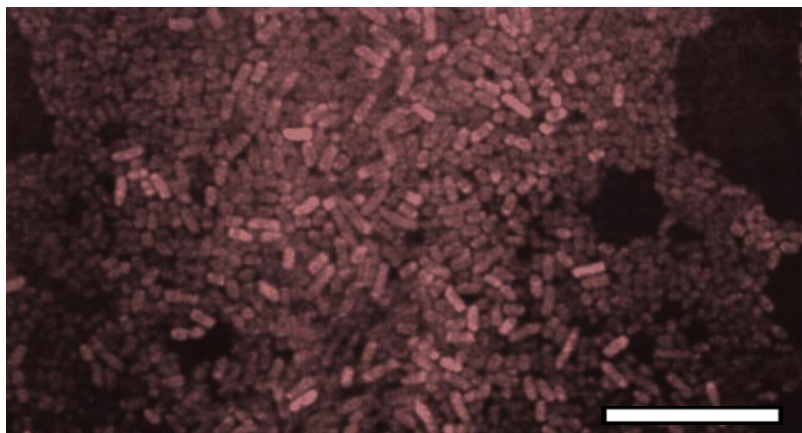
OD65- 18 h



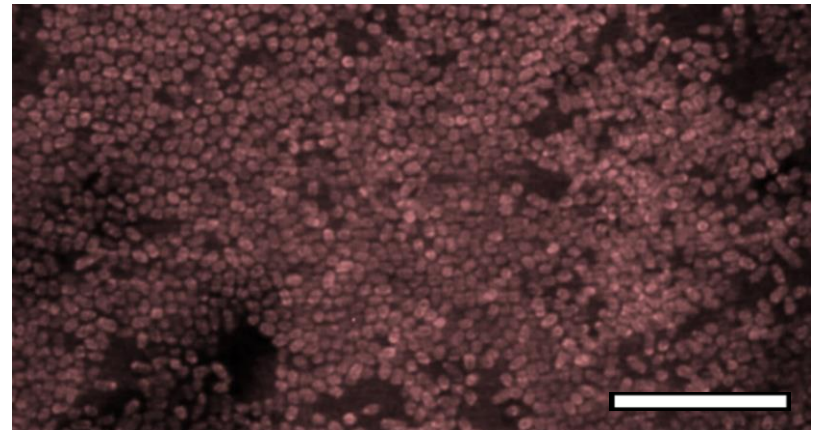
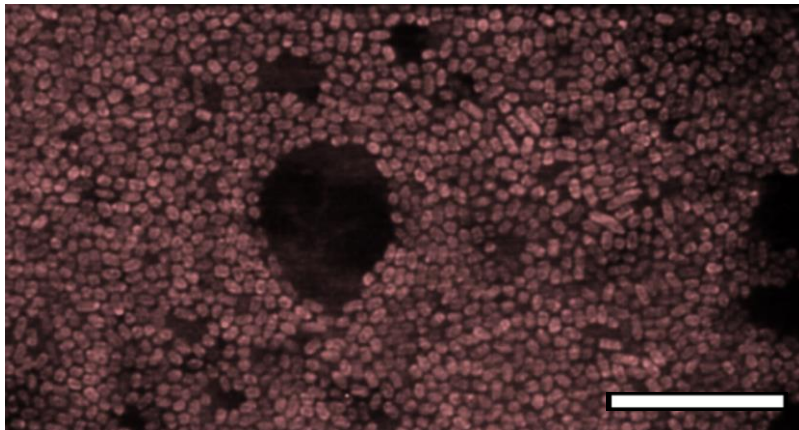
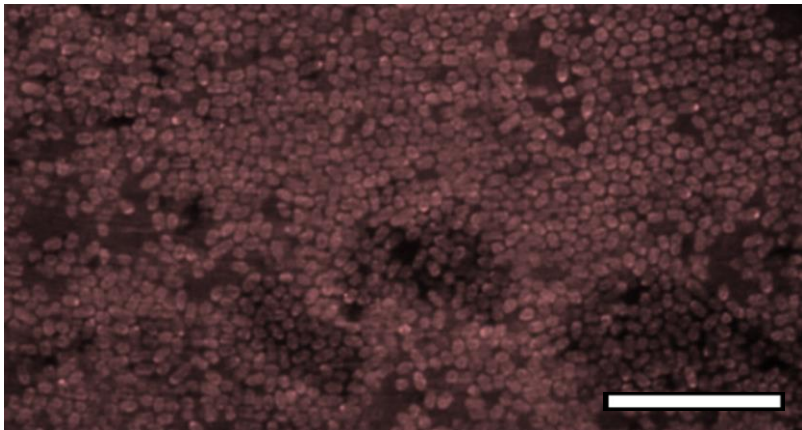
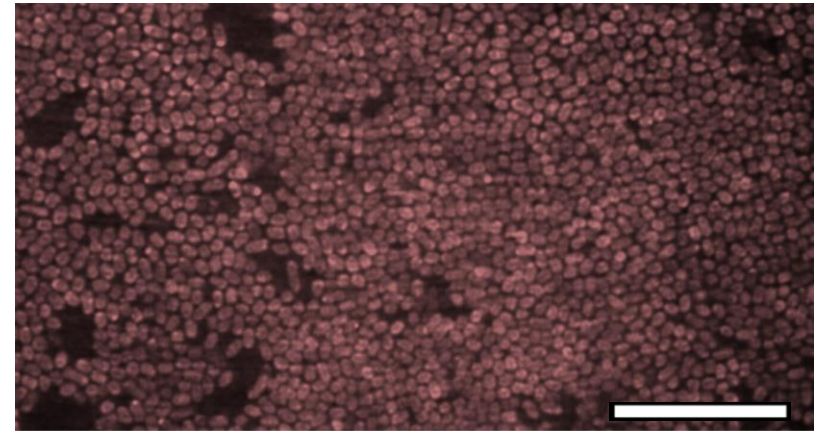
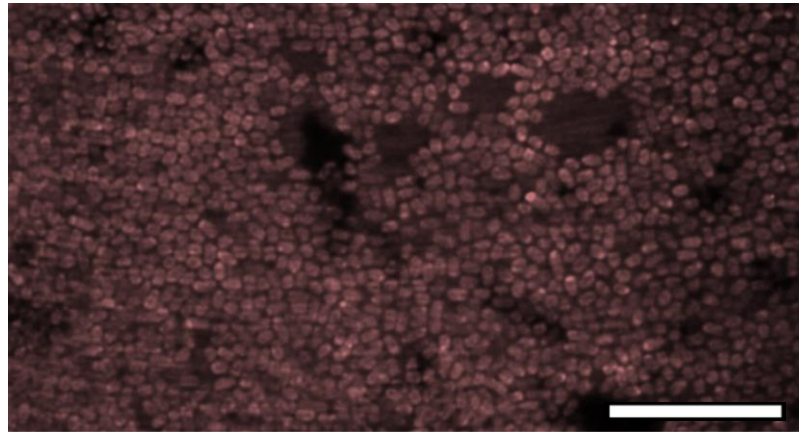
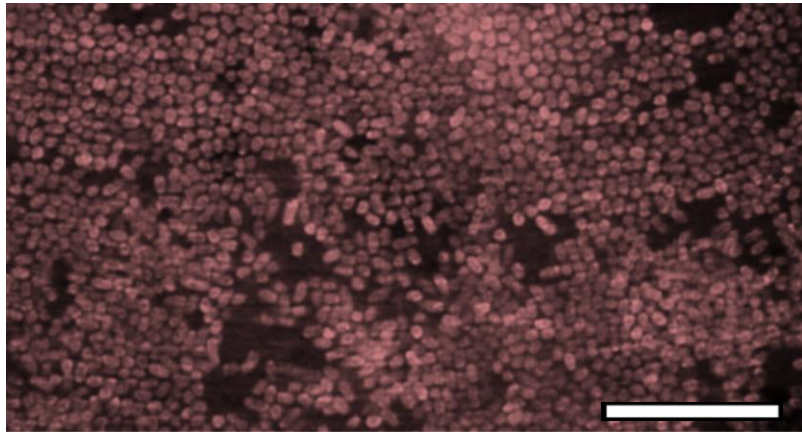
OD65- 19 h



OD65- 20 h

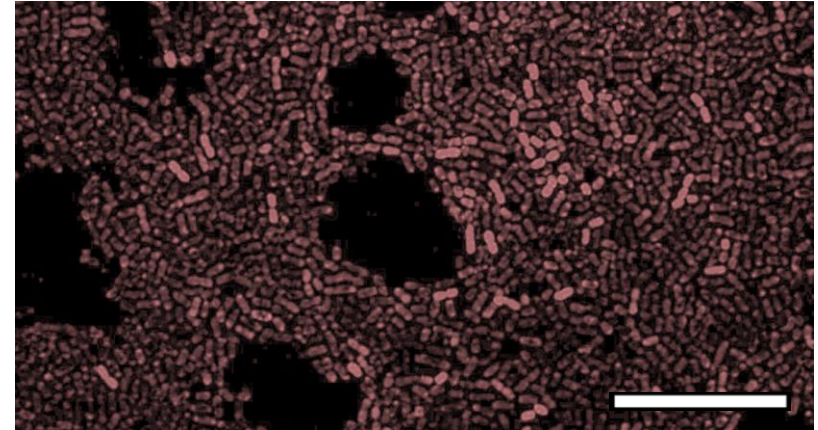
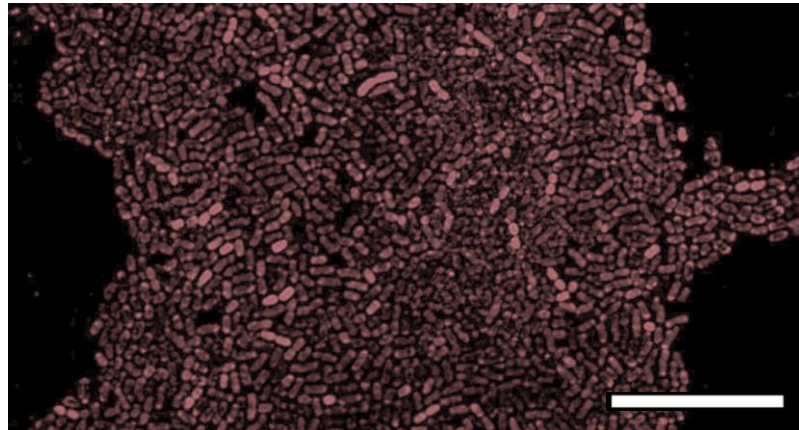
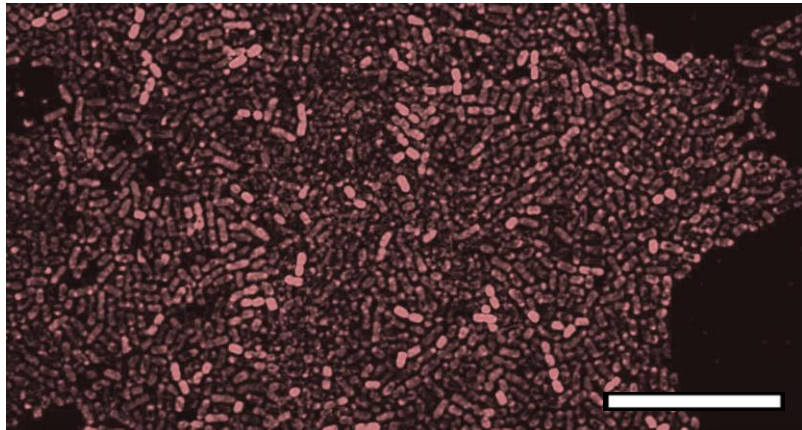
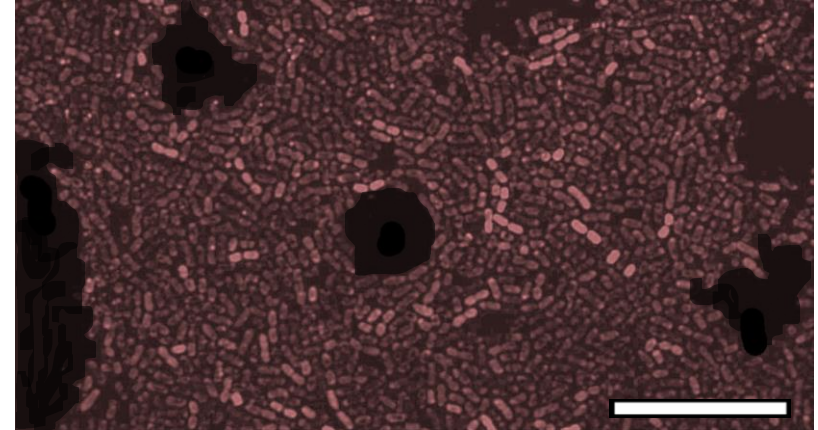
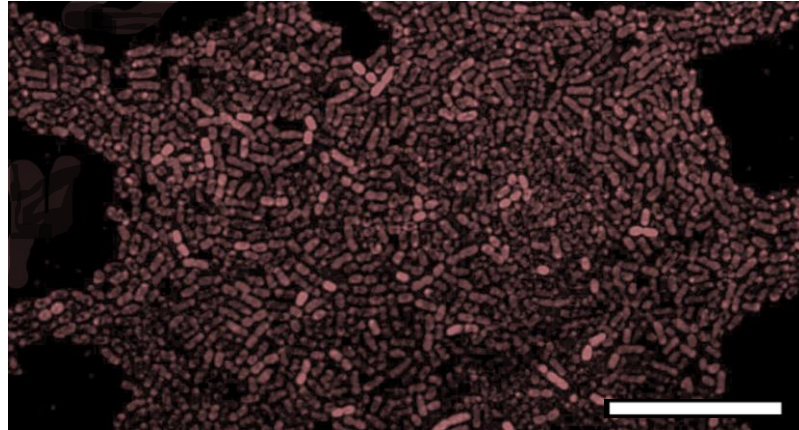
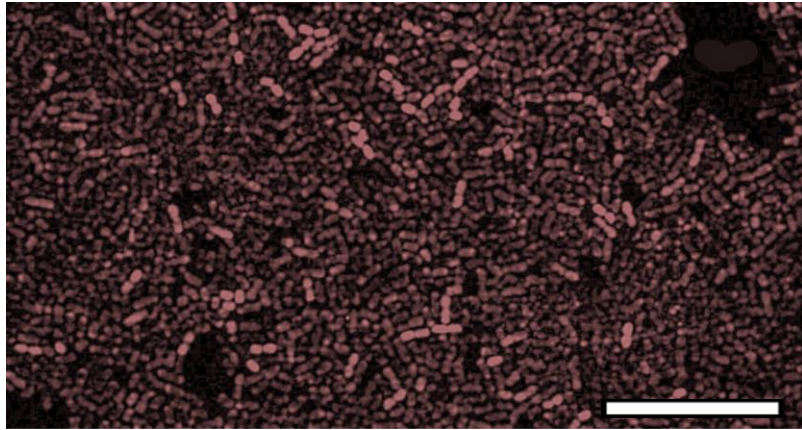


OD65- 21 h

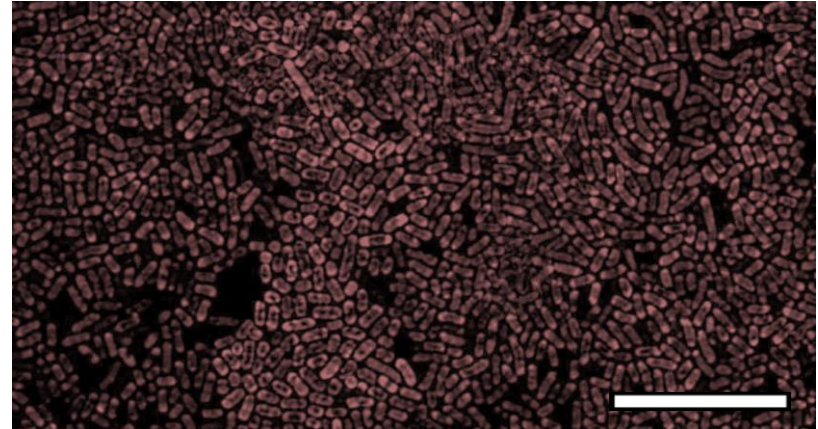
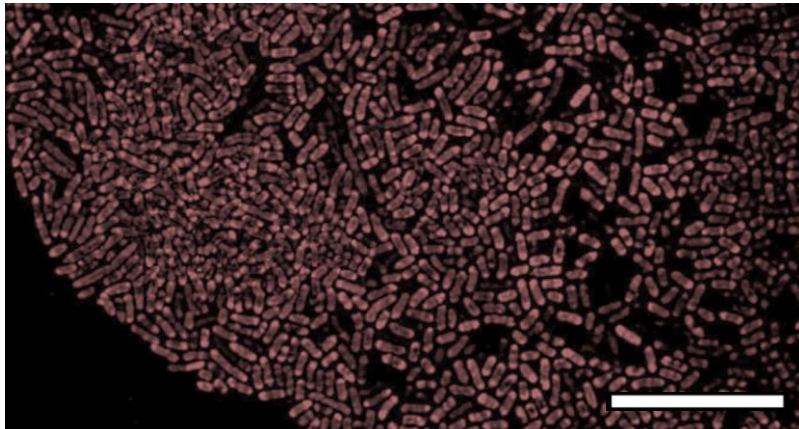
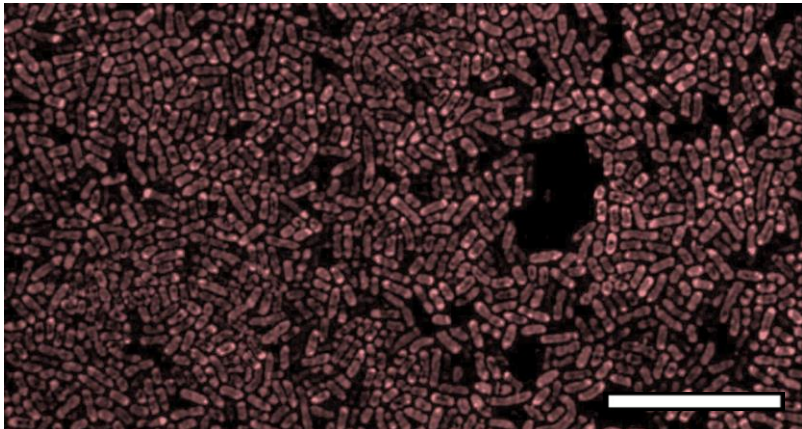
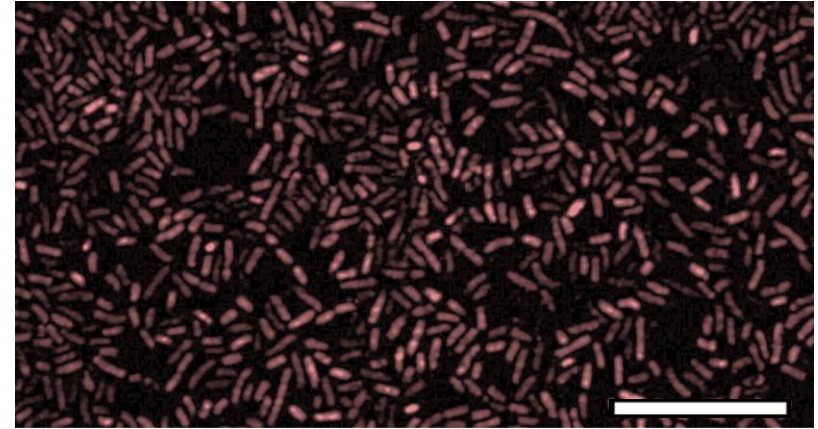
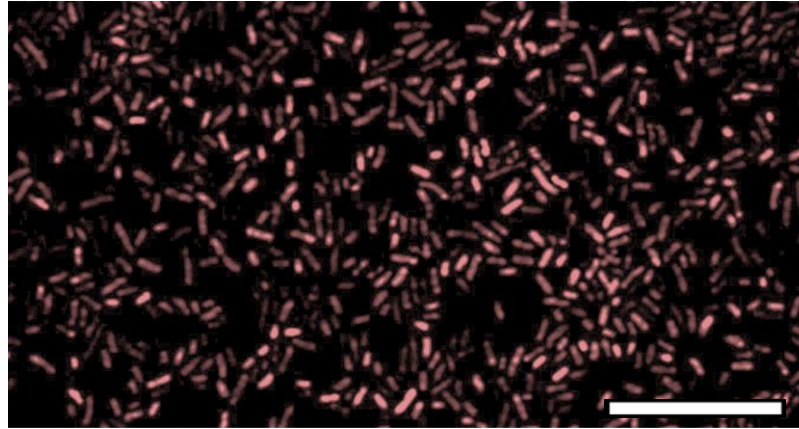
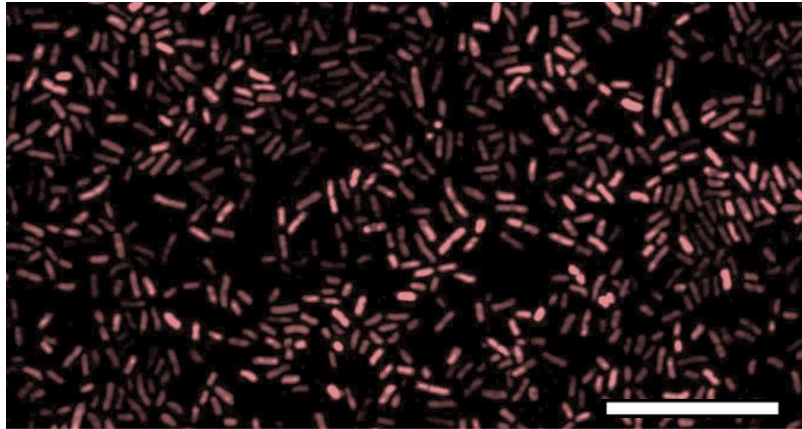




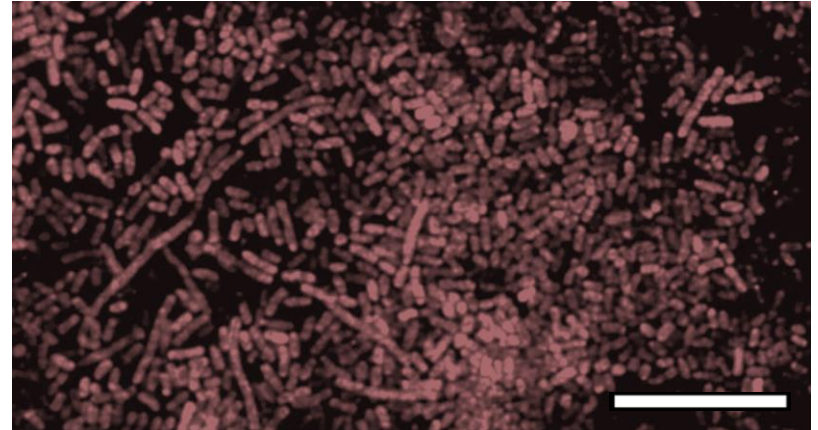
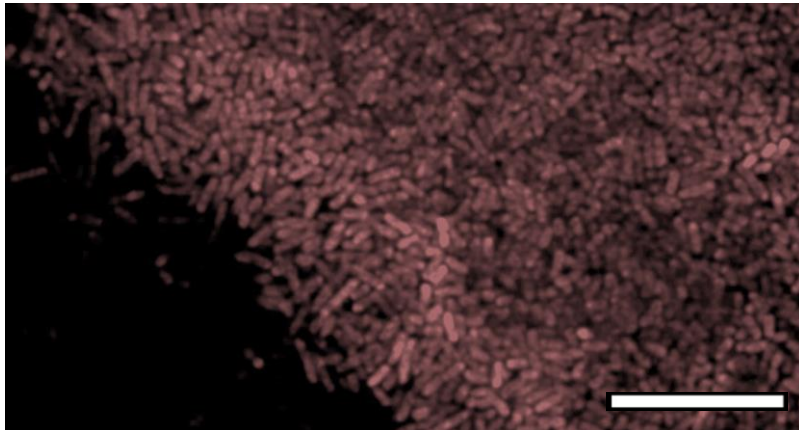
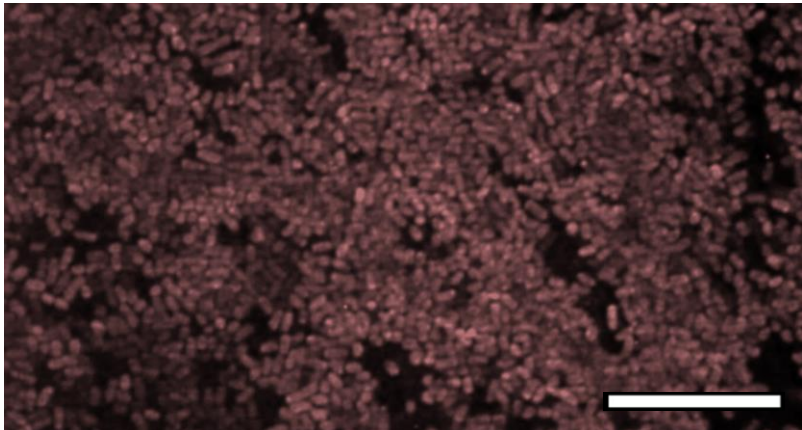
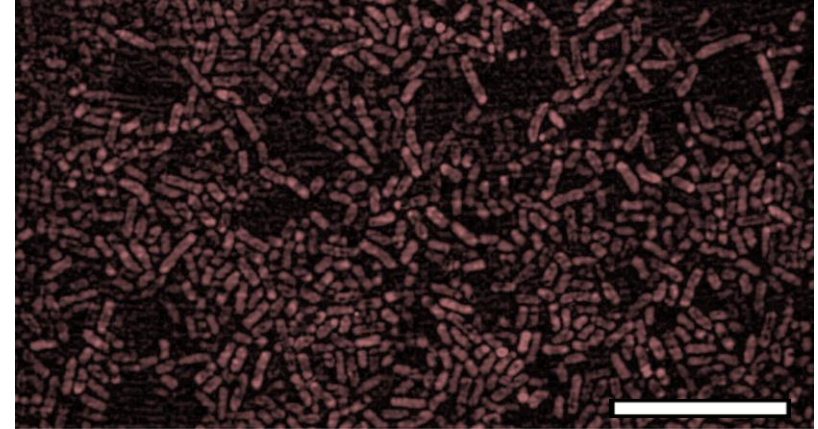
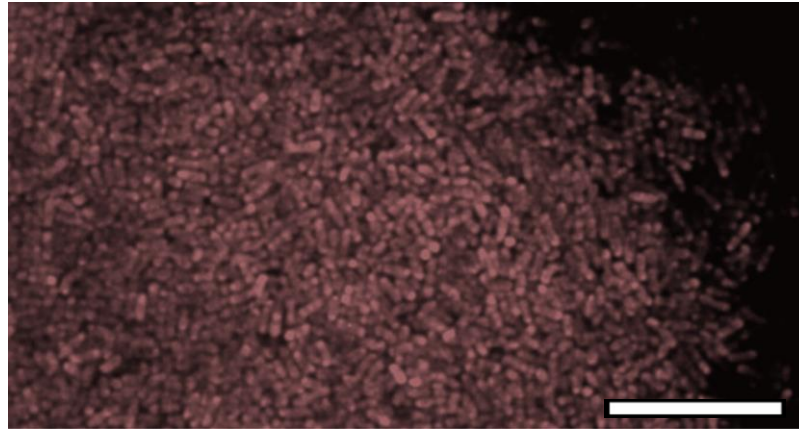
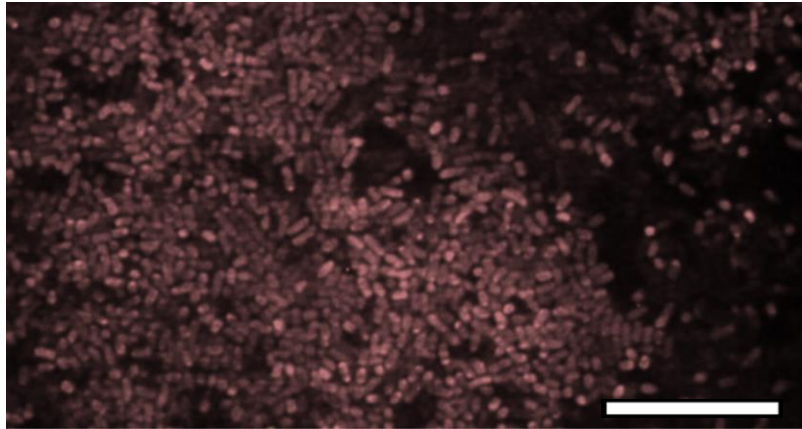
OD65- 22 h



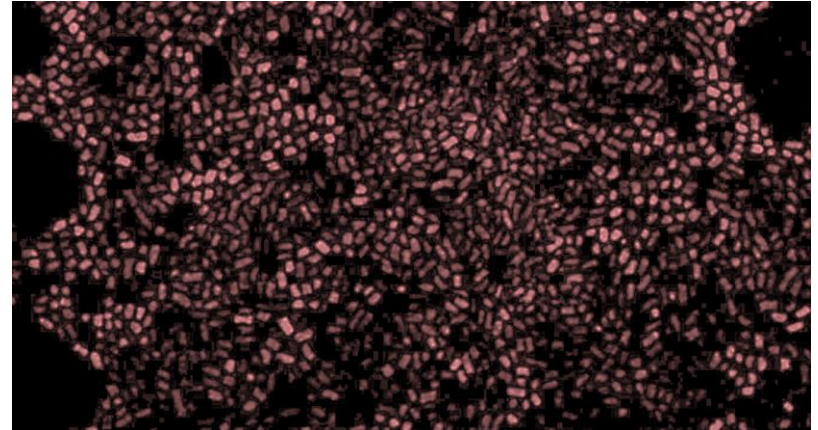
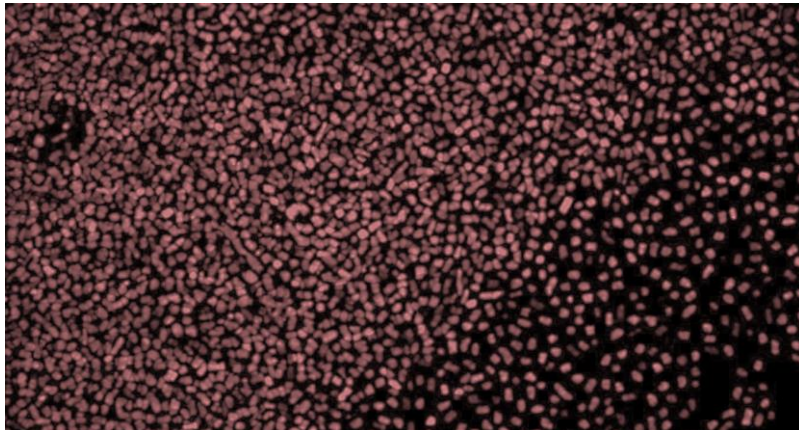
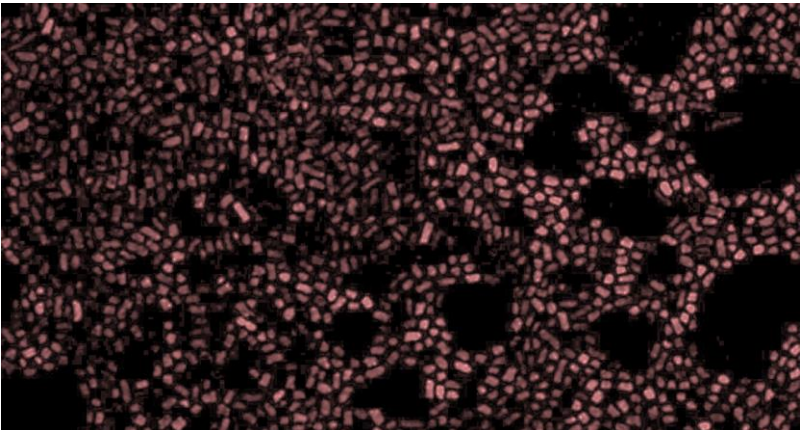
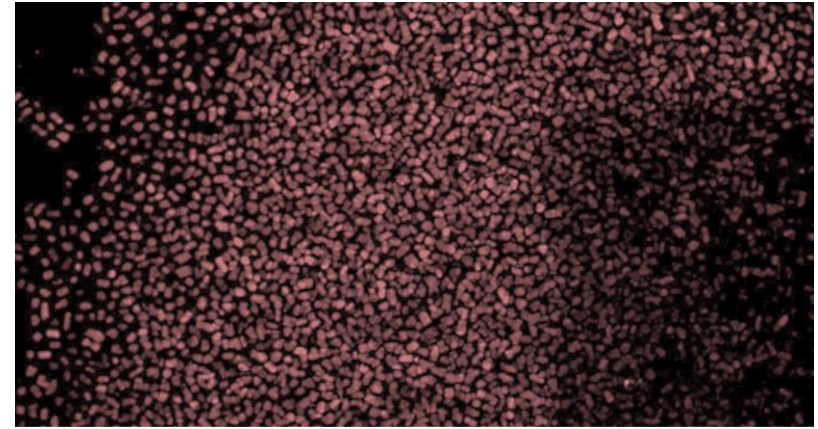
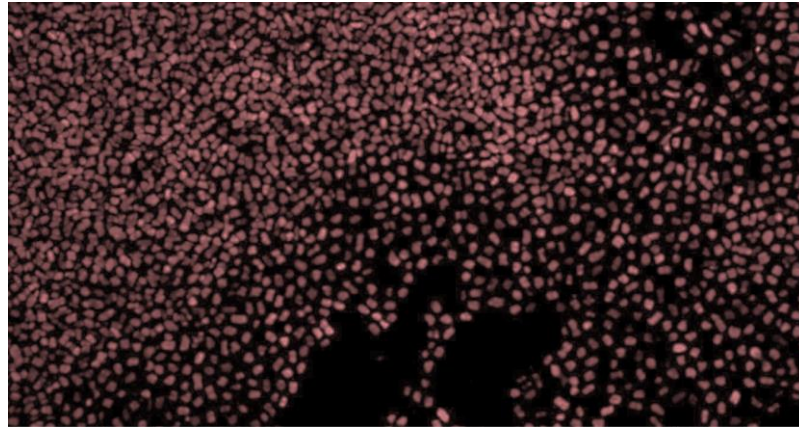
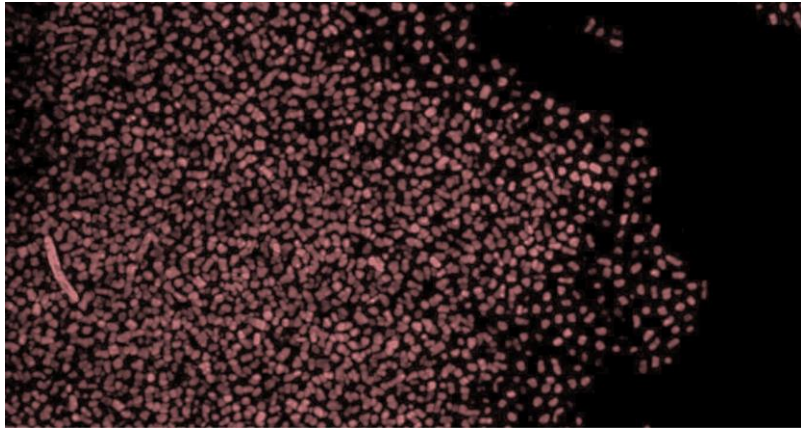
OD65- 23 h



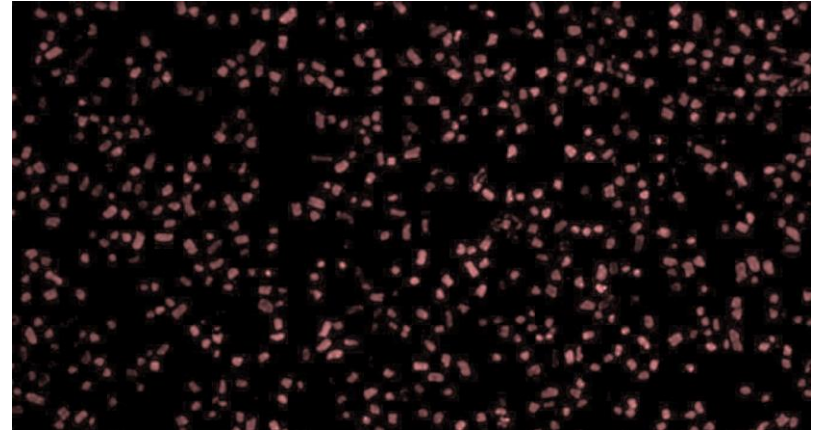
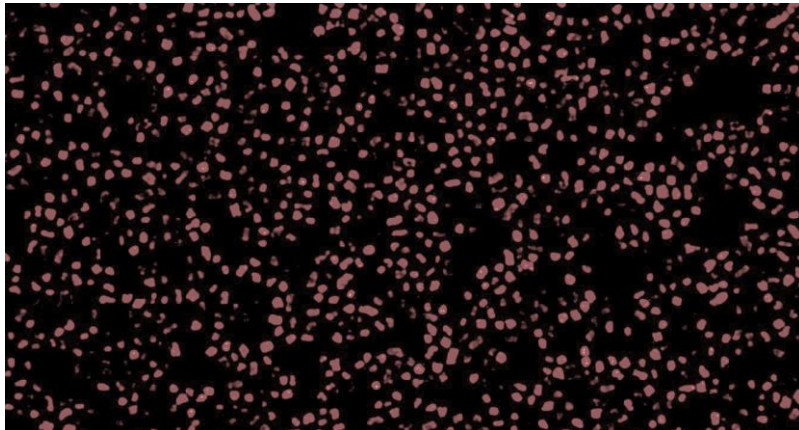
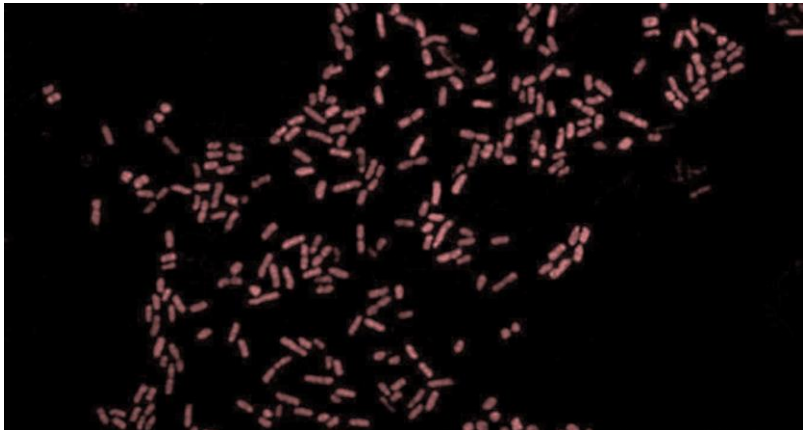
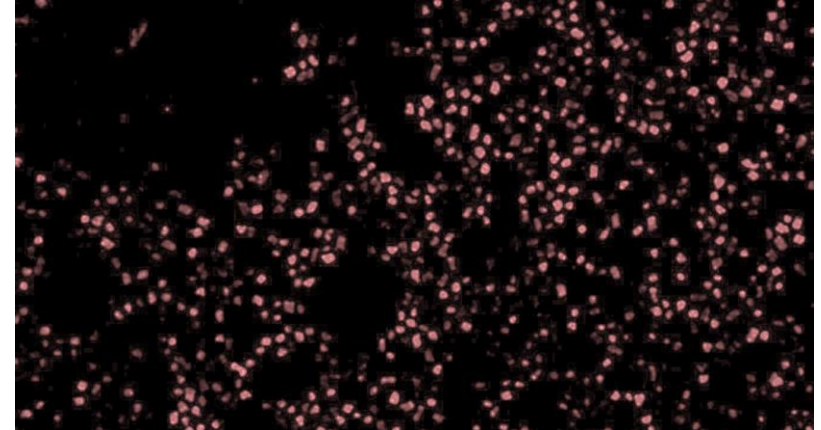
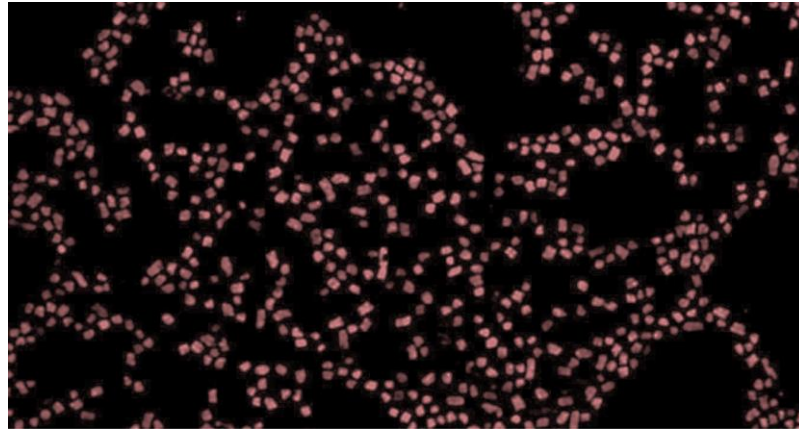
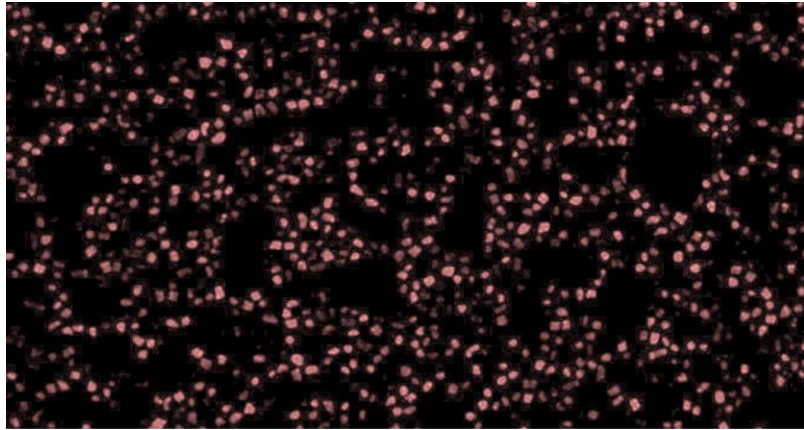
OD65- 24 h



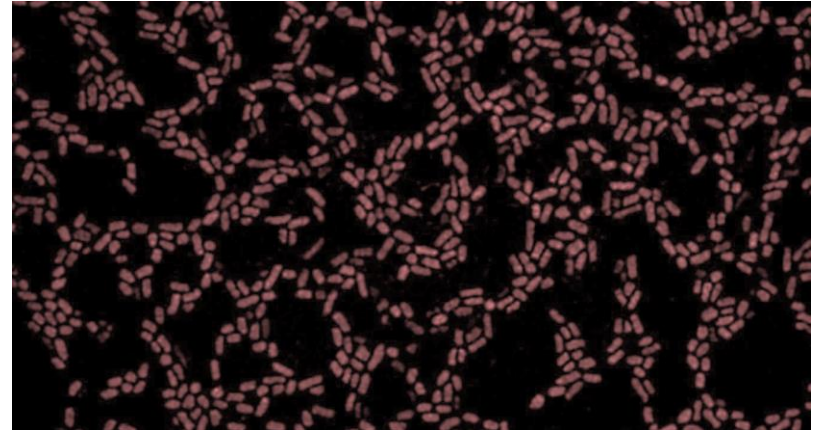
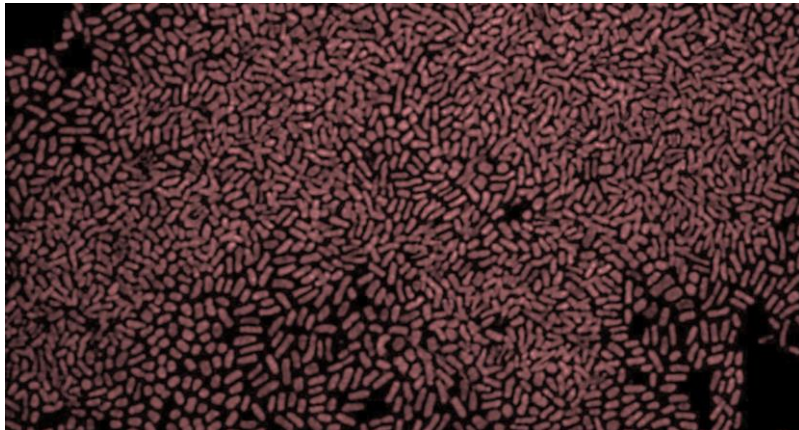
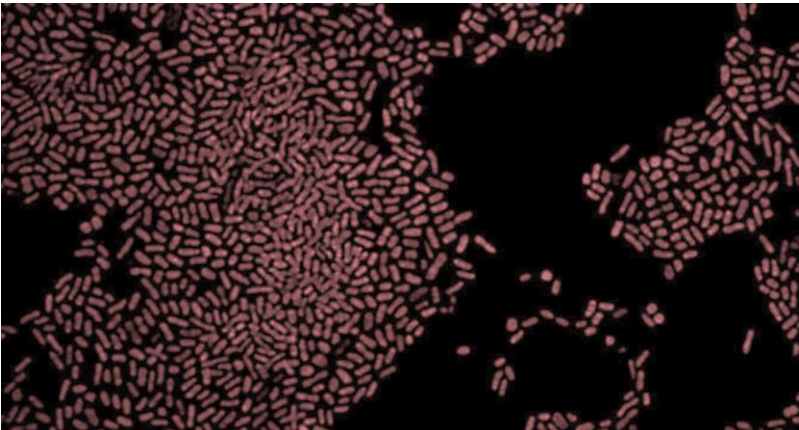
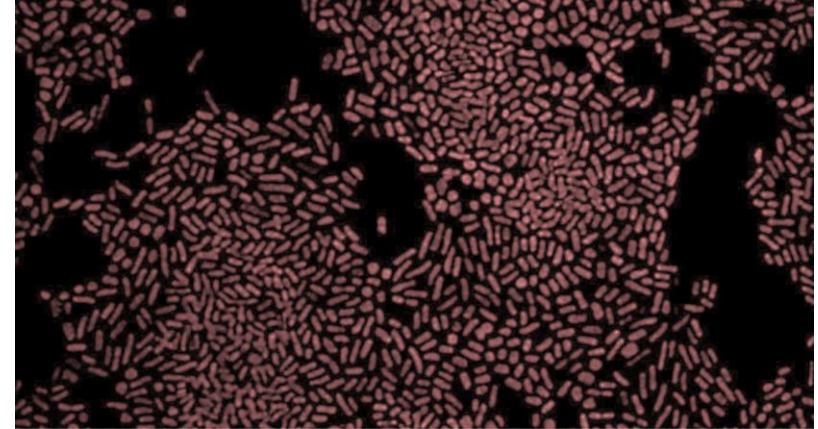
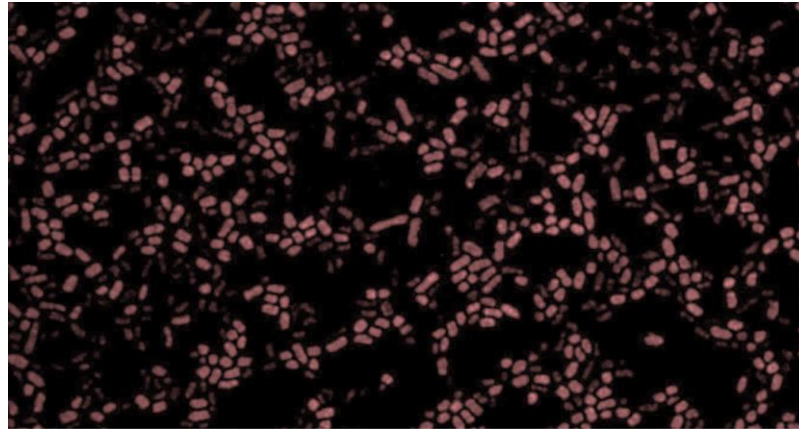
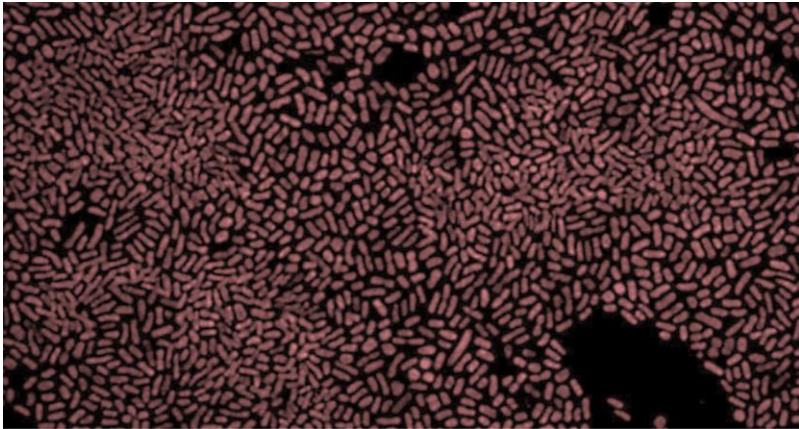
OD65- 48 h



OD65- 72 h



OD65- 96 h



# Anexo II

Formación de biopelículas de UPEC CFT073 móvil y UPEC ST12 OD65  
fenotípicamente inmóvil, en cultivo dinámico

# UPEC CFT073 y UPEC ST12 OD65

Vista general



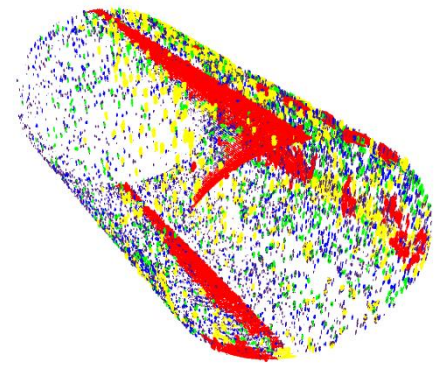
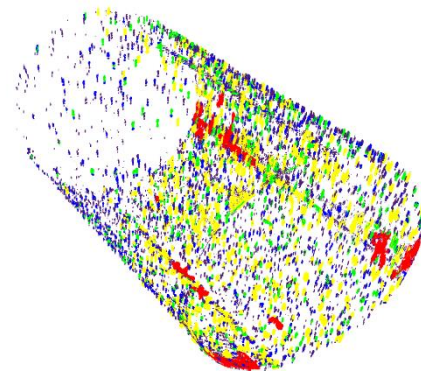
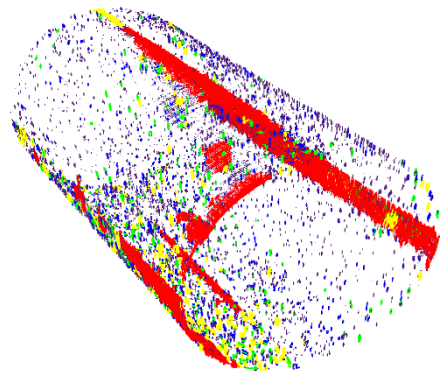
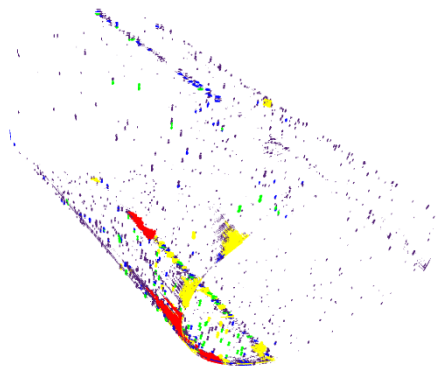
1h

2h

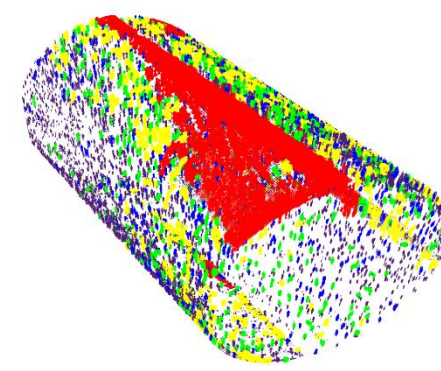
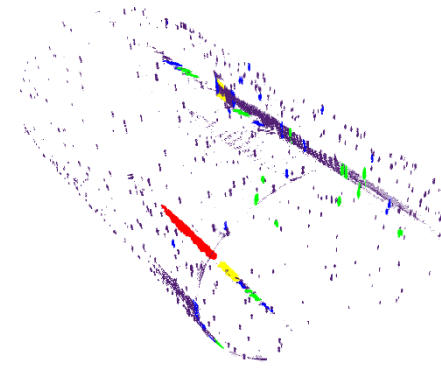
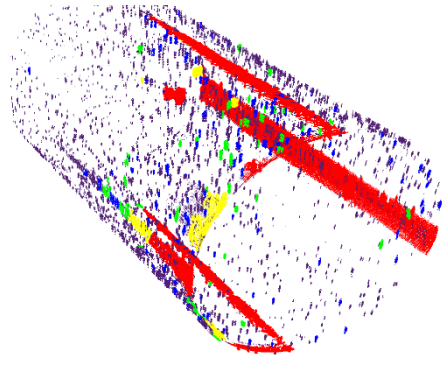
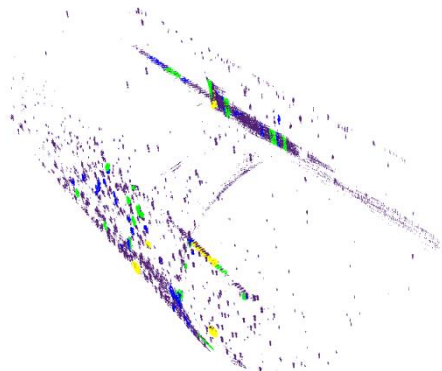
3h

4h

CFT073



OD65



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$



0

950,63

1e+13

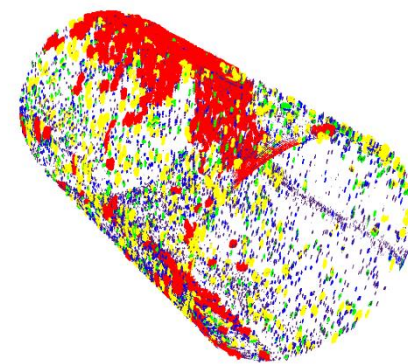
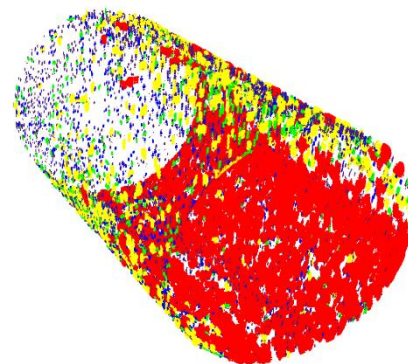
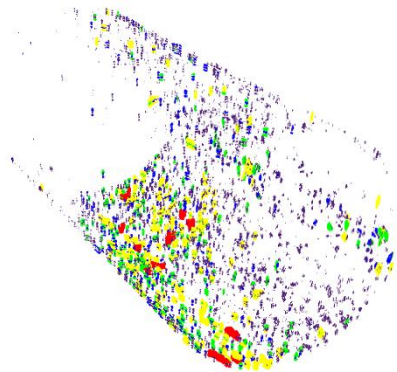
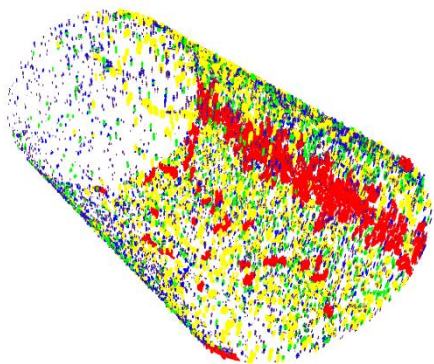
5h

6h

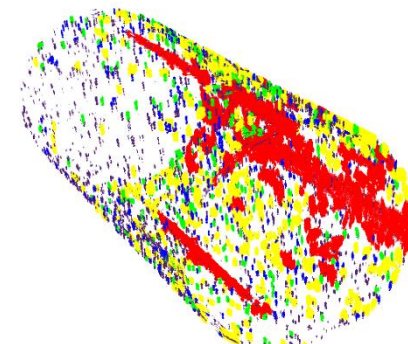
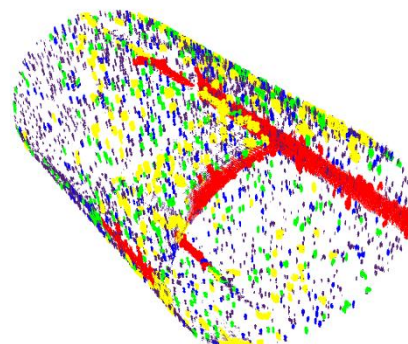
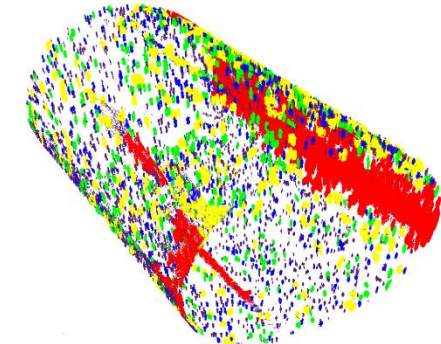
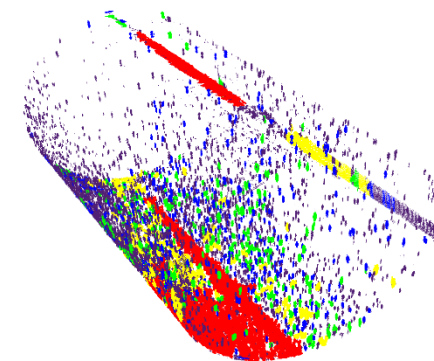
7h

8h

CFT073



OD65



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

950,63

1e+13



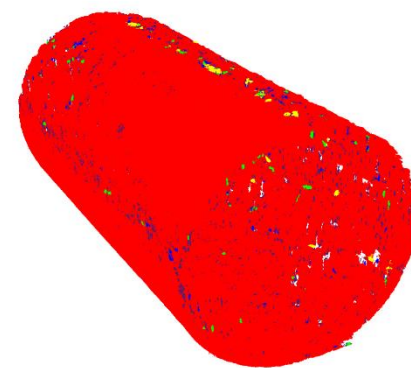
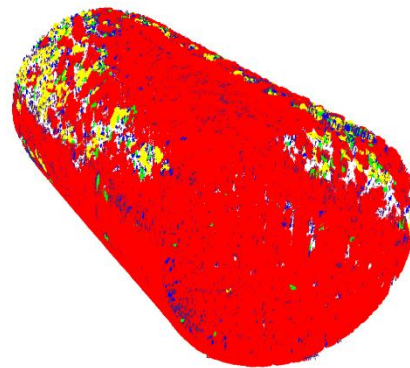
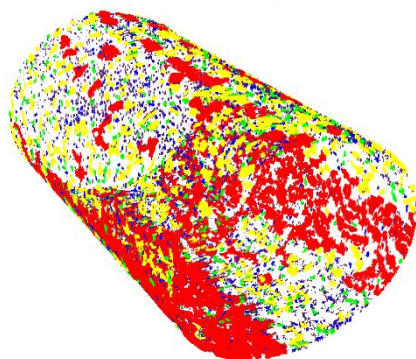
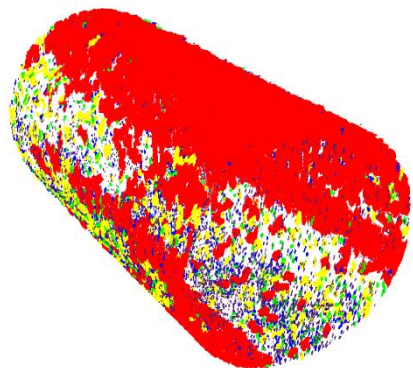
9h

10h

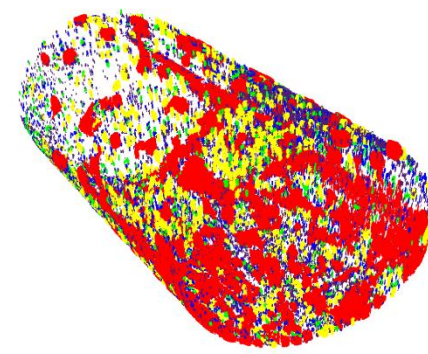
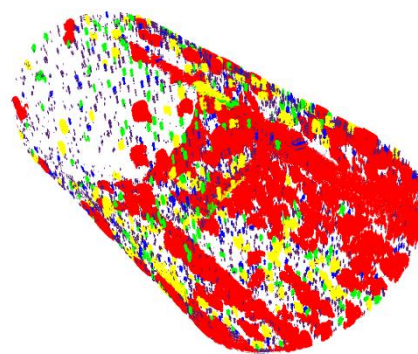
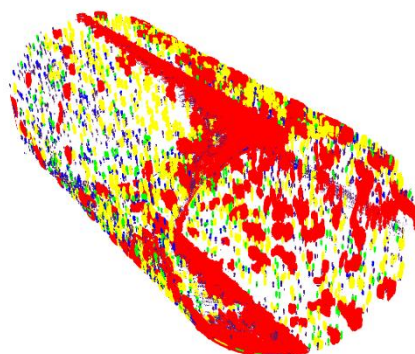
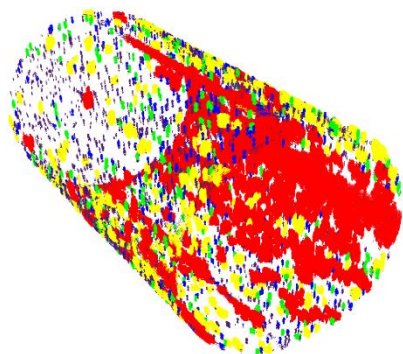
11h

12h

CFT073



OD65



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

950,63

1e+13



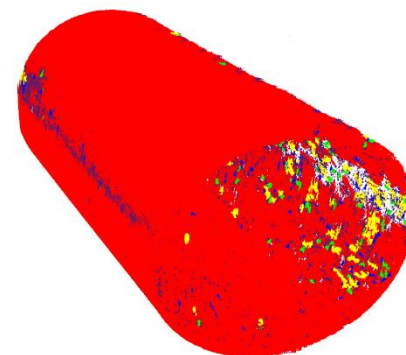
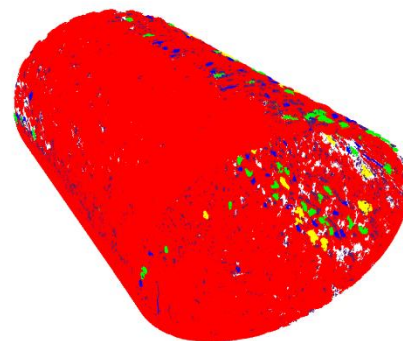
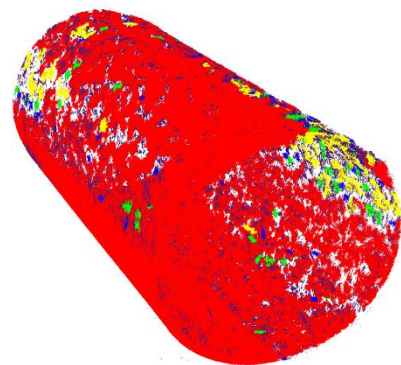
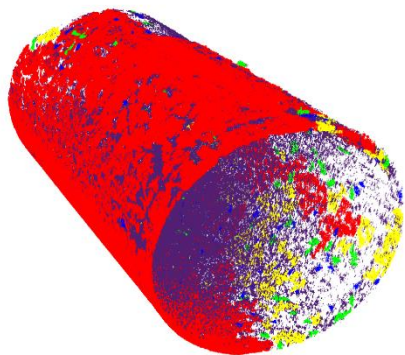
13h

14h

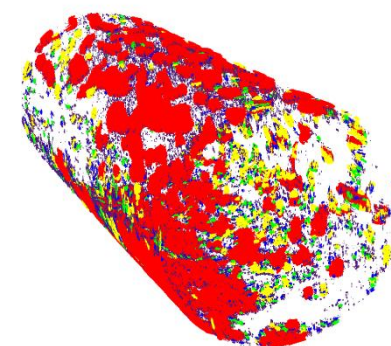
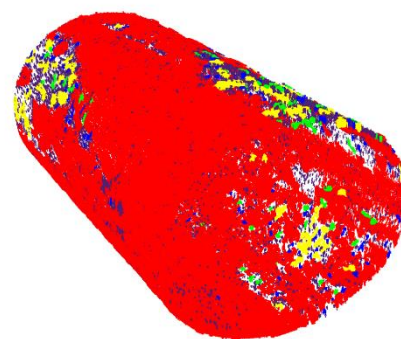
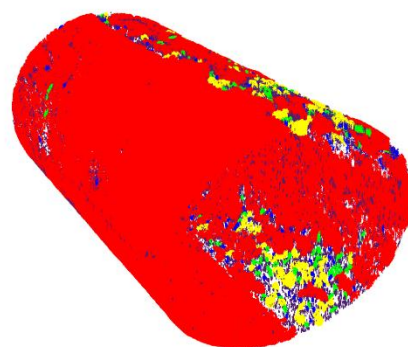
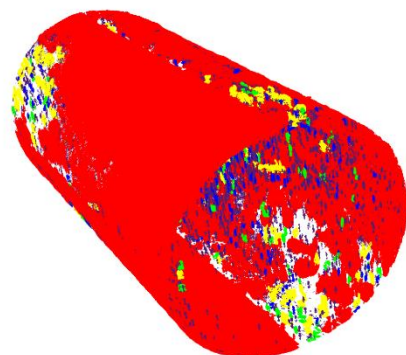
15h

16h

CFT073



OD65



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

950,63

1e+13



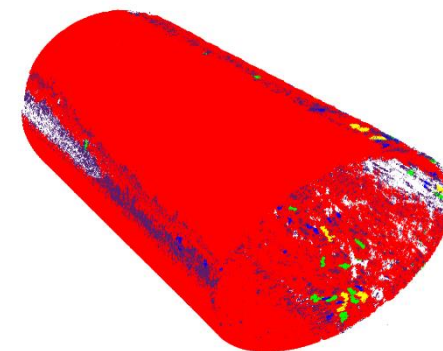
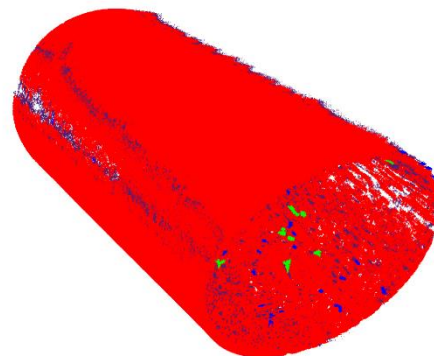
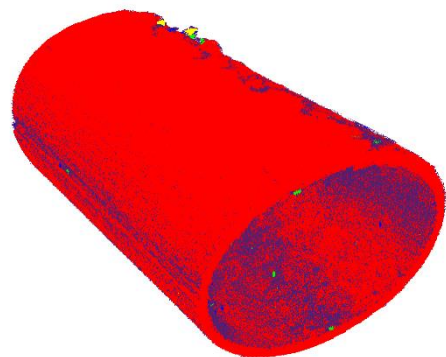
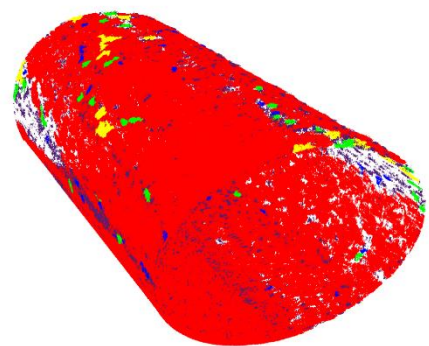
17h

18h

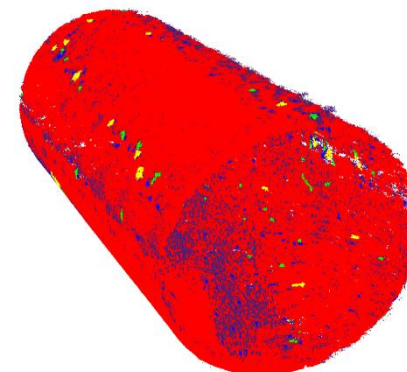
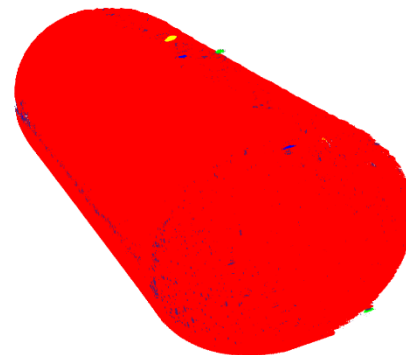
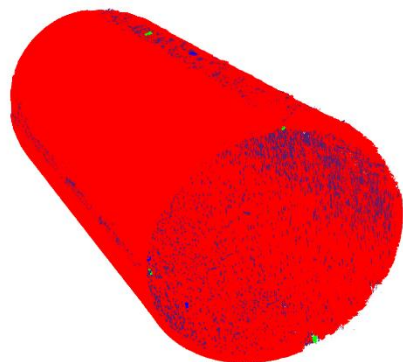
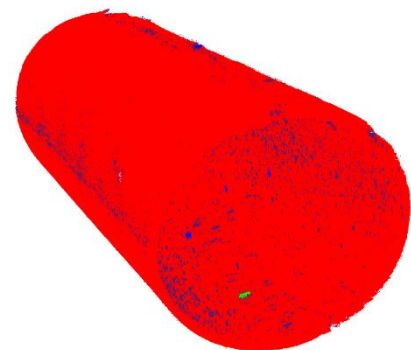
19h

20h

CFT073



OD65



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

950,63

1e+13



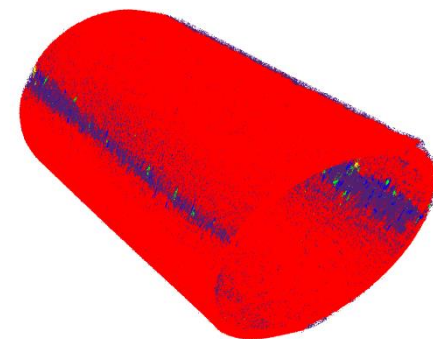
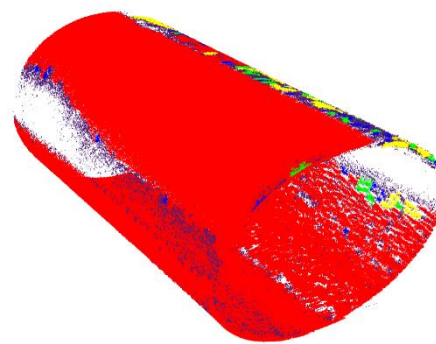
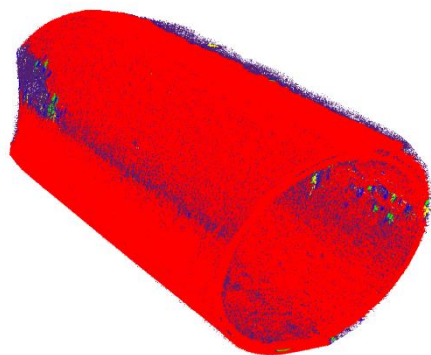
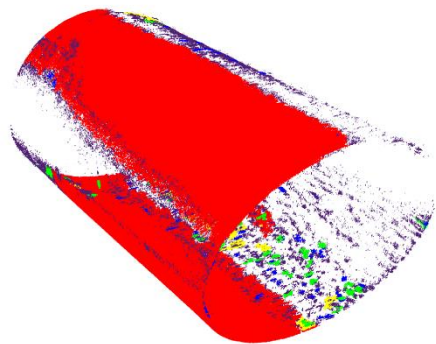
21h

22h

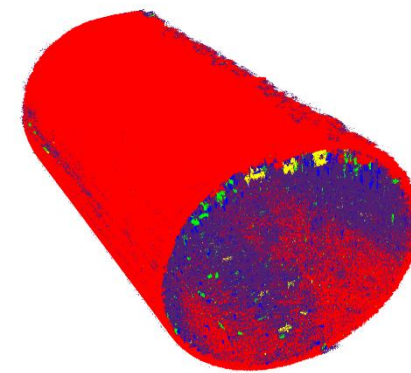
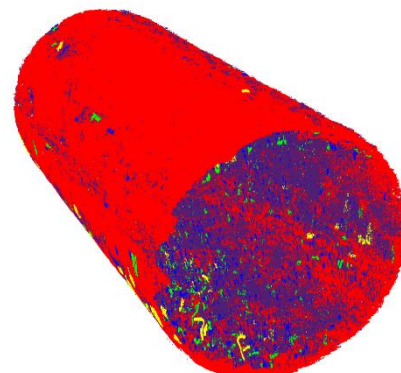
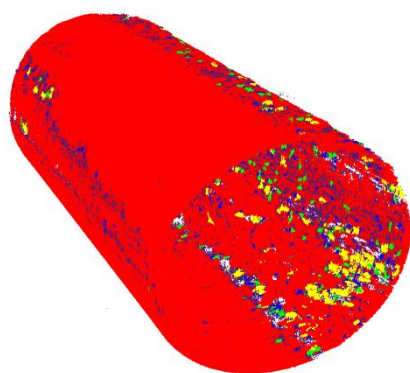
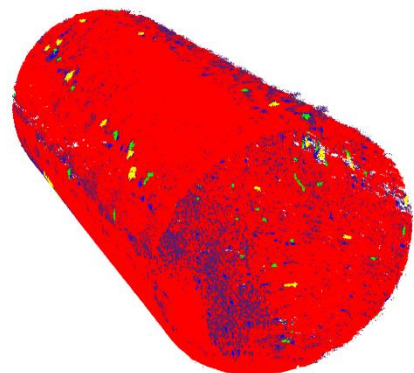
23h

24h

CFT073



OD65



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

950,63

1e+13

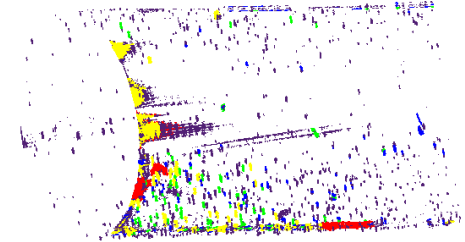
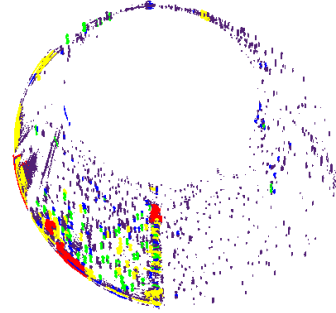
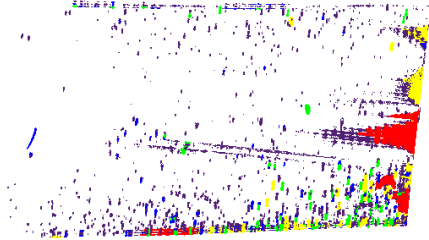


# **UPEC CFT073**

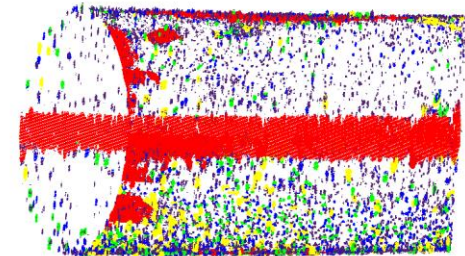
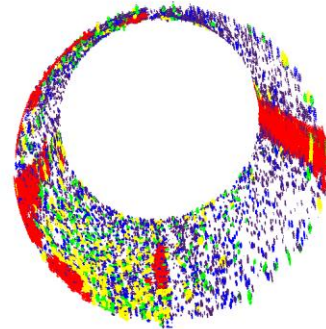
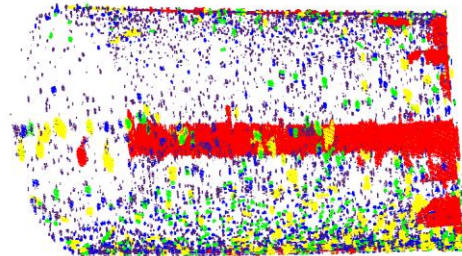
Vista central y lateral

# CFT073

1h



2h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

950,63

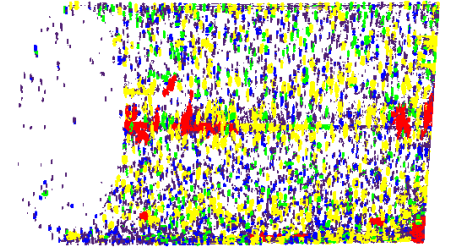
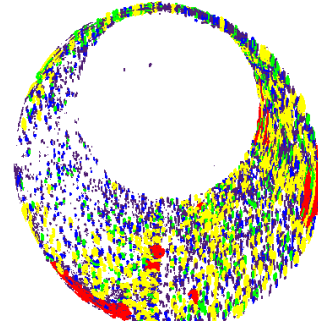
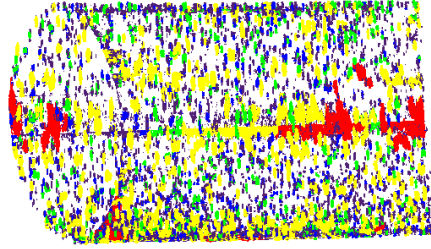
1e+13



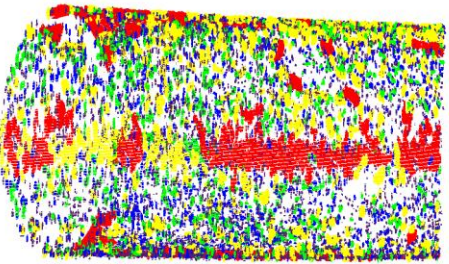
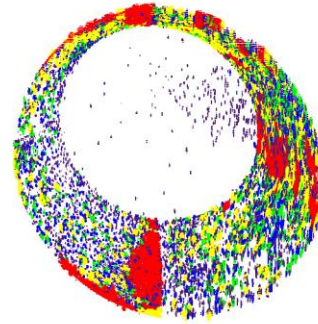
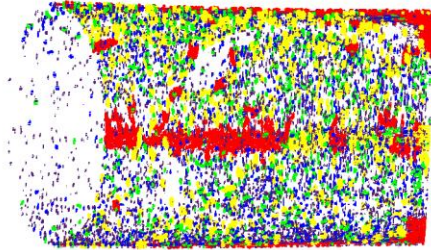


CFT073

3h



4h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$



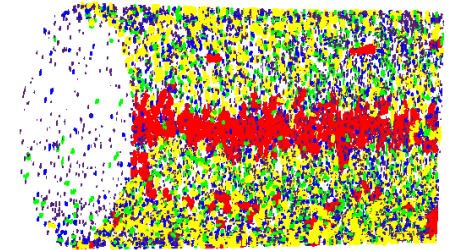
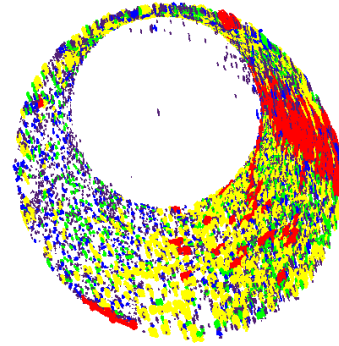
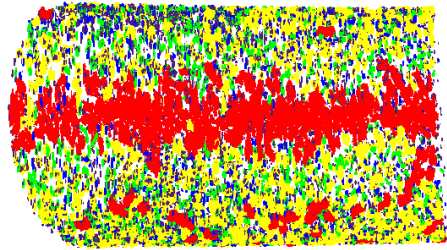
0

950,63

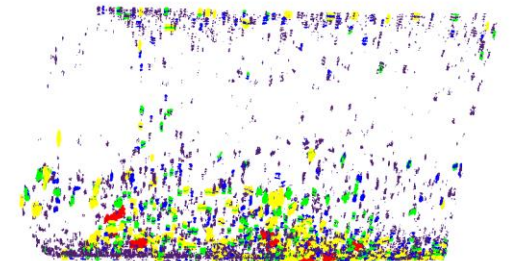
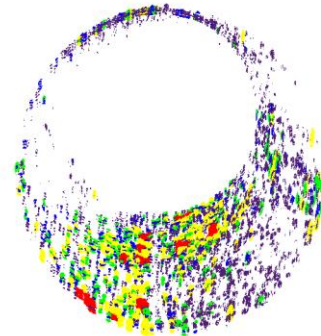
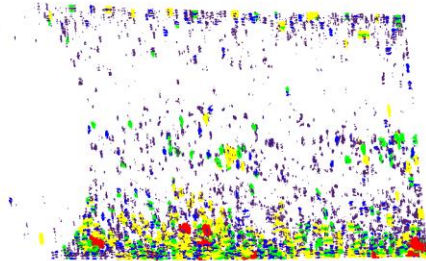
1e+13

CFT073

5h

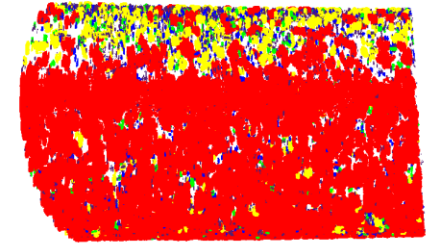
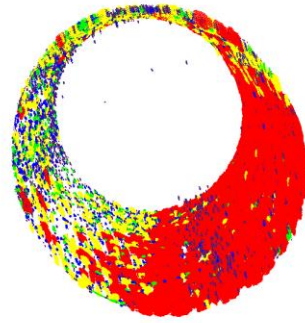
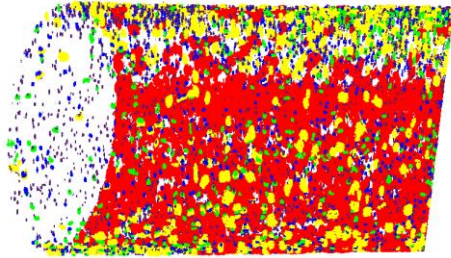


6h

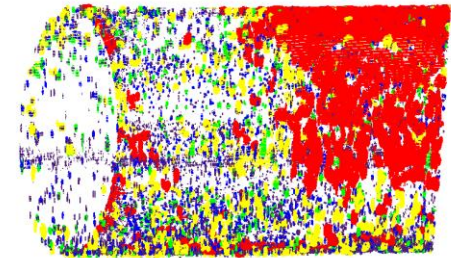
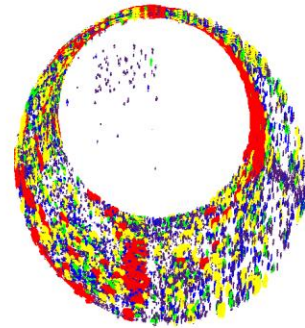
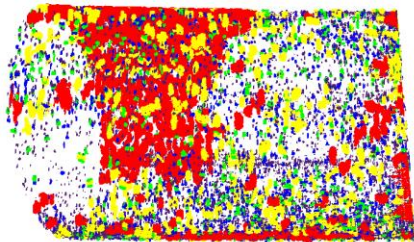


CFT073

7h



8h



380,25

9506,25

0

950,63

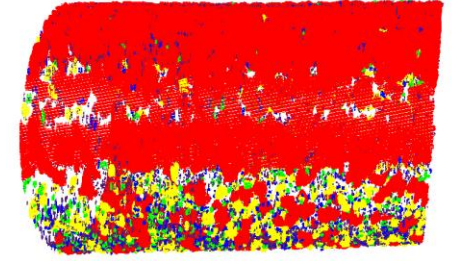
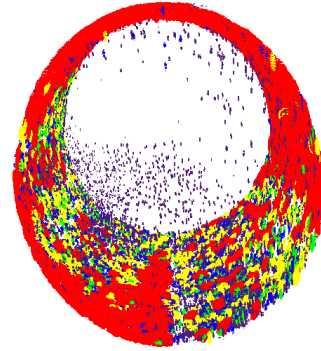
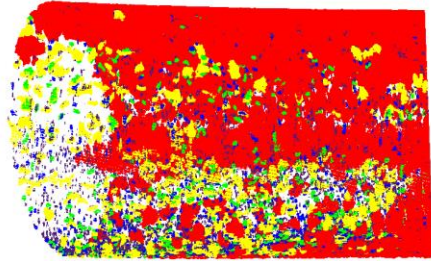
$\mu\text{m}^3$

1e+13

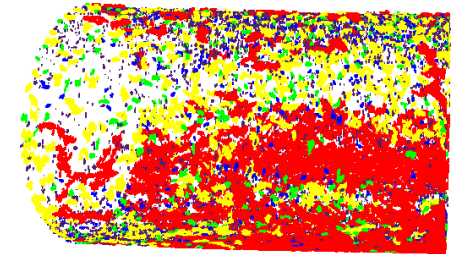
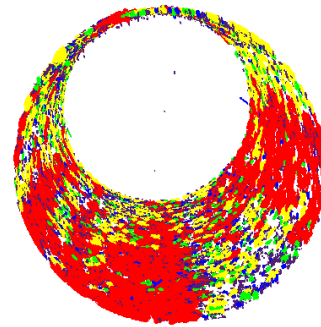
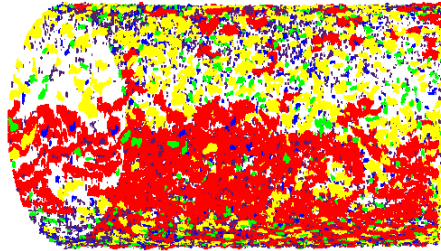


CFT073

9h



10h



380,25

9506,25



0

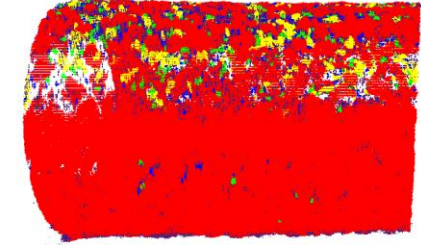
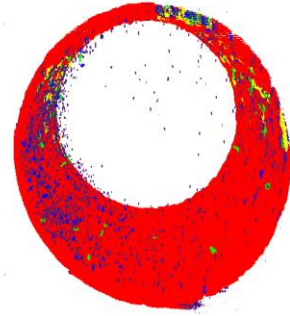
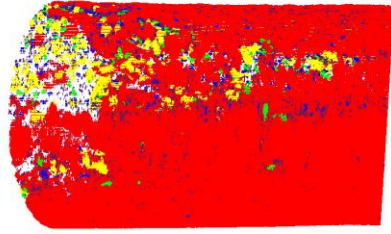
950,63

$\mu\text{m}^3$

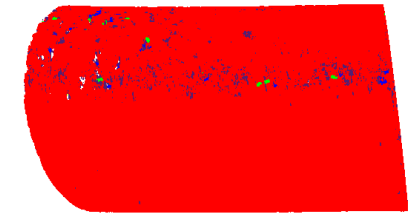
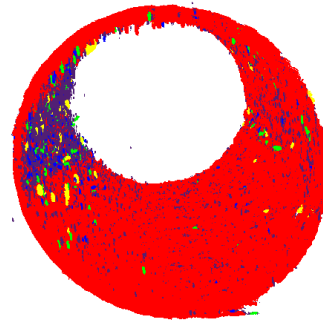
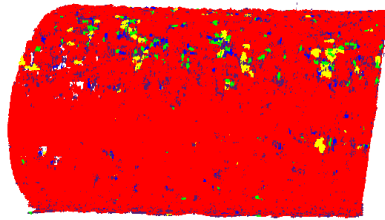
1e+13

CFT073

11h



12h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

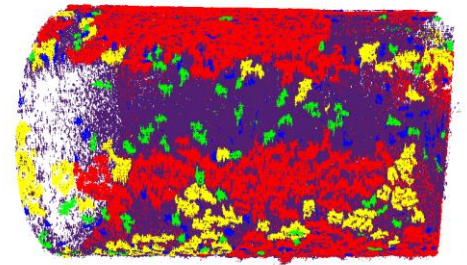
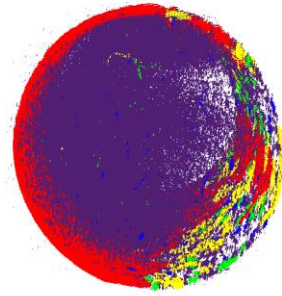
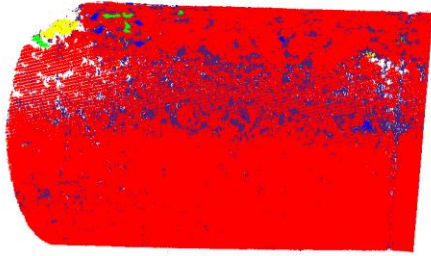
950,63

1e+13

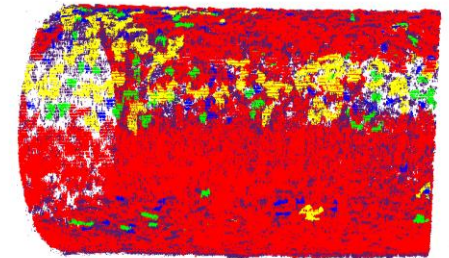
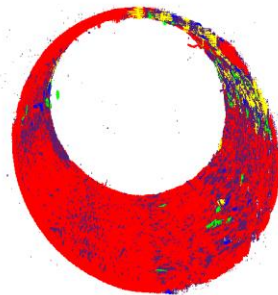
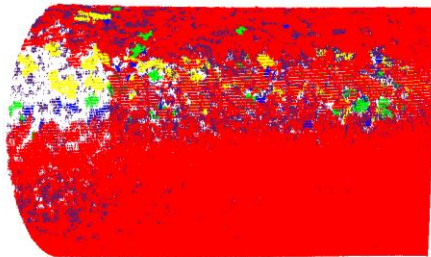


CFT073

13h



14h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

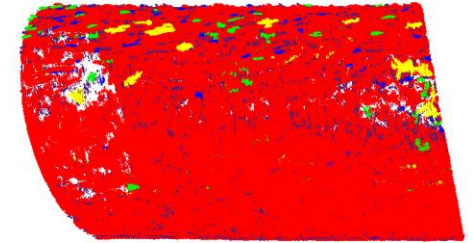
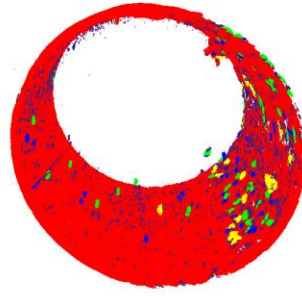
950,63

1e+13

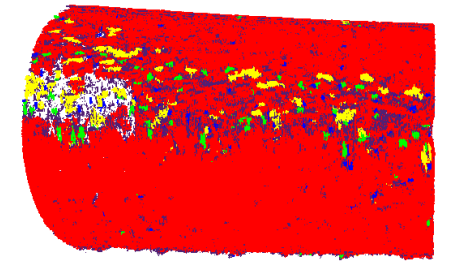
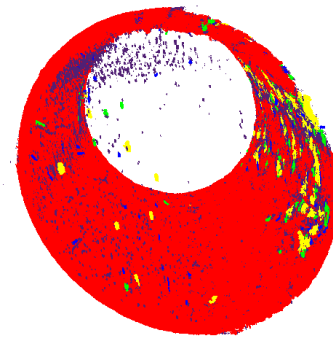
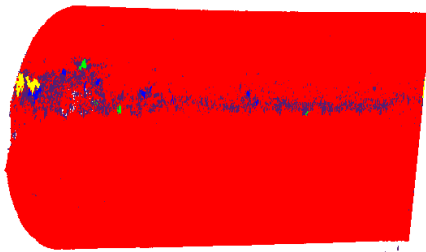


CFT073

15h

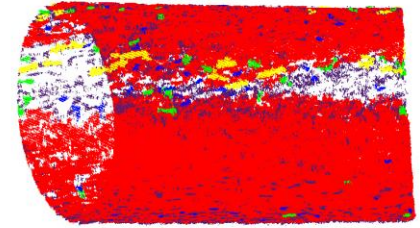
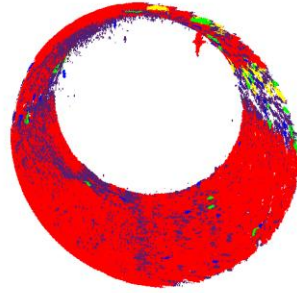
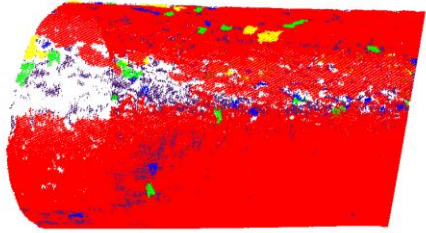


16h

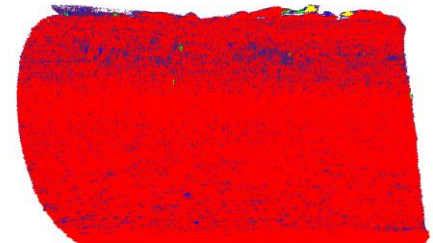
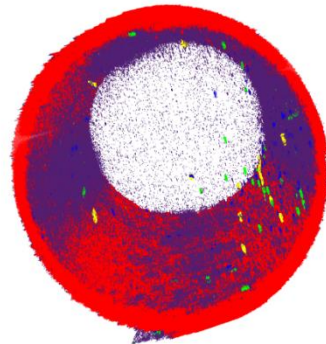
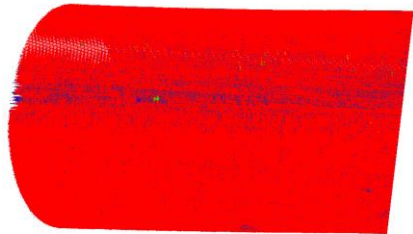


CFT073

17h



18h



380,25

9506,25

0

950,63

$\mu\text{m}^3$

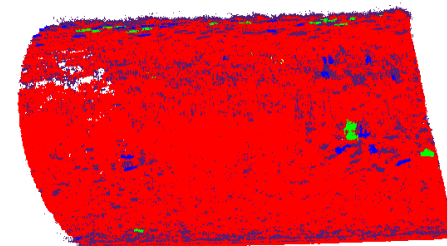
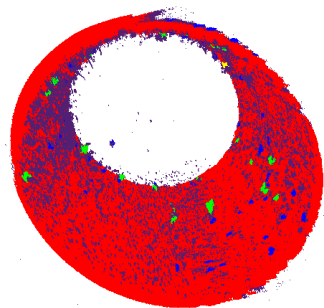
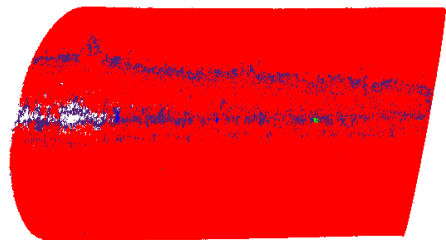
1e+13



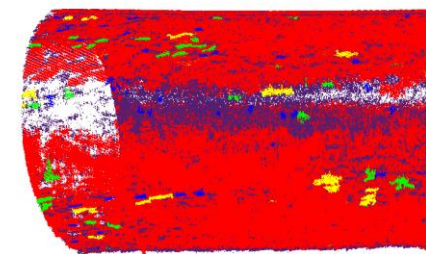
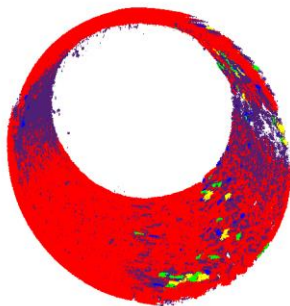
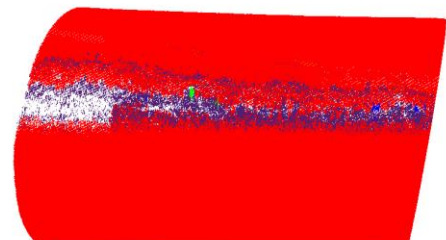


CFT073

19h

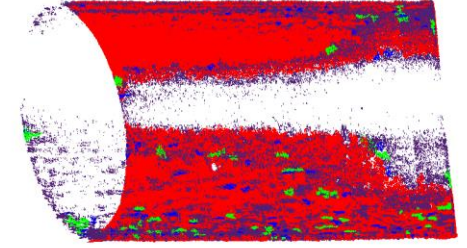
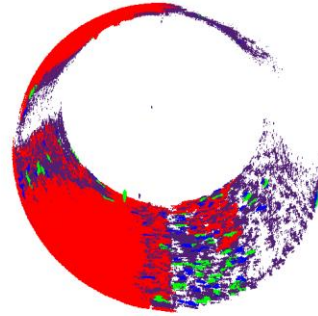
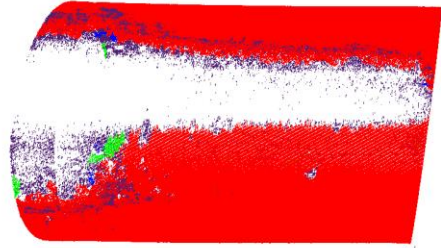


20h

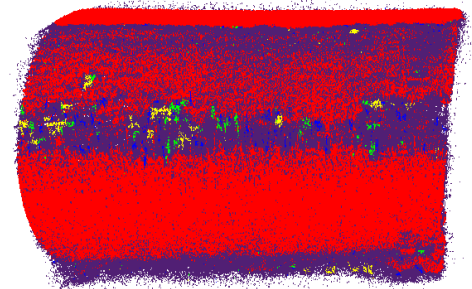
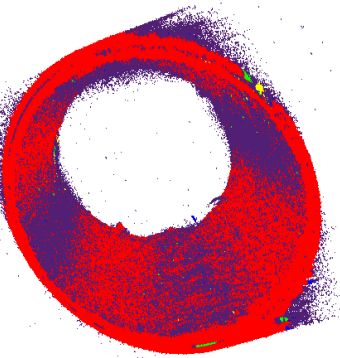
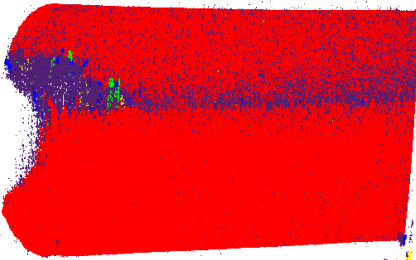


CFT073

21h



22h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

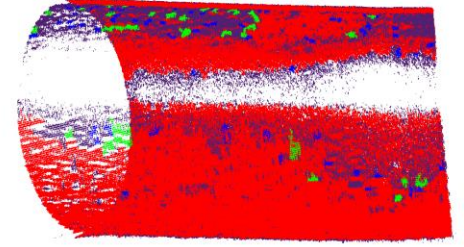
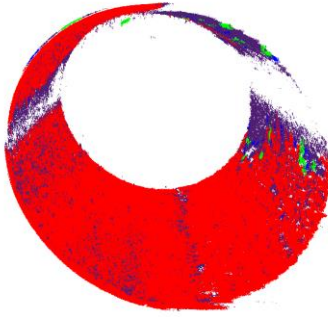
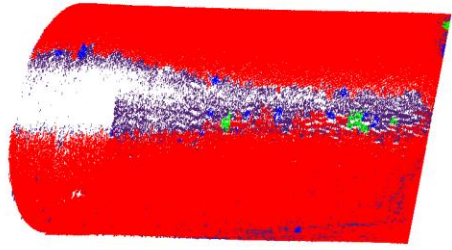
950,63

1e+13

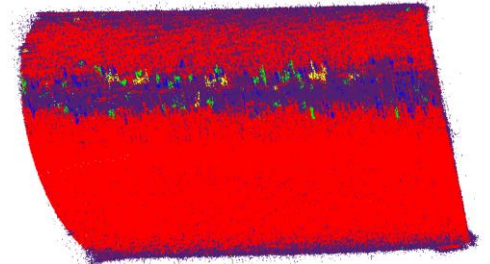
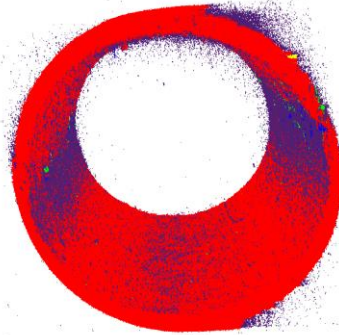
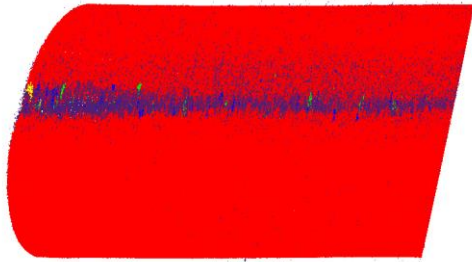


CFT073

23h



24h

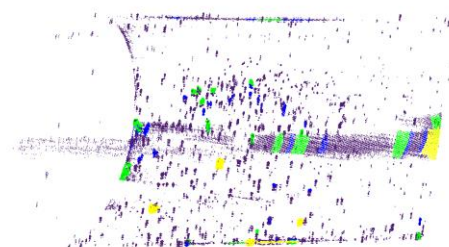
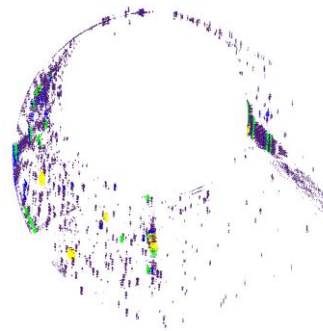
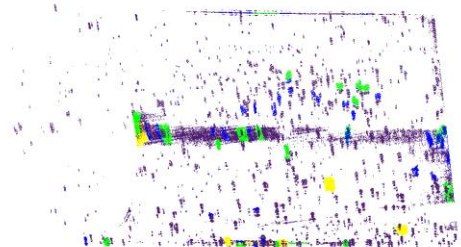


**UPEC ST12 OD65**

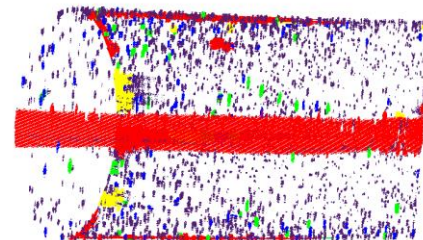
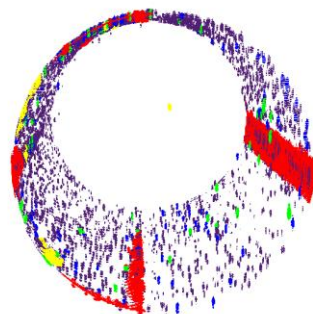
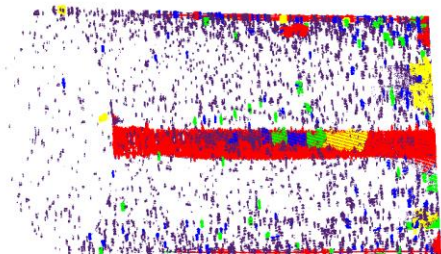
Vista central y lateral

OD65

1h



2h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

950,63

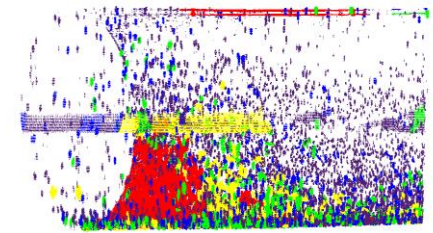
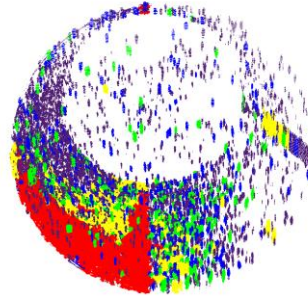
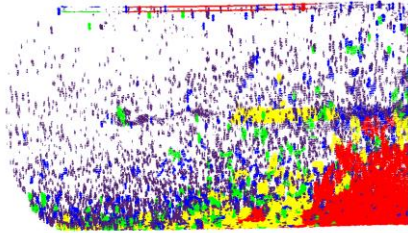
1e+13



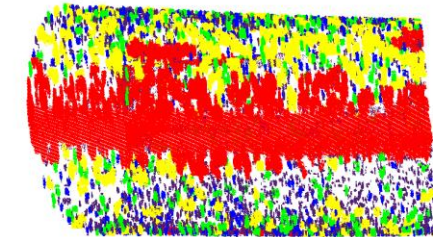
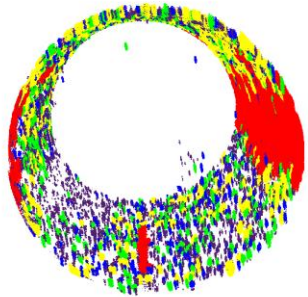
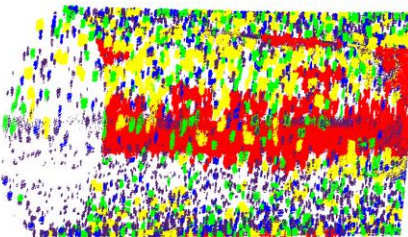


OD65

5h



6h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

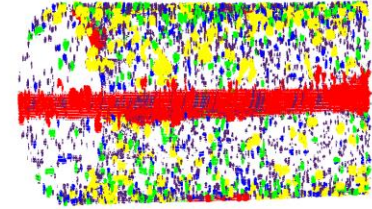
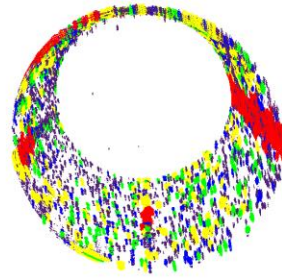
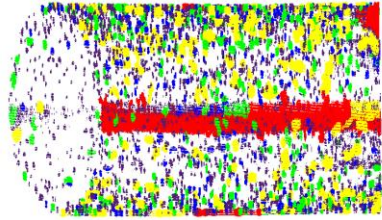
950,63

1e+13

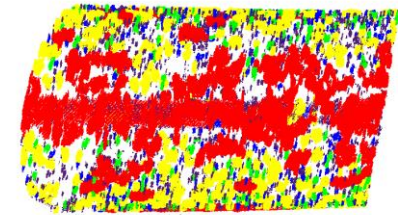
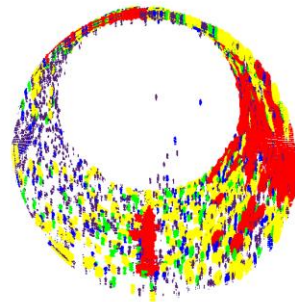
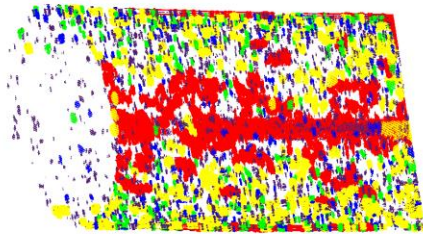


OD65

7h



8h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

950,63

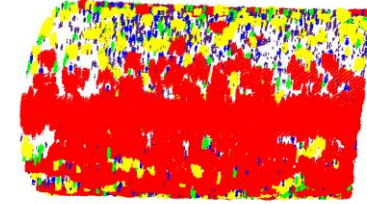
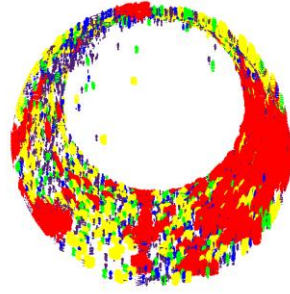
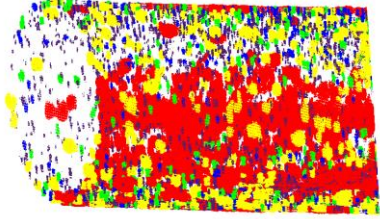
1e+13



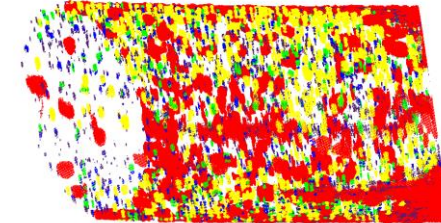
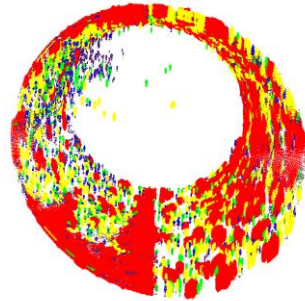
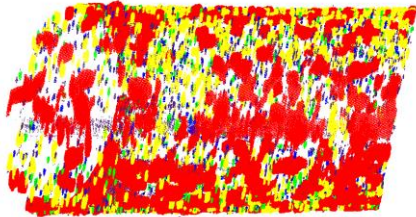


OD65

9h



10h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

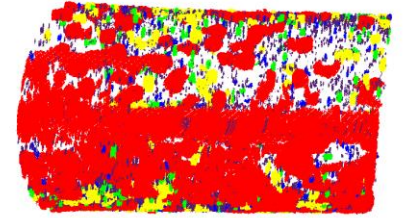
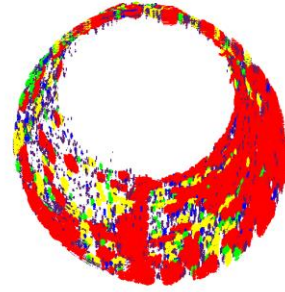
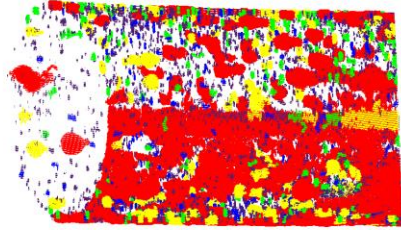
950,63

1e+13

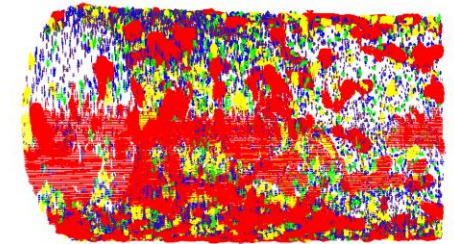
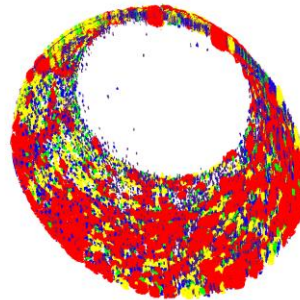
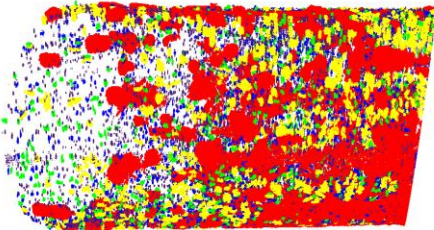


OD65

11h



12h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

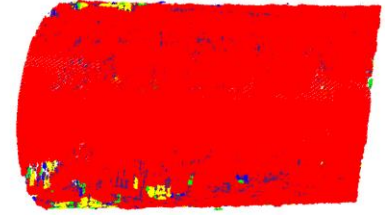
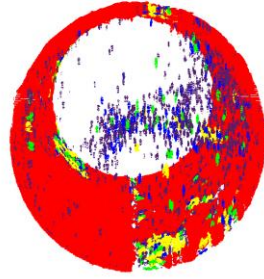
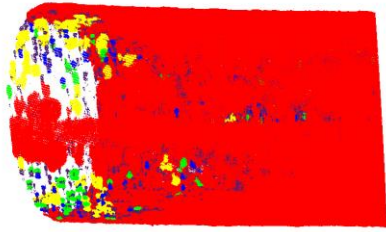
950,63

1e+13

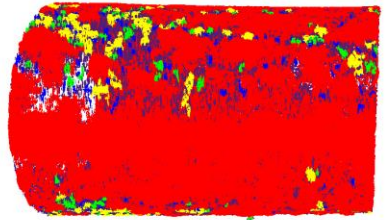
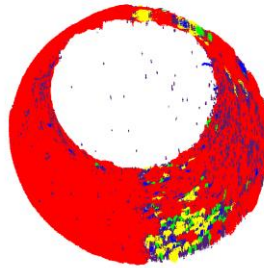
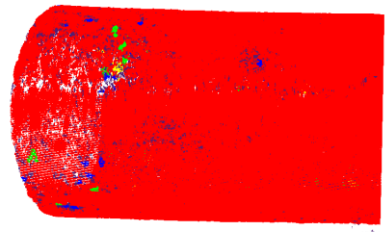


OD65

13h

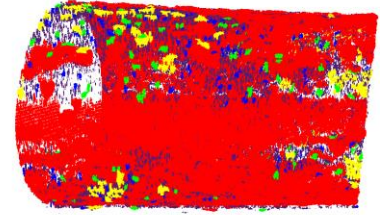
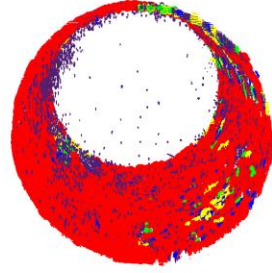
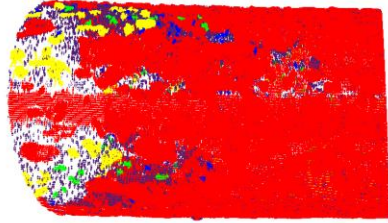


14h

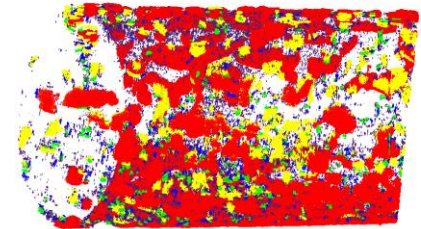
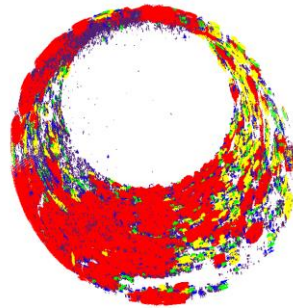
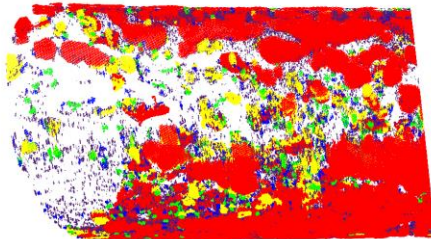


OD65

15h



16h



380,25

9506,25

$\mu\text{m}^3$

0

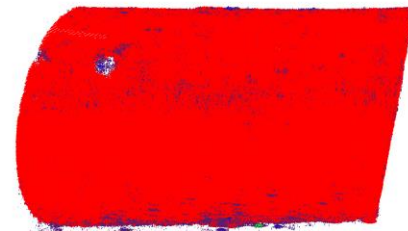
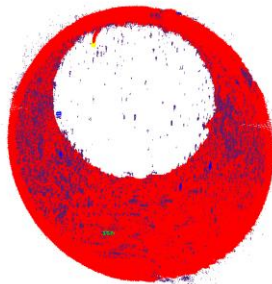
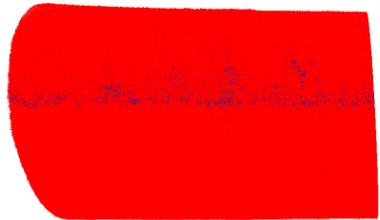
950,63

1e+13

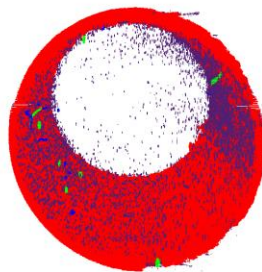


OD65

17h

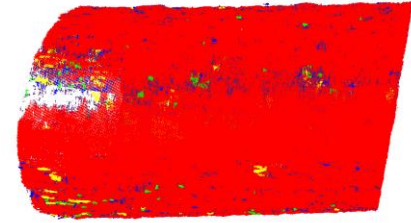
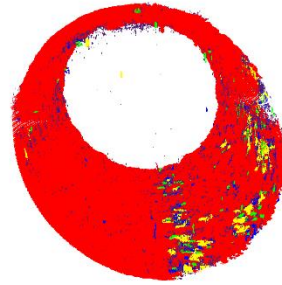


18h

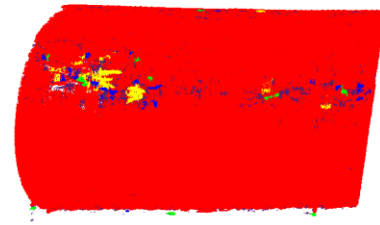
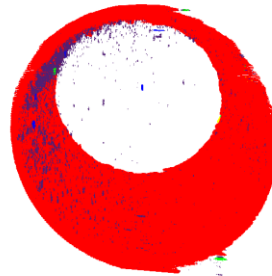
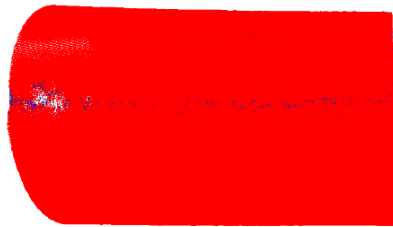


OD65

19h

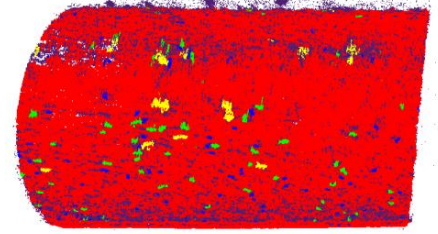
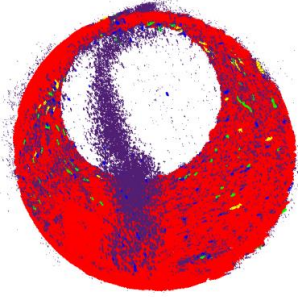
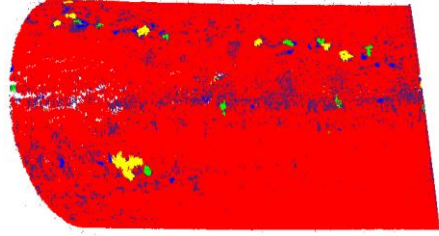


20h

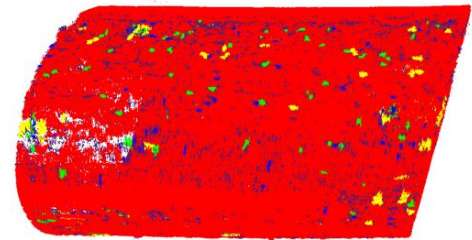
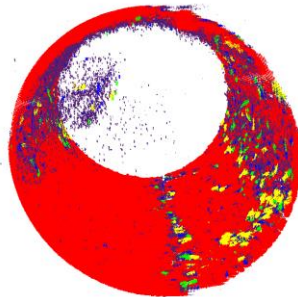
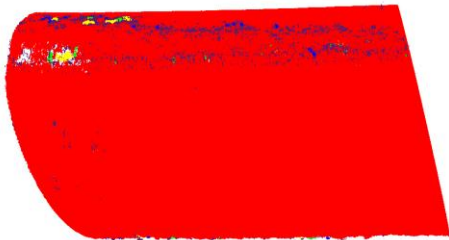


OD65

21h

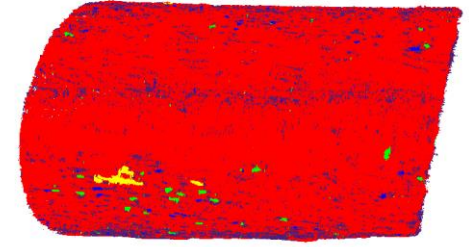
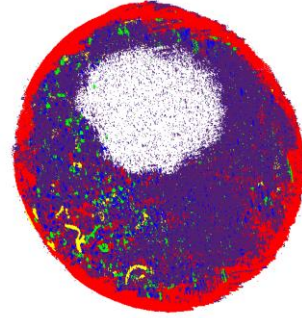
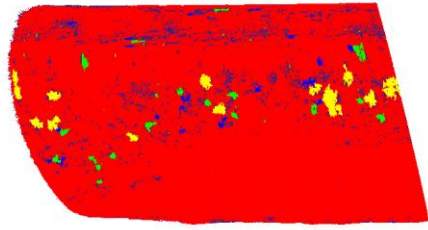


22h



OD65

23h



24h

